

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου 2 και της καλμοδουλίνης με τη βοήθεια μοριακών προσομοιώσεων



Χρυσάνθη Μπεκύρου Χημικός, Πανεπιστημίου Πατρών

Αθήνα 2018



HELLENIC REPUBLIC National and Kapodistrian University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN "BIOINFORMATICS"

Master Diploma Thesis

Study of the Type 2 Ryanodine receptor and Calmodulin interaction by means of molecular simulation



Chrysanthi Bekyrou Chemist, University of Patras

Athens 2018



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου 2 και της καλμοδουλίνης με τη βοήθεια μοριακών προσομοιώσεων



Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Κωνσταντίνος Βοργιάς (επιβλέπων)

Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Γεώργιος Νούνεσης Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αθήνα 2018

iv

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη «Βιοπληροφορική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πενεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κ.Βοργιά.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον καθηγητή κύριο Κ.Βοργιά και την καθηγήτρια κυρία Β.Οικονομίδου για τη τιμή που μου έκαναν συμμετέχοντας στην εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής εργασίας μου. Τις πιο θερμές ευχαριστίες μου ωφείλω, στον καθηγητή κύριο Κ.Βοργιά και στον Δρ. Γ.Νούνεση που από κοινού, μου εμπιστεύτηκαν ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα διπλωματικής εργασίας, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας κατά το πέρας της εκπόνησής της. Η βοήθεια και η επιλογή του Δρ. Γ.Νούνεση ως μέλος της εργαστηριακής του ομάδας, υπήρξε άκρως τιμητική για μένα, ενώ αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα ανέλιξης της εκπαίδευσής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης στη Βιοπληροφορική.

Στο σημείο αυτό, οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στον Δρ. Α.Θανάσουλα, η βοήθεια του οποίου υπήρξε καθοριστική για την επιτυχή έκβαση της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ από καρδιάς για το ζεστό καλωσόρισμα στην εργαστηριακή ομάδα, την άψογη καθημερινή μας συνεργασία καθώς και την απεριόριστη βοήθεια που μου παρείχε μέσω της καθοδήγησης και των διορθώσεών του στο αντικείμενο της έρευνας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποφήψια Δρ. Ι.Κοντογιάννη για το ευχάριστο κλίμα της συνεργασίας μας και τις εποικοδομητικές μας συζητήσεις σε κάθε πτυχή της ερευνητικής μας δραστηριότητας.

Κλείνοντας την ενότητα αυτή, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδακτικό προσωπικό του τμήματος Μ.Δ.Ε. «Βιοπληροφορική», για την πλήρη κι ολοκληρωμένη εκπαίδευσή μου στο συγκεκριμένο κλάδο. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου, χωρίς την υποστήριξη των οποίων δεν θα ήταν δυνατή η επιτυχής ολοκλήρωση των ακαδημαϊκών μου σπουδών.

Περίληψη

Η γνώση της δομής των συμπλόκων που εμφανίζουν βιολογική δραστικότητα αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση τόσο της δικής τους λειτουργικής συμπεριφοράς όσο και των μηχανισμών ρύθμισης των βιολογικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν. Η πρόσβαση σήμερα σε τελευταίας τεχνολογίας εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης, έχει διευρύνει κατά πολύ τη μελέτη των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων, ακόμα και όταν δεν υπάρχει η ακριβής γνώση για τη στερεοδιάταξη κάποιου μακρομορίου. Πλέον, μέσω μοριακών προσομοιώσεων, μπορούν να παραχθούν ρεαλιστικές αρχιτεκτονικές μορίων και συμπλόκων με βιοχημικό ενδιαφέρον για ένα μεγάλο εύρος φυσικοχημικών συνθηκών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η δομική μελέτη της αλληλεπίδρασης της καλμοδουλίνης (CaM), με συγκεκριμένες περιοχές του υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου-2 [RyR2] (Πεπτίδιο_B και Πεπτίδιο_F), που με βάση τη βιβλιογραφία αποτελούν τις κύριες περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης και ρύθμισης της CaM/RyR2 δεν είναι πλήρως κατανοητός, κυρίως εξαιτίας της απουσίας δομικής πληροφορίας σχετικά με τον RyR2, αν και από τα μέχρι τώρα ερευνητικά δεδομένα είναι γνωστό ότι δρα ως μοριακός διακόπτης στο κανάλι απελευθέρωσης Ca²⁺ από το Σαρκοπλασματικό Δίκτυο (ΣΔ), διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στο μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής του καρδιακού παλμού.

Επιπρόσθετα, καινούργια ερευνητικά δεδομένα κάνουν λόγο για τον εντοπισμό 17 μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν την CaM (*CALM1,CALM2* και *CALM3*), κυρίως σε νεαρούς ασθενείς με καρδιακές δυσλειτουργίες που ξεκινούν από σοβαρές αρρυθμίες και φτάνουν μέχρι και τη καρδιακή ανεπάρκεια. Ο μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για την εμφάνιση τέτοιων φαινοτύπων παραμένει άγνωστος και συνεπώς υπάρχει ανάγκη για την αποσαφήνιση του τρόπου επίδρασης των μεταλλαγμάτων της CaM στους μηχανισμούς ομοιόστασης Ca²⁺ των καρδιακών κυττάρων. Μέχρι σήμερα υπάρχουν τρία πιθανά σενάρια για την επίδραση των μεταλλαγμάτων της CaM, που αφορούν είτε τη μεταβολή στο βαθμό συγγένειας της CaM για τον RyR2, είτε τη μεταβολή της συγγένειας της CaM για τα ιόντα Ca²⁺, ενώ τέλος γίνεται λόγος για σοβαρές επιπτώσεις στη θερμοσταθερότητα του συμπλόκου CaM/RyR2.

Για την επίτευξη όλων των παραπάνω στόχων και τη μελέτη όλων των πιθανών σεναρίων, πραγματοποιούνται προσομοιώσεις αγκυροβόλησης (docking) σε περιοχές-κλειδιά της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης CaM/RyR2 και γίνεται αξιολόγηση των συμπλόκων που προέκυψαν. Επίσης, πραγματοποιείται με κατάλληλα εργαλεία η *de novo* σύνθεση των πεπτιδίων B και F του υποδοχέα RyR2 και γίνεται ανάλυση των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών. Τέλος, μέσω εξειδικευμένων προγραμμάτων μοριακής δυναμικής, κατασκευάζονται μοντέλα μεταλλαγμένων μορφών καλμοδουλίνης με στόχο τη μελέτη της επίδρασης τους στη δομή και στη δραστικότητα του μορίου.

Όλα τα αποτελέσματα που προκύπτουν συγκρίνονται με συμπεράσματα τόσο από πρόσφατες πειραματικές μελέτες όσο και από τα υπάρχοντα θεωρητικά πλαίσια για το σχηματισμό του συμπλόκου CaM/RyR2. Με βάση τα ευρήματα αυτά, παρουσιάζεται ένα καινούργιο δομικό μοντέλο για τη ρύθμιση του ανθρώπινου RyR2 καθώς και σύνδεση συγκεκριμένων δομικών μεταβολών στο μόριο της CaM με παθολογικές καταστάσεις.

Θεματική Περιοχή: Βιομοριακή Φυσική, Υπολογιστική Βιολογία

Λέξεις Κλειδιά: Καλμοδουλίνη (CaM), Υποδοχέας Ρυανοδίνης Τύπου 2 (RyR2), ιόντα Ασβεστίου (Ca²⁺), Αρρυθμίες, Αγκυροβόληση (Docking), Μεταλλαξογένεση

Abstract

For complexes with biological activity, structural information is an important step towards a better understanding of both their functional behavior and mechanisms of regulation of their corresponding biological pathways. Nowdays, access to state-of-the-art bioinformatic tools, has greatly expanded the study of biomolecular interactions, even without any prior knowledge of their exact conformation. Today, through molecular simulations, realistic molecules and complexes of biochemical interest can be produced for a wide range of physicochemical conditions.

The scope of this master thesis is the structural study of the interaction of calmodulin (CaM) with specific regions of the type 2 ryanodine receptor [RyR2] (Peptide B and Peptide F), which according to the literature are the main binding sites of CaM in RyR2. The molecular mechanism of interaction and regulation of CaM/Ry2 is not fully understood, mainly due to the absence of structural information about RyR2. Data so far have shown that RyR2 acts as a molecular switch on the Ca²⁺ release channel of the Sarcoplasmic Reticulum (SR), having an important role in the excitation-contraction coupling mechanism of the cardiac muscle and hence the heartbeat.

In addition, recent research data identified 17 mutations in genes encoding CaM (*CALM1*, *CALM2* and *CALM3*), mainly in young patients with cardiac dysfunctions including severe arrhythmias and heart failure. The molecular mechanism giving rise to such phenotypes remains unknown and therefore there is a need to clarify the effect of CaM mutants on Ca²⁺ homeostasis mechanisms of heart cells. To date, there are three propable scenarios for the effect of CaM mutants: 1) either a drastic change in CaM affinity for RyR2, 2) a drastic change for the Ca²⁺ ions binding affinity in CaM, or 3) a significant change in the thermodynamic stability of the CaM.

To fully explore all possible scenarios, docking simulations were performed in key areas of the CaM/RyR2 interaction interface and evaluation of the resulting complexes was made. Furthermore, *de novo* synthesis of RyR2 peptides B and F was performed with proper bioinformatic tools followed by analysis of their physicochemical characteristics. Finally, structural models of calmodulin mutations were constructed via specialized molecular dynamics programs, in order to study their effect on both structure and activity of the molecule.

All findings were compared to recent experimental results and existing theoretical frameworks on the conformation of the CaM/RyR2 complex to validate the conclusions of this study. As a result, a new structural model is poposed for the regulation of human RyR2 as well as associating specific biophysicall changes of CaM with pathological conditions.

Subject Area: Biomolecular Physics, Computational Biology

Keywords: Calmodulin (CaM), Ryanodine Receptor Type 2 (RyR2), Calcium ions (Ca²⁺), Arrhythmias, Docking, Mutagenesis

Περιεχόμενα

Πρόλογος		V
Περίληψι]	. vi
Abstract.		vii
Ι. Εισαγω	γή	1
1.1	Σήματα ασβεστίου και βιολογικές λειτουργίες	2
1.1.1	Το ασβέστιο ως αγγελιοφόρος – Χημικές ιδιότητες ασβεστίου	2
1.1.2	Ρύθμιση σηματοδότησης ασβεστίου (Μεταφορά – Κανάλια – Σήματα)	5
1.1.3	Η καθολικότητα της σηματοδότησης Ca ²⁺ - βιολογικές λειτουργίες	9
1.2	Ο μηχανισμός του καρδιακού παλμού	, 11
1.2.1	Καρδιακός μυς – καρδιακός παλμός	. 11
1.2.2	Μηχανισμός καρδιακού παλμού: σύζευξη διέγερσης – συστολής	. 12
1.3	Υποδοχείς Ρυανοδίνης (RyRs)	. 14
1.3.1	Υποδοχείς RyRs και ισομορφές τους	. 14
1.3.2	Δομή των RyR1 και RyR2	. 15
1.3.3	Δομικές μεταβολές των RyRs κατά τη μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση	. 20
1.3.4	Ρυθμιστές των RyRs	. 21
1.3.5	Δυσλειτουργία των RyR και παθολογικές καταστάσεις	. 22
1.4	Ο ρόλος της καλμοδουλίνης (CaM) στη λειτουργία του RyR2	. 24
1.4.1	Δομή και λειτουργία της CaM	. 24
1.4.2	Ρύθμιση λειτουργίας του RyR2 από την CaM	. 27
1.4.3	Μεταλλάξεις στην CaM και καρδιακή παθογένεια	. 29
1.5	Περιοχές αλληλεπίδρασης RyR2-CaM	. 32
1.5.1	Η περιοχή πρόσδεσης 3614-3643 (CaMBD) στον RyR1 και η αντίστοιχη 3583-3603 του RyR2	34
1.5.2	Η περιοχή πρόσδεσης 4064-4210 (CaMLD) στον RyR1	. 39
1.6	Τεχνολογία μελέτης μοριακών αλληλεπιδράσεων	40
1.6.1	Docking και η σημασία του	. 40
1.6.2	Τύποι μελετών Docking	. 41
1.6.3	Αλγόριθμοι Αναζήτησης και Βαθμολόγησης	. 42
1.6.4	Προγράμματα Docking και αξιολόγησή τους	. 44
1.7	Σκοπός	. 45
II. Πειραμ	ιατικό μέρος	. 46
2.1	Πορεία εργασίων	. 47
2.2	Ά Μέρος: Συλλογή δεδομένων και ανάλυσή τους	. 49
2.2.1	Σύνολο δεδομένων από UniProt	. 50
2.2.2	Σύνολο δεδομένων από PDB	. 52
2.2.3	Πολλαπλή Στοίχιση συνόλου δεδομένων UniProt	. 58
2.2.4	Δομική στοίχιση-Υπέρθεση συνόλου δεδομένων PDB	. 59

2.3	Β' Μέρος: Ανάκτηση των υπό εξέταση δομών	61
2.3.1	Δ ομή Ca ²⁺ /CaM	61
2.3.2	Δομή πεπτιδίων RyR2	63
2.4	Γ' Μέρος: Docking - Μελέτη αλληλεπίδρασης	
2.4.1	ClusPro Docking	
2.4.2	GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) Docking	
2.4.3	Αξιολόγηση και ανάλυση αποτελεσμάτων Docking	
2.5	Δ' Μέρος : Μεταλλαξογένεση της Ca ²⁺ /CaM – Μελέτη της επίδρασης στη δομή του μα	ορίου. 77
2.5.1	Μεταλλαξογένεση της Ca ²⁺ /CaM μέσω MOE	
2.5.2	Μελέτη μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας (ΔΔG)	
III. Алота	ελέσματα - Συζήτηση	
3.1	Αναλυση συνόλων δεδομένων	
3.1.1	Πολλαπλή στοίχιση αμινοξικής ακολουθίας	
3.1.2	Υπέρθεση δομών	
3.2	Δομές αλληλεπιδρώντων μορίων	
3.2.1	Δ ομή της Ca^{2+}/CaM	
3.2.2	Πεπτίδια Β και F του RyR2 _{human}	
3.3	Αποτελέσματα Docking	102
3.3.1	Αποτελέσματα ClusPro	102
3.3.2	Αποτελέσματα GOLD	106
3.4	Αποτελέσματα ανάλυσης μοντέλων	110
3.4.1	PepFlexDock	110
3.4.2	CONSRank	113
3.4.3	COCOMAPS	117
3.5	Αποτελέσματα μεταλλαγμάτων της Ca ²⁺ /CaM	119
3.5.1	Δομικές μελέτες μεταλλαγμάτων της Ca ²⁺ /CaM	119
3.5.2	Υπολογισμός ΔΔG	122
ΙΥ. Συμπε	εράσματα	126
Συντμήσε	ας – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια	131
V. Βιβλιο	γραφία	132
VI. Παρά	ρτημα	148
i.	Κώδικας υλοποίησης clustering στην R	149
ii.	RMSD διάγραμμα	153
iii.	Γραφικές αναπαραστάσεις των clusters	158
iv.	Αναλυτικά αποτελέσματα docking ClusPro	160

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Περιοχές διαφοροποίησης που εντοπίζονται στην πρωτοταγή δομή (αμινοξική ακολουθία) των ισομορφών RyR1 και RyR2	v 15
Πίνακας 2: Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν τους RyRs	22
Πίνακας 3: Μεταλλάξεις της καλμοδουλίνης που συνδέονται με σοβαρές κολπικές αρρυθμίες	29
Πίνακας 4: Πιθανές θέσεις πρόσδεσης της CaM στους RyRs βάσει ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής του	ς 32
Πίνακας 5: Αμινοξική ακολουθία της περιοχής CaMBD των υποδοχέων ρυανοδίνης σκελετικού και καρδιακού μυ αντίστοιχα	37
Πίνακας 6: Δεδομένα από τη UniProt	50
Πίνακας 7: Δεδομένα δομικής πληροφορίας των συμπλόκων της CaM με πρωτεΐνες	52
Πίνακας 8: Δεδομένα δομικής πληροφορίας των συμπλόκων της CaM με πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή πρόσδεσης Ca ²⁺ - CBD	54
Πίνακας 9: Δεδομένα δομικής πληροφορίας των συμπλόκων της CaM με μικρά μόρια	57
Πίνακας 10: Αμινοξική ακολουθία των υπό σύνθεση πεπτιδίων	63
Πίνακας 11: Μεταλλάξεις της CaM	78
Πίνακας 12: Δομές της Ca ²⁺ /CaM για την κατασκευή του μοντέλου	87
Πίνακας 13: Αμινοξική ακολουθία των πεπτιδίων που συντέθηκαν	96
Πίνακας 14: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το control πεπτίδιο γι το πεδίο ισορροπίας	ια 103
Πίνακας 15: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο Β για το πεδίο ισορροπίας	104
Πίνακας 16: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο F για το πεδίο ισορροπίας	105
Πίνακας 17: Αποτελέσματα βαθμολόγησης των μοντέλων του CONSRank για το Ca ²⁺ /CaM – control πεπτίδιο	113
Πίνακας 18: Αποτελέσματα βαθμολόγησης των μοντέλων του CONSRank για το Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο B	114
Πίνακας 19: Αποτελέσματα βαθμολόγησης των μοντέλων του CONSRank για το $Ca^{2+}/CaM - \pi \epsilon \pi \tau$ ίδιο F	115
Πίνακας 20: Αποτελέσματα των ειδών των αλληλεπιδράσεων στην περιοχή πρόσδεσης της Ca ²⁺ /CaM με πεπτίδιο B	το 117
Πίνακας 21: Αποτελέσματα ανάλυσης των παραμέτρων ASA (solvent accessible surface area, επιφάνεια προσβάσιμη στο διαλύτη) για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο B	117
Πίνακας 22: Αποτελέσματα των ειδών των αλληλεπιδράσεων στην περιοχή πρόσδεσης της Ca ²⁺ /CaM με πεπτίδιο F	το 118
Πίνακας 23: Αποτελέσματα ανάλυσης των παραμέτρων ASA (solvent accessible surface area, επιφάνεια προσβάσιμη στο διαλύτη) για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο F	118
Πίνακας 24: Αποτελέσματα πρόβλεψης ΔΔG για κάθε μετάλλαξη της Ca ²⁺ /CaM στην 1CLL	122
Πίνακας 25: Αποτελέσματα πρόβλεψης ΔΔG για κάθε μετάλλαξη της Ca ²⁺ /CaM στην 2WEL	124
Πίνακας 26: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το control πεπτίδιο γι το ηλεκτροστατικό πεδίο Πίνακας 27: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το control πεπτίδιο γι	ια 161
το υδροφοβικό πεδίο	162

Πίνακας 28: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το control πεπτίδιο για το πεδίο VdW μαζί με ηλεκτροστατικό	164
Πίνακας 29: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο Β για το ηλεκτροστατικό πεδίο	166
Πίνακας 30: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο Β για το υδροφοβικό πεδίο	167
Πίνακας 31: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο Β για το π VdW μαζί με ηλεκτροστατικό	εδίο 169
Πίνακας 32: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο F για το ηλεκτροστατικό πεδίο	170
Πίνακας 33: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο F για το υδροφοβικό πεδίο	171
Πίνακας 34: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca ²⁺ /CaM με το πεπτίδιο F για το πεδίο VdW μαζί με ηλεκτροστατικό	173

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Χρονολογικά αξιοσημείωτα ευρήματα από την έρευνα για τη σηματοδότηση του ασβεστίου	3
Εικόνα 2: Ca ²⁺ και Mg ²⁺ με το EF-hand μοτίβο πρωτεΐνης (υποθετική σύγκριση)	4
Εικόνα 3: Τα τέσσερα στάδια του δικτύου σηματοδότησης Ca ²⁺	5
Εικόνα 4: Ενδοκυττάρια ομοιόσταση ασβεστίου	7
Εικόνα 5: In vivo αποτελέσμα της αυξανόμενης έντασης της ταλάντωσης του Ca ²⁺ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του διεγέρτη (ή αγωνιστή)	8
Εικόνα 6: Λειτουργική οργάνωση καναλιών ασβεστίου για την έναρξη σηματοδότησης ${ m Ca}^{2+}$	9
Εικόνα 7: Συλλογή σημαντικών βιολογικών λειτουργιών, οι οποίες διαμορφώνονται από τα σήματα του ασβεστίου στα ευκαρυωτικά κύτταρα	10
Εικόνα 8: Δομή καρδιακού μυ και καρδιακών κυττάρων	11
Εικόνα 9: Απεικόνιση ηλεκτροκαρδιογραφήματος	12
Εικόνα 10: Τα γεγονότα που εμπλέκονται στη σύζευξη διέγερσης-συστολής	13
Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα της πρωτεΐνης RyR	16
Εικόνα 12: Η αρχιτεκτονική του RyR1 στα 4.8Å	17
Εικόνα 13: Διαμεμβρανικός πόρος RyR1 και C-τελική περιοχή	18
Εικόνα 14: Κρυσταλλική δομή των περιοχών Α,Β και C του RyR1	19
Εικόνα 15: Μηχανισμός απελευθέρωσης Ca ²⁺ : Σχηματικός μηχανισμός του μηχανισμού CICR στον υποδοχέα RyR1	20
Εικόνα 16: Χάρτης των πιθανότερων θέσεων σύνδεσης των κυριότερων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς RyR	21
Εικόνα 17: Σχηματικά διαγράμματα του μοτίβου EF-hand	25
Εικόνα 18: Αμινοξικές ακολουθίες μοτίβων δέσμευσης ασβεστίου ΕF, σε τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες (παρβαλβουμίνη, καλμοδουλίνη και τροπονίνη–C)	25
Εικόνα 19: Απεικόνιση διαφορετικών στερεοδιατάξεων της CaM	27
Εικόνα 20: Θεωρητικό μοντέλο ρύθμισης του υποδοχέα RyR2 από την καλμοδουλίνη	28
Εικόνα 21: Σχηματικό μοντέλο των βρόχων δέσμευσης Ca ²⁺ της καλμοδουλίνης στις αμινοτελικές (Ι και ΙΙ) και καρβοξυτελικές (ΙΙΙ και ΙV) περιοχές που δείχνουν τις θέσεις των μεταλλάξεων	31
Εικόνα 22: Πιθανές θέσεις πρόσδεσης της CaM στους υποδοχείς RyR1 και RyR2	33
Εικόνα 23: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δέσμευσης της Ca ²⁺ /CaM _{WT} στον RyR1	35
Εικόνα 24: Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Ca^{2+}/CaM -RyR $1_{3614-3643}$ σε ατομική ανάλυση 2 Å	36
Εικόνα 25: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δέσμευσης της apo-CaM στον RyR2	38
Εικόνα 26: Αμινοξικές ακολουθίες τριών περιοχών πρόσδεσης της CaM (CaMBD)	38
Εικόνα 27: Παράδειγμα Protein-Ligand Docking	42
Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της πορείας εργασιών της παρούσας διπλωματικής εργασίας.	47
Εικόνα 29: Αρχική σελίδα T-coffee	59
Εικόνα 30: Παράμετοι που χρησιμοποιήθηκαν για την υπέρθεση δομών στο Chimera	60
Εικόνα 31: Παράμετοι για την πρωτονίωση του πρωτεϊνικού μοντέλου	61

Εικόνα 32: Διάγραμμα ροής του PEP-FOLD	64
Εικόνα 33: Σύνθεση πεπτιδίων του ανθρώπινου RyR2	65
Εικόνα 34: Εισαγωγή αμινοξικής ακολουθίας στο πρόγραμμα πρόβλεψης PSIPRED	65
Εικόνα 35: Τρόπος λειτουργίας του ClusPro	66
Εικόνα 36: Αρχική σελίδα του ClusPro.	68
Εικόνα 37: Αρχική σελίδα του FlexPepDock	73
Εικόνα 38: Αρχική σελίδα του CONSRank	74
Εικόνα 39: Αρχική σελίδα COCOMAPS	75
Εικόνα 40: Δομή της 1CLL, Ca ²⁺ /CaM.	77
Εικόνα 41: Τρόπος λειτουργίας του iStable	81
Εικόνα 42: Αποτέλεσματα πολλαπλής στοίχισης μέσω οπτικοποίησης με JalView	86
Εικόνα 43: Μοντέλο Ca ²⁺ /CaM, με συστοιχισμένες 61 δομές μέσω του Chimera	88
Εικόνα 44: Κατανομή του συνόλου δεδομένων σε κοινές ομάδες βάσει της κοινής διακύμανσής τους	89
Εικόνα 45: Κατανομή του συνόλου δεδομένων σε διαστάσεις PC1 × PC2	90
Εικόνα 46: Κατανομή των δεδομένων σε 2 clusters	91
Εικόνα 47: Κατανομή των δεδομένων σε 2 clusters	91
Εικόνα 48: Ομαδοποίηση αποτελεσμάτων για έλεγχο clusters με k=3, k=4, k=5 και k=6	92
Εικόνα 49: Αποτελέσματα συνάρτησης Elbow	93
Εικόνα 50: Αποτελέσματα συνάρτησης Silhuette	93
Εικόνα 51: Αποτελέσματα συνάρτησης Gap Statistic	94
Εικόνα 52: Κρυσταλλική δομή της 2WEL (CaM δεσμευμένη με SU6656-bound calcium/calmodulin- dependent protein kinase II delta)	95
Εικόνα 53: Αποτέλεσμα πρόγνωσης PSIPRED για το πεπτίδιο Β	96
Εικόνα 54: Αποτέλεσμα πρόγνωσης της de novo σύνθεσης του PEP-FOLD για το πεπτίδιο Β	96
Εικόνα 55: Αποτέλεσμα πρόγνωσης PSIPRED για το πεπτίδιο F	97
Εικόνα 56: Αποτέλεσμα πρόγνωσης της de novo σύνθεσης του PEP-FOLD για το πεπτίδιο F	97
Εικόνα 57: Α. Αποτέλεσμα πρόγνωσης της de novo σύνθεσης του PEP-FOLD για το control πεπτίδιο B	98
Εικόνα 58: Συνολικό αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών και των 5 μοντέλων πρόβλεψης για το πεπτίδιο Β	99
Εικόνα 59: Αποτελέσματα μέτρησης των ανά δύο RMSD για τα 5 μοντέλα πρόβλεψης του πεπτιδίου Β	99
Εικόνα 60: Συνολικό αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών και των 5 μοντέλων πρόβλεψης για το πεπτίδιο F	100
Εικόνα 61: Αποτελέσματα μέτρησης των ανά δύο RMSD για τα 5 μοντέλα πρόβλεψης του πεπτιδίου F	100
Εικόνα 62: Συνολικό αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών και των 5 μοντέλων πρόβλεψης για το control πεπτίδιο μαζί με το κρυσταλλικό πεπτίδιο που έχει απομονωθεί από το σύμπλοκο της 2WEL	100
Εικόνα 63: Αποτελέσματα μέτρησης των ανά δύο RMSD για τα 5 μοντέλα πρόβλεψης για το control πεπτίδιο μαζί με το κρυσταλλικό πεπτίδιο που έχει απομονωθεί από το σύμπλοκο της 2WEL	101
Εικόνα 64: Αποτελέσματα docking για Ca ²⁺ /CaM-control πεπτίδιο	102
Εικόνα 65: Αποτελέσματα docking για Ca ²⁺ /CaM-πεπτίδιο B Εικόνα 66: Αποτελέσματα docking για Ca ²⁺ /CaM-πεπτίδιο F	103 104

Εικόνα 67: Μοντέλο πρόβλεψης docking του συμπλόκου Ca ²⁺ /CaM-control με αλλοιωμένη δομή πεπτιδίου	0 105
Εικόνα 68: Αποτελέσματα docking για Ca ²⁺ /CaM-control πεπτίδιο	106
Εικόνα 69: Αποτελέσματα υπέρθεσης των αγυροβολημένων συμπλόκων για Ca ²⁺ /CaM-control πεπτίδιο μέσω του ClusPro και GOLD, και του κρυσταλλικού συμπλόκου	107
Εικόνα 70: Αποτελέσματα docking για Ca ²⁺ /CaM-πεπτίδιο B	107
Εικόνα 71: Αποτελέσματα υπέρθεσης των αγυροβολημένων συμπλόκων για Ca ²⁺ /CaM-πεπτίδιο B μέσω του ClusPro και GOLD	108
Εικόνα 72: Αποτελέσματα docking για Ca ²⁺ /CaM-πεπτίδιο F	108
Εικόνα 73: Αποτελέσματα υπέρθεσης των αγυροβολημένων συμπλόκων για Ca ²⁺ /CaM-πεπτίδιο F μέσω του ClusPro και GOLD	109
Εικόνα 74: Τελικά αποτελέσματα docking του ClusPro	110
Εικόνα 75: Δομή εισόδου της Ca ²⁺ /CaM με το control πεπτίδιο για ανάλυση του PepFlexDock	111
Εικόνα 76: Αποτέλεσμα FlexPepDock για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – control πεπτίδιο	111
Εικόνα 77: Αποτέλεσμα FlexPepDock για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο B	112
Εικόνα 78: Αποτέλεσμα FlexPepDock για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο F	112
Εικόνα 79: Τελικό μοντέλο δομής για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – control πεπτίδιο	113
Εικόνα 80: Υπέρθεση δομών τελικού μοντέλου πρόβλεψης για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – control πεπτίδιο με την αντίστοιχη κρυσταλλική δομή	114
Εικόνα 81: Τελικό μοντέλο δομής για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο B	115
Εικόνα 82: Τελικό μοντέλο δομής για το σύμπλοκο Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο F	116
Εικόνα 83: Αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών των 17 σημειακών μεταλλάξεων που προκλήθηκαν στη 1CLL με την αγρίου τύπου 1CLL	120
Εικόνα 84: Αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών των 17 σημειακών μεταλλάξεων που προκλήθηκαν στη 2WEL με την αγρίου τύπου 2WEL	121

Ι. Εισαγωγή

1.1 Σήματα ασβεστίου και βιολογικές λειτουργίες

Ένα από τα πλέον αξιοθαύμαστα χαρακτηριστικά των κυττάρων είναι η ικανότητά τους να ρυθμίζουν τις λειτουργίες τους ανάλογα με τις αλλαγές που εμφανίζονται στο περιβάλλον τους. Αυτή η ικανότητα προσαρμογής, προϋποθέτει την ύπαρξη ενδοκυττάριων μηχανισμών μεταφοράς μηνυμάτων, που με τη χρήση ειδικών αγγελιοφόρων μορίων είναι ικανά να ενεργοποιούν ή να αναστέλλουν με δυναμικό τρόπο τις κατάλληλες κυτταρικές δράσεις. Τα ιόντα ασβεστίου (στο εξής Ca^{2+}), παρά τη φαινομενικά απλή φύση τους, αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους αγγελιοφόρους στη βιολογία, καθώς ρυθμίζουν αναρίθμητες βασικές και πολλές αντίρροπες κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η γονιμοποίηση, κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, η γονιδιακή έκφραση, η νευρική σηματοδότηση, η μυϊκή χάλαση και συστολή, ο κυτταρικός θάνατος και άλλα (Berridge, Bootman, & Roderick, 2003; Berridge, Lipp, & Bootman, 2000). Βασικά εξαρτήματα του μηχανισμού ελέγγου των βιολογικών αυτών δράσεων αποτελούν οι πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου (calcium-binding proteins), ένα πολυάριθμο και ετερογενές σύνολο πρωτεϊνών που έχουν ως κοινό σημείο την ικανότητα να αλληλεπιδρουν επιλεκτικά και αντιστρεπτά με τα Ca²⁺ μέσα από εξειδικευμένα δομικά μοτίβα. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν κεντρικό ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό των κυττάρων και μπορούν να αποκωδικοποιούν την όποια μεταβολή συγκέντρωσης των Ca²⁺ εμφανίζεται (σήματα Ca^{2+}), με την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των κατάλληλων κάθε φορά βιοχημικών μονοπατιών. Μία μεγάλη ποικιλία από πρωτεΐνες έχει πλέον προταθεί, οι οποίες δεσμεύουν και μεταφέρουν το ασβέστιο. Όλες συμβάλλουν στη ρύθμισή του μέσα στο κύτταρο, αλλά υπάρχουν κι ορισμένες οι οποίες αποδικωποιούν το μήνυμά του προς όφελος του του στόχου. Οι σημαντικότερες από αυτές τις αισθητήριες πρωτεΐνες του ασβεστίου, είναι αυτές με δομικό μοτίβο EF-hand (έλικα-στροφή-έλικα). Το ασβέστιο λοιπόν αποτελεί έναν αδιαμφισβήτητο αγγελιοφόρο, απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία του κυττάρου, όπου αν δεν ελέγχεται προσεκτικά χωρικά και χρονικά εντός των κυττάρων, είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί επιλεκτική ενεργοποίηση του επιθυμητού κάθε φορά κυτταρικού μηχανισμού. Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η απορρύθμιση αυτού του ευαίσθητου μηχανισμού απόκρισης σε σήματα Ca²⁺ μπορεί να δημιουργήσει σοβαρές κυτταρικές δυσλειτουργίες και να προκαλέσει ακόμα και τον κυτταρικό θάνατο (Carafoli & Krebs, 2016). Στα κεφάλαια που ακολουθούν περιγράφονται τα βασικά χαρακτηριστικά των σημάτων Ca²⁺ και ο τρόπος με τον οποίον επιτυγχάνεται η ρύθμιση πόλλών διαφορετικών βιολογικών διεργασίων με βάση το απλό αυτό ιόν.

1.1.1 Το ασβέστιο ως αγγελιοφόρος - Χημικές ιδιότητες ασβεστίου

Οι πρώτες ένδειξεις για τη βιολογική σημασία των ιόντων Ca^{2+} παρουσιάστηκαν το 1883 από τον Sydney Ringer, όταν διαπίστωσε ότι το πλούσιο σε ασβέστιο νερό του Λονδίνου μπορούσε να διατηρήσει εμβαπτισμένες καρδιές βατράχων σε φάση συστολής ενώ σε απεσταγμένο νερό κάτι τέτοιο δεν ήταν δυνατό (Carafoli, 2003). Αρκετά αργότερα (το 1954), διαπιστώθηκε ότι τα Ca^{2+} ενεργοποιούν τη συστολή των σκελετικών μυών αλληλεπιδρώντας με τη Τροπονίνη C (Troponin C) καθώς και ότι σημαντικές ποσότητες Ca^{2+} βρίσκονται αποθηκευμένες στο σαρκοπλασματικό δίκτυο (στο εξής ΣΔ). Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα Ca^{2+} ρυθμίζουν έμμεσα ή άμεσα αναρίθμητες κυτταρικές λειτουργίες μέσω πολύπλοκων και αλληλένδετων βιοχημικών μονοπατιων που περιλαμβάνουν κανάλια και αντλίες ιόντων, ενδοκυττάριους χώρους αποθηκευσης και εξειδικευμένα πρωτεϊνικά μόρια.

Μερικά από τα βασικά ερωτήματα που δημιουργούνται κατά τη μελέτη των σημάτων ασβεστίου είναι η διασαφήνιση του ακριβούς μηχανισμού με τον οποιο επιτυγχάνεται η ρύθμιση της κατάλληλης κάθε φορά κυτταρικής δράσης καθώς και ο λόγος που τα Ca²⁺ καθιερώθηκαν ως κεντρικό αγγελιοφόρο μόριο σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμους έναντι άλλων ιόντων με παρόμοιο μέγεθος και φορτίο (π.χ. Mg²⁺).

Το ασβέστιο, το τρίτο πιο άφθονο μέταλλο στη φύση, ήταν διαθέσιμο στο περιβάλλον των ζωντανών οργανισμών σε μεγάλες συγκεντρώσεις, σε όλα τα εξελικτικά σταδια και από πολύ νωρίς αποτέλεσε έναν αποτελεσματικό μηχανισμό ελέγχου πολλών βιολογικών δράσεων. Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί δαπανούν μεγάλα ποσά ενέργειας για τη δημιουργία βαθμίδων συγκέντρωσης Ca^{2+} (στο εξής $[Ca^{2+}]$) μεταξύ του εξωκυττάριου και του ενδοκυττάριου χώρου. Σε ένα τυπικό κύτταρο, η $[Ca^{2+}]$ στο κυτταρόπλασμα διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα (~ 100 nM), ενώ στο εξωτερικό του η $[Ca^{2+}]$ είναι αρκετά μεγαλύτερη (> 1 mM) (Clapham,

2007). Αντίθετα, τα επίπεδα των Mg²⁺, ιόντα με μεγαλες ομοιότητες με αυτά του ασβεστίου, διαφέρουν ελάχιστα στις δυο πλευρές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η βιολογική αναγκαιότητα για τη διατήρηση χαμηλών [Ca²⁺] στο κυτταρόπλασμα προκύπτει από το γεγονός ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις σχηματίζει αδιάλυτα φωσφορικά άλατα, τα οποία είναι τοξικά για το κύτταρο (Clapham, 2007).

Η ηλεκτρική, ορμονική ακομά και μηχανική διέγερση των κυττάρων μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της $[Ca^{2+}]$ στο κυτταρόπλασμα με είσοδο ιόντων από τον εξωκυττάριο χώρο ή/και απελευθέρωση τους από κυτταροπλασματικές θέσεις αποθήκευσης. Ο αυστηρός έλεγχος της τελικής $[Ca^{2+}]$, του χρόνου που η $[Ca^{2+}]$ παραμένει υψηλότερη από τα επίπεδα ηρεμίας, καθώς και των κυτταρικών περιοχών που εμφανίζεται αυτή η μεταβολή επιτρέπει τον επιλεκτικό έλεγχο πολλών κυτταρικών διεργασιών μέσω της διαφορετικής ευαισθησίας τους στα τρία αυτά χαρακτηριστικά της ροής Ca^{2+} (ένταση σήματος, ρυθμός μεταβολής σήματος, κυτταρικό διαμέρισμα) (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000). Με τον τρόπο αυτό, συγκεκριμένες πληροφορίες μπορούν να κωδικοποιηθούν και να μεταδοθούν σε διάφορα σημεία του κυττάρου χωρίς να επηρρεάστουν άλλες βασικές λειτουργίες του (Berridge, Bootman, & Lipp, 1998; Orrenius, Zhivotovsky, & Nicotera, 2003).



Εικόνα 1: Χρονολογικά αξιοσημείωτα ευρήματα από την έρευνα για τη σηματοδότηση του ασβεστίου. Απόδειξη πως ένας από τους βασικότερους αγγελιοφόρους στη βιολογία είναι τα ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺) από το αρχικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε με νερό βρύσης (πλούσιο σε ασβέστιο) μέχρι και τον πρόσφατο τομέα της έρευνας (Αναπροσαρμογή από Carafoli, 2003).

Τα Ca²⁺ επιλεχθηκαν για τους μηχανισμούς σηματοδότησης έναντι άλλων ιόντων με παρόμοια πυκνότητα φορτίου, χάρη στην ιδίαιτερη χημεία συναρμογής τους (coordination chemistry). Γενικά, η αλληλεπίδραση των μεταλλικών ιόντων με υποκαταστάτες και η τελική γεωμετρία του συμπλόκου που προκύπτει καθορίζεται από τις εξής φυσικοχημικές ιδιότητες:

- το φορτίο του ιόντος
- την ιοντική ακτίνα
- την πολικότητα
- την ενθαλπία ενυδάτωσης
- τον αριθμό των μορίων νερού που οργανώνονται γύρω από το ιόν

Με βάση τις ιδιότητες αυτές, εξηγείται γιατί το ασβέστιο προσδένεται εύκολα σε περιοχές ακανόνιστης γεωμετρίας, όπως αυτές που υπάρχουν σε πολύπλοκα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες), καθώς και γιατί σε αυτές τις περιοχές δέσμευσης δεν θα μπορούσε να προσδεθεί ένα συγγενές στοιχείο όπως π.χ. το Mg. Η ευέλικτη χημεία συναρμογής του ασβεστίου (τυπικά μπορεί να δεχθεί από 6 έως 12 υποκαταστάτες) και το μεγάλο έυρος στα μήκη και τις γωνίες των δεσμών που σχηματίζει, απέχουν κατά πολύ από αυτά του μαγνησίου, όπου εξαιτίας του μικρότερου μεγέθους του (0.65 Å συγκριτικά με τα 0.99 Å του Ca²⁺) και της χαμηλής του πολικότητας απαιτεί μία σταθερή οκταεδρική γεωμετρία και έξι υποκαταστάτες προσαρμογής με ελάχιστη μεταβλητότητα στο μήκος του δεσμού. Έχει παρατηρηθεί ότι η πρόσδεση του ασβεστίου σε εξειδικευμένες πρωτεϊνικές θέσεις σύνδεσης πραγματοποιείται συνήθως με τη βοήθεια καρβοξυλικών ενώσεων (μονοσθενών ή δισθενών) ή οξυγόνου (προτιμητέος υποκαταστάτης). Σε αυτές τις θέσεις, το ασβέστιο συνδέστιο συνδέεται γενικά με επτά άτομα οζυγόνου σε μία διαμόρφωση που αντιπροσωπεύεται καλύτερα από μία πενταγωνική διπυραμίδα (Carafoli & Krebs, 2016).



Εικόνα 2: Συναρμογή Ca²⁺ και Mg²⁺ με το EF-hand μοτίβο πρωτεΐνης (υποθετική σύγκριση).

πρωτεινης (υποθετικη συγκριση). Οι διαφορές στα σημεία δεύσμεσης, οφείλονται στις χημικές ιδιότητες των δύο μετάλλων (το Mg έχει μικρότερη ιοντική ακτίνα, πολικότητα και μεγαλύτερη ενέργεια ενθαλπίας καθώς και επιφάνεια ένυδρων ιόντων), γεγονός που δείχνει την ευκολία του ασβεστίου να δεσμεύεται σε θέσεις ακανόνιστης γεωμετρίας (Carafoli & Krebs, 2016).

Στο εσωτερικό των κυττάρων, το ασβέστιο μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με ανόργανες ενώσεις και οργανικά μόρια μικρού μοριακού βάρους. Ωστόσο, οι ενώσεις δεσμεύουν ασβέστιο με χαμηλή συγγένεια και έτσι δεν μπορούν να μειώσουν την ελεύθερη συγκέντρωσή των Ca^{2+} στα επίπεδα που συναντάμε στο εσωτερικό των κυττάρων. Για να επιτευχθεί συγκέντρωση του Ca^{2+} της τάξης των nM, απαιτείται η πρόσδεση των Ca^{2+} σε ειδικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαθέτουν θέσεις σύνδεσης με την απαραίτητη συγγένεια και εκλεκτικότητα για το Ca^{2+} . Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: η πρώτη κατηγορία αποτελείται από πρωτεΐνες που είναι διαλυτές στο κυτταρόπλασμα, οι οποίες απομονώνονται εντός των κυτταρικών οργανιδίων ή οργανώνονται σε αδιάλυτες μη μεμβρανώδεις δομές, όπως είναι ο κυτταροσκελετός. Η δεύτερη κατηγορία αφορά διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που μεταφέρουν το Ca^{2+} εντός ή εκτός των κυττάρων ή μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του εσωτερικού των οργανιδίων. Πρόφανως, όταν η μεταφορά του Ca^{2+} πραγματοποιείται

κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, τροποποιείται η ολική συγκέντρωση ασβεστίου στο κύτταρο (Carafoli & Krebs, 2016).

Η αιτία που αυτό το ιόν είναι ικανό να ρυθμίσει πολυάριθμες βιολογικές λειτουργίες έγκειται στη μεγάλη χωρική και χρονική ποικιλομορφία του σήματος του, αφού η απόκριση Ca²⁺ μπορεί να παρουσιάσει άπειρα μοτίβα (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000). Μέσω μιας περίπλοκης συνάθροισης δράσεων μεταξύ διαφόρων μεταφορέων Ca²⁺ στο κύτταρο, η συγκέντρωση του κυτοσολικού Ca²⁺ μπορεί να αρχίσει να ταλαντεύεται, όπως ένα ραδιοσήμα. Επομένως, συγκεκριμένες πληροφορίες μπορούν να κωδικοποιηθούν αποτελεσματικά στο σήμα και να μεταδοθούν μέσω του κυττάρου χωρίς να βλάψουν το ίδιο το κύτταρο (Berridge, Bootman, & Lipp, 1998; Orrenius, Zhivotovsky, & Nicotera, 2003).

1.1.2 Ρύθμιση σηματοδότησης ασβεστίου (Μεταφορά – Κανάλια – Σήματα)

<u>Τρόποι μεταφοράς ασβεστίου – κανάλια ασβεστίου</u>

Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν εξειδικευμένες θέσεις δέσμευσης για τα Ca²⁺ αποτελούν τα βασικότερα εξαρτήματα ενός σύνθετου κυτταρικού μηχανισμού που αποκωδικοποιεί τα σήματα Ca²⁺ και μεταφέρει τη πληροφορία που περιέχουν στα κατάλληλα βιοχημικά μονοπάτια. Σχηματικά, η διαδικασία μετατροπης του αρχικού σηματος Ca²⁺ στην ανάλογη βιολογική δράση μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα διακριτά στάδια (Εικόνα 3):

- Αρχικά, ένα εξωτερικό ερέθισμα (π.χ. ένα ορμονικό σήμα) ενεργοποιεί τα βιοχημικα μονοπάτια που ρυθμιζουν τις ροές Ca²⁺ στο κύτταρο.
- Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της [Ca²⁺] στο κυτταρόπλασμα (ενεργοποίηση κυττάρου).
- Η [Ca²⁺] γίνεται τέτοια που τα Ca²⁺ μπορούν πλέον να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες δέσμευσης-Ca²⁺ ([Ca²⁺] ~ K_d, όπου K_d η σταθερά διάστασης της αλληλεπίδρασης). Η αντιστρεπτή δέσμευση του ασβεστίου προκαλεί αλλαγές στο φορτίο και το σχήμα της πρωτεΐνης, ενεργοποιώντας μια σειρα αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες-στόχους.
- Μετά το πέρας της επίδρασης του εξωτερικού ερεθίσματος, η [Ca²⁺] στο κυτταρόπλασμα επιστρέφει στα επίπεδα ηρεμίας, το Ca²⁺ αποσυνδέεται από τις πρωτεΐνες δέσμευσης-Ca²⁺ οι οποίες και ανακτούν την αρχική τους λειτουργικότητα.



Εικόνα 3: Τα τέσσερα στάδια του δικτύου σηματοδότησης Ca²⁺. Τα ερεθίσματα δρουν δημιουργώντας σήματα κινητοποίησης Ca²⁺ τα οποία δρουν σε διάφορους μηχανισμούς ON για να προκαλέσουν αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca²⁺. Το αυξημένο επίπεδο του Ca²⁺ διεγείρει διάφορες λειτουργίες ευαίσθητες σε Ca²⁺, για να ενεργοποιήσει με τη σειρά του πολλές διαφορετικές κυτταρικές οδούς. Η απόκριση τερματίζεται από OFF μηχανισμούς που αποκαθιστούν το Ca²⁺ στο επίπεδο ηρεμίας του (Michael J. Berridge, Lipp, & Bootman, 2000).

Τα κύτταρα έχουν πρόσβαση σε δύο πηγές Ca²⁺, είτε στη περίσσεια Ca²⁺ στον εξωκυττάριο χώρο είτε στα ιόντα Ca²⁺ που βρίσκονται σε ειδικές θέσεις αποθήκευσης στον ενδοκυττάριο χώρο, ρυθμίζοντας τις ροές με εξειδικευμένους μεμβρανικούς υποδοχείς (συνήθως InsP₃ και RyR, βλέπε παρακάτω). Αυτή η αντιστρεπτότητα στις ροές Ca²⁺ επιτυγχάνεται με τη δυνατότητα των υποδοχέων αυτών να υιοθετούν τουλάχιστον δύο διακριτές

διαμορφώσεις, μία ενεργή (ανοιχτή) και μία ενενεργή (κλειστή). Αυτές οι διαμορφώσεις βρίσκονται σε μια αλλοστερική ισορροπία, η οποία καθιστά τα κανάλια σηματο-ελεγχόμενους διακόπτες. Τα σήματα, τα οποία ελέγχουν το άνοιγμα ή το κλείσιμο του καναλιού, μπορεί να είναι ηλεκτρικά, χημικά, μηχανικά ή ακόμη και θερμικά και με βάση τη φύση τους καθορίζεται και η ταξινόμηση των καναλιών αυτών. Γενικά, τα κανάλια ελέγχουν την είσοδο και την έξοδο του Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα, οι ΑΤΡάσες είναι αυτές που μεταφέρουν το Ca²⁺ με μεγάλη συγγένεια στο εσωτερικό του και τέλος οι ανταλλάκτες το μεταφέρουν με μικρότερη συγγένεια, με σκοπό την αντικατάστασή του από ένα άλλο ιόν (συνήθως Na⁺) (Carafoli & Krebs, 2016).

Τα κανάλια Ca²⁺ της **πλασματικής μεμβράνης**, κατανέμονται επιλεκτικά στους ιστούς με βάση τις ιδιότητές τους στην ανοικτή/κλειστή διαμόρφωση και τη δυνατότητα απόκρισης σε συγκεκριμένα ερεθίσματα ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου, ώστε να ρυθμίσουν διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς όπως:

- Την αλληλεπίδραση με υποκαταστάτες
- Την εκκένωση των ενδοκυττάριων αποθηκών Ca²⁺ (Putney Jr, 1986)
- Τις αλλαγές στο ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης, μέσω των καναλιών VOCCs (Voltage-Operated Calcium Channels) (Bertolino & Llinas, 1992)
- Την αλληλεπίδραση με περιβαλλοντικά σήματα

Οι μεμβράνες του ΣΔ περιέχουν τα πιο σημαντικά ενδοκυττάρια κανάλια Ca^{2+} , τα οποία ρυθμίζονται από τους υποδοχείς 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (στο εξής InsP₃) (Fan et al. 2015) και υποδοχείς ρυανοδίνης (στο εξής RyR). Οι υποδοχείς InsP₃ βρίσκονται στο ΣΔ και ρυθμίζονται από το Ca^{2+} , καθώς η σύνδεσή τους ενεργοποιεί το κανάλι τροφοδοτώντας με Ca^{2+} το ΣΔ από το κυτταρόπλασμα (Ca^{2+} -επαγόμενη απελευθέρωση Ca^{2+} - Calcium Induced – Calcium Released και στο εξής CICR). Οι RyR, βρίσκονται στη μεμβράνη του ΣΔ και είναι απαραίτητοι για τον έλεγχο της κυτταροπλασματικής [Ca^{2+}] κατά τη τη διαδικασία της ταχείας δίεγερσης και αποδιέγερσης των κυττάρων (όπως π.χ συμβαίνει στα καρδιακά κύτταρα). Ουσιαστικά, οι υποδοχείς InsP₃ και RyR δεν είναι μόνο εξειδικευμένα κανάλια Ca^{2+} αλλά ταυτόχρονα και αισθητήρες της [Ca^{2+}], ρυθμίζοντας τη διαπερατότητά τους σε Ca^{2+} σύμφωνα με τον ακόλουθο κύκλο ανάδρασης: τα κανάλια βρίσκονται στην ανοικτή διαμόρφωση όταν η κυτταροπλασματική [Ca^{2+}] είναι κάτω από 300 nM (θετική ανατροφοδότηση) και στη κλειστή διαμόρφωση όταν είναι πάνω από 300 nM (αρνητική ανατροφοδότηση). Αυτή η δυναμική απόκριση της διαμόρφωσης των καναλιών ανάλογα με τη [Ca^{2+}] στο άμεσο περιβάλλον τους, αποτελεί το βασικό μοριακό μηχανισμό πίσω από τις CICR διεργασίες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το Ca²⁺ μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον εξωκυττάριο χώρο ή προς το εσωτερικό των οργανιδίων με τη βοήθεια ειδικών αντλιών (κυρίως ATPάσες) (**Εικόνα 4**). Οι ATPάσες Ca²⁺ (**αντλίες Ca²⁺**) βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη (**αντλία PCMA**), στη μεμβράνη του ΕΔ/ΣΔ (**αντλία SERCA-ATPάσης Ca²⁺** του σαρκοπλασματικού δικτύου) και στο σύμπλεγμα Golgi (**αντλία SPCA** – μονοπάτι έκκρισης ATPάσης Ca²⁺) (Brini & Carafoli, 2009). Η αντλία SERCA είναι το πιο ισχυρό σύστημα για την απομάκρυνση του Ca²⁺ από το κυτταρόπλασμα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα ζωϊκά κύτταρα συνυπάρχει μαζί με την αντλία PCMA, η οποία όμως εκφράζεται σε πολύ μικρότερο βαθμό. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωνουν τις αρχικές εκτιμήσεις (Mohamed et al. 2011; Vasington & Murphy, 1962) ότι ο κυριότερος ρόλος της PCMA στους περισσότερους ιστούς δεν είναι ο καθολικός έλεγχος του κυτταροπλασματικού Ca²⁺, αλλά ο έλεγχος της σηματοδότησης Ca²⁺ σε συγκεκριμένες περιοχές της πλασματικής μεμβράνης που περιέχουν υποδοχείς ασβεστίου. Επιπρόσθετα, η PCMA αλληλεπιδρά με τη καλμοδουλίνη (στο εξής CaM) σε υψηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αντλίας. Η ενεργοποίηση της αντλίας από την CaM, οδηγεί στη δημιουργία ενός περιοδικά αυξομειώμενου σήματος Ca²⁺ (ταλαντώσεις Ca²⁺) (Vasington & Murphy, 1962).

Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα κανάλια του ανταλλάκτη Na⁺/Ca²⁺ (**κανάλι NCX**), ένα σύσημα εκροής Ca²⁺ στην πλασματική μεμβράνη (Berridge, Bootman & Roderick, 2003) το οποίο μπορεί να λειτουργεί και αντίστροφα, δηλαδη μεταφέρει Ca²⁺ πίσω στο κύτταρο, καθώς και το κανάλι διαμεμβρανικού μονομεταφορέα (**κανάλι MCU**), που βοηθάει την εισροή Ca²⁺ στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων (De Stefani et al. 2011; Baughman et al. 2011).



• H⁺

Εικόνα 4: Ενδοκυττάρια ομοιόσταση ασβεστίου. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου, ρυθμίζονται μέσα σε ένα στενό ευρός συγκεντρώσεων (Berridge, Bootman, & Roderick, 2003). Η είσοδος κυτταρικού Ca²⁺ μέσω της πλασματικής μεμβράνης πραγματοποιείται: (α) από τους διαύλους Ca^{2+} που λειτουργούν με υποδοχέα (ROCC), (β) τους διαύλους Ca^{2+} που λειτουργούν με τάση (VOCC), (γ) τους διαύλους Ca²⁺ που λειτουργούν βάσει χωρητικότητας (SOCC) και (δ) τον ανταλλάκτη Na⁺/Ca²⁺ (NCX). Ο NCX παρουσιάζεται ιδιαίτερα ενεργός στα κύτταρα ταχείας διέγερσης/αποδιέγερσης και συμπληρώνει τη δράση της ΑΤΡάσης, καθώς διαθέτει μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς, αλλά χαμηλότερη συγγένεια με το Ca^{2+} και έτσι δεν μπορεί να μειώσει τη συγκέντρωση του Ca^{2+} σε επίπεδα nM (φάση ηρεμίας). Λειτουργεί με βάση τη διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται κατά την ανταλλαγή τριών ιόντων Na⁺ με ένα ιόν Ca²⁺ και με αυτό το τρόπο μπορεί να ανταποκρίνεται δυναμικά σε μεταβολές τόσο στο διαμεμβρανικό δυναμικό όσο και στις συγκεντρώσεις Na⁺ και Ca²⁺ μέσα και έξω από το κύτταρο (Blaustein & Lederer, 1999). Το ασβέστιο μπορεί επίσης να απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα από το ΕΔ, μέσω του υποδογέα InsP3 και του υποδογέα RyR. Η αντλία ασβεστίου της πλασματικής μεμβράνης (PMCA), ο NCX και η ΑΤΡάση ασβεστίου του ΣΔ (SERCA), συμμετέγουν στην αποκατάσταση των φυσιολογικών επιπέδων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η περίσσεια Ca²⁺ μπορεί επίσης να απορροφηθεί από τα μιτοχόνδρια μέσω του μιτοχονδριακού μονομεταφορέα ασβεστίου (MCU). Τα Ca²⁺ μπορόυν να απελευθερωθούν ξανά στο κυτταρόπλασμα μέσω της λειτουργίας του μιτοχονδριακού NCX (mNCX), ο οποίος μπορεί να ρυθμίσει τη ροή ιόντων και προς τις δύο κατευθύνσεις. mHCX: μιτογονδριακός μονομεταφορέας ασβεστίου/υδρογόνου, PTP: πόρος μετάπτωσης διαπερατότητας. MMCA: μιτοχονδριακή μεμβράνη ΑΤΡάσης Ca²⁺ (Magi et al. 2016).

Το πλήθος των συστημάτων μεταφοράς του Ca²⁺ σε συνδυασμό με τη μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών και αισθητήριων πρωτεϊνών, υπογραμμίζει τη ζωτική σημασία του ακριβούς ελέγχου του σήματος Ca²⁺ (χώρος, χρόνος, ένταση), ο οποίος αντικατοπτρίζεται στη μεγάλη λίστα των ενζύμων κι άλλων κυτταρικών διεργασιών που ελέγχονται από το Ca²⁺ (βλέπε παρακάτω).

<u>Σήματα ασβεστίου</u>

Τα κύτταρα είναι συνεχώς εκτεθειμένα σε εξωτερικά ερεθίσματα, τα οποία μεταφράζονται σε αλλαγές στην κυτταροπλασματική συγκέντρωση των Ca^{2+} , η οποία πολύ συχνά εμφανίζεται με τη μορφή ταλαντώσεων (Gu & Spitzer, 1995) (**Εικόνα 5**). Οι ταλαντώσεις Ca^{2+} παρατηρούνται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους με συχνότητες που κυμαίνονται από δεκάδες Hz στους νευρώνες, έως δεκάδες mHz στα μη διεγειρόμενα κύτταρα (Boulware & Marchant 2008). Η συχνότητα του σήματος είναι ανάλογη με την ένταση του ερεθίσματος στο οποίο εκτίθεται το κύτταρο, καθορίζοντας με το τρόπο αυτό το βαθμό διέγερσής του (Godbout et al. 2013). Ανάλογα με το είδος του εξωτερικού ερεθίσματος, οι ταλαντώσεις Ca^{2+} μπορούν να εμφανίσουν διάφορα μοτίβα επανάληψης, όπως ημιτονοειδή μορφή, μορφή διέγερσης-χαλάρωσης ή ακόμα και χαοτικές μορφές. Το μοτίβο ταλάντωσης που προκύπτει κάθε φορα ερμηνεύεται από διάφορους ενεργοποιητές, οι οποίοι με τη σειρά τους ελέγχουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Η <u>κωδικοποίηση</u> του σήματος στις ταλαντώσεις Ca^{2+} μπορεί να πραγματοποιηθεί ειτε μέσω διαμόρφωσης συχνότητας (Frequency modulation - FM – κωδικοποίηση με αλλαγή του πλάτους σήματος), όπως σήματος), όπως γίνεται στα ραδιοκύματα (τρόποι μετάδοσης σήματος).

Η <u>αποκωδικοποίηση</u> του ταλαντευόμενου σήματος συνήθως πραγματοποιείται από πρωτεΐνες με πολλαπλές θέσεις δέσμευσης Ca²⁺, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Η κωδικοποίηση της βιολογικής πληροφορίας με τη μορφή ταλαντώσεων Ca²⁺ επιτρέπει τη μετάδοση συγκεκριμένων σημάτων, χωρίς να δημιουργούνται βλάβες στο κύτταρο (Berridge, Bootman, & Lipp, 1998; Orrenius, Zhivotovsky, & Nicotera, 2003).



του διεγέρτη (ή αγωνιστή). Καταγραφή της συχνότητας ταλάντωσης του Ca²⁺ καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του διεγέρτη (Α) σε κύτταρα HeLa, (Β) σε καρδιακά κύτταρα, (Γ) καρδιακά κύτταρα σε υψηλά ποσοστά διέγερσης. Παρατηρούμε πως με την αύξηση της συγκέντρωσης, αυξάνεται η ένταση του σήματος (συχνότητας). f: συχνότητα, T: περίοδος, FDHM: Full Duration Half Maximum – μέσο μέγιστο πλήρους διάρκειας και Duty cycle: κύκλος λειτουργίας (Smedler & Uhlén, 2014).

Η αποκρυπτογράφηση της πληροφορίας προυποθέτει ότι οι πρωτεϊνες αυτές θα μπορούν να αντιλαμβάνονται ακόμα και πολύ μικρές μεταβολές στη [Ca²⁺], μεταβάλλοντας με δυναμικό τρόπο τη δομή τους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του σήματος και δρώντας με το τρόπο αυτό σαν μοριακοί διακόπτες σε βιοχημικά μονοπάτια (**Εικόνα 6**) (Smedler & Uhlén, 2014).



Εικόνα 6: Λειτουργική οργάνωση καναλιών ασβεστίου για την έναρξη σηματοδότησης Ca²⁺. Γενικά, κατά τη καθολική σηματοδότηση του Ca²⁺, υπάρχει μία ιεραρχική οργάνωση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα: Αρχικά, πραγματοποιείται το άνοιγμα είτε μεμονωμένων καναλιών (μονοκαναλικά) είτε ομάδων ενδοκυττάριων αποθηκών. Το επόμενο βήμα οργάνωσης αφορά μικρές ομάδες καναλιών (περίπου 10-20), που απελευθερώνουν Ca^{2+} , ως τοπική μονάδα (φαινόμενο γνωστό ως 'puffs'στους υποδοχείς InsP3 και ως 'sparks'στους υποδογείς RyR) (Berridge, 1997). Η τοπική αυτή άυξηση στη $[Ca^{2+}]$ είναι ικανή να διεγείρει γειτονικούς υποδοχείς μέσω του συστήματος CICR, για τη δημιουργία ενός γενικευμένου ενδοκυττάριου σήματος. Ανάλογα λοιπόν με το βαθμό διέγερσης του κυττάρου, το πλάτος των σημάτων Ca²⁺ (AM) ρυθμίζεται κάθε φορά από ένα συνδυασμό των επιμέρους αυτών τοπικών γεγονότων (M J Berridge, 1997).

1.1.3 Η καθολικότητα της σηματοδότησης Ca²⁺ - βιολογικές λειτουργίες

Η σηματοδότηση Ca²⁺ πραγματοποιείται καθόλη τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού. Η ζωή αρχίζει με μία αύξηση του Ca²⁺ κατά τη γονιμοποίηση και αυτό το ευέλικτο σύστημα στη συνέχεια χρησιμοποιείται επανειλημμένα για τον έλεγχο πολλών διεργασιών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ενήλικης ζωής (**Εικόνα 7**).

Ένα τεράστιο ερευνητικό πεδίο, το οποίο μόλις τώρα αρχίζει να καλλιεργείται, αφορά το ρόλο του Ca^{2+} σε διάφορες μορφές κυτταρικής παθολογίας. Είναι σαφές ότι ακόμη και σχετικά μικρές διαταραχές στον ομοιοστατικό μηχανισμό Ca^{2+} μπορούν να έχουν θανατηφόρες συνέπειες. Το Ca^{2+} δεν είναι μόνο ένας παντοδύναμος ενδοκυττάριος αγγελιοφόρος: ελέγχει επίσης την κυτταρική επιβίωση, ενεργοποιώντας όπου είναι απαραίτητο τους μηχανισμούς απόπτωσης. Πολύ μικρές αλλαγές στην ομοιόσταση του Ca^{2+} , κατά την πάροδο μηνών ή ακόμα και ετών, μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες που συνδέονται με την υπολειτουργία των κυττάρων και σε κάποιες περιπτώσεις, τον κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, η χρόνια δυσομοιόσταση του Ca^{2+} συνδέεται με πολυάριθμες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως π.χ. διαβητικές νευροπάθειες ή νευροεκφυλιστική άνοια. Οι γνώσεις μας σχετικά με την παθολογία της σηματοδότησης Ca^{2+} βρίσκονται ακόμα σε αρχικό στάδιο, παρόλο που οι μελέτες που συνδέουν τις δυσλειτουργίες στην ομοιόσταση των Ca^{2+} με διάφορες ασθένειες αυξάνονται συνεχώς (Benzaquen et al. 1995; Vander Heiden et al. 1997; Zhu et al., 1999; Kuo et al. 1998; Foyouzi-Youssefi et al. 2000). Για παράδειγμα, πρόσφατες μελέτες σχετικές με τη κυτταρική παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer υποδεικνύουν ορισμένες διαταραχές στα επίπεδα Ca²⁺ του ενδοπλασματικού δικτύου (Pinton et al. 2000; Schlossmann et al. 2000) ως παράγοντα που προάγει τη σύνθεση και τη συσσώρευση του βαμυλοειδούς. Περαιτέρω έρευνες του παθολογικού αυτού δυναμικού των δυσλειτουργιών σηματοδότησης του Ca²⁺ αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη πρόκληση, καθώς τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών μπορεί να αποτελέσουν τα θεμέλια για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών.



Εικόνα 7: Συλλογή σημαντικών βιολογικών λειτουργιών, οι οποίες διαμορφώνονται από τα σήματα του ασβεστίου στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

1.2 Ο μηχανισμός του καρδιακού παλμού

Μία από τις πλέον σημαντικές βιολογικές λειτουργίες που είναι άμεσα συνδεδεμένη με τα σήματα Ca²⁺, είναι ο καρδιακός παλμός. Ήδη όπως αναφέρθηκε παραπάνω, από το 1882 ο Sidney Ringer είχε παρατηρήσει ότι ο καρδιακός ιστός συστελλόταν με εμβάπτιση στο πλούσιο σε άλατα νερό του Λονδίνου, ενώ επανερχόταν σταδιακά στο φυσιολογικό του μέγεθος κατά τη μεταφορά του σε απιονισμένο νερό (Miller, 2004). Στις μέρες μας γνωρίζουμε ότι το μηχανικό αποτέλεσμα του κύκλου συστολής-διαστολής της καρδιάς (σύζευξη διέγερσης -συστολής) παράγεται από μία συντονισμένη αλληλουχία κυτταρικών δράσεων. Στα κεφάλαια που ακολουθούν γίνεται μια σύντομη παρουσίαση των βιοχημικών μηχανισμών που ελέγχουν την εύρυθμη καρδιακή λειτουργία.

1.2.1 Καρδιακός μυς - καρδιακός παλμός

Από όλα τα ιόντα που εμπλέκονται στην καρδιακή λειτουργία, το ασβέστιο θεωρείται ίσως το πιο σημαντικό. Είναι ζωτικής σημασίας για την ίδια τη διαδικασία που επιτρέπει στους κόπλους της καρδιάς να συστέλλονται και να χαλαρώνουν, μία διαδικασία που ονομάζεται σύζευξη διέγερσης-συστολής (D. M. Bers, 2002). Τα ερεθίσματα για συστολή των καρδιακών μυών ξεκινούν από το φλεβόκομβο (κόμβος SA) που αποτελείται από μια σειρά κυττάρων που ονομάζονται βηματοδοτικά (**Εικόνα 8**). Τα βηματοδοτικά κύτταρα αποπολώνονται με εισροή ιόντων Na⁺, και μόλις η διαφορά δυναμικού στη πλασματική μεμβράνη φθάσει το κατώφλι των -40 mV, τα κανάλια Ca²⁺ ανοίγουν και κατευθύνουν τη ροή Ca²⁺ στα κύτταρα των κόμβων. Λόγω των εισερχόμενων Ca²⁺, ο SA κόμβος αποκτά ένα ηλεκτρικό δυναμικό που διεγείρει τα άλλα καρδιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση παλμού (Germani et al. 2007).



Εικόνα 8: Δομή καρδιακού μυ και καρδιακών κυττάρων. Η καρδιά είναι ένας κοίλος μυς και αποτελέι μία φυσική αντλία, καθώς λαμβάνει το αίμα από τις φλέβες (σε χαμηλή πίεση) και το μεταφέρει στις αρτηρίες (με υψηλή πίεση). Τα καρδιακά κύτταρα (cardiomyocyte) αποτελούνται από μυϊκές ίνες, οι οποίες περιέχουν μυϊκά ινίδια και διαθέθουν ανεπτυγμένο ΣΔ και σύστημα αγωγών (το 1% των μυοκαρδιακών ινών αποτελούν το σύστημα αγωγής της καρδιακής διέγερσης, με αποτέλεσμα την έναρξη του καρδιακού παλμού και τη γρήγορη διάδοσή του μέχω χασμοσυνδέσεων). Οι καρδιακές μυϊκές ίνες (υς (myofibrils) περιέχουν υψηλή συγκέντρωση μυοσφαιρίνης, πολυάριθμα μιτοχόνδρια,

σαρκοπλασματικό δίκτυο και έχουν πλούσια αιμάτωση, είναι αρκετά βραχύς και ηλεκτρικά συζευγμένες με εμβόλιμους δίσκους. Έτσι όταν διεγερθεί μία από αυτές, το δυναμικό δράσης μεταδίδεται σ'ολόκληρο το μυ, επιτρέποντας να συσπατεί ως μία μονάδα (Gama-Carvalho, Andrade, & Brás-Rosário, 2014).

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος καταγραφής του καρδιακού παλμού είναι μέσω του ηλεκτροκαρδιογραφήματος (HKΓ – ECG), το οποίο αποτελεί την απεικόνιση της ηλεκτρικής δραστηριότητας της καρδιάς κατά τη συστολή και διαστολής της και ουσιαστικά αποτελεί το αποτύπωμα της καρδιακής λειτουργίας. Μέσω αυτού μπορούν να καταγραφούν και οι διαταραχές του μυοκαρδύου, καθώς η προβληματική διαχείρηση των Ca²⁺ από τα μυοκύτταρα είναι μια βασική αιτία τόσο της συστολικής δυσλειτουργίας όσο και των αρρυθμιών σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις (Pogwizd et al. 2001). Κατά τη φυσιολογική καρδιακή λειτουργία, κάθε κύκλος HKΓ αντιπροσωπεύει την ομαλή εξέλιξη της διαδικασίας πόλωσης/αποπόλωσης των καρδιακών κυττάρων και αποτελείται από πέντε σημαντικά σημεία που αναφέρονται ως P, Q, R, S και T όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9**. Η επιτυχής και ακριβής καταγραφή των σημαντικών σημείων βοηθά στην ανίχνευση των καρδιακών ανωμαλιών στο HKΓ (Sahoo, Thakkar, & Lee, 2017).







Εικόνα 9: Απεικόνιση ηλεκτροκαρδιογραφήματος (α) Φυσιολογικό ηλεκτροκαρδιογράφημα, όπου ανά καρδιακό παλμό καταγράφεται η κορυφή R (οξεία κορυφή) (β) Μη φυσιολογικό ηλεκτροκαρδιογράφημα, στο οποίο εμφανίζονται αλλοιώσεις στις κορυφές καθώς και στην καταγραφή των κυμάτων. Τα σημεία P, Q, R, S και T όπως απεικονίζονται, είναι αυτά που θα δώσουν την επιτυχή ανάγνωση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος, τα οποία εξάγονται από εξειδικευμένους αλγορίθμους (Sahoo, Thakkar, & Lee, 2017)

1.2.2 Μηγανισμός καρδιακού παλμού: σύζευξη διέγερσης – συστολής

Στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα, η αποπόλωση της πλασματικής μεμβράνης οδηγεί στο άνοιγμα των τασεοεξαρτώμενων L-τύπου καναλιών Ca²⁺ (Long-lasting – κανάλια που εμπλέκονται στη λειτουργία διέγερσηςσύσπασης), I_{Ca-L}, με αποτέλεσμα την είσοδο Ca²⁺ από τον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια, το Ca²⁺ συνδέεται απευθείας ή μέσω της καλμοδουλίνης (CaM) στην αμινοτελική περιοχή κάθε υπομονάδας του καναλιού **RyR2**, της κύριας ισομορφής του υποδοχέα ρυανοδίνης στα καρδιακά κύτταρα, ανοίγοντας το κανάλι και απευθείως ή μέσω της καλμοδουλίνης (CaM) στην αμινοτελική περιοχή κάθε υπομονάδας του καναλιού **RyR2**, της κύριας ισομορφής του υποδοχέα ρυανοδίνης στα καρδιακά κύτταρα, ανοίγοντας το κανάλι και απελευθερώνοντας Ca²⁺ από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ο υποδοχέας RyR2 δρα ως ενισχυτής σήματος μέσω μηχανισμών CICR. Ο συνδυασμός εισροής Ca²⁺ από το εξωτερικό του κυττάρου και της απελευθέρωσης Ca²⁺ από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα, έχει σαν αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της [Ca²⁺]_i (ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου), με την μορφή σπινθήρων Ca²⁺ (Ca²⁺ sparks), οδηγώντας στην πρόσδεση των Ca²⁺ στη τροπονίνη C των μυοϊνιδίων. Με την πρόσδεση των Ca²⁺ στη τροπονίνη C ενεργοποιείται ο μηχανισμός συστολής του μυός μέσω του συμπλέγματος τροπονίνης-μυσσίνης (Cheng et al. 1996). Ωστόσο, όσο τα επίπεδα Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα αυξάνονται, το Ca²⁺ προκαλεί το κλείσιμο του καναλιού RyR2. Αυτό προυποθέτει την ύπαρξη πολλαπλών θέσεων σύνδεσης για το Ca²⁺, με διαφορετικές συγγένειες και διαφορετικές κινητικές σύνδεσης. Το επόμενο στάδιο μετά τη σύσπαση που προκαλείται από την αύξηση του Ca²⁺, είναι η χαλάρωση του καρδιακού μυ, με επιστροφή κυρίως της περίσσειας του Ca²⁺ πίσω στο ΣΔ και επαναφορά της συγκέντρωσής του στα αρχικά επίπεδα, μέσω της ΑΤΡάσης SERCA (Εικόνα 10) (Janssen 2010; D. M. Bers, 2002).

Ta Ca²⁺ είναι ο διακόπτης που ενεργοποιεί τα μυϊκά νημάτια, ωστόσο η σύσπαση έχει διαβαθμίσεις και εξαρτάται κυρίως από τη [Ca²⁺] και από άλλους παράγοντες. Γενικά, η φυσιολογική συστολή παράγει τόσο ισομετρική δύναμη (ή κοιλιακή πίεση) όσο και ταχεία ισοτονική δύναμη (για την κυκλοφορία το αίματος). Υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι για να αλλάξει η δυναμική της καρδιακής συστολής: αλλάζοντας το πλάτος ή τη διάρκεια του σήματος Ca²⁺, καθώς και αλλάζοντας την ευαισθησία των μυϊκών νημάτιων σε Ca²⁺. Η ευαισθησία του μυονημάτιου σε Ca²⁺, ενισχύεται δυναμικά με την έκτασή τους (καθώς η καρδιά γεμίζει με αίμα), με αποτέλεσμα την ισχυρότερη συστολή. Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στην εγκάρσια συμπίεση του πλέγματος του νήματος που εμφανίζεται κατά το τέντωμα, γεγονός που ενισχύει την αλληλεπίδραση ακτίνης-μυσσίνης (Fukuda et al. 2001). Αυτή η πλευρική συμπίεση είναι ένας σημαντικός αυτορυθμιζόμενος μηχανισμός, με τον οποίο η καρδιά προσαρμόζεται στην αλλοιωμένη διαστολική πλήρωση (νόμος του Frank-Starling). Η ευαισθησία του μυϊκού νημάτιου σε Ca²⁺ μειώνεται με την οξέωση και με αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφορικών και Mg²⁺ (και το τρία, εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας). Η ευαισθησία του μυϊκού νημάτιου σε Ca²⁺ μειώνεται με την οξέωση και με αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφορικών και Mg²⁺ (και το τρία, εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας). Η ευαισθησία του μυϊκού νημάτιου σε Ca²⁺ μειώνεται με την οξέωση και με αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφορικών και Mg²⁺ (και το τρία, εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας). Η ευαισθησία του μυϊκού νημάτιου σε Ca²⁺ μειώνεται με την οξέωση και με αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφορικών και Mg²⁺ (και το τρία, εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας). Η ευαισθησία του μυϊκού νημάτιου σε Ca²⁺ μειώνεται με τοι οτροιο το πλάρες αυδο τοι το τρία και ορισμένα ινοτρόπα φάρμακα (D. M. Bers, 2002).

Για να χαλαρώσει ο καρδιακός μυς, η $[Ca^{2+}]$ πρέπει να μειωθεί σε επίπεδα ηρεμίας. Αυτό συμβαίνει μέσω δύο διεργασιών: (i) το Ca^{2+} επιστρέφει στο ΣΔ από την ATPάση- Ca^{2+} του ΣΔ (SERCA) όπως αναφέρθηκε παραπάνω ενώ (ii) εξάγεται από το κύτταρο μέσω του ανταλλάκτη Na^+/Ca^{2+} (NCX), με συνεισφορά από την ATPάση- Ca^{2+} της πλασματικής μεμβράνης. Η δραστικότητα του SERCA εξαρτάται τόσο από τη $[Ca^{2+}]$ όσο και από τη βοηθητική πρωτεΐνη φωσφολαμβάνη. Η μη φωσφορυλιωμένη φωσφολαμβάνη αναστέλλει το SERCA και όταν αυτή φωσφορυλιώνεται (όπως συμβαίνει κατά τη β-αδρενεργική διέγερση) αυτή η αναστολή σταματάει (Tada & Katz, 1982). Ο NCX χρησιμοποιεί την ενέργεια που προσφέρεται από τρία ιόντα Na^+ που εισέρχονται στο κύτταρο για να αντλήσουν ιόντα Ca^{2+} έξω, δημιουργώντας έτσι μια διαφορά δυναμικού . Πρέπει να τονιστεί ότι οι μεταβολές στη $[Ca^{2+}]$ είναι το κύριο μέσο με το οποίο ελέγχεται η συσταλτικότητα της καρδιάς, καθώς σε φυσιολογικές συνθήκες η ποσότητα του Ca^{2+} που εισέρχεται από τη πλασματική μεμβράνη πρέπει να ισούται με εκείνη που αντλείται έξω από αυτό και η ποσότητα που απελευθερώνεται από το ΣΔ πρέπει να ισούται με την ποσότητα που λαμβάνεται πίσω στο ΣΔ (Eisner, 2014).



Εικόνα 10: Τα γεγονότα που εμπλέκονται στη σύζευξη διέγερσης-συστολής. Το διάγραμμα δείχνει την επιφάνεια της μεμβράνης και τον Τ-σωληνίσκο ενός κοιλιακού μυοκυττάρου. (1) Η ανάπτυξη διαφοράς δυναμικού οδηγεί στο άνοιγμα του καναλιού Ca^{2+} τύπου L (I_{Ca-L}) και στην αύξηση της $[Ca^{2+}]$ κοντά στον υποδοχέα της ρυανοδίνης 2 (RyR2). (2) Η αύξηση της $[Ca^{2+}]$ οδηγεί στο άνοιγμα του RyR2, απελευθερώνοντας περισσότερο Ca^{2+} από το σαρκοπλασμικό δίκτυο (ΣΔ) και παράγοντας παροδικά συστολικό Ca^{2+} . (3) Οι παροδικές πτώσεις του Ca^{2+} που οφείλονται στο κλείσιμο του RyR2 και στην άντληση του Ca^{2+} πίσω στο ΣΔ από την ΑΤΡάση- Ca^{2+} του ΣΔ (SERCA). (4) Το ασβέστιο αντλείται επίσης έξω από το κύτταρο με τη βοήθεια του ανταλλάκτη Na⁺/Ca²⁺ (NCX) (Eisner, 2014).

1.3 <u>Υποδοχείς Ρυανοδίνης (RyRs)</u>

Οι υποδοχείς ρυανοδίνης (RyRs) ανακαλύφθηκαν ως πρωτεΐνες με θέσεις πρόσδεσης μεγάλης συγγένειας για το αλκαλοειδές ρυανοδίνη, το οποίο προέρχεται από το φυτό της Ν. Αμερικής Ryania speciosa, γνωστό για την εντομοκτόνο δράση του, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει δηλητηριώδη δράση παρεμποδίζοντας την εύρυθμη καρδιακή λειτουργία (F. A. Lai et al. 1989). Σε συγκεντρώσεις της τάξης των nM η ρυανοδίνη "κλειδώνει" τον υποδοχέα σε μια μισάνοιχτη κατάσταση, προκαλώντας την αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης Ca^{2+} , η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το μηχανισμό CICR, που αναφέρθηκε και παραπάνω, από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, με συνέπεια την ολική μυϊκή σύσπαση. Σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM το κανάλι ρυανοδίνης κλείνει τελείως οδηγώντας σε χάλαση. Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί έως σήμερα τρεις διαφορετικές ισομορφές των υποδοχέων ρυανοδίνης (RyR1–3). Ο υποδοχέας RyR1, είναι ο πρώτος που απομονώθηκε και εκφράζεται κυρίως στους σκελετικούς μυς, ο RyR2 κυρίως στην καρδιά και ο RyR3 κυρίως στον εγκέφαλο, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται και σε άλλους κυτταρικούς τύπους (εξωκρινή, επιθηλιακά κύτταρα κ.λπ.). Είναι υπεύθυνοι για την απελευθέρωση Ca^{2+} εξαρτώμενες λειτουργίες του κυτάρου. Είναι κυρίως γνωστοί για τη συμμετοχή τους στη σύζευξη διέγερσης-συστολής της καρδιάς μέσω απελευθέρωσης Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, διαδικασία μέσω της οποίας ελέγχουν πολλές Ca^{2+} -εξαρτώμενες λειτουργίες του κυττάρου. Είναι κυρίως γνωστοί για τη συμμετοχή τους στη σύζευξη διέγερσης-συστολής της καρδιάς μέσω απελευθέρωσης Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (Wehrens & Marks, 2005)

1.3.1 Υποδοχείς RyRs και ισομορφές τους

Oi υποδοχείς ρυανοδίνης (στο εξής RyRs) είναι μία οικογένεια διαύλων από κατιόντα υψηλής αγωγιμότητας τα οποία απελευθερώνουν Ca^{2+} από τις ενδοκυττάριες αποθήκες όπως είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Ιστορικά, η έρευνα σε αυτά τα κανάλια έχει επικεντρωθεί στους ρόλους τους στη σύζευξη διέγερσης-συστολής (ECC, **Κεφάλαιο 2**), μηχανισμός που ενεργοποιεί τη συστολή στους μυϊκούς ιστούς. Oi RyRs των θηλαστικών κωδικοποιούνται από τρία ξεχωριστά γονίδια, τα προϊόντα των οποίων έχουν 65% ομολογία μεταξύ τους ενώ τροποποιούνται μεταμεταγραφικά και μεταμεταφραστικά, δημιουργώντας μια δομική και λειτουργική ποικιλομορφία (Sorrentino, Barone, & Rossi, 2000). Oi RyRs αλληλεπιδρούν με μια πληθώρα προσδετών, συμπεριλαμβανομένου του Ca^{2+} σε νανομοριακές έως μικρομοριακές συγκεντρώσεις (CICR), ενώ προκαλούν αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις με τα τασεο-εξαρτώμενα L-τύπου κανάλια Ca^{2+} , την ATP και ενδεχομένως την ADP κυκλική ριβόζη (cADPr). Αναστολείς αυτών των καναλιών αποτελούν μεταξύ άλλων το Ca^{2+} σε συγκεντρώσεις της τάξης των μΜ και Mg²⁺ σε συγκεντρώσεις της τάξης των μΜ και Mg²⁺ σε συγκεντρώσεις της τάξης mM (Mackrill, 2010).

Οι RyRs, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εμφανίζονται στα θηλαστικά σε τρεις ισομορφές: την RyR1, την RyR2 και την RyR3. Ο τύπος 1 RyR (στο εξής RyR1) εκφράζεται σε μεγαλύτερα επίπεδα στο ΣΔ των τερματικών δεξαμενών του σκελετικού μυός (Takeshima et al. 1989; Zorzato et al. 1990). Ο RyR1 εμφανίζεται επίσης να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στον καρδιακό μυϊκό ιστό, τους λείους μυς (Neylon et al. 1995), το στομάχι, τα νεφρά, τον θύμο αδένα(Nakai et al., 1990; Giannini et al. 1995) παρεγκεφαλίδα, κύτταρα του Purkinje, επινεφρίδια, και όρχεις (Marks et al. 1989; Takeshima et al. 1989; Furuichi et al. 1994). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο RyR1 εκφράζεται επίσης σε Β-λεμφοκύτταρα (Vukcevic et al. 2010). Η κυρίαρχη μορφή του RyR στον καρδιακό μυ είναι ο τύπος 2 RyR (στο εξής RyR2) (Nakai et al., 1990; Otsu et al., 1990). Ο RyR2 εκφράζεται επίσης σε υψηλά επίπεδα σε κύτταρα του Purkinje της παρεγκεφαλίδας και του εγκεφάλου (F. Aa Lai et al., 1992; Nakanishi, Kuwajima, & Mikoshiba, 1992; Sharp et al. 1993; Furuichi et al. 1994) και σε χαμηλά επίπεδα στο στομάχι, τους νεφρούς, τους αδένες, τις ωοθήκες, τον θύμο αδένα και τους πνεύμονες (Kuwajima et al. 1992; Giannini et al. 1995). Ο τύπος 3 RyR (στο εξής RyR3) εκφράζεται σε νευρώνες του ιππόκαμπου, κύτταρα του Purkinje, στο ραβδωτό σώμα (Hakamata et al. 1992; Furuichi et al. 1994), σκελετικούς μύες (υψηλότερη έκφραση στο διάφραγμα) (Neylon et al. 1995; Marks et al. 1989), κύτταρα λείων μυών του στεφανιαίου αγγειακού συστήματος, πνεύμονα, νεφρό, σπλήνα, στομάχι και αορτή ποντικού, τη μήτρα, την ουροδόχο κύστη και τον οισοφάγο κουνελιού (Giannini et al. 1992; Giannini et al. 1995; Hakamata et al. 1992; Ottini et al. 1996). Αντίστοιγα, στα μη θηλαστικά σπονδυλωτά εκφράζονται δύο ισομορφές των RyRs και συγκεκριμένα οι ισομορφές α και β. Ο RyRa, φαίνεται να είναι ομόλογος με την ισομορφή RyR1 του σκελετικού μυός των θηλαστικών, είναι άφθονος στο σκελετικό μυ και σε χαμηλά επίπεδα εκφράζεται στον εγκέφαλο, ενώ ο RyRβ φαίνεται να είναι ομόλογος με την ισομορφή RyR3 των θηλαστικών και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και όργανα συμπεριλαμβανομένων του σκελετικού και καρδιακού μυός, της παρεγκεφαλίδας, του πνεύμονα και του στομάχου (Ottini et al., 1996; Oyamada et al. 1994).

Οι τρεις αυτές ισομορφές κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια στον ανθρώπο, τα οποία εντοπίζονται και σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Wehrens & Marks, 2005). Από την αμινοξική αλληλούχιση των RyRs που παράχθηκε από cDNA κλωνοποίηση, βρέθηκε ότι τα μόρια αυτά είναι ομοτετραμερή, όπου το κάθε μονομερές αποτελείται από περίπου **5.000 αμινοξέα** και περίπου **565 kDa** (Hakamata et al. 1992; Tunwell et al. 1996). Οι τρεις αυτές ισομορφές εμφανίζουν ομολογία περίπου κατά **65%** όπως έχει ήδη αναφερθεί, ενώ διαθέτουν τρεις κύριες περιοχές διαφοροποίησης κυρίως για τις ισομορφές RyR1 και RyR2 (**Πίνακας 1**) (Hakamata et al. 1992), οι οποίες θα μπορούσαν και να αφορούν την εξειδικευμένη λειτουργία της κάθε ισομορφής.

Πίνακας 1:	Περιοχές	διαφοροποίησης ποι) εντοπίζονται	στην πρωτοταγή	δομή (αμινοξική	j ακολουθία) τω ν
ισομορφών	RyR1 και	RyR2.				

DR1	[4254-4631]	[4210-4562]
DR2	[1342-1403]	[1353-1397]
DR3	[1872-1923]	[1852-1890]

Περιοχή διαφοροποίησης	Αμινοξική Ακολουθία του RyR1	Αμινοξική Ακολουθία του RyR2
------------------------	------------------------------	------------------------------

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στον υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου 2 (RyR2) του καρδιακού μυ καθώς και στην αλληλεπίδρασή του με την καλμοδουλίνη (calmodulin, CaM), της σημαντικότερης πρωτεΐνης-ρυθμιστή Ca²⁺ στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

1.3.2 Δομή των RyR1 και RyR2

OI RyRs αποτελούνται από τέσσερα μονομερή (MB μονομερούς: ~565 kDa) τα οποία αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν ένα λειτουργικό κανάλι Ca²⁺ (MB: ~2.3 MDa) με σχήμα μανιταριού, καθιστώντας τους υποδοχείς αυτούς το μεγαλύτερο γνωστό πρωτεϊνικό κανάλι Ca²⁺ (F. A. Lai et al. 1989). Το ομοτετραμερές αυτό σύμπλοκο είναι εξαιρετικά σταθερό και λόγω του τεράστιου μεγέθους του, μπορεί να υποβληθεί σε κρυσηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-electron microscopy, στο εξής cryo-EM) και ανάλυση εικόνας για τη δημιουργία χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μορίου (Samso & Wagenknecht, 1998; Serysheva, 2004) στα 14 Å (Serysheva et al. 2005) και ~ 30 Å (Radermacher et al. 1994; Sharma et al. 2006). Η δομή του υποδοχέα RyR2 δεν είναι ακόμα διαθέσιμη έστω και σε χαμηλή ατομική ανάλυση. Καθώς όμως όλες οι ισομορφές εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στη αμινοξική τους ακολουθία (>65%), αναμένεται ότι οι ανώτερες δομές τους θα έχουν πολύ μικρές διαφοροποιήσεις.

Με βάση αυτά τα δεδομένα και τη χρήση τοπολογικών μοντέλων έχει αποκαλυφθεί μία τετραγωνική δομή με μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή (περίπου το 90% της αμινοξικής ακολουθίας (F. A. Lai et al. 1989), το «καπάκι» του μανιταριού) καθώς και μικρότερες σε έκταση διαμεμβρανικές περιοχές (καρβοξυ-τελικό άκρο, στο εξής καρβοξυτελικό) (**Εικόνα 11**). Η ασυνήθιστη αυτή δυσαναλογία μεγεθών μπορεί ίσως να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το τμήμα αυτό αποτελεί μονάδα σύνδεσης για πολλές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη λειτουργία του υποδοχέα όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Η ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης RyR έχει δείξει, ότι η αλληλουχία στο καρβοξυτελικό άκρο περιέχει έως και 12 υδρόφοβες ελικοειδείς περιοχές, οι οποίες είναι και οι διαμεμβρανικές περιοχές (Takeshima et al. 1989; Nakai et al., 1990; Zorzato et al. 1990; Tunwell et al. 1996; Hakamata et al. 1992; Otsu et al., 1990). Τα μοντέλα μέχρι και σήμερα υποδεικνύουν 4 (Takeshima et al. 1989), 6 (Tunwell et al. 1996), 12 (Zorzato et al. 1990) ή 6-8 διαμεμβρανικές περιοχές ανά μονομερές με μία διαμεμβρανική περιοχή, η οποία σχηματίζει τον πόρο προς την εσωτερική πλευρά (Du, Sandhu, Khanna, Guo, & MacLennan, 2002). Η μεγάλη αμινο-τελική περιοχή (στο εξής αμινοτελική) διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για μόρια τα οποία διαμορφώνουν το κανάλι και ρυθμίζουν τη διαμόρφωση του καναλιού, όπως είναι οι πρωτεΐνες σύνδεσης FK506: FKBP12 (calstabin1) και FKBP12.6 (calstabin2) (Marx et al. 2000). Για παράδειγμα, η σύνδεση της FKBP12/12.6 με τον RyR σταθεροποιεί το κανάλι στην κλειστή του διαμόρφωση. Τα τοπολογικά μοντέλα, δείχνουν ότι το μόριο RyR1/RyR2 υφίσταται σημαντικές δομικές αλλαγές κατά τη μετάβαση από ανοικτή σε κλειστή δομή και πως ο RyR2 έχει διαφορετική διαμόρφωση όταν συνδέεται με FKBP12.6. O RyR2 συγκεκριμένα, διαθέτει τρία μοτίβα «φερμουάρ» λευκίνης/ισολευκίνης (leucine zippers), τα οποία επιτρέπουν τη δέσμευση των πρωτεϊνών σπινοφιλίνη, PR130 και mAKAP, οι οποίες στοχεύουν αντίστοιχα τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες PP1 και PP2A και την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) στο σύμπλοκο του καναλιού (Wehrens & Marks, 2005).



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα της πρωτέινης RyR. (Α) Διάγραμμα που δείχνει την πρωτεΐνη RyR με τις διαμεμβρανικές περιοχές (TM-transmembrane) και τον πόρο. Επίσης παρουσιάζονται τα «φερμουάρ» λευκίνης/ισολευκίνης και η θέση δέσμευσης της FKBP12/FKBP12.6. (Β) Η προτεινόμενη οργάνωση των διαμεμβρανικών περιοχών, όπου σύμφωνα με τον MacLennan et al. (Du et al. 2002) οι περιοχές των TM αριθμούνται από 1-8 (M1-M8), ενώ στη συνέχεια είναι ο πόρος (M9) (Wehrens & Marks, 2005).

Πρόσφατες μελέτες, πέτυχαν μέσω <u>cryo-EM</u> την ανάλυση της τρισδιάστασης δομής του συμπλόκου RyR1calstabin2 (επίσης γνωστό ως FKBP12.6), από το σκελετικό μυ κουνελιού (*Oryctolagus cuniculus*) στην ατομική ανάλυση των 6.1 Å (Efremov et al. 2015) και των 4.8 Å (Zalk et al. 2015).

Η αρχιτεκτονική του RyR1 (Εικόνα 12), απέδειξε ότι αποτελείται από τέσσερα μονομερή τα οποία περιβάλλουν έναν κεντρικό διαμεμβρανικό πόρο (καρβοξυτελικό άκρο), ο οποίος συμπίπτει με τον άξονα συμμετρίας τάξεως 4 του τετραμερούς. Τα τέσσερα αυτά μονομερή απότελούν την κυτταροπλασματική περιοχή, η οποία αποκαλείται και "πόδι" (the foot) και δημιουργούν μία μεγάλη περιοχή με κοιλότητες και μικροδομές που διευκολύνουν την αλληλεπίδραση με διαλύτες, μικρά μόρια και πρωτεΐνες-ρυθμιστές (αμινοτελικό άκρο, βλέπε παρακάτω). Η κυτταροπλασματική περιοχή του τετραμερούς RyR1 εκτίνεται στις περιοχές που αφορούν τις γωνίες του τετραμερούς, γνωστές ως σφιγκτήρες (clamps), ενώ μεγαλύτερες δομές σγηματίζουν τις πλευρικές περιοχές της κυτταροπλασματικής περιοχής γνωστές ως λαβές (handles). Κάθε μονομερές βρίσκεται γύρω από ένα εκτεταμένο ικρίωμα, στην κυτταροπλασματική περιοχή, επαναλαμβανώμενων μοτίβων α-σωληνοειδούς (asolenoid, που ονομάζεται α-σωληνοειδές 1) (Groves & Barford, 1999). Αυτό το ικρίωμα, σχηματίζεται από ~37 επαναλήψεις α-ελικοειδών μοτίβων φουρκέτας, σε μία αρχιτεκτονική που περιλαμβάνει 2.217 αμινοξικά κατάλοιπα. Το ικρίωμα του α-σωληνοειδούς βρίσκεται τόσο στο αμινοτελικό άκρο, το οποίο αποτελείται από δύο δομικές περιοχές β-τριφυλλιού (b-trefoil), την Ν-τελική περιοχή (NTD) - Α και την περιοχή NTD-B, οι οποίες συνθέτουν έναν κεντρικό κυτοσολικό πυρήνα, ότι και στο καρβοζυτελικό άκρο του διαμεμβρανικού πόρου που υιοθετεί τέτοια δομή, τοποθετώντας τον στην υπεροικογένεια των ιοντικών καναλιών με 6 διαμεμβρανικές περιοχές (6TM), η οποία περιλαμβάνει τα κανάλια τάσης K⁺/Na⁺ και τα κανάλια TRP (Transient Receptor Potential Channels). Το ικρίωμα του α-σωληνοειδούς αποτελείται από πέντε κύριες περιοχές: τρεις SPRY περιοχές (SPRY1-3) και δύο ζεύγη επαναλήψεων RyR (RY12 και RY34, όπου το τελευταίο περιέχει μια θέση φωσφορυλίωσης της ρυθμιστικής πρωτεϊνικής κινάσης A στη Ser2843) (Zalk et al. 2015). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η προεξοχή του α-σωληνοειδούς περιλαμβάνει την αμινοξική ακολουθία (στο εξής αα) 3550-3650, περιοχή στην οποία εντοπίζεται η κύρια θέση πρόσδεσης της CaM (Efremov et al. 2015), η οποία αποτελεί ρυθμιστή του υποδοχέα, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.



Εικόνα 12: Η αρχιτεκτονική του RyR1 στα 4.8Å. (α) Προβολή από την πλευρά της μεμβράνης του ΣΔ μιας πυκνής πλάκας (μπλε πλέγμα) που συμπίπτει με τον άξονα του καναλιού, (β) Αναπαράσταση με χρωματική κωδικοποίηση του RyR1 όπου B-sol: σωληνοειδής γέφυρα, C-sol: σωληνοειδής πυρήνας, N-sol: σωληνοειδές αμινοτελικό άκρο, (γ) Προβολή στο επίπεδο της μεμβράνης του σαρκοπλασμικού δικτύου, (δ) Προβολή από το κυτταρόπλασμα, (ε) Προβολή από το εσωτερικό του χάρτη πυκνότητας του σκελετικού μυός RyR1 σε ανάλυση 5.0 Å, όπου με χρώμα φαίνεται το ένα μονομερές, σύμφωνα με τις περιοχές που αντιστοιχούν στο μοντέλο, χρωματισμένο ως εξής: μπλε: αμινοτελική περιοχή, κυανό: SPRY1, SPRY2 και SPRY3, ροζ περιοχή σφιγκτήρα (επαναλήψεις RY12) και περιοχή φωσφορυλίωσης (επαναλήψεις RY34), κίτρινο: καλσταβίνη, πράσινο: το ικρίωμα σωληνοειδούς γέφυρας, κόκκινο: ο πυρήνας του σωληνοειδούς και πορτοκαλί: διαμεμβρανικές και καρβοζυτελικές περιοχές, μωβ: πιθανή περιοχή δέσμευσης Ca²⁺ (EF). Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τμήματα χωρίς σαφή διαμόρφωση (αναπροσαρμογή από Zalk et al., 2015).

Οι τρεις δομικές περιοχές SPRY (SPRY1, SPRY2 και SPRY3), διατάσσονται σε συστάδα κοντά στην περιφέρεια του α-σωληνοειδούς. Οι περιοχές SPRY σχηματίζουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα ένα από τα πιο συνηθισμένα μοτίβα των β-πτυχωτών επιφανειών, τα β-σάντουιτς και διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών. Υπάρχουν ως κεντρικές δομικές περιοχές στις λιγάσες, δρουν ως συνδέτες σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες και διευκολύνουν τη συναρμολόγηση των μακρομοριακών συμπλόκων (Perfetto et al. 2013). Ο λειτουργικός ρόλος των SPRY περιοχών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Ωστόσο, οι θέσεις τους στο RyR1 υποδηλώνουν ότι μεταξύ άλλων πιθανών λειτουργιών, διατηρούν τη δομική ακεραιότητα του υποδοχέα, μεσολαβώντας στην επαφή των δύο δομικών περιοχών του α-σωληνοειδούς (1 και 2) και παρέχοντας ένα ικρίωμα για τη δομική περιοχή των επαναλήψεων 1-2 (repeat 1-2 domain) (Efremov et al. 2015).

Μια δεύτερη περιοχή α-σωληνοειδούς, που ονομάζεται α-σωληνοειδές 2, σχηματίζει τις άκρες του τετραγώνου όπως γίνεται στην κυτταροπλασματική περιοχή του RyR1 (σφιγκτήρες). Αποτελείται από 38 αέλικες και σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, εκτείνεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 1920-3500. Στο επίπεδο της τριτοταγούς δομής, επεκτείνεται μεταξύ των περιοχών SPRY του ενός μονομερούς και στην περιοχή του σωληνοειδούς 1 του γειτονικού μονομερούς. Μέχρι και σήμερα ο ρόλος των δομικών περιοχών των σωληνοειδών α είναι γνωστός για τη δέσμευση άλλων πρωτεϊνών (ρυθμιστικών) (Kobe & Kajava, 2000). Επομένως, είναι πιθανόν ορισμένες από τις πρωτεΐνες-ρυθμιστές του RyR1 να προσδένονται στις περιοχές αυτές.

Στην αλληλουχία του RyR1, τέσσερις επαναλήψεις μήκους ~110 αμινοξέων οργανώνονται διαδοχικά ανά δύο (repeat 1-2 και repeat 3-4), με κάθε ζεύγος που να αναδιπλώνεται να σχηματίζει μία διαμόρφωση σε σχήμα V (Zorzato et al. 1990). Η επανάληψη 1-2 εντοπίστηκε στις γωνίες της κυτταροπλασματικής περιοχής και αλληλεπιδρά με την περιοχή SPRY2, ενώ η επανάληψη 3-4 τοποθετείται στην κορυφή της κεντρικής περιοχής

του α-σωληνοειδούς 2. Η επανάληψη 1-2 πιθανώς να είναι ο μεσολαβητής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μονομερών του RyR1 (Ferguson, Schwartz, & Franzini-Armstrong, 1984). Η επανάληψη 3-4 περιλαμβάνει τη θέση φωσφορυλίωσης στη Ser2843 στη θηλιά που είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια του RyR1 και βρίσκεται απέναντι από την περιοχή SPRY1. Στη συγκεκριμένη περιοχή, έχουν εντοπιστεί 7 μεταλλάξεις οι οποίες έχουν συνδεθεί με ασθένειες (Yuchi, Lau, & Van Petegem, 2012). Επίπρόσθετα, έχει βρεθεί πως η επανάληψη 3-4, συμβάλλει στην απευθείας αλληλεπίδραση του RyR με το κανάλι ασβεστίου DHPR (Dihydropyridine Receptor-υποδοχείς διυδροξυπυριδίνης, διαμεμβρανικός δίαυλος ασβεστίου του συστήματος σωληνίσκων Τ, αλλιώς γνωστό ως κανάλι Cav1.1), γεφυρώνοντας τη στενή κυτταροπλασματική περιοχή ανάμεσα στις μεμβράνες του συστήματος σωληνίσκων Τ και αυτών του ΣΔ (Lanner et al. 2010).

Παράλληλα, στο τελικό τμήμα του α-σωληνοειδούς 1, έχει εντοπιστεί ένα ζέυγος δομικού μοτίβου EF-hand, παρόμοια με αυτά της CaM (βλέπε παρακάτω), μήκους 50 αμινοξικών καταλοίπων. Τέτοιες περιοχές είναι γνωστό ότι λειτουργούν ως αλλοστερικοί διακόπτες που ενεργοποιούνται κατά τη σύνδεση με το Ca²⁺ (Kuboniwa et al. 1995). Καθώς οι συγκεντρώσεις Ca²⁺ της τάξης των μΜ ενεργοποιούν τον RyR1, η εγγύτητα της περιοχής του μοτίβου EF-hand στο ιοντικό κανάλι υποδηλώνει την ύπαρξη ενός αλλοστερικού μοριακού μηχανισμού που επάγεται από τα Ca²⁺ και λειτουργεί ρυθμιστικά στη λειτουργία του καναλιού RyR1.

Η αρχιτεκτονική του πόρου του RyR1 τον κατατάσσει στην υπεροικογένεια των 6 TM ιοντικών διαύλων, με έξι διαμεμβρανικές έλικες (S1-S6) ανά μονομερές να περιβάλλουν τον κεντρικό πόρο. Ένα εκτεταμένο πεπτίδιο (το τμήμα P, the P-segment), δομικά ανάλογο του φίλτρου εκλεκτικότητας των διαύλων καλίου και νατρίου, οριοθετεί το άνοιγμα προς τον αυλό του ΣΔ (Εικόνα 13γ). Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από δύο περιοχές: την περιοχή του πόρου, που σχηματίζεται από τα S5, S6, την έλικα του πόρου και το τμήμα P, καθώς και μία περιοχή ψευδοαισθητήρα τάσης (pseudo voltage-sensor domain, pVSD), που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές έλικες S1-S4 που αλληλεπιδρά με τη δομή του πόρου του γειτονικού μονομερούς (Εικόνα 13δ) (Zalk et al. 2015).



Εικόνα 13: Διαμεμβρανικός πόρος RyR1 και C-τελική περιοχή. (α) Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας της περιοχής των πόρων (μαύρο πλέγμα) και ο πυρήνας του σωληνοειδούς (μπλε πλέγμα) μαζί με τη διαμεμβρανική περιοχή ενός μονομερούς (το αμινοτελικό άκρο είναι μπλε, το καρβοξυτελικό είναι κόκκινο), (β) Περιστροφή κατά 90[°] της πλάκας από την πλευρά της μεμβράνης, όπου τα νούμερα υποδηλώνουν τις θέσεις των 6 διαμεμβρανικών ελίκων, (γ) Η διαμεμβρανική περιοχή ενός μονομερούς σε χρωματισμό των επιμέρους δομικών στοιχείων, (δ) Αλληλοκάλυψη του πόρου του RyR1 με τη δομή ενός τασεο-ελεγχόμενου καναλιού νατρίου (NavAB, κωδικός PDB: 3RVY) (Zalk et al. 2015)

Στις μέρες μας, έχει ταυτοποιηθεί μέσω <u>κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ</u>, η κρυσταλλική δομή της αμινοτελικής περιοχής ποντικού τόσο του υποδοχέα RyR2 (αα 1-217) όσο και του RyR1 (αα 9-205) στα 2.55Å και 2.9Å, αντιστοίχως (Lobo & Van Petegem, 2009). Δομική πληροφορία υπάρχει επίσης για την NTD περιοχή του RyR1 (210 κατάλοιπα) στα 2.5Å (Amador et al. 2009), καθώς επίσης και για την αα 1-559 του RyR1 στα 2.5Å (Tung et al. 2010), ενώ τέλος πληροφορία υπάρχει για την περιοχή SPRY2 και για τον RyR1 και RyR2 στα 1.34 – 1.84 Å (Lau & Van Petegem, 2014).

Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του RyR1 (αα 1-559, ανάλυση 2.5Å) από κύτταρα κουνελιού, αυτή αποτελείται από τρεις διακριτές δομές (A, B και C), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω μιας κύριας υδρόφιλης διεπιφάνειας (Εικόνα 14). Η δομική περιοχή A (με αα 1-205), αποτελείται από ένα μοτίβο β-τριφυλλιού με μία επιπλέον α-έλικα, η περιοχή B (αα 206-394) σχηματίζει επίσης ένα δομικό μοτίβο β-τριφύλλι, ενώ η περιοχή C (αα 395-532) σχηματίζει μία συστάδα πέντε α-ελίκων. Τα αμινοξικά κατάλοιπα, δεν είναι ορατά στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και έτσι μπορεί να είναι δομικό μέρος κάποιας άλλης περιοχής. Οι διεπιφάνειες των δομικών περιοχών καλύπτουν ένα μέρος επιφάνειας της τάξης των 1.687Å², εκ των οποίων τα 517Å² είναι υδρόφοβου χαρακτήρα. Χαρτογραφήθηκαν επίσης στη δομική περιοχή ABC, μία πληθώρα σημειακών μεταλλάξεων που σχετίζονται με ασθένειες (33 για τον RyR1 και 23 για τον RyR2) (Tung et al. 2010).

Χαρτογραφήθηκαν οι θέσεις των 33, σχετιζόμενων με ασθένειες, μεταλλάξεων σε RyR1 και 23 τέτοιων μεταλλάξεων σε RyR2 στη δομή RyR1 ABC. Οι θέσεις αυτές των μεταλλάξεων μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες: (1) αυτές που είναι πλήρως θαμμένες μέσα στο εσωτερικό του μορίου και έτσι πιθανόν να προκαλέσουν λανθασμένη αναδίπλωση της περιοχής αυτής (6 μεταλλάξεις) (2) αυτές που βρίσκονται στις διεπιφάνειες μεταξύ των περιοχών Α, Β και C εντός μιας υπομονάδας και έτσι πιθανώς να αποσταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις των περιοχών αυτών (15 μεταλλάξεις) και (3) εκείνων που βρίσκονται σε διεπιφάνειες άλλων περιοχών του RyR (35 μεταλλάξεις), συμπεριλαμβανομένων των διεπιφανειών κατά μήκος των υπομονάδων. Παρά την ύπαρξη μίας μεγάλης επιφάνειας των τριών αυτών περιοχών (ABC) εκτεθειμένης στο διαλύτη κατά μήκος του RyR1, όλες οι μεταλλάξεις εν τέλει είναι είτε θαμμένες στο εσωτερικό του μορίου είτε στις διεπιφάνειες των περιοχών αλληλεπίδρασης. Καμιά από τις μεταλλάξεις δεν εκτίθεται απλώς σε διαλύτη, όπου θα ήταν λιγότερο πιθανό να προκαλέσει μια λειτουργική αλλαγή (Tung et al. 2010).



Εικόνα 14: Κρυσταλλική δομή των περιοχών Α, Β και C του RyR1. (α) Δομή του RyR1 από κύτταρα κουνελιού για τα αα 1-559. Αυτό το τμήμα του RyR1 αποτελείται από την περιοχή Α (μπλε, αα 1-205), την περιοχή Β (πράσινο, αα 206-394) και την περιοχή C (κόκκινο, αα 395-532). Τα υπόλοιπα 27 αα δεν είναι ορατά εξαιτίας της χαμηλής τους ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Οι εύκαμπτοι βρόχοι εμφανίζονται ως διακεκομμένες γραμμές, ενώ βλέπουμε αριθμημένες τις α-έλικες (α1α6) και β-έλικες (1-24), (β) Διαφορετική προβολή του (α), (γ) Τυπικός χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε τυχαία επιλεγμένη περιοχή (Tung et al. 2010).

1.3.3 Δομικές μεταβολές των RyRs κατά τη μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση

Στις μέρες μας υπάρχει μια αρκετά καθαρή εικόνα για το πώς ενεργοποιείται ένας υποδοχέας RyR: το σήμα έναρξης είναι η είσοδος Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα, οπότε ο RyR αποκρινόμενος στην αύξηση αυτή μεταβαίνει από την κλειστή στην ανοιχτή του διαμόρφωση και επιτρέπει την έξοδο των Ca^{2+} από το ΣΔ. Η αποτελεσματικότητα του σήματος έναρξης είναι ανάλογη του ρυθμού μεταβολής και της τελικής συγκέντρωσης των Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα και μόνο ένα σήμα με τα σωστά χαρακτηριστικά οδηγεί στην ενεργοποίηση των RyRs του κυττάρου (Fabiato, 1985). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο χρόνος που απαιτείται για τη μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση του υποδοχέα και το αντίστροφο είναι της τάξης των 20 ms (D. M. Bers, 2001; Fill & Copello, 2002).

Συγκεκριμένα, η δέσμευση του Ca^{2+} στον RyR, πραγματοποιείται στην περιοχή που εντοπίζεται το μοτίβο EF-hand και οδηγεί τον υποδοχέα σε αλλαγή διαμόρφωσης. Η δέσμευση αυτή τροποποιεί τη θέση του ασωληνοειδούς 1 σε σχέση με τις καρβοξυτελικές και διαμεμβρανικές περιοχές, γεγονός που αυξάνει τη μέση διάμετρο του πόρου. Όπως και κάθε άλλο μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (N. Fischer et al. 2010), ο RyR1 (2.3-MDa) υφίσταται θερμικές μετατοπίσεις που συμβαίνουν σε χιλιοστά του δευτερολέπτου και παρατηρούνται σε όλες τις διαφορετικές διαμορφώσεις που μπορεί να υιοθετήσει ο υποδοχέας. Αυτές οι θερμικές κινήσεις είναι ικανές να ανοίζουν προσωρινά τον πόρο των ιόντων (**Εικόνα 15**) για μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου (Smith et al. 1988). Κατά το μηχανισμό αυτό, η πιθανότητα ανοίγματος του καναλιού εξαρτάται από τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης που δευσμεύεται στον RyR γύρω από τις εσωτερικές έλικες, η οποία πρωτεΐνη ρυθμίζεται αλλοστερικά από το μοτίβο EF-hand, το οποίο λειτουργεί ως διακόπτης διαμόρφωσης που ενεργοποιείται με Ca²⁺ (Kuboniwa et al., 1995). Παρουσία περίσσειας Ca²⁺, το μοτίβο EF-hand αλλάζει τη διαμόρφωση των διαμεμβρανικών ελίκων που σχηματίζουν τον πόρο, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα να βρεθεί ο υποδοχέας στην ανοικτή διαμόρφωση, αλλά δεν αλλάζει τη χρονική διάρκεια που παραμένει στη κατάσταση αυτή (Sitsapesan & Williams, 1994).

Ο παραπάνω προτεινόμενος μηχανισμός εξηγεί επίσης την επίδραση που έχει στον πόρο η δέσμευση των ρυθμιστών στην κυτταροπλασματική περιοχή του RyR. Το FKBP, για παράδειγμα, δεσμεύεται 100Å μακριά από τον πόρο και σταθεροποιεί τόσο τις ανοιχτές όσο και τις κλειστές καταστάσεις του καναλιού (Gaburjakova et al. 2001; Ahern, Junankar, & Dulhunty, 1994), αφού «σφίγγει» δύο περιοχές του RyR και έτσι επιβραδύνει τη συνολική κίνηση των πρωτεϊνών. Οι μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με ασθένειες και εντοπίζονται στις διεπιφάνειες των κυτταροπλασματικών περιοχών (Tung et al. 2010) πιθανώς να έχουν παρόμοια δράση, να αλλάζουν δηλαδη το εύρος των θερμικών κινήσεων και συνεπώς τη ροή Ca²⁺ από το κανάλι (Efremov et al. 2015)



Εικόνα 15: Μηχανισμός απελευθέρωσης Ca²⁺: Σχηματικός μηχανισμός του μηχανισμού CICR στον υποδοχέα RyR1. Η δυναμική του RyR1 απουσία (α) και παρουσία (b) κυτταροπλασματικού Ca²⁺ επηρεάζεται από θερμικές κινήσεις. Στην

πραγματικότητα υπάρχουν δύο διακριτές καταστάσεις αυτού του μηχανισμού· η μετάβαση μεταξύ των καταστάσεων αυτών υποδεικνύεται από το γράμμα T (Transition). Η δέσμευση των ιόντων Ca²⁺ (ροζ) στην περιοχή του EF-hand (μωβ) επάγει αλλαγές διαμόρφωσης που μεταδίδονται στις περιοχές κάτω από το α-σωληνοειδές 1 (πορτοκαλί) και την καρβοξυτελική περιοχή (κόκκινο). Αυτό μεταβάλλει τη «μέση» διαμόρφωση της πρωτεΐνης και αυξάνει την πιθανότητα ανοίγματος του πόρου κατά τη διάρκεια συλλογικών θερμικών κινήσεων του καναλιού. Το ανώτερο στρώμα της δομής αποτελείται από τις ρυθμιστικές περιοχές και τις περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (α-σωληνοειδή, επανάληψη 3-4 και περιοχές AB). Η ρύθμιση του διαύλου μέσω της σύνδεσης των βοηθητικών ή ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε αυτές τις περιοχές ή η χημική τους μετατροπή μέσω μεταμεταφραστικών τροποποίησεων μεταβάλλει το εύρος των θερμικών διακυμάνσεων και συνεπώς αλλάζει την πιθανότητα ανοίγματος του πόρου (Efremov et al. 2015).

1.3.4 <u>Ρυθμιστές των RyRs</u>

Είναι γνωστό οτι η μεγάλη κυτταροπλασματική αμινοτελική περιοχή του RyR, καθώς και η πλευρά του αυλού του ΣΔ, σχηματίζουν θέσεις πρόσδεσης για μία πληθώρα πρωτεϊνών, μικρών μορίων και ιόντων (Εικόνα 16). Οι προσδέτες αυτοί λειτουργούν ως ρυθμιστές του υποδοχέα, δρώντας είτε ως ενεργοποιητές είτε ως αναστολείς. Έγει διατυπωθεί η υπόθεση, οτι οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών από την πλευρά του κυτταροπλάσματος επηρεάζουν τα πρώτα στάδια του κύκλου διέγερσης-συστολής του μυός και τη λειτουργική κατάσταση του διαύλου, ενώ οι αλληλεπιδράσεις από την πλευρά του αυλού του ΣΔ συμβάλουν στην ρύθμιση του διαύλου μέσω της ανίχνευσης της αλλαγής στη συγκέντρωση των Ca²⁺ του Σ Δ (I. Györke et al. 2004). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2), γίνεται αναφορά για τη ρυθμιστική ικανότητα των φυσικών προσδετών του κυτταροπλάσματος, όπως είναι η δεσμευτική πρωτεΐνη της FK506 (FK506 binding protein, FKBP), η πρωτεϊνική κινάση Α και η πρωτεϊνική κινάση ΙΙ της καλμοδουλίνης (PKA και CaMKII, αντίστοιχα), καθώς και σε ρυθμιστές του αυλού του ΣΔ όπως η καλσεκουεστρίνη (calsequestrin), η τζανκτίνη (junctin) και η τριαδίνη (triadin). Παράλληλα, μικρά μόρια με ρυθμιστική δράση είναι τα ιόντα Ca^{2+} , μαγνησίου (Mg^{2+}) και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Πέρα από τους φυσικούς ρυθμιστές των RyRs, μία σειρά φαρμακευτικών παραγόντων με ισχυρή επίδραση στους RyRs είναι τα παράγωγα ρυανοδίνης και καφεΐνης, γεγονός που επιτρέπει την καλύτερη μελέτη των υποδοχέων αυτών. Σε επόμενες ενότητες της εργασίας αυτής γίνεται εκτενής αναφορά στο μόριο της καλμοδουλίνης και στον ιδιαίτερο της ρόλο στη ρύθμιση του καρδιακού RyR2 κατά τον καρδιακό παλμό (Song et al. 2011).



Εικόνα 16: Χάρτης των πιθανότερων θέσεων σύνδεσης των κυριότερων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς RyR. Η πλειονότητα των θέσεων σύνδεσης αφορά την κυτταροπλασματική πλευρά του υποδοχέα: αλδολάση καλμοδουλίνη FKB12, FKB12.6, CAMKII, CUC2, DHPR, Homer, σοκρίνη, σπινοφιλίνη, τζανκτοφιλίνη 1, mAKAP, S100A1, PP1/SP, PP2A, ενώ για τον αυλό του ΣΔ έχουμε: καλσικουεστρίνη, τζανκτίνη, τριαδίνη, καλουμερίνη, HRC (αναπροσαρμογή από Song et al., 2011).

Πίνακας 2: Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν τους RyRs. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται πληροφορίες για το όνομα της πρωτεΐνης, το κατά προσέγγιση μοριακό τους βάρος, τη λειτουργία που έχουν βάσει της αλληλεπίδρασής τους με τους RyRs, και την αντίστοιχη βιβλιογραφική αναφορά, από όπου μπορούν να αντληθούν περισσότερες πληροφορίες. (D. Bers, 2004).

Πρωτεΐνη	Μοριακό Βάρος	Λειτουργία	Βιβλιογραφική Αναφορά
RyR2	565,000	Κανάλι ΣΔ απελευθέρωσης Ca	(Otsu et al. 1990)
FKBP12	12,000	Ευνοεί το συντονισμένο άνοιγμα του RyR1	(Jayaraman et al. 1992)
FKBP12.6	12,600	Ευνοεί το συντονισμένο άνοιγμα του RyR2	(Timerman et al. 1994)
Calmodulin	16,800	Αναστολή στον RyR2 (± στον RyR1)	(Tripathy et al. 1995)
CaMKII	68,000	Φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον RyR2	(T. Zhang et al. 2003)
РКА	96,000	Φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον RyR2	(Marx et al. 2001; Marx et
-mAKAP	250,000	- Πρόσδενει τον ΡΚΑ	al., 2000)
PPI	35,000	Αποφωσφορυλίωση του RyR	(Marx et al., 2001; Marx et
-Spinophilin	140,000	-Προσδένει τον ΡΡΙ	al., 2000)
PP2A	35,000	Αποφωσφορυλίωση του RyR	(Marx et al., 2001; Marx et
-PR130	130,000	-Προσδένει τον ΡΡ2Α	al. 2000)
Sorcin	22,000	Αναστέλει το κλείσιμο του RyR	(Meyers et al. 1995)
DHPR	100,000	Συντονισμός της DHPR στον RyR	(Li & Bers, 2001; El-Hayek & Ikemoto, 1998)
Homer	41,000	Ενεργοποιεί τον RyR1 και αναστέλει τον RyR2	(Feng et al. 2002)
Junctin	26,000	Δεσμέυει την καλσεκουεστρίνη στον RyR	(L. Zhang et al. 1997)
Triadin	35,000	Δεσμέυει την καλσεκουεστρίνη στον RyR	(L. Zhang et al. 1997)
Calcequestrin	45,000	Ρυθμίζει την [Ca ²⁺]ΣΔ, επιδρά στη διαμόρφωση του RyR	(L. Zhang et al. 1997)
HRC	170,000	Ρυθμίζει την [Ca]ΣΔ, επιδρά στη διαμόρφωση του RyR	(H. G. Lee, Kang, & Park, 2001)

1.3.5 Δυσλειτουργία των RyR και παθολογικές καταστάσεις

Παλιότερες μελέτες σε έμβρυα ποντικών που υπολείπονται των γονιδίων RyR1 και RyR2 έδειξαν ότι αυτά πεθαίνουν κατά τα πρώτα στάδια της κύησης, ενώ ποντικοί στους οποίους υπολείπεται το γονιδίο RyR3 γεννιούνταν και αναπτύσσονταν κανονικά (Takeshima et al. 1995; Takeshima et al. 1998). Καθώς οι RyRs ρυθμίζονται από ένα μεγάλο σύνολο εξειδικευμένων πρωτεΐνών, είναι λογικό ότι οποιαδήποτε αδυναμία σχηματισμού των κατάλληλων συμπλόκων μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτούργια του υποδοχέα και τελικώς στην εμφάνιση παθογένειας. Σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός κληρονομούμενων ασθενειών έχουν σχετισθεί με τη μη φυσιολογική λειτουργία των RyRs.

Γενικά, τα μεταλλάγματα των RyRs κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: 1) αφανείς (leaky) μεταλλάγματα με αυξημένη ευαισθησία σε ενεργοποιητές καναλιών απελευθέρωσης Ca²⁺ (Ponting, 2000) 2) μη συζευγμένα Ε-C μεταλλάγματα, με μερική ή πλήρης απώλεια της λειτουργίας απελευθέρωσης Ca²⁺ παρουσία μιας φυσιολογικής απόθηκης Ca²⁺ στο ΣΔ (Bosanac et al. 2005), και 3) μεταλλάγματα που προκύπτουν με χαμηλότερο κατώφλι για την αποθήκευση υπερφορτωμένου CICR (SOICR) (Bosanac et al. 2002). Αν και είναι γνωστά πολλά για την
επίδραση αυτών των μεταλλάξεων στη λειτουργία των υποδοχέων, λίγα είναι γνωστά για τις επιδράσεις τους στη δομή των RyRs αν και τελευταία έχουν ξεκινήσει προσπαθείες για τη βιοφυσική μελέτη και τη τρισδιάσταση αναπάρασταση των περιοχών των μεταλλάξεων των υποδοχέων (Amador et al. 2009; Lau, & Van Petegem, 2014).

Η κακοήθης υπερθερμία (<u>Malignant hyperthermia – MH</u>) είναι μία θανατηφόρος φαρμακογενετική ασθένεια των σκελετικών μυών. Εμφανίζεται σε άτομα που είναι γενετικά ευαίσθητα, μέσω της έκθεσή τους σε ευρέως χρησιμοποιούμενους πτητικούς αναισθητικούς παράγοντες ή σε συγκεκριμένα μυοχαλαρωτικά και προκαλούν τη δυσλειτουργία της απελευθέρωσης του Ca²⁺ από το ΣΔ με αποτέλεσμα την έντονη συσταλτικότητα, τη μυϊκή ακαμψία και την υπερθερμία. Η μη αντιμετώπιση της συγκεκριμένης ασθένειας μπορεί να οδηγήσει σε ραβδομυόλυση, απώλεια λειτουργίας βασικών οργάνων ακόμη και το θάνατο. Η πλειονότητα των περιπτώσεων που αφορούν την MH, σχετίζονται με σημειακές μεταλλάξεις στον RyR1 (McCarthy, Heffron, & Mackrill, 2005). Περισσότερες από 100 από αυτές τις μεταλλάξεις εντοπίζονται σε τρεις περιοχές του RyR1: στην αμινοτελική κυτταροπλασματική πλευρά, στην κεντρική κυτταροπλασματική και στην καρβοξυτελική περιοχή. Έχει προταθεί πως αυτές οι μεταλλάξεις προκαλούν την αποδίπλωση αυτών των δομικών περιοχών, οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες αληλεπιδρούν ενδομοριακά ή στο εσωτερικό των υπομονάδων με αποτέλεσμα το άνοιγμα του πόρου του υποδοχέα. Συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις ή συνδυασμός αυτών που έχουν βρεθεί σε ετεροζυγώτες, προκαλούν ασθένειες πιο σοβαρές από την MH όπως είναι η κεντρική νόσος πυρήνα (central core disease – CCD) ή εμβρυϊκή παρεγκεφαλίτιδα (McCarthy, Heffron, & Mackrill, 2005).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο του RyR2, έχουν συσχετισθεί με καρδιακές αρρυθμίες όπως είναι η Κατεχολαμινεργική Πολύμορφη Κοιλιακή Ταχυκαρδία (Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia type 1, στο εξής CPVT1), Αρρυθμιογόνος Δυσπλασία της Δεξιάς Κοιλίας (Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia type 2, στο εξής AVRD2), καθώς και το Σύνδρομο Μακρού Διαστήματος QT (στο εξής LQTS) που αποτελεί και μία απο τις κύριες αιτίες αιφνίδιου καρδιακού θανάτου σε παιδιά και νεαρά άτομα (S. Györke & Carnes, 2008; Blayney & Lai, 2009). Οι ασθενείς με τη παθολογία αυτή εμφανίζουν φυσιολογικές ενδείξεις στα ηλεκτροκαρδιογραφήματα σε φάση χαλάρωσης, αλλά κατά την άσκηση ή υπο συνθήκες στρες εμφανίζουν σοβαρές αρρυθμίες. Όπως και στον RyR1, περισσότερες από 80 μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί στις τρεις ανάλογες περιοχές του RyR2. Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο οι μεταλλάξεις του RyR2 προκαλούν αρρυθμίες είναι ακόμα άγνωστος και το αντικείμενο αυτό έχει γίνει το επικέντρο πολλών ερευνητικών προσπαθειών τα τελευταία πέντε χρόνια (Blayney & Lai, 2009).

Την τελευταία δεκαετία, έχουν συσσωρευτεί ερευνητικά δεδομένα που υποδηλώνουν ότι αλλαγές στη λειτουργία του RyR2 συμβάλλουν στην εκδήλωση καρδιακής ανεπάρκειας (Heart Failure, στο εξής HF). Ερευνητικές εργασίες που περιελάμβαναν ανθρώπινα και ζωικά μοντέλα με HF έδειξαν ότι στις περιπτώσεις αυτές οι RyR2 βρίσκονται συνεχώς σε ανοιχτή ή μερικώς ανοιχτή διαμόρφωση, με αποτέλεσμα τη διαρροή Ca²⁺ από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα ακόμα και κατά τη φάση της διαστολής. Η αυξημένη παρουσία Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα έχει ως αποτέλεσμα τη μειώση της συστολικής σύσπασης, ενώ παράλληλα προκαλεί ακανόνιστη συστολή (αρρυθμία) και ηλεκτρική δραστηριότητα, κατάσταση που οδηγεί σε υπολειτουργία της καρδιάς και προδιαθέτει το μυοκάρδιο για κυτταρικό θάνατο (Belevych et al. 2013).

1.4 <u>Ο ρόλος της καλμοδουλίνης (CaM) στη λειτουργία του RyR2</u>

Η καλμοδουλίνη (στο εξής, CaM) είναι αναμφίβολα μία από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη λειτουργία των RyRs. Στους ανώτερους οργανισμούς η CaM, κωδικοποιείται από τρία διακριτά γονίδια (CALM1, CALM2 και CALM3) (Berchtold et al. 1993) μοιρασμένα σε διαφορετικά χρωμοσώματα, γεγονός που υπογραμμίζει τη μεγάλη βιολογική σημασία και την αναγκαιότητα συντήρησης του μορίου. Και τα τρία αυτά γονίδια, οδηγούν εν τέλει στη σύνθεση μιας πανομοιότυπης πρωτεΐνης, που αποτελείται από **149** αμινοξικά κατάλοιπα και έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με περισσότερες από 30 πρωτεΐνες για το σχηματισμό βιολογικώς ενεργών συμπλόκων που συμμετέχουν σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια (Bähler & Rhoads, 2002). Αποτελεί λοιπόν, μία υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη που βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και λειτουργεί ως ένας ευαίσθητος ενδοκυττάριος ανιχνευτής των επιπέδων Ca²⁺, καθώς διαθέτει τέσσερεις ειδικές θέσεις σύνδεσης με διαφορετική συγγένεια για το Ca²⁺ (Chin & Means, 2000; M. Zhang et al. 2012).

1.4.1 Δομή και λειτουργία της CaM

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι πληροφορίες για βιολογικές διεργασίες που κωδικοποιούνται στα παροδικά σήματα του Ca²⁺ αποκωδικοποιούνται από εξειδικευμένες ενδοκυττάριες πρωτεΐνες που δεσμεύουν αντιστρεπτά το Ca²⁺ και μετατρέπουν το σήμα σε βιολογική πληροφορία. Υπάρχουν πρωτεΐνες, όπως η πρωτεϊνική κινάση C, οι οποίες δεσμεύουν Ca^{2+} και αυτό αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή τους, υπάρχουν όμως και πρωτεΐνες που δεσμεύουν Ca^{2+} , και σε αυτές ανήκει και η CaM, στις οποίες η δέσμευση αυτή πραγματοποιείται ως ενδιάμεσο βήμα με σκοπο την μετέπειτα ενεργοποίηση συγκεκριμένων βιολογικών διεργασιών. Στη τελευταία κατηγορία ανήκει και μία οικογένεια πρωτεϊνών που διαθέτουν το γαρακτηριστικό δομικό μοτίβο γνωστό ως EF-hand (χέρι EF). Με τον όρο μοτίβο, εννοούνται απλοί συνδυασμοί μερικών στοιχείων δευτεροταγούς δομής με μία συγκεκριμένη γεωμετρική διευθέτηση, όπου κάποια από αυτά μπορούν να συσγετιστούν με μία συγκεκριμένη λειτουργία (για παράδειγμα τη σύνδεση στο DNA) και άλλα δεν έχουν συγκεκριμένη βιολογική λειτουργία από μόνα τους, αλλά αποτελούν μέρη μεγαλύτερων δομικών και λειτουργικών μονάδων. Ένα τέτοιο μοτίβο είναι και το EF-hand, το οποίο αποτελείται από δύο α-έλικες συνδεόμενες με ένα βρόγο (Εικόνα 17). Η στερεοδιάταξη του δεύτερου μοτίβου όπως φαίνεται και στην εικόνα είναι ειδικό για δέσμευση Ca²⁺, ρυθμίζοντας με το τρόπο αυτό μια σειρά από κυτταρικές λειτουργίες. Αυτό το δομικό μοτίβο δέσμευσης του Ca^{2+} ανακαλύφθηκε το 1973 από τον Robert Kretsinger, όταν επιλύθηκε η δομή της παρβαλβουμίνης σε ατομική ανάλυση 1.8 Å (Tufty & Kretsinger, 1975). Το μοτίβο αυτό λοιπόν ονομάστηκε EF-hand, διότι η πέμπτη και έκτη, από το αμινοτελικό άκρο, έλικα στην παρβαλβουμίνη, οι οποίες ονομάστηκαν Ε και F (F, καρβοξυτελικό άκρο) αντίστοιχα, αποτελούν τα μέρη εκείνα της πρωτεϊνικής δομής που αρχικα χρησιμοποιήθηκαν για να απεικονιστεί η δέσμευση του Ca²⁺ από το μοτίβο αυτό και η ονομασία αυτή έχει διατηρηθεί στη βιβλιογραφία. Το Ca²⁺ προσδένεται στο βρόγο ανάμεσα στις δύο α-έλικες με συγκεκριμένες στερεοδιατάξεις της κύριας αλυσίδας του βρόχου, ωστόσο απαιτείται και η παρουσία ορισμένων ειδικών πλευρικών αλυσίδων έτσι ώστε το μοτίβο αυτό να είναι λειτουργικό. Το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα περιέχει ένα ικρίωμα που συγκρατεί τους υποκαταστάτες ασβεστίου στην κατάλληλη θέση, έτσι ώστε να είναι δυνατή η αντιστρεπτή σύνδεση του Ca^{2+} από τις αλυσίδες αυτές.



Εικόνα 17: Σχηματικά διαγράμματα του μοτίβου EF-hand. (α) Το μοτίβο που προσδένεται σε DNA, (β) το μοτίβο δέσμευσης Ca²⁺, που είναι παρόν σε πολλές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το αυτό (γ) το μοτίβο δέσμευσης Ca²⁺ στην τρισδιάστατη δομή του, αναπαριστάται με ένα δεξί χέρι. Η έλικα Ε (κόκκινο) ξεκινά από το αμινοτελικό άκρο – κορυφή του χεριού και καταλήγει στη βάση του δείκτη. Το λυγισμένο μεσαίο δάκτυλο αντιστοιχεί στον πράσινο βράχο των 12 καταλοίπων, που προσδένει το Ca²⁺ (ροζ χρώμα). Η έλικα F (μπλε) εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο – το άκρο του αντίχειρα (Branden & JohnTooze, 1999).

Είναι πλέον γνωστό ότι υπάρχει ένα σύνολο περιορισμών στους οποίους πρέπει να υπακούει μία αμινοξική ακολουθία, προκειμένου να μπορεί να σχηματίσει ένα τέτοιο μοτίβο. Όπως ήδη σημειώθηκε παραπάνω, το μοτίβο περιέχει δύο α-έλικες (Ε και F) που βρίσκονται εκατέρωθεν ένος βρόχου 12 συνεχόμενων αμινοξικών καταλοίπων. Από αυτά, πέντε κατάλοιπα του βρόχου συμμετέχουν στην πρόσδεση ασβεστίου και οι πλευρικές τους αλυσίδες πρέπει να περιέχουν ένα άτομο οξυγόνου, ενώ τα ίδια να είναι κατά προτίμηση Asp ή Glu (Εικόνα 18). Το κατάλοιπο 6 του βρόχου, πρέπει να είναι η Γλυκίνη (Gly) και αυτό γιατί η πλευρική αλυσίδα οποιουδήποτε άλλου αμινοξέος θα παρεμπόδιζε τη δομή του μοτίβου. Επιπρόσθετα, ένας αριθμός πλευρικών αλυσίδων σχηματίζει έναν υδρόφοβο πυρήνα ανάμεσα στις α-έλικες, και συνεπώς θα πρέπει και αυτές να έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα.



Εικόνα 18: Αμινοξικές ακολουθίες μοτίβων δέσμευσης ασβεστίου ΕΓ, σε τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες (παρβαλβουμίνη, καλμοδουλίνη και τροπονίνη–C). Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στη δέσμευση του Ca²⁺ απεικονίζονται με καφέ χρώμα και αυτά που συνθέτουν τον υδρόφοβο πυρήνα εμφανίζονται με ανοιχτό πράσινο. Από κάτω χρωματισμένη η περιοχή έλικα-στροφή-έλικα (Branden & JohnTooze, 1999).

Η CaM έχει απομονωθεί από σπονδυλωτά, ασπόνδυλα, πρωτόζωα, πράσινα φύκια και φυτά. Πρόκειται για μία όξινη πρωτεΐνη (ισοηλεκτρικό σημείο, pI = 4.1–4.3), αποτελούμενη από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, με μοριακό βάρος περίπου 16.700. Η αμινοξική της ακολουθία είναι σχεδόν πανομοιότυπη σε όλες τις καλμοδουλίνες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα και εμφανίζει κάποια διακριτά χαρακτηριστικά: την υψηλή περιεκτικότητα σε όξινα αμινοξέα, την απουσία τρυπτοφάνης και κυστεΐνης (ίσως με την εξαίρεση μερικών φυτικών CaM), την υψηλή αναλογία θρεονίνης/σερίνης και φαινυλαλανίνης/τυροσίνης, καθώς και το ασυνήθιστο αμινοξύ, τριμεθυλο-λυσίνη. Οι λειτουργικές ομοιότητες μεταξύ των CaM από διάφορες πηγές αναδεικνύουν μία εξαιρετικά διατηρημένη δομή καθόλη την εξέλιξη. Οι ενδείξεις για μια υψηλά διατηρημένη δομή υποστηρίζονται από την ομοιότητα της ακολουθίας των αμινοξέων της CaM μέχρι και από εξελικτικά απομακρυσμένα είδη οργανισμών (Krebs, 1981). Η CaM είναι μία σχετικά μικρή πρωτεΐνη, αποτελούμενη απο 149 κατάλοιπα στα σπονδυλωτά, που διαθέτει **4** μοτίβα ΕF-hand, απο τα οποία τα 1 και 2 βρίσκονται στην αμινοτελική περιοχή και τα 3 και 4 στην καρβοξυτελική περιοχή (Chin & Means, 2000).

Οι μεταβολές που προκύπτουν στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca²⁺ έχουν επίδραση στη δράση της CaM σε διάφορα επίπεδα: αρχικά, σε κυτταρικό επίπεδο, εμφανίζονται αλλαγές στην υποκυττάρια κατανομή της πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα σε μοριακό επίπεδο, υιοθετούνται διαφορετικές πρωτεϊνικές διαμορφώσεις (ανάλογα με τα επίπεδα Ca^{2+}) που ενεργοποιούν μια σειρά αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένους ενδοκυττάριους στόχους. Η ρύθμιση πρωτεϊνικών κινασών μέσω της CaM, είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα των μηχανισμών με τους οποίους οι πρωτεΐνες που ανιχνεύουν Ca²⁺ μπορούν να επιδράσουν σε συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια. Γενικότερα, οι πρωτεϊνικοί ασθητήρες Ca²⁺ πρέπει να είναι σε θέση να ανιχνεύουν και να ανταπροκρίνονται σε ενα πολύ συγκεκριμένο εύρος [Ca²⁺], ανάλογα με τη βιολογική τους λειτουργία. Για παράδειγμα, η CaM συνδέεται με το Ca^{2+} ακολουθώντας μια ισορροπία με σταθερά διάστασης από $K_d = 5 \ge 10^{-7} M$ έως $5 \ge 10^{-6} M$, η οποία συμπίπτει με το εύρος των ενδοκυττάριων συγκεντρώσεων του Ca²⁺ που παρατηρούνται στα περισσότερα κύτταρα σε φάση διέγερσης. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως το καρβοξυτελικό άκρο της CaM, με 2 μοτίβα EFhand έχει τρεις έως πέντε φορές υψηλότερη συγγένεια για το Ca^{2+} , από το αμινοτελικό της άκρο, γεγονός που επιτρέπει την υιοθέτηση πολλών διαφορετικών διαμορφώσεων του μορίου ανάλογα με το βαθμό κορεσμού των τεσσάρων θέσεων δέσμευσης Ca²⁺ (Chin & Means, 2000; Swindells & Ikura, 1996). Με το μηχανισμό αυτό επιτυγγάνεται μια διαβαθμισμένη απόκριση στα σήματα Ca²⁺, επιτρέποντας στην εύκαμπτη CaM να εμφανίζει διαφορετικές διεπιφάνειες αλληλεπίδρασης για κάθε [Ca²⁺] στο κυτταρόπλασμα.

Οι δύο περιοχές της CaM λοιπόν, αποκτούν διαφορετικές στερεοδιατάξεις απουσία ή παρουσία του Ca²⁺ (Εικόνα 19_A). Απουσία του Ca²⁺, η αμινοτελική περιοχή του μορίου apo-CaM (CaM χωρίς κάποιο δεσμευμένο Ca²⁺) υιοθετεί μία «κλειστή» δομή, στην οποία οι έλικες και στα δύο EF-motifs βρίσκονται κοντά μεταξύ τους. ενώ η καρβοζυτελική περιοχή υιοθετεί μία περισσότερο ανοικτή διαμόρφωση όπου μόνο μια μικρή υδρόφοβη περιοχή είναι προσβάσιμη στο διαλύτη. Αυτό επιτρέπει στην καρβοξυτελική περιοχή της CaM να αλληλεπιδράσει με μερικές πρωτεΐνες-στόχους ακόμα και σε $[Ca^{2+}]$ στα επίπεδα ηρεμίας (Swindells & Ikura, 1996). Στην περίπτωση μίας παροδικής αύξησης της $[Ca^{2+}]$, κατά τη σύνδεσή του, το ιόν Ca^{2+} συγκρατείται στο κάθε βρόγο δέσμευσης απο επτά πλευρικές αλυσίδες. Η δέσμευση του Ca²⁺ οδηγεί σε αλλαγές των εσωτερικών γωνιών των α-ελίκων εντός των μοτίβων EF-hand σε κάθε περιοχή (αμινο- και καρβοξυτελική) και αλλάζει δραματικά τις αποστάσεις ανάμεσα τους, με αποτέλεσμα να σχηματίζει λιγότερο συμπαγείς δομές (Εικόνα 19в). Αυτές οι συντονισμένες δομικές αναδιατάξεις οδηγούν σε έκθεση στο διαλύτη μιας υδρόφοβης περιοχής πλούσιας σε κατάλοιπα μεθειονίνης στο κέντρο του μορίου. Η έκθεση αυτών των υδρόφοβων καταλοίπων, απελευθερώνει σημαντικό ποσό ελεύθερης ενέργειας. Αυτή η ικανότητα μετατροπής της δέσμευσης του Ca²⁺ σε βιοχημική ενέργεια, είναι αυτη που χαρακτηρίζει τις αισθητήριες πρωτεΐνες Ca²⁺ και αποτελούν τη βάση της ικανότητάς τους να μεταφέρουν σήματα Ca²⁺. Τέλος, είναι γνωστό απο λυμένες κρυσταλλογραφικές δομες, πως κατα την πρόσδεση της CaM σε κάποιο στόχο για το σχηματισμο συμπλόκου, η CaM αποκτά μια εντελώς διαφορετική στερεοδιάταξη, στην οποία εμφανίζεται μία κεντρική κοιλότητα (Εικόνα 19Γ), που αυτή με τη σειρά της υποδέχεται τον προσδέτη (Chin & Means, 2000).



Εικόνα 19: Απεικόνιση διαφορετικών στερεοδιατάξεων της CaM. A) Στερεοδιάταξη της apo-CaM (CaM χωρίς κάποιο δεσμευμένο Ca²⁺), κωδικός PDB: **1CDF**, απομόνωση από τον οργανισμό *Xenopus laevis* (Kuboniwa et al., 1995), B) Στερεοδιάταξη της CaM με όλες τις θέσεις πρόσδεσης κατειλλημένες απο Ca²⁺, κωδικός PDB: **1CLL**, απομόνωση από τον οργανισμό *Homo Sapiens* (Chattopadhyaya et al. 1992), Γ) CaM σε σύνδεση με την αμίνη DPD (N-(3,3-Diphenylpropyl)-N'-[1-R-(3,4-Bis-Butoxyphenyl)-Ethyl]-Propylenediamine), κωδικός PDB: **1QIV**, απομόνωση από τον οργανισμό: *Bos taurus* (Harmat et al. 2000).

1.4.2 <u>Ρύθμιση λειτουργίας του RyR2 από την CaM</u>

Η CaM αποτελεί έναν από τους βασικούς ρυθμιστές των RyRs για την απελευθέρωση Ca²⁺ από το ΣΔ/ΕΔ κατά το μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής. Ωστόσο, ο τρόπος συμμετοχής της CaM στους μηχανισμούς που ελέγχουν την απελευθέρωση Ca²⁺ από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (ΣΔ) στο σκελετικό και καρδιακό μυ παραμένει ασαφής.

Η CaM συνδέεται άμεσα με τους υποδοχείς RyR1 και RyR2 τόσο απουσία όσο και παρουσία Ca²⁺ (σε συγκέντρωσεις της τάξης των μ M) με στοιχειομετρία 4 μόρια CaM/τετραμερές RyR, αλλά ρυθμίζει τις δύο αυτές ισομορφές του υποδοχέα με διαφορετικό τρόπο. Παρουσία Ca²⁺ σε υψηλές συγκεντρώσεις (περιοχή της τάξης των μ M), η πρόσδεση της CaM συνδέεται με την αναστολή τόσο του RyR1 όσο και του RyR2. Αντίθετα, σε συγκεντρώσεις Ca²⁺ της τάξης των nM, η δέσμευση με CaM συνδέεται με την ενεργοποίηση RyR1 και την παρεμπόδιση του RyR2. Οι παράγοντες που πιθανόν να ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις της CaM με τον υποδοχέα RyR1 παραμένουν ακόμα ακαθόριστοι και κατά συνέπεια το μέγεθος των επιδράσεων της CaM στη λειτουργία του RyR1 ποικίλλει σημαντικά στις διάφορες μελέτες, καθώς χρησιμοποιούνται διαφορετικές κάθε φορά πειραματικές συνθήκες (Fruen, Mickelson, & Louis 1997; Ikemoto, Iino, & Endo 1995; Zhang et al. 1999). Επίσης υπάρχουν ερευνητές που υποστηρίζουν ότι η CaM σε υψηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺ παρεμποδίζει τον RyR2, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺ (τάξης 100 nM) δεν επιφέρει καμία επίδραση στη λειτουργία του RyR2 (Fruen et al. 2000).

Autή η διαφορετική ρύθμιση των RyR1 και RyR2 από την CaM, είναι πιθανό να οφείλεται στις διαφορές που εμφανίζουν οι υποδοχείς αυτοί κατά το μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής. Στο σκελετικό μυ, η ενεργοποίηση του RyR1 γίνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής του με το κανάλι I_{Ca-L} (ή CaV_{1.1} ή DHPRs κατά τη βιβλιογραφία), μία διεργασία που ολοκληρώνεται αρκετά γρήγορα (2 ms) (Protasi 2002). Αντίθετα, στον καρδιακό μυ, η ενεργοποίηση του RyR2 γίνεται μέσω του εξωκυττάριου Ca²⁺ το οποίο εισρέει στο κύτταρο μέσω του καναλιού I_{Ca-L} (ή CaV_{1.2} ή DHPRs κατά τη βιβλιογραφία) ακολουθώντας μία κινητική αρκετά πιο αργή από την αντίστοιχη του σκελετικού μυ (Sham, Cleemann, & Morad, 1995).

Πλήθος ερευνητικών αποτελεσμάτων, έχουν δείξει πως η μείωση των επιπέδων του Ca²⁺ στο εσωτερικό του ΣΔ, που προκύπτει από την απελευθέρωση Ca²⁺ από το ΣΔ, παίζει σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση του RyR2 και εν τέλει στον τερματισμό της απελευθερώσης (Zima et al. 2008; Lukyanenko, Wiesner, & Györke 1998; Niggli 2009). Επιπρόσθετα, μέσω πειραμάτων σε μυοκαρδιακά κύτταρα, βρέθηκε ότι ο σχηματισμός σπινθήρων Ca²⁺ τερματίζεται όταν το περιεχόμενο του ΣΔ σε Ca²⁺ μειώνεται πέραν ενός συγκεκριμένου ορίου, γνωστό ως όριο τερματισμού (Zima et al. 2008).

Η CaM, αποτελεί κύριο ρυθμιστή του RyR2 στα κύτταρα του μυοκαρδίου μέσω ισχυρής πρόσδεσης (K_d=10-20nM). Συγκεκριμένα, αναστέλει τη δράση του υποδοχέα σε οποιαδήποτε [Ca²⁺], παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση Ca²⁺ από το ΣΔ (Yang et al. 2014) και έτσι πιθανόν να εμπλέκεται στη ρύθμιση του τερματισμού απελευθέρωσης του Ca²⁺ από το ΣΔ. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η αγρίου τύπου CaM, αύξανε το κατώφλι τερματισμού (όριο τερματισμού), δηλαδή διευκόλυνε τον τερματισμό, αλλά δεν είχε επίδραση στο κατώφλι ενεργοποίησης στο οποίο λαμβάνει χώρα η αυθόρμητη απελευθέρωση Ca²⁺. Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις της CaM που ελαττώνουν τη δέσμευση Ca²⁺ τόσο στο Ν-λοβό (αμινοτελική περιοχή) όσο και στο C-λοβό (καρβοξυτελική περιοχή), ή μόνο στο C-λοβό, μείωσαν το κατώφλι τερματισμού (δηλαδή καθυστέρηση τερματισμού) με έναν παρόμοιο όριο ενεργοποίησης. Συνεπώς, ο τερματισμός της απελευθέρωσης Ca²⁺ από το ΣΔ διευκολύνεται παρουσία CaM και συγκεκριμένα όταν στην CaM έχουν προσδεθεί Ca²⁺ στο C-λοβό.

Παράλληλα, η εξάλειψη των καταλοίπων 3583- 3603 ή η παρουσία τριπλών σημειακών μεταλλάξεων (W3587A / L3591D / F3603A, W3587A ή L3591D) στην περιοχή δέσμευσης της CaM στον RyR2 έδειξε να εμποδίζει το σχηματισμό συμπλόκου και να μειώνει όλα τα όρια τερματισμού χωρίς όμως να έχει σημαντική επίδραση στο όριο ενεργοποίησης. Αξίζει επίσης να σημειωθεί το γεγονός ότι η παρουσία μιας μόνο μετάλλαξης στην περιοχή πρόσδεσης της CaM (W3587A, L3591D και F3603A) οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων με χαμηλότερη συγγένεια και χαμηλότερο όριο τερματισμού, αναδεικνύοντας την πιθανότητα ύπαρξης πρόσθετων περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Συνοπτικα, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η CaM προάγει τον τερματισμό απελευθέρωσης Ca²⁺ από το ΣΔ αυξάνοντας το όριο τερματισμού και πως αυτή η δράση της CaM εξαρτάται από τη δέσμευση του Ca²⁺ κυρίως στον C- και όχι στον N-λοβό της CaM (Tian et al. 2013). Γενικά η μη φυσιολογική αλληλεπίδραση CaM-RyR2 έχει συσχετισθεί με σημαντικές επιπτώσεις στην καρδιακή λειτουργία (βλέπε παρακάτω).

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί δύο περιοχές αλληλεπίδρασης των RyR1 με τη CaM, η μία εκ των οποίων εμφανίζει υψηλή ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή δέσμευσης του RyR2, ενώ γίνονται προσπάθειες για τον εντοπισμό περισσότερων περιοχών. Το κυρίαρχο θεωρητικό μοντέλο σήμερα προτείνει οτι αυτές οι δύο περιοχές του υποδοχέα, απουσία της CaM, αλληλεπιδρούν και σταθεροποιούν το κανάλι στην ανοιχτή του διαμόρφωση. Όταν δεσμεύεται με την CaM, αυτή παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο αυτών περιοχών και συνδέεται με αυτές, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του καναλιού και τη μετάβασή του στην κλειστή διαμόρφωση (**Εικόνα 20**) (Gangopadhyay & Ikemoto, 2006; Ikemoto & Yamamoto, 2000; Ikemoto & Yamamoto, 2002).



Εικόνα 20: Θεωρητικό μοντέλο ρύθμισης του υποδοχέα RyR2 από την καλμοδουλίνη. Η σύνδεση της πρωτεΐνης στις θέσεις CAMBD και CAMLD (περιοχές αλληλεπίδρασης του υποδοχέα, Κεφάλαιο 5) προκαλεί αλλοστερικές μεταβολές που οδηγούν το κανάλι από την ανοιχτή στην κλειστή διαμόρφωση, εμποδίζοντας τη ροή Ca²⁺ από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα (Αναπροσαρμογή από Dobrev, Carlsson, & Nattel, 2012).

1.4.3 Μεταλλάξεις στην CaM και καρδιακή παθογένεια

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η καλμοδουλίνη στους ανώτερους ευκαρυώτες κωδικοποιείται από τρία διακριτά γονίδια (CALM1, CALM2 και CALM3). Η σχετική έκφραση της CaM στον ανθρώπινο καρδιακό ιστό, έχει βρεθεί με την αναλογία CaMI: CaM2: CaM3, να είναι είναι περίπου 1: 2: 5 αντίστοιχα. Αυτή η ανομοιογένεια στην έκφραση των γονιδίων CALM θα μπορούσε να αποδώσει αξιοσημείωτα την επίδραση της ισχός των μεταλλάξεων του κάθε γονιδίου, όπου σύμφωνα με την αναλογία έκφρασής τους, η ισχός του μεταλλαγμένου CALM3 για παράδειγμα, προς κανονικά αλληλόμορφα θα ήταν πολύ μεγαλύτερη από ό, τι για τα CALM1 και CALM2. Τη τελευταία πενταετία εντοπίστηκαν σε βρέφη με LQTS μεταλλάξεις στα γονίδια CALM1 και CALM2, που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση της CaM. Οι γονείς ήταν υγιείς και με φυσιολογικά ηλεκτροκαρδιογραφήματα, ενώ ο γενετικός έλεγχος δεν έδειξε την ύπαρξη μεταλλάξεων σε κάποιο άλλο από τα 15 μέχρι τότε συσχετιζόμενα με την ασθένεια γονίδια (Crotti et al. 2013). Η ανακάλυψη αυτή, έθεσε τη βάση για πολλές ερευνητικές εργασίες, σε μία προσπάθεια να ερμηνευτούν καρδιακές αρρυθμίες που μέχρι τότε ήταν αγνώστου αιτιολογίας. Στο πλαίσιο αυτό, τα τελευταία τρία χρόνια, έχουν εντοπιστεί **17** παρανοηματικές μεταλλάξεις στα τρία γονίδια που κωδικοποιούν την καλμοδουλίνη και οι σποίες έχουν συσχετισθεί με κολπικές αρρυθμίες υψηλής θνησιμότητας σε πολύ μικρές ηλικίες, συμπεριλαμβανομένης της <u>CPVT</u>, του <u>LQTS</u> και της ιδιοπαθούς κοιλιακής μαρμαρυγής (Idiopathic ventricular fibrillation, <u>IVF</u>) (**Πίνακας 3**).

Πίνακας 3: Μεταλλάξεις της καλμοδουλίνης που συνδέονται με σοβαρές κολπικές αρρυθμίες. Αναφέρεται το γονίδιο, στο οποίο βρέθηκε η μετάλλαξη, καθώς και η κλινική διάγνωση των ασθενών στους οποίους εντοπίστηκαν με την αντίστοιχη βιβλιογραφική αναφορά.

Μετάλλαξη	Γονίδιο	Φαινότυπος Ασθενούς	Βιβλιογραφική Αναφορά
N54I	CALM1	CPVT	(Hwang et al. 2014)
F90L	CALM1	IVF	(Marsman et al., 2014; Nomikos et al. 2014)
D96H	CALM3	LQTS	(Shaik et al. 2018)
D96V	CALM2	LQTS	(Crotti et al. 2013; Yin et al. 2014; Hwang et al. 2014)
N98I	CALM2	LQTS	(Makita et al. 2014)
N98S	CALM1 & CALM2	CPVT	(Makita et al. 2014)
A103V	CALM3	LQTS	(Nieves Gomez-Hurtado et al. 2016)
E105A	CALM1	LQTS	(Takahashi et al. 2017)
D130G	CALM1 & CALM3	LQTS	(Crotti et al. 2013; Yin et al. 2014; Hwang et al. 2014)
D132E	CALM2	CPVT, LQTS	(Makita et al. 2014)
D132H	CALM2	LQTS	(Pipilas et al. 2016)
D132V	CALM1	LQTS	(Pipilas et al. 2016)
D134H	CALM2	LQTS	(Makita et al. 2014)
Q136P	CALM2	CPVT, LQTS	(Makita et al. 2014)
E141G	CALM1	LQTS	(N. Gomez-Hurtado et al. 2014)
E141K	CALM3	LQTS	(Wren et al. 2017)
F142L	CALM1 & CALM3	LQTS	(Yin et al. 2014; Hwang et al. 2014)

Τα παραπάνω ευρήματα πιστοποιούν ότι υπάρχει ισχυρή σύνδεση της λειτουργίας της καλμοδουλίνης με καρδιακές αρρυθμίες που εμφανίζονται σε πολύ μικρή ηλικία. Είναι εντυπωσιακό το ότι μία και μόνο μετάλλαξη σε ένα από τα έξι αλληλόμορφα αρκεί για να προκαλέσει έναν παθογόνο φαινότυπο. Όμως, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε διαφορετικού τύπου καρδιακές αρρυθμίες δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός. Οι ασθενείς τόσο με CPVT όσο και με LQTS, δεν φέρουν αλλαγές στα ανατομικά χαρακτηριστικά της καρδιάς, έχουν συνήθως ηλεκτροκαρδιογράφημα εντός των φυσιολογικών ορίων, ενώ εμφανίζουν επεισόδια συγκοπής και καρδιακής προσβολής σε μικρή ηλικία, συνήθως κατά την διάρκεια έντονης άσκησης ή στρες και πιθανόν να είναι κληρονομικές. Αντίθετα, ασθενείς με IVF δεν έχουν χαρακτηριστικό

ηλεκτροκαρδιογράφημα και η γενετική παρακολούθηση είναι δύσκολη, καθώς η διάγνωση ασθενούς με IVF γίνεται αφού το άτομο έχει υποστεί επεισόδιο και ο αριθμός των ασθενών για γενετικές μελέτες είναι περιορισμένος (Marsman et al., 2014; Nyegaard et al., 2012).

Οι μορφές του CPVT που έχουν εντοπιστεί κατά κύριο λόγο οφείλονται στη δυσλειτουργία του υποδοχέα RyR2 (λόγω μεταλλάξεων στο μόριο του που σχετίζονται με την ελλιπή ρύθμιση του υποδοχέα από την CaM), εξαιτίας της διαρροής Ca^{2+} από τον αυλό του ΣΔ κατά το μηχανισμό της καρδιακής διαστολής (Blayney & Lai, 2009). Αντίθετα, το σύνδρομο LOTS φαίνεται να σγετίζεται με μεταλλάξεις (αντιπροσωπεύουν περίπου το 75% αυτών), στα κανάλια καλίου KCNO1, KCNH2 (Ghosh, Nunziato, & Pitt, 2006; Cordeiro et al. 2010), στα κανάλια νατρίου SCN5A (Q. Wang et al. 1995) καθώς και με μεταλλάξεις στην α-υπομονάδα καναλιού ασβεστίου Lτύπου Ca_{V1.2} (Fukuyama et al. 2014; Wemhöner et al. 2015). Οι κυτταροπλασματικές περιοχές των καρβοξυτελικών περιοχών των καναλιών αυτών αποτελούνται από δύο συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης της CaM, γνωστές ως IQ και 1-5-10 μοτίβα (Rhoads & Friedberg, 1997), και αποτελούν μόρια-στόγους της (Yus-Nájera, Santana-Castro, & Villarroel, 2002; Chagot & Chazin, 2011). Σε γενετικές μελέτες ασθενών με CPVT και LQTS, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση αυτών των γονιδίων (KCNQ1, KCNH2, SCN5A), συμπεραίνοντας έπειτα ότι τα γονίδια αυτά δεν φέρουν τις χαρακτηριστικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις συγκεκριμένες ασθένειες. Επόμενο βήμα λοιπόν και με αφορμή την ανασταλτική δράση της CaM στο μηχανισμό σύζευξης διέργεσης-συστολής των καρδιακών κυττάρων όπως έγει ήδη αναφερθεί, υπήρξε ο προσδιορισμός αλληλουγίας των γονιδίων της CaM, για να βρεθεί εν τέλει μία σειρά από μεταλλάξεις, όπως και έγινε κυρίως στα γονίδια CALM1 και CALM2 με φαινότυπο IVF, CPVT ή/και LQTS (Πίνακας 3).

Οι κυτταρικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την προδιάθεση εμφάνισης αρρυθμίας, εξαιτίας των μεταλλάξεων καλμοδουλίνης, είναι πολύπλοκοι, δεδομένης του πλήθους των μοριακών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχει η CaM. Όπως έχει αποδειχθεί για το LQTS (Crotti et al. 2013), η μη φυσιολογική δράση της CaM μπορεί να διαταράξει την εξαρτώμενη από Ca²⁺ απενεργοποίηση των καναλιών τύπου L, οδηγώντας σε αυξημένο ρεύμα αποπόλωσης κατά τη διάρκεια του καρδιακού παλμού. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι μεταλλάξεις ασθενών με CPVT δεν επηρεάζουν τη συγγένεια Ca²⁺ στον ίδιο βαθμό με εκείνες που συνδέονται με την εμφάνιση LQTS (Nyegaard et al. 2012). Η μοριακή και κυτταρική παθοφυσιολογία της προδιάθεσης εμφάνισης αρρυθμίας, εξαιτίας μεταλλάξεων καλμοδουλίνης αποτελεί ακομά και σήμερα αντικείμενο έρευνας (Limpitikul et al. 2014; Hwang et al. 2014).

Είναι πιθανό συσχετισμοί γονότυπου-φαινοτύπου ασθενών με μεταλλάξεις στην CaM, όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 3, να παρέγουν ενδείξεις για τους παθοφυσιολογικούς μηγανισμούς. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη στο γονίδιο CALM2, D132E ταυτοποιήθηκε σε έναν ενήλικα με ιστορικό νεογνικού LQTS που αργότερα ανέπτυξε CPVT. Παρομοίως, στο γονίδο CALM2, η μετάλλαξη Q136P ταυτοποιήθηκε σε ένα παιδί με LQTS και CPVT. Θεωρείται λοιπόν, ότι ο συνδυασμός των κλινικών χαρακτηριστικών των LQTS και CPVT αντικατοπτρίζουν την επίδραση της μετάλλαξης D132E και πιθανώς της Q136P σε δύο μοριακούς στόγους. Η μη φυσιολογική ρύθμιση από τη CaM, των καναλιών Ca²⁺ τύπου L είναι πιθανόν να οδηγεί σε μειωμένη επαναπόλωση του μυοκαρδίου παρόμοια με το φαινότυπο του συνδρόμου LQTS, ενώ η μη φυσιολογική λειτουργία του RYR2 να οδηγεί σε αλλαγή της ρύθμισης της ομοιόστασης του ενδοκυττάριου Ca²⁺ όπως αναμένεται στο φαινότυπο του CPVT (Fernández-Velasco et al. 2009; Knollmann et al. 2006). Επιπρόσθετα, για τη μετάλλαξη N98S έχει διαπιστωθεί ότι η πανομοιότυπη υποκατάσταση αμινοξέων σε 2 διαφορετικά γονίδια της CaM μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς κλινικούς φαινοτύπους. Στο γονίδιο CALM1, η N98S βρέθηκε σε ασθενή με γαρακτηριστικά CPVT, ενώ στο γόνίδιο CALM2, η N98S βρέθηκε σε ασθενή με σαφή φαινότυπο LQTS. Η φυσιολογική βάση αυτής της ανομοιότητας γονότυπου-φαινοτύπου είναι άγνωστη, αλλά μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στα πρωτεώματα διαφόρων φορέων των αντίστοιχων μεταλλάξεων, λόγω διαφορετικού φύλου ή εθνικότητας ή ακόμα σε διαφορές στην ειδική έκφραση των CALM1 και CALM2, ανάλογα με το τμήμα του οργάνου και τον κυτταρικό τύπο που βρίσκονται (Makita et al. 2014).

Οι μεταλλάξεις της CaM που συνδέονται με CPVT ή LQTS κατά την παιδική ηλικία εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε κατάλοιπα εντός των περιοχών των μοτίβων EF-hand της πρωτεΐνης (**Εικόνα 21**) και έχει αποδειχθεί με βιοφυσικές μελέτες ότι επηρεάζουν τη συγγένεια της πρωτεΐνης για τα Ca²⁺ (Crotti et al., 2013; Nomikos et al., 2014; Makita et al., 2014; Søndergaard et al., 2015). Γενικά, αν οι μεταλλάξεις της CaM ομαδοποιηθούν βάσει φαινοτύπου διαπιστώνεται ότι όλα τα μεταλλάγματα της CaM που σχετίζονται με LQTS (LQTS-CaMs) εμφανίζουν αρκετά μειωμένη συγγένεια με Ca²⁺, ενώ τα μεταλλάγματα της CaM που σχετίζονται με CPVT

(CPVT-CaMs) έχουν φυσιολογική ή λίγο μικρότερη συγγένεια για το Ca^{2+} και εμφανίζουν αυθόρμητα κύματα και σπινθήρες Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάρκεια ανοίγματος του καναλιού RyR2 και την αυξημένη συγγένεια δέσμευσης με τον RyR2. Αντίθετα, τα LQTS-CaMs δεν προάγουν κύματα Ca^{2+} και εμφανίζουν είτε φυσιολογική ρύθμιση των μονοκαναλικών RyR2 (**D96V**) είτε χαμηλότερης συγγένειας δέσμευσης RyR2 (**D130G**, **F142L**) (Hwang et al. 2014).



Εικόνα 21: Σχηματικό μοντέλο των βρόχων δέσμευσης Ca²⁺ της καλμοδουλίνης στις αμινοτελικές (Ι και ΙΙ) και καρβοζυτελικές (ΙΙΙ και ΙV) περιοχές που δείχνουν τις θέσεις των μεταλλάξεων. Με εξαίρεση τις μεταλλάξεις F90L και N54I που εντοπίζονται στους βρόχους σύνδεσης των EF-hand, όλες οι υπόλοιπες γνωστές μεταλλάξεις της CaM εντοπίζονται στις περιοχές δέσμευσης Ca²⁺ των EF-hand μοτίβων. Οι κύκλοι με κόκκινο και πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *CALM2* (δηλαδή, D96V, N98S, N98I, D132E, D134H, Q136P), στο γονίδο *CALM1* (N54I), καθώς και στα γονίδια *CALM2* και *CALM3* (D130G, F142L) (Makita et al. 2014).

Πιο συγκεκριμένα, σε πρόσφατα πειράματα παρατηρήθηκε πως η μετάλλαξη F90L που εντοπίζεται στο βρόχο που ενώνει το μοτίβο EF-hand II με το EF-hand III, με φαινότυπο IVF, μεταβάλλει σημαντικά τις βιοφυσικές και βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν πως προκαλεί αποσταθεροποίηση της καρβοξυτελικής περιοχής με αποτέλεσμα τη μειωμένη συγγένεια για το Ca²⁺ και τη συνολική απώλεια της συνεργατικότητας μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης Ca²⁺ σε αυτήν την περιοχή. Παράλληλα, βρέθηκε ότι η μετάλλαξη F90L μειώνει την ικανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ CaM και RyR2 και εμφανίζει μη φυσιολογική δέσμευση της [³H]ρυανοδίνης στον υποδοχέα (Nomikos et al. 2014).

Σε πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη διερεύνηση των επιπτώσεων της παρουσίας μεταλλαγμάτων της CaM στις θέσεις πρόσδεσης Ca²⁺ των μοτίβων EF-hand στη καρβοξυτελική περιοχή του μορίου, διαπιστώθηκε πως τα περισσότερα από αυτά τα μεταλλάγματα προκαλούν μείωση στο βαθμό συγγένειας του Ca²⁺ στα καρβοξυτελικά EF-hand αλλά δεν εμφάνιζαν καμία επίδραση στα αμινοτελικά EF-hand. Εξαίρεση αποτελεί η μετάλλαξη N54I, που δεν έχει σημαντική επίδραση στη δέσμευση Ca²⁺ ούτε στην αμινοτελική περιοχή, ούτε και στη καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης (Nyegaard et al. 2012; Hwang et al. 2014).

Παρόλα αυτά, η ταξινόμηση των μεταλλάξεων της CaM με βάση τη συγγένεια για το Ca²⁺ σε *in vitro* μελέτες ή τη θέση της μετάλλαξης στη τριτοταγή της δομή, έχει αποδειχθεί προβληματική στην αξιόπιστη πρόβλεψη εκδήλωσης συγκεκριμένων κλινικών φαινοτύπων. Ωστόσο, μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στην κατανόηση του ρόλου των ιοντικών διαύλων κατά τον κύκλο ECC. Η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στις ασθένειες αυτές και η ανακάλυψη νεών αρρυθμιογενών μεταλλάξεων της CaM, θα επιτρέψει την έγκαιρη διάγνωσή τους και θα οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικές και εξατομικευμένες θεραπευτικές στρατηγικές.

1.5 Περιοχές αλληλεπίδρασης RyR2-CaM

Όπως αναλύθηκε σε προήγουμενο κεφάλαιο, ο μηχανισμός ρύθμισης του RyR2 από την CaM δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός, κυρίως λόγω της απουσίας δομικών πληροφοριών σχετικές με τον υποδοχέα και τις περιοχές πρόσδεσης της CaM. Η εικόνα που υπάρχει σήμερα σχετικά με τη δομή και τις θέσεις σύνδεσης του υποδοχέα RyR2 διαμορφώνεται κυρίως απο μελέτες και δεδομένα που έχουν συγκεντρωθεί για τον RyR1, ενώ παράλληλα δεδομένα από πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν νέες διεπιφάνειες αλληλεπίδρασης για τον RyR2 οι οποίες δεν έχουν ακριβή αντιστοίχιση με περιοχές άλλων ισομορφών.

Το πρώτο βήμα στην εύρεση των περιοχών πρόσδεσης της CaM στους RyRs ήταν η ανάλυση της πρωταγούς δομής των τριών ισομορφών των RyRs μέσω κλωνοποίησης του cDNA που τις κωδικοποιεί (Takeshima et al. 1989; Zorzato et al. 1990; Otsu et al., 1990; Nakai et al., 1990; Hakamata et al. 1992). Η ανάλυση της πρωταγούς δομής του RYR τόσο του σκελετικού μυ όσο και του καρδιακού, οδηγησε στην ταυτοποίηση πιθανών θέσεων δέσμευσης CaM, όπως φαίνονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4**), ενώ αποδείχθηκε ότι οι θέσεις αυτές εμφανίζουν πολύ υψηλή συντήρηση μεταξύ των ισομορφών (Otsu et al., 1990; Nakai et al., 1990; Hakamata et al. 1992). Σύμφωνα με τα πειράματα αυτά, η CaM προσδένεται στο κεντρικό τμήμα του μορίου (δύο θέσεις πρόσδεσης) και στο καρβοζυτελικό άκρο (μία θέση) του RyR (Guerrini et al. 1995). Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με τις περιοχές πρόδεσης της CaM σε διάφορες πρωτεΐνες (μοτίβα IQ), οι οποίες συνήθως αποτελούνται απο ένα μοτίβο αμφιπαθούς α-έλικας, με δυο θετικά φορτισμένες περιοχές που χωρίζονται από μια υδρόφοβη περιοχή (Harris, Croall, & Morrow 1988; Buschmeier, Meyer, & Mayr 1987; Takeshima et al. 1989).

Πίνακας 4: Πιθανές θέσεις πρόσδεσης της CaM στους RyRs βάσει ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής τους. Περιέχει πληροφορίες για την ισομορφή του RyR στον οποίο έχουν εντοπιστεί οι θέσεις πρόσδεσης, τη σειρά της αμινοξικής ακολουθίας που αφορά τη θέση πρόσδεσης της CaM καθώς και την αντίστοιχη βιβλιογραφική αναφορά.

	3614-3637 4295-4325	(Takeshima et al. 1989)
	2807-2840 2909-2930	(Zorzato et al. 1990)
	3031-3049	· · · · · ·
RyR1	2641-2657	
	3362-3374	(A R Marks Eleischer & Tempst 1990)
	3947-3965	(A. K. Marks, Fleischer, & Tempst, 1990)
	4309-4322	
	1383-1400	
	1974-1996	(Brandt et al. 1992)
	3358-3374	
	3581-3604	$(N_{0}k_{0}) = (1000)$
2	4257-4285	(Ivakai et al., 1990)
yR	2775-2807	
R	2877-2898	(Otsu et al. 1990)
	2998-3016	

Με αφετηρία τις πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR1 και τον RyR2 που προέκυψαν από την ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας των ισομορφών των RyRs, ακολούθησαν λεπτομερέστερα βιοχημικά και βιοφυσικά πειράματα για την ταυτοποίηση των θέσεων δέσμευσης που βασίζονταν στη μελέτη συμπλόκων της CaM με χιμαιρικές πρωτεΐνες (fusion proteins) και συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν σε δομικές περιοχές των υποδοχέων (Balshaw, Xu, Yamaguchi, Pasek, & Meissner, 2001; Domeier, Blatter, & Zima, 2009; Yang et al. 2014; Tian et al. 2013; Harris, Croall, & Morrow, 1988; Buschmeier, Meyer, & Mayr, 1987; Brandt et al. 1992; Marks et al., 1990; Guerrini et al. 1995; Nakai et al., 1990; Menegazzi et al. 1994; Xiaojun Huang, Fruen, Farrington, Wagenknecht, & Liu, 2012; Yamaguchi et al. 2003).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 22, οι περιοχές του RyR1 που εμφάνισαν συγγένεια για την CaM περιλαμβάνουν τα τμήματα 921-1.173, 1.975-1.999, 2.063-2.091, 2.804-2.930 και 2.961-3.084, 2.937-3.225,

3.042-3.057, 3.225-3.662, 3.546-3.655, 3.611-3.642, 3.614-3.643, 3.617-3.634, 4.302-4.430, 4.303-4.328, 4.425-4621, και 4.540-4.557, ενώ για τον RyR2 σύμπλοκα με τη CaM σχημάτισαν τα αα στις θέσεις 263-614, 2.724-3.016, 3.007-3.023, 3.298-3.961, 3.583-3.603, 4.480-4.497 και 4.548-4.748. Τα δεδομένα αυτά βασίζονται κυρίως σε in vitro μελέτες με μικρά τμήματα των RyRs, καθώς είναι πολύ δύσκολη η απομόνωση διαμεμβρανικών υποδοχέων τόσο μεγάλου μεγέθους. Αν και η χρήση των πεπτιδίων RyR συμβάλλει στην απλοποίηση των πειραμάτων και έχει καθιερωθεί από τη διεθνή βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να μην είναι πλήρως αντιπροσωπευτικά, καθώς κάποιες από τις ακολουθίες αυτές, που είναι θαμμένες βαθιά στο εσωτερικό του RyR, είναι απίθανο να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την κυτταροπλασματική CaM (X. Huang et al. 2013). Κατά το πέρας των ερευνών βέβαια, βρέθηκε ότι η προτεινόμενη ακολουθία δέσμευσης της CaM στον RyR2 263-615, βάσει ανάλυσης πρωτοταγούς δομής (Balshaw, Xu, Yamaguchi, Pasek, & Meissner, 2001) δεν συμβαδίζει με τα δεδομένα που προέκυψαν από cryo-EM (R. Wang et al. 2007) και κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ/μοριακό ελλειμενισμό (Tung, Lobo, Kimlicka, & Van Petegem, 2010). Η προβλεπόμενη ακολουθία πρόσδεσης της CaM 921-1.173 στον RyR1 (S. R. Chen and MacLennan 1994), επίσης τελικά δεν συμβαδίζει με πειραματικές δομικές μελέτες (Li Zhu et al. 2013). Οι προτεινόμενες ακολουθίες δέσμευσης της CaM κοντά στα αα 2.724-3.066 του RyR2 (Balshaw et al., 2001) και 2.804-2.930 στο RyR1 (S. R. Chen & MacLennan, 1994) περιέχουν και μία θέση φωσφορυλίωσης, η οποία σύμφωνα με δεδομένα cryo-EM (Meng et al. 2007), κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ και μοριακών προσομοιώσεν (Yuchi, Lau, & Van Petegem, 2012) δεν είναι κοντά στις γνωστές περιοχές πρόσδεσης της CaM.



Εικόνα 22: Πιθανές θέσεις πρόσδεσης της CaM στους υποδοχείς RyR1 και RyR2. Από τις αρχικές μέχρι και τις πιο πρόσφατες μελέτες για τον προσδιορισμό των θέσεων αλληλεπίδρασης CaM/RyR. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται ο αριθμός των αμινοξικών καταλοίπων των υποδοχέων RyR1/RyR2, με κόκκινο και μωβ οι περιοχές πρόσδεσης της CaM που έχουν προσδιοριστεί στις μέχρι σήμερα μελέτες. Το κόκκινο υποδηλώνει ισχυρή συγγένεια πρόσδεσης, ενώ το μωβ αφορά αρκετά χαμηλή συγγένεια (μελέτες βιοφυσικής ανάλυσης). Με πράσινο χρώμα υποδηλώνονται οι περιοχές CaMBD και CaMLD, ως οι κυριότερες περιοχές αλληλεπίδρασης της CaM/RyR1. Για κάθε περιοχή προσδιορισμού παρατίθεται και η αντίστοιχη βιβλιογραφική μελέτη (Χ. Huang et al. 2013).

Σήμερα, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει στραφεί σε δύο συγκεκριμένες περιοχές αλληλεπίδρασης της CaM, που έχουν προσδιοριστεί στον υποδοχέα των σκελετικών μυοκυττάρων RyR1: την περιοχή 3614-3643 της αμινοξικής του ακολουθίας, που αποτελεί την κύρια περιοχή σύνδεσης (CaM binding domain - στο εξής CaMBD) (Yamaguchi, Xin, & Meissner 2001; Moore et al., 1999) και την περιοχή 4064-4210, που βρίσκεται απέναντι από την κύρια περιοχή και διαθέτει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με την CaM, συμπεριλαμβανομένης και της ύπαρξης θέσεων δέσμευσης Ca^{2+} (CaM like domain – στο εξής **CaMLD**) (L. Xiong et al. 2006). Η περιοχή 3583-3603 του RyR2 εμφανίζει πολύ υψηλή ομολογία με την CaMBD περιοχή του RyR1, όπως θα αναφερθούμε στη συνέχεια, ενώ έχει αποδειχθεί ότι μεταλλάξεις σε κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα στην περιοχή αυτή οδηγούν σε απώλεια της αλληλεπίδρασης CaM – RyR2, όπως ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση του RyR1 (Yamaguchi et al. 2003). Συμπερασματικά, φαίνεται πως οι RyR1 και RyR2 έχουν τουλάχιστον μια κοινή δομική περιοχή για τη δέσμευση της CaM (CaMBD) στα πεπτιδικά τμήματα 3614-3643 και 3583–3603, αντίστοιγα (Yamaguchi et al. 2003; Balshaw, Xu, Yamaguchi, Pasek, & Meissner, 2001). Οι μέχρι τώρα προσπάθειες να εντοπιστεί συγκεκριμένη περιοχή ή περιοχές αντίστοιχες με την CaMLD στον υποδογέα RyR2 δεν έγουν στεφθεί με επιτυγία καθώς δεν υπάργει διαθέσιμη η τριτοταγής δομή του RyR2, όπως συμβαίνει με τον RyR1. Υπάρχουν όμως σοβαρές ενδείξεις, που θα αναλυθούν παρακάτω, ότι υπάρχει τουλάγιστον μία ακόμα περιογή πρόσδεσης της CaM στον υποδογέα RyR2 βάσει βιοφυσικών ερευνών (X. Huang et al., 2013; Lau, Chan, & Van Petegem, 2014).

1.5.1 <u>Η περιοχή πρόσδεσης 3614-3643 (CaMBD) στον RyR1 και η αντίστοιχη 3583-3603 του RyR2</u> 3614-3643 RyR1

Η εικόνα που έχει διαμορφωθεί μέχρι και σήμερα στο μηχανισμό ρύθμισης των RyRs από την CaM, έγκειται στο ότι η CaM με δεσμευμένο Ca²⁺, λειτουργεί ως αναστολέας τόσο στο κανάλι απελευθέρωσης Ca²⁺ του σκελετικού μυ (RyR1) όσο και στα καρδιακά κύτταρα (RyR2), ενώ η apo-CaM τον ενεργοποιεί τον RyR1 και αναστέλλει τη δράση του RyR2, γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει ότι η εξάρτηση του ίδιου του καναλιού (RyR1-RyR2) από Ca²⁺, ρυθμίζεται από την CaM. Η αντίθετη δράση της CaM και της apo-CaM στον υποδοχέα μπορεί να εξηγηθεί σύμφωνα με έναν μηχανισμό, κατά τον οποίο οι δύο μορφές της CaM δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις στο RYR1 για να ρυθμίσουν τη λειτουργία του. Οι θέσεις δέσμευσης αυτές εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για συγκεκριμένες διαμορφώσεις της CaM, οι οποίες με τη σειρά τους εξαρτώνται από τη [Ca²⁺] και το βαθμό κορεσμού της πρωτεΐνης σε Ca²⁺. Ο προσδιορισμός λοιπόν, των θέσεων πρόσδεσης της CaM/apo-CaM στον RyR1, βοήθησε στη ταυτοποίηση του μοριακού μηχανισμόυ ενεργοποίησης/απενεργοποίησης του υποδοχέα.

Σε μια σειρά πειραμάτων που χρησιμοποιήθηκε επισημασμένη [³⁵S]CaM με Ca²⁺ και χωρίς οι περιοχές πρόσδεσης των Ca²⁺/CaM και apoCaM στον RyR1 να είναι επικαλυπτόμενες ή ίδιες, καθώς η Ca²⁺/[³⁵S]CaM και η [³⁵S]apo-CaM προσδένονται στην ίδια περιοχή στον RYR1, η θρυψίνη βρέθηκε να καταστρέφει και τις δύο θέσεις πρόσδεσης με τον ίδιο ρυθμό, ενώ η προεπώαση τόσο με Ca²⁺/CaM όσο και με apo-CaM προστατεύουν από πρωτεόλυση με θρυψίνη των πεπτιδικών δεσμών της ακολουθίας στις θέσεις Arg/3630-3631 και Arg/3637-3638, αμινοξέα που ανήκουν στην περιοχή με αα 3614-3643. Οι συγκεκριμένες θέσεις προστασίας σε αυτήν την αα βρίσκονται εντός μιας προβλεπόμενης θέσης πρόσδεσης Ca²⁺/CaM, που έχει προσδιοριστεί και με ανάλυση ακολουθίας των Takeshima et al. 1989 και με χρήση χιμαιρικών πρωτεϊνών από τους Chen & MacLennan, 1994 και Menegazzi et al. 1994, οι οποίες αντιστοιχούν επικαλύψεις των ακολουθιών του RyR1 και της [¹²⁵I] CaM (Moore et al. 1999). Επιπρόσθετα, σε πειράματα με συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν στην RyR1 περιοχή σύν επικαλύψεις των ακολουθιών του RyR1 περιοχή 3614-3643 παρατηρήθηκε ισχυρή αλληλεπίδραση τόσο με την apo-CaM όσο και με την holo-CaM (ισοδύναμη ονομασία για Ca²⁺/CaM) (Rodney, Moore, et al. 2001).

Παράλληλα πειράματα με πεπτίδια της ίδιας περιοχής που έφεραν συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις (V3619A, W3620A, L3624D) (Yamaguchi, Xin, & Meissner 2001), επιβεβαίωσαν το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η apo-CaM και η holo-CaM δεσμεύονται σε διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες θέσεις στον υποδοχέα. Είναι άξιο αναφοράς ότι αν από τη περιοχή αυτή αφαιρεθούν τα τελευταία **9** αμινοξικά κατάλοιπα (3635-3643), το πεπτίδιο χάνει την ικανότητα να δεσμεύει την apo-CaM αλλά όχι και την holo-CaM, γεγονός που υποδεικνύει την ανεξαρτησία των καταλοίπων που συμβάλλουν στη σύνδεση των δύο αυτών μορφών στον RyR1 (Rodney, Moore, et al. 2001). Αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται και από άλλα πειράματα, σύμφωνα με τα οποία η αλκυλίωση της κυστεΐνης 3635 αναστέλλει τη δέσμευση apo-CaM αλλά όχι τη δέσμευση της holo-CaM (Moore, Zhang, & Hamilton, 1999). Στα ίδια πειράματα, βρέθηκε πως η πρόσδεση της holo-CaM στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα

την μετατόπισή της προς το αμινοτελικό άκρο της περιοχής πρόσδεσης, επάγωντας μια σειρά δομικών αλλαγών στον RyR1 που δεν παρατηρείται κατά τη σύνδεση της apo-CaM στην αντίστοιχη θέση.

Πρόσφατα δομικά δεδομένα που συγκεντρώθηκαν με τη βοήθεια cryo-EM, επιτρέπουν τη τρισδιάστατη αναπάρασταση της αλληλεπίδρασης της apo-CaM και holo-CaM με τον RyR1. Σύμφωνα με τις δομές αυτές, η apo-CaM συνδέεται σε κάθε υπομονάδα RyR1 κατά μήκος της κυτταροπλασματικής πλευράς του υποδοχέα, σε μία θέση η οποία είναι κοντά στην αντίστοιχη θέση πρόσδεσης που προσδιορίστηκε για την holo-CaM-RyR1. Η περιοχή αυτή εμπλέκεται και στις αλληλεπιδράσεις του RyR1 με τη DHPR, αποδεικνύοντας τον άμεσο ρόλο της CaM στο μηγανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής στο σκελετικό μυ. Οι περιογές αυτές είναι επικαλυπτόμενες και υπολογίζεται ότι η σχετική τους απόσταση είναι περίπου στα 33±5 Å (απόσταση μεταξύ των κέντρων των περιοχών), σε άριστη συμφωνία με τα αποτελέσματα πειραμάτων μέσω ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής (Samsó & Wagenknecht, 2002). Ακολούθησαν κι άλλα πειράματα με cryo-EM, στα οποία συγκρίθηκαν οι δομικές αλλαγές που προκαλεί η πρόσδεση του Ca^{2+} στον RyR1 απουσία (Wagenknecht et al. 1997) και παρουσία (Samsó & Wagenknecht 2002) CaM, τα οποία έδειξαν ότι οι αλλοστερικές τροποποιήσεις που επάγονται από τη σύνδεση του Ca²⁺ είναι μικρότερης έκτασης σε σχέση με αυτές που προκαλούνται από τη CaM, επιβεβαιώνοντας πως η μετατόπιση αυτή συνδέεται άμεσα με την πρόσδεση της CaM στον RyR1, όπως είχε προβλεφθεί κι από πειράματα αναλυσης αμινοξικής ακολουθίας (Moore, Rodney, et al., 1999; Yamaguchi, Xin, & Meissner, 2001). Τέλος, σε πειράματα φθορισμού κατά τη σύνδεση στον RyR1 ενός μεταλλάγματος της CaM (CaM1234) η οποία δεν έχει την ικανότητα πρόσδεσης Ca^{2+} (συμπεριφορά apo-CaM), διαπιστώθηκε πως ανεξάρτητα με τη $[Ca^{2+}]$ (nM ή μM) η πρόσδεση του μεταλλάγματος πραγματοποιείται στην ίδια θέση πρόσδεσης, αυτή της apo-CaM (Xiaojun Huang, Fruen, Farrington, Wagenknecht, & Liu, 2012).



Εικόνα 23: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δέσμευσης της Ca²⁺/CaM_{WT} στον RyR1. Κάτοψη της διαμεμβρανικής επιφάνειας του υποδοχέα: με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι θέσεις δέσμευσης της Ca²⁺/CaM, αγρίου τύπου στον RyR1, όπως βρέθηκαν με χρήση cryo-EM. Η apo-CaM, σύμφωνα με τους Samsó & Wagenknecht, 2002, δεσμεύεται στη θέση μεταξύ της περιοχής 3 (Xiaojun Huang et al. 2012).

Συγκεντρώνοντας όλα αυτά τα πειραματικά δεδομένα γίνεται φανερό οτι τόσο η apo-CaM όσο και η holo-CaM δεσμεύονται με νανομοριακή συγγένεια με τον RYR1 (Tripathy, Xu, Mann, & Meissner, 1995; Yamaguchi, Xin, & Meissner, 2001; Rodney, Moore, et al., 2001; Rodney, Krol, Williams, Beckingham, & Hamilton, 2001). Η σύνδεση αυτή αυξάνει τη δραστικότητα του καναλιού σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺, ενώ τη μειώνει σε υψηλές συγκεντρώσεις (Tripathy et al., 1995). Επιπρόσθετα, η CaM αποτελεί ρυθμιστή της αλληλεπίδρασης του καναλιού Ca²⁺ τύπου L με τον RyR1. Οι αλληλεπίδράσεις αυτές πραγματοποιούνται κυρίως μεσω του καρβοξυτελικού λοβού της CaM, δημιουργώντας ερωτήματα σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει ο αμινοτελικός λοβός στη ρύθμιση του RyR1.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τόσο ολόκληρο τον RYR1 όσο και συνθετικά πεπτίδια δομικών περιοχών του, αποδείχθηκε ότι η θέση πρόσδεσης της CaM στον RYR1 είναι πιθανότατα ασυνεχής, με τον καρβοξυτελικό λοβό τόσο της apo-CaM, όσο και της holo-CaM να δεσμεύεται στα αμινοξέα μεταξύ της αμινοξικής περιοχής 3614 και 3643 και τον αμινοτελικό λοβό να δεσμεύεται σε θέσεις σχετικά απομακρυσμένες στην πρωτοταγή ακολουθία. Η πρόσδεση του Ca²⁺ στον καρβοξυτελικό λοβό της CaM, την μετατρέπει από ενεργοποιητή σε αναστολέα, αλλά ταυτόχρονα απαιτείται η αλληλεπίδραση με τον αμινοτελικό λοβό για να επιτευχθεί η πλήρης ενεργοποίηση/απενεργοποίηση του RYR1. Μελετώντας την αλληλεπίδρασή της με τον RyR1 (την περιοχή πρόσδεσης με αα 3614-3643), βρέθηκε πως ο καρβοξυτελικός λοβός προσδένεται ισχυρότερα και σε υψηλές και σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺, συγκριτικά με ολόκληρο το μόριο της CaM, ενώ ο αμινοτελικός λοβός δεν προσδένεται στο πεπτίδιο σε χαμηλές [Ca²⁺] και προσδένεται σε υψηλές αλλά με πολύ μικρότερη συγγένεια σε σχέση με τον καρβοξυτελικό λοβό. Βάσει των πειραματικών ενδείξεων, υποστηρίζεται πλέον πως η περιοχή με αα 3614-3643 αποτελεί την κύρια περιοχή πρόσδεσης του καρβοξυτελικού λοβού της CaM, ενώ ο αμινοτελικός λοβός προσδένεται σε περιοχές που απέχουν αρκετά από αυτή στην πρωτοταγή ακολουθία (L.-W. Xiong et al. 2002).

Σε συμφωνία με τις παραπάνω μελέτες, η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής (ατομική ανάλυση 2 Å) του συμπλόκου Ca^{2+}/CaM με πεπτίδιο 30 αμινοξικών καταλοίπων του RyR1 (αα 3614-3643) αποκάλυψε πως η Ca^{2+}/CaM προσδένεται **αντιπαράλληλα** στο πεπτίδιο, με τον καρβόξυ- και αμινοτελικό λοβό της να σχηματίζουν μία κεντρική κοιλότητα στην οποία εγκολπώνεται το πεπτίδιο (**Εικόνα 24**). Επίπλέον, αποδείχθηκε ότι ο καρβοξυτελικός λοβός της CaM αλληλεπιδρά ισχυρά με το αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου κατά τρόπο εξαρτώμενο από Ca^{2+} και η δέσμευση Ca^{2+} στον καρβοξυτελικό λοβό είναι σημαντική για την ανασταλτική δράση της CaM. Η κρυσταλλική δομή επιβεβαιώνει ακόμα ότι το κατάλοιπο Trp-3620 παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τον καρβοξυτελικό λοβό της Ca²⁺/CaM, ενώ ο αμινοτελικός λοβός αλληλεπιδρά ασθενώς με την Phe-3636 (Maximciuc et al. 2006).



Εικόνα 24: Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Ca²⁺/CaM-RyR1₃₆₁₄₋₃₆₄₃ σε ατομική ανάλυση 2 Å. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η CaM, με κόκκινο τα Ca²⁺, το πεπτίδιο RyR1 με γκρι χρώμα, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες των RYR1 υδρόφοβων καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με τους δύο λοβούς της CaM απεικονίζονται ως ράβδοι (sticks) (Maximciuc et al. 2006).

Πιο συγκεκριμένα, ο καρβοξυτελικός λοβός της Ca²⁺/CaM αλληλεπιδρά ισχυρά με το αμινοτελικό τμήμα του πεπτιδίου, (με ασβεστο-εξαρτώμενο τρόπο) και κυρίως μέσω του αμινοξέος Trp-3620 του πεπτιδίου, ενώ ο αμινοτελικός λοβός αλληλεπιδρά ασθενώς με το καρβοξυτελικό τμήμα του πεπτιδίου, κυρίως μέσω του αμινοξέος Phe-3636. Η ικανότητα του καρβοξυτελικού λοβού να δεσμεύεται στον RyR1 (αα 3614-3643) απουσία του αμινοτελικό λοβού (L.-W. Xiong et al. 2002), η απουσία αλληλεπίδρασης των δύο λοβών μεταξύ τους στην κρυσταλλική δομή Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο του RyR1 καθώς και NMR δεδομένα που δείχνουν ότι στο σύμπλεγμα αυτό που βρίσκεται σε διάλυμα επιτρέπονται ανεξάρτητες κινήσεις δομικών περιοχών των λοβών, υποδεικνύουν ότι ο αμινοτελικός λοβός της CaM θα μπορούσε να απομακρυνθεί από την περιοχή 3614-3643 χωρίς να διαταράξει την αλληλεπίδραση του καρβοξυτελικού λοβού της με το πεπτίδιο. Ο αμινοτελικός λοβός, μπορεί να εκτοπιστεί από μία άλλη ανταγωνιστική περιοχή, όπως η 4064-4210 του RYR1, η οποία πιθανόν αδεσμευτεί στο πεπτίδιο του RyR1 (αα 3614-3643) είτε παρουσία και των δύο λοβών, είτε μόνο με τον καρβοξυτελικό λοβός της CaM να αλληλεπίδραση του καρβοξυτελικού λοβού του RYR1, η οποία πιθανόν αποτελείται από δύο EF-hand μοτίβα. Σύμφωνα με τα δομικά και βιοφυσικά δεδομένα λοιπόν, η CaM μπορεί να δεσμευτεί στο πεπτίδιο του RyR1 (αα 3614-3643) είτε παρουσία και των δύο λοβών, είτε μόνο με τον καρβοξυτελικό λοβός, ο οποίος μπορεί να επιτρέψει στην CaM να αλληλεπίδρασι ταυτόχρονα τόσο με την περιοχή 3614-3643 όσο και με μία μη συνεχή περιοχή του υποδοχέα (Maximciuc et al. 2006).

3583-3603 RyR2

Οι λειτουργικές συνέπειες της αλληλεπίδρασης της CaM με τους RyR εξαρτώνται από τη συγκέντρωση Ca²⁺, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο. Συγκεκριμένα σε [Ca²⁺]>1μM, η CaM αναστέλλει τον υποδοχέα καρδιακού μυός RyR2, ενώ σε $[Ca^{2+}] < 1 \mu M$ ενεργοποιεί τον RyR1 και αναστέλλει τον RyR2, επομένως το ερώτημα που δημιουργείται είναι αν η CaM ρυθμίζει τον RyR2 με την πρόσδεσή της σε μία υψηλά συντηρημένη περιοχή, όπως αναλύθηκε παραπάνω και για τον RyR1. Πράγματι, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της πρόσδεσης τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές [Ca²⁺] με χρήση επισημασμένης CaM ([³⁵S] CaM), διαπιστώθηκε πως όταν στον υποδοχέα έχει γίνει εξάλειψη της αμινοξικής περιοχής 3583-3603 η CaM γάνει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον RyR2 σε όλες τις περιπτώσεις και συνεπώς η αμινοξική περιογή 3583-3603 αποτελεί την CaMBD του RyR2. Επιπρόσθετα, με την πραγματοποίηση πέντε απλών ή διπλών σημειακών μεταλλάξεων στην περιοχή δέσμευσης της CaM (W3587A, L3591D, F3603A, W3587A/L3591D και L3591D/F3603A), απώλεσαν ή μείωσαν σημαντικά τη δέσμευση [35S]CaM και την αναστολή των μονοκαναλικών λειτουργειών από την Ca²⁺/CaM. Παράλληλα, με υποκατάσταση 4 αμινοξέων στην CaMBD του RyR2 από αντίστοιγα αμινοξέα της περιογής CaMBD του RyR1 (αναφορικό παράδειγμα **Πίνακας 5**), οδήγησε σε πρόσδεση με τη $[^{35}S]$ CaM και αναστολή λειτουργίας, συμπεριφορά ταυτόσιμη με αυτή του αγρίου τύπου RyR2wT, γεγονός που αποδεικνύει οτι η διαφορά στη ρύθμιση των RyR1 και RyR2 από την CaM δεν οφείλεται στις διαφορές της αμινοξικής ακολουθίας τους, αλλά σε άλλες περιοχές αλληλεπίδρασης που μπορεί να ευθύνονται για τη διαφορετική ρύθμιση (Yamaguchi et al. 2003).

Πίνακας 5: Αμινοξική ακολουθία της περιοχής CaMBD των υποδοχέων ρυανοδίνης σκελετικού και καρδιακού μυ αντίστοιχα.

Τύπος Υποδοχέα Ρυανοδίνης	Αμινοξική Ακολουθία
RyR1 [3614-3643]	KSKKAVWHKLLSKQRRRAVVACFRMTPLYNL
RyR2 [3583-3603]	KKAVWHKLLSKQR <mark>K</mark> RAVVACF

Πειράματα cryo-EM που πραγματοποιήθηκαν για την τρισδιάστατη αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης apo-CaM_{WT} με τον υποδοχέα RyR2 (Xiaojun Huang et al., 2012), έδειξαν ότι η apo-CaM λειτουργεί ως αναστολέας του RyR2 και πως η διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ των τμημάτων **3** και **7** (**Εικόνα 25**), περιοχή όπου η Ca²⁺/CaM, αναστολέας του RyR1, δεσμεύει τον RyR1σε σχέση με τη θέση πρόσδεσης της apo-CaM που βρέθηκε για τον RyR1. Οι μεγαλύτερες διαφορές εντοπίζονται στην περιοχή 7, πιθανόν υποδεικνύοντας ότι ο τρόπος δέσμευσης δεν είναι ίδιος με αυτόν της δέσμευσης της Ca²⁺/CaM στον RyR1. Παρόλα αυτά, η δέσμευση της apo-CaM στον RyR2 στην κοιλότητα που σχηματίζεται από τους τομείς 3 και 7 είναι παρόμοια με εκείνη της Ca²⁺/CaM-RyR1 (Rodney, Williams, Strasburg, Beckingham, & Hamilton, 2000; Buratti, Prestipino, Menegazzi, Treves, & Zorzato, 1995; Tripathy et al., 1995; Yamaguchi et al., 2003).



Εικόνα 25: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δέσμευσης της apo-CaM στον RyR2 Με μωβ χρώμα απεικονίζεται η δέσμευση της apo-CaM στον RyR2, μεταξύ των περιοχών 3 και 7 σε κάθε μονομερές του υποδοχέα. (Α) απεικόνιση με πλάγια όψη και (Β) κάτοψη (Xiaojun Huang et al., 2012).

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με χρήση της μεθόδου θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC, isothermal titration calorimetry), μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του κάθε λοβού της CaM (αμινο- και καρβοξυτελικός) με τρεις διαφορετικές περιοχές των RyR1 και RyR2, παρουσία ή χωρίς Ca²⁺ (δηλαδή για τις ισομορφές apo-CaM και Ca²⁺/CaM) (Lau, Chan, & Van Petegem, 2014). Η ITC είναι η κατεξοχήν μέθοδος μελέτης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων καθώς επιτρέπει με υψηλή ευαισθησία τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τόσο της σταθεράς σύνδεσης και της στοιχειομετρίας όσο και των μεταβολών ενθαλπίας, εντροπίας και ελεύθερης ενέργειας Gibbs (καταγραφή θερμοδυναμικών όρων) που συνοδεύουν τη σύνδεση γωρίς την ανάγκη ακινητοποίησης ή επισήμανσης μορίων (Velazquez-Campoy, Leavitt, & Freire, 2004; Leavitt & Freire, 2001). Λόγω λοιπόν της πολυπλοκότητας με την οποία η CaM μπορεί να δεσμεύσει τους στόγους της όπως έχει αναλυθεί ως τώρα και την ικανότητα των λοβών της να αλληλεπιδρούν μεμονωμένα με συγκεκριμένες αμινοξικές περιοχές, η μελέτη με χρήση της ITC επικεντρώθηκε σε 3 θέσεις δέσμευσης (CaMBD1-CaMBD3) (Εικόνα 25), τόσο για τον RyR1 όσο και για τον RyR2. Οι περιοχές αυτές αφορούν τις αμινοξές περιογές 1941-1965 (CaMBD1), 3580-3606 (CaMBD2), και 4246-4276 (CaMBD3) για τον RyR2 ποντικού και εμφανίζουν ομολογία με τις αντίστοιγες περιογές του RyR1, 64%, 89% και 26% ανίστοιγα (Εικόνα 25). Τα αποτελέσμα του ΙΤC είναι συμβατά με τη λυμένη κρυσταλλική δομή του Ca²⁺/CaM με την περιοχή CaMBD2 του RyR1 (αα αντίστοιχη με τη μελέτη κρυσταλλογραφίας ακτίντων-Χ) και αποδεικνύουν πως η περιοχή αυτή αλληλεπιδρά ισχυρά με τον καρβοξυτελικό λοβό της Ca²⁺/CaM, ενώ ο αμινοτελικός λοβός αλληλεπιδρά ασθενότερα και είναι πιθανό να μπορεί να δεσμευτεί και σε άλλη περιοχή (Maximciuc et al. 2006). Επίσης σε εξέταση της συγγένειας δέσμευσης των apoCaM και Ca²⁺/CaM στις περιοχές CaMBD1 (που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα του RyR1 1975-1999) και CaMBD3 (κατάλοιπα RyR1 4295-4325), βρέθηκε ότι η apoCaM δεν δεσμεύεται με το CaMBD1 τμήμα, ούτε στον RyR1 ούτε και στον RyR2, ενώ η Ca²⁺/CaM προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια στον Ca²⁺/αμινοτελικό λοβό του CaMBD1 όπως στον RyR2, χωρίς ισχυρή δέσμευση στον καρβοξυτελικό λόβό. Ένας απλός μηγανισμός που μπορεί να ερμηνεύσει τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι η Ca²⁺/CaM συνδέεται στις CaMBD1 και CaMBD2 θέσεις του RyR2 μέσω του αμινοτελικού λοβού και του καρβοξυτελικού λοβού αντίστοιχα. Τέλος, η περιοχή CaMBD3 τόσο του RyR1 όσο και του RyR2 παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια για την apo-CaM από τις άλλες δύο περιοχές (κυριώς με τον αμινοτελικό λοβό), υποδηλώνοντας ότι η CaMBD3 πιθανόν να αποτελεί την κύρια περιοχή πρόσδεσης της apoCaM. Η πρόσδεση της Ca²⁺/CaM στη CaMBD2 περιοχή των RyR1 και RyR2 είναι σχεδόν εξίσου ισχυρή, αλλά εμφανίζει διαφορετικό θερμοδυναμικό χαρακτήρα, γεγονος που υποδεικνύει ένα διαφορετικό μηχανισμό σταθεροποίησης του συμπλόκου που προκύπτει (Lau, Chan, & Van Petegem, 2014). $ID\% = 64 (R_VR1 v R_VR2)$

RyR1 RyR2 RyR3	-1975 SRYALLMRAFTMSAAETARRTREFR FRYNEVMQALNMSAALTARKTREFR FRYNELMQALNMSAALTARKTREFR	1999 1965 1867	CaMBD1
RyR1 RyR2 RyR3	•3614 •3624 •3634 KSKKAVWHKLLSKQRKRAVVACFRMAP RSKKAVWHKLLSKQRKRAVVACFRMAP	3640 3606 3495	ID% = 89 CaMBD2
RyR1 RyR2 RyR3	•4295 RLAAAAARALRGLSYRSLRRVRRLRRLTAR ALRYNVLTLVRMLSLKSLKKQMKRMKKMTVK SVKRNVTDFLKRATLKNLRKQYRNVKKMTAK	4325 4276 4178	ID% = 26

Εικόνα 26: Αμινοξικές ακολουθίες τριών περιοχών πρόσδεσης της CaM (CaMBD). Με γκρι χρώμα τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανιζόνται σε υψηλή ομολογία (συντηρημένα) μεταξύ των ισομορφών RyR1-RyR3. Με μωβ χρώμα, οι

μεταλλάξεις των καταλοίπων στον RyR1/CaMBD3. Η αρίθμηση είναι για τον RyR1 κουνελιού, RyR2 ποντικού και για ανθρώπινη RyR3 (Lau, Chan, & Van Petegem, 2014).

1.5.2 Η περιοχή πρόσδεσης 4064-4210 (CaMLD) στον RyR1

Δεδομένου ότι οι περιοχές δέσμευσης της CaM στα κανάλια Cav1.1 και RyR1 δεν αλληλεπιδρούν άμεσα, επικεντρώθηκε η μελέτη και για άλλες περιοχές αλληλεπίδρασης. Με τη χρήση ενός εργαλείου βιοπληροφορικής ανάλυσης που βασίζεται σε ομολογία πρωτεϊνικής ακολουθίας, γνωστό ως 3D-PSSM (σήμερα ονομάζεται Phyre²), βρέθηκε μία ακολουθία εντός του RyR1 (αα 4064-4210) και μία εντός της καρβοξυτελικής ουράς της υπομονάδας a1 του Cav1.1 - (αα 1395-1540), η οποία προβλέπεται να αναδιπλώνεται όπως η CaM και να δεσμεύει Ca²⁺ (L. Xiong et al. 2006). Κάποια μοντέλα προβλέπουν ότι αυτές οι δομικές περιοχές, που μοιάζουν με την CaM (CaM-like domain, CaMLD), μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις θέσεις πρόσδεσης της CaM στον RyR1, δρώντας ανταγωνιστικά. Διάφορες μελέτες εξέτασαν την περιοχή αυτή ως προς την ικανότητα της να δεσμεύει Ca²⁺, να αλληλεπιδρά με τον RyR1, το κανάλι τύπου-L του Ca²⁺ (Ca_v1.1) καθώς και με πολλά πεπτίδια που δεσμεύουν τη CaM, συμπεριλαμβανομένου του πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην CaMBD του RyR1 (CaMBP, αα 3614-3643). Με τον τρόπο αυτό διαπιστώθηκε η ικανότητα δέσμευσης δύο Ca²⁺, η οποία οδηγεί σε δομικές αλλαγές που εκθέτουν μια σειρά από υδρόφοβα κατάλοιπα στο διαλύτη. Επίσης επιβεβαιώθηκε ότι το εκφρασμένο θραύσμα του RyR1 (αα 4064-4210), μπορεί να δεσμεύεται στο κανάλι Cav1.1 καθώς και σε πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν τις θέσεις πρόσδεσης της CaM τόσο στον RyR1 και όσο και στο Cav1.1, με αυτές να προτείνονται να αφορούν περισσότερο γενικά μοτίβα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, που δεσμεύονται σε περιοχές που περιέχουν EF-hand μοτίβα. Η σημασία αυτού, για το μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής είναι ότι μπορεί να παρέχει έναν μοναδικό μηγανισμό για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των δύο ιοντικών καναλιών: η περιοχή πρόσδεσης της CaM στο κανάλι Cav1.1 με την περιοχή CaMDL του RyR1 και η περιοχή CaMBD του RyR1 αλληλεπιδρώντας με την περιοχή CaMLD στο Cav1.1 (βλέπε Εικόνα 20). Παράλληλα, σε πειράματα πρόσδεσης της [³H]ρυανοδίνης στον RyR1, βρέθηκε ότι η περιοχή 4064-4210 όπως και η αντίστοιχη CaMBD του RyR1 (αα 3614-3643) μεταβάλλουν τη λειτουργικότητα του Cav1.1 με ασβεστιο-εξαρτώμενο τρόπο, υποδηλώνοντας ότι και οι δύο περιογές μπορεί να εμπλέκονται σε μια ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των αμινοξέων 4064 και 4210 και των 3614 και 3643 στον RyR1, προκειμένου να ρυθμίσουν την απόκριση του καναλιού στις αλλαγές στη συγκέντρωση του Ca²⁺ (L. Xiong et al. 2006).

Τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώνονται από μελέτη της αλληλεπίδρασης της περιογής δέσμευσης CaMBD (Lys3614-Asn3643) με την περιοχή Cys4114-Asn4142 (περιοχή που περιλαμβάνεται στην περιοχή CaMLD) με χρήση αντιπεπτιδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων. Βάσει των αποτελεσμάτων από τα αντισώματα που δημιουργήθηκαν για τις δύο αυτές περιοχές, βρέθηκε ότι υπήρξε σημαντική αναστολή στη δραστικότητα πρόσδεσης της [³H]ρυανανοδίνης του RyR1, γεγονός που υποδεικνύει ότι και οι δυο περιογές είναι απαραίτητες για την ορθή λειτουργία του υποδοχέα. Αυτό συμφωνεί και με το μηχανισμό βάσει του οποίου, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο περιογών Lys3614-Asn3643 και Cys4114-Asn4142 ενεργοποιεί το κανάλι, είτε παρουσία είτε απουσία Ca^{2+} . Τα αντισώματα παρεμποδίζουν την ενδομοριακή αυτή αλληλεπίδραση αναστέλλοντας το κανάλι (Jaya P. Gangopadhyay, & Ikemoto, 2008). Ερμηνεύοντας τα δεδομένα συγκεντρωτικά, είναι σαφές οτι μία ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών CaMBD και CaMLD οδηγεί στην ενεργοποίηση του RyR1, ενώ παρουσία της CaM αναστέλλεται η δράση του καναλιού. Παρόλο που η θεωρία αυτή είναι σύμφωνη με την διαπίστωση ότι η CaM δρα ανασταλτικά στους RyR1 και RyR2, δεν ερμηνεύει όμως αποτελεσματικά τη δράση της CaM ως ενεργοποιητή του RyR1 σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$. Σημαντικό βήμα στη διερεύνηση αυτών των ερωτημάτων για τη λειτουργία του υποδοχέα RyR2, θα αποτελέσει ο προσδιορισμός της αντίστοιχης περιοχής ή περιοχών CaMLD όπως και στον RyR1. Πολύ πρόσφατα, βιοφυσικά και βιοχημικά πειράματα έχουν εντοπίσει μία καινούργια περιοχή του ανθρώπινου RyR2 (αα 4255-4271, πιθανή CaMLD) που συνδέεται ισχυρά με την CaM και πιθανότατα να αποτελεί μία νέα θέση σύνδεσης της CaM, πέραν της περιοχής CaMBD. Ωστόσο, μεχρι σήμερα δεν υπάρχουν συγκεκριμένες δομικές πληροφορίες για την αλληλεπίδραση αυτή. Η καλύτερη γνώση της αρχιτεκτονικής των συμπλόκων CaM-RyR2 που προκύπτουν θα προσφέρει σημαντικές απαντήσεις σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς πίσω από τη λειτουργία του υποδοχέα τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

1.6 Τεχνολογία μελέτης μοριακών αλληλεπιδράσεων

Η ακριβής γνώση της στερεοδιάταξης των βιομορίων είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της δραστικότητάς τους και του τρόπου με τον οποίο οργανώνονται σε πολυπλοκότερες δομές. Μέχρι και σήμερα, υπάρχει δομική πληροφορία για 142.220 μοριακά σύμπλοκα με χρήση διαφόρων τεχνικών (δεδομένα από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB, https://www.rcsb.org/), εκ των οποίων οι λυμένες πρωτεϊνικές δόμές, χωρίς συμπλοκοποίηση με DNA/RNA, αποτελούν το 132.019. Σε πολλές περιπτώσεις όμως, δεν υπάρχει διαθέσιμη κάποια δομή που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την ερμηνεία της βιολογικής τους λειτουργίας και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται εργαλεία μοριακών προσομοιώσεων. Τα εργαλεία αυτά, μέσω εξειδικευμένων με βιολογικό ενδιαφέρον για ένα μεγάλο εύρος φυσικοχημικών συνθηκών. Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκε εκτενέστερα στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν ο ελλειμενισμός (ή αγκυροβόληση, στο εξής **docking**), τεχνική που έχει τη δυνατότητα να αποδώσει την ενεργειακά προτιμητέα στερεοδιάταξη των μορίων ενός συμπλόκου για εξαιδικευμένω βιολογικής πληροφορία δισητης αποσύσα διπλωρατική εργασία ήταν ο ελλειμενισμός και συναλοκών αυχορίθημο και λογισμικών με βιολογικό ενδιαφέρον για ένα μεγάλο εύρος φυσικοχημικών συνθηκών. Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκε εκτενέστερα στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν ο ελλειμεινισμός (ή αγκυροβόληση, στο εξής **docking**), τεχνική που έχει τη δυνατότητα να αποδώσει την ενεργειακά προτιμητέα στερεοδιάταξη των μορίων ενός συμπλόκου για εξαιδικευμένα βάσει του τύπου των υπό εξέταση μορίων.

1.6.1 Docking και η σημασία του

To docking, τυπικά επιδιώκει να βρει την «καλύτερη» δυνατή αλληλεπίδραση μεταξύ δύο μορίων: του υποδοχέα και του πρσδέτη (στο εξής ligand), για παράδειγμα μεταξύ δύο πρωτεϊνών (Bonvin, 2006; Gray, 2006; Sternberg, Gabb, & Jackson, 1998), πρωτεΐνης-DNA, DNA και άλλων μικρών μορίων, πρωτεΐνης και ενός μικρού μορίου που μπορεί να είναι ορμόνη, αναστολέας, φάρμακο (Taylor, Jewsbury, & Essex, 2002). Το αποτέλεσμα της πληροφορίας που θα δοθεί, είναι χρήσιμο για το συμπέρασμα του βιολογικού μηχανισμού της αλληλεπίδρασης, τον προσδιορισμό της έντασης και της ισχύς της δέσμευσης και γενικότερα για τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και της τεταρτοταγούς δομής. Χρησιμοποιείται αρκετά στον τομέα της Κυτταρικής Βιολογίας, με σκοπό να βρει απαντήσεις σε ερωτήματα βιολογικής λειτουργίας των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών με άλλα μόρια του κυττάρου, αλλά κυρίως αποτελεί εργαλείο κλειδί στο σχεδιασμό φάρμακων (rational drug design), όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση αναστολέων της δράσης πρωτεϊνών-στόχων. Ουσιαστικά οι αλγόριθμοι του docking με δύο μόρια, ελέγχουν αν αυτά είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, ενώ ταυτόχρονα ψάχνουν τον προσανατολισμό εκείνο κατά τον οποίο βελτιστοποιείται η αλληλεπίδραση (κατάσταση στην οποία η ενέργεια του συμπλόκου είναι ελάγιστη). Για τη προβλέψη της «σωστής» πρόσδεσης, ως βασικά δεδομένα λαμβάνονται οι ατομικές συντεταγμένες των δύο μορίων, στην πράξη ωστόσο μπορούν να δοθούν και πρόσθετες βιοχημικές και φυσικοχημικές πληροφορίες, όπως η γνώση των θέσεων πρόσδεσης (ligand binding sides), η θερμοκρασία, το pH του διαλύματος, η ιοντική ισχύς κ.τ.λ.

Μία από τις πρώτες θεωρίες που βασίστηκε το docking ήταν αυτή του Crick, ο οποίος πρότεινε ότι η συμπληρωματικότητα της υπερέλικας α-ελίκων θα μπορούσε να διομορφωθεί σύμφωνα με το μοτίβο κουμπιά σε κουμπότρυπες (knobs into holes ή «εσοχές-εξοχές», οι επιφάνειες των δύο πρωτεϊνών είναι συμπληρωματικές ή το γεωμετρικό κέντρο του ενζύμου είναι συμπληρωματικό, σα γεωμετρικό σχήμα, με το υπόστρωμα – «κλειδίκλειδαριά») (Crick, 1953), αλλά η μεγάλη ανάπτυξη του πεδίου του docking ήρθε στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Το πρώτο υπολογιστικό πρόγραμμα που αναπτύχθηκε για την απεικόνιση της επιφάνειας αποτελούνταν από ένα σύνολο κουκκίδων που επεκτείνονταν κατά μήκος της επιφάνειας van der Waals (B. Lee & Richards, 1971), μέθοδος που πλέον δεν εφαρμόζεται στο docking. Αυτό που γίνεται στην πραγματικότητα είναι πως κάθε άτομο αναπαριστάται ως σφαίρα με ακτίνα ίση με την ακτίνα van der Waals του. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον λεπτομερειακό υπολογισμό ενός τρισδιάστατου πλέγματος από τον Connolly (επιφάνεια Connolly) (Connolly, 1983b; Connolly, 1983a), η τεχνική του Lenhoff (Roth, Neal, & Lenhoff, 1996), η δημιουργία τρισδιάστατου πλέγματος και άλλων επιτευγμάτων (Kuntz et al. 1982), οδήγησαν στην επαρκή αναπαράσταση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης και της αναγνώρισης των περιοχών ενδιαφέροντος (κοιλότητες, προεξοχές). Έτσι λοιπόν, οι αρχικοί αλγόριθμοι του docking βασίστηκαν σε απλά γεωμετρικά κριτήρια (αρχή συμπληρωματικότητας) (Kuntz et al., 1982; Zielenkiewicz & Rabczenko, 1984; R. H. Lee & Rose, 1985; DesJarlais, Sheridan, Dixon, Kuntz, & Venkataraghavan, 1986) και αργότερα προστέθηκαν πιο σύνθετοι που

περιείχαν και όρους ενέργειας (διαμοριακές και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις) (Wodak & Janin, 1978; Wodak, De Crombrugghe, & Janin, 1987; Goodford, 1985; Goodsell, Morris, & Olson, 1996).

Υπάρχουν τρία βασικά σταδια κατά τη διαδικασία του docking: 1) αναπαράσταση του συστήματος, 2) χωρική αναζήτηση διαμόρφωσης και 3) κατάταξη πιθανών αποτελεσμάτων (ranking score). Τα στάδια αυτά είναι αλληλένδετα, δηλαδή η επιλογή της απεικόνισης της επιφάνειας (σταθερή ή ευέλικτη) θα καθορίσει τους τύπους των αλγορίθμων που θα πραγματοποιήσουν αναζήτηση διαμόρφωσης και στη συνέχεια τον τρόπο κατάταξης των αποτελεσμάτων βάσει ενός συστήματος βαθμολόγησης. Καθώς το docking ουσιαστικά προσομοιώνει την αλληλεπίδραση μιας πρωτεϊνικής επιφάνειας, ένα επόμενο ερώτημα είναι πώς ορίζεται μία πρωτεϊνική επιφάνεια. Η επιφάνεια μπορεί να περιγραφεί με μαθηματικά μοντέλα, όπως π.χ. με γεωμετρικά σχήματα ή πλέγματα έχοντας είτε στατικά (docking σταθερού σώματος - στο εξής rigid docking) είτε δυναμικά χαρακτηριστικά (ευέλικτο docking - στο εξής, flexible docking). Η διαδικασία του docking περιλαμβάνει δύο ακόμα συνιστώσες: έναν αποτελεσματικό αλγόριθμο αναζήτητης (search algorithm) και έναν καλό αλγόριθμο βαθμολόγησης (scoring function). Η αποτελεσματικότητα του αλγορίθμου αναζήτησης έγκειται στη ταγύτητα με την οποία καλύπτει το σχετικό χώρο διαμόρφωσης, ενώ αυτή του αλγορίθμου βαθμολόγησης βασίζεται στην ταχύτητα με την οποία μπορεί να εφαρμοστεί για έναν μεγάλο αριθμό πιθανών λύσεων και κυρίως στην ικανότητα του να διακρίνει τις εγγενείς από τις μη-εγγενείς αγκυροβολημένες διαμορφώσεις με βάση κάποια ενεργειακά κριτήρια. Για τους λόγους αυτούς, θα πρέπει να συνδιάζονται παντα οι καλύτεροι αλγόριθμοι αναζήτησης με τους καλύτερους αλγόριθμους βαθμολόγησης, ώστε να επιτευχθεί κάθε φορά το πιο «σωστό» αποτέλεσμα docking (Halperin et al. 2002).

1.6.2 <u>Τύποι μελετών Docking</u>

Γενικά, στη μελέτη της αλληλεπίδρασης μορίων μέσω docking, τα συμμετέχοντα μόρια θεωρούνται εύκαμπτα διαθέτοντας εκατοντάδες έως γιλιάδες βαθμούς ελευθερίας (αριθμός περιστροφών γύρω από τους δεσμούς Ca-C' και N- C_a των πεπτιδικών ομάδων), με το συνολικό αριθμό των πιθανών στερεοδιατάξεων να είναι αστρονομικός. Ο βαθμός της ευελιξίας των μορίων αυτών μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις κατηγορίες βάσει του βαθμού ελευθερίας τους: 1) rigid docking, όπου θεωρεί τα δύο μόρια, ως δύο άκαμπτα στέρεα σώματα, 2) semi-flexible (ημι-ευέλικτο), το οποίο είναι ασύμμετρο καθώς ένα από τα δύο μόρια, συνήθως ο μικρότερος προσδέτης, θεωρείται εύκαμπτος, ενώ ο υποδογέας άκαμπτος και 3) flexible docking, όπου και τα δύο μόρια θεωρούνται εύκαμπτα. Λόγω αυτού του διαγωρισμού των αλγορίθμων, οι μελέτες docking διακρίνονται σε αγκυρόβοληση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (στο εξής, Protein-Protein Docking) και σε αγκυροβόληση πρωτεΐνης-μικρού μορίου (στο εξής, Protein-Ligand Docking). Παρόλα αυτά, και για τους δύο τύπους, οι αλγόριθμοι docking εμφανίζουν ένα φάσμα ευελιξίας. Το rigid docking γειρίζεται έναν ορισμένο βαθμό μεταβλητότητας επιφάνειας επιτρέποντας κάποια ενδομοριακή διείσδυση. Στο άλλο άκρο, για το flexible docking, ανάλογα με το μέγεθος των μορίων, μπορεί κανείς να επιτρέψει κίνηση σε (σχεδόν) κάθε δεσμό του προσδέτη. Μέχρι πρότινος, ακόμη και όταν επιτρέπεται μεγάλος βαθμός ευελιξίας στο flexible docking, τυπικά ο υποδοχέας διατηρείται άκαμπτος ή με περιορισμένη μόνο ευελιξία κυρίως στη θέση πρόσδεσης. Έτσι λοιπόν έγει επικρατήσει στη διαδικασία του Protein-Protein Docking τα δύο βιομόρια να θεωρούνται «άκαμ π τα» - rigid docking. Τα μόρια αυτά διαθέτουν **6** βαθμούς ελευθερίας και αρχικά εφαρμόζονται στερεοχημικοί περιορισμοί και στη συνέχεια εκτελούνται ενεργειακοί υπολογισμοί για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις. Σαν μέθοδος είναι αρκετά δοκιμασμένη, αν και πάντα γρειάζεται ένας πολύ καλός και γρήγορος αλγόριθμος βαθμολόγησης για να αξιολογήσει ταγύτατα έναν μεγάλο αριθμό δομικών λύσεων, μιας και με το μεγάλο μέγεθος των συμπλόκων δημιουργεί δυσκολίες. Η πλειοψηφία των αλγορίθμων αναζήτησης του rigid docking προϋποθέτει γνώση της περιοχής πρόσδεσης, αν και μερικοί είναι ικανοί να χειριστούν ολόκληρες τις μοριακές επιφάνειες (όπως ο μετασχηματισμός Fourier-FFT (Katchalski-Katzir et al. 1992), γεωμετρικός κατακερματισμός-Geometric Hashing (Norel et al. 1994) και ο BiGGER (Palma et al. 2000)), με τους χρόνους της CPU (χρόνος επεξεργασίας δεδομένων από την κεντρική μονάδα επεξεργασίας CPU) ανάλογα με την αναζήτηση, να ποικίλουν σημαντικά. Αντίθετα στο Protein-Ligand Docking, ο υποδογέας είναι «άκαμπτος» ενώ ο προσδέτης «εύκαμπτος» - flexible docking. Αυτός ο τύπος μελέτης docking έχει έναν πολυ μεγαλύτερο χώρο αναζήτησης με αποτελέσμα να παρουσιάζει μεγάλο υπολογιστικό κόστος (χρόνος και υπολογιστική δύναμη) σε σχέση με το rigid-docking. Για να ελαττωθεί αυτό το κόστος χρησιμοποιούνται διάφορες εναλλακτικές μέθοδοι, οι οποίες ουσιαστικά χωρίζουν τον προσδέτη σε «σταθερά» σώματα που συνδέονται με εύκαμπτα τμήματα ή γίνεται αναζήτηση στο χώρο, αν και συχνά χρειάζεται εξαντλητική

αναζήτηση πλέγματος κάθε φορά που προστίθεται και ένα σώμα-θραύσμα (DesJarlais et al. 1986; DesJarlais et al. 1988; Leach & Kuntz, 1992). Συνήθως όμως επιλέγονται στοχαστικές μέθοδοι, δηλαδή μέθοδοι που βασίζονται σε έναν βαθμό τυχαιότητας, οι οποίοι δεν δίνουν πάντα τη «βέλτιστη» λύση, αλλά μία πιθανά σωστή μέσα σε ένα εύλογο χρόνικό διάστημα. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι **Γενετικοί** αλγόριθμοι (λογισμικό **GOLD**) και οι αλγόριθμοι **Monte Carlo** (AutoDock) To Protein-Ligand Docking (**Εικόνα 27**), βρίσκει εφαρμογή κυρίως στο σχεδιασμό φαρμάκων με βάση γνωστή δομή (Structure-Based Drug Design – SBDD). Δεδομένου ότι η πληροφορία της θέσης πρόσδεσης του ligand (συνήθως κάποια κοιλότητα του υποδοχέα) αναγνωρίζεται από πειραματικά προσδιορισμένες δομές, προβλεπει το «σωστό» τρόπο πρόσδεσης, δηλαδή τη θέση, τον προσανατολισμό και τη διαμόρφωση, καθώς και τη συγγένεια πρόσδεσης (score). Αν υπάρχει και η πληροφορία για την ακριβής πρόσδεση, μπορούν να αναγνωριστούν τα τμήματα που είναι απαραίτητα για να υπάρξει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο βιομορίων, να βελτιστοποιηθεί η πρόσδεση καθώς και να αποφευχθούν αλλαγές που μπορεί να προκαλέσουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις.



Εικόνα 27: Παράδειγμα Protein-Ligand Docking. Με διακεκομμένες γραμμές το πλέγμα (grid) που ορίζεται ως χώρος αναζήτησης (μπλε χρώμα), με πράσινο το σημείο πρόσδεσης που ορίζεται, στη συνέχεια προστίθεται ο ligand (εικόνα από server: DockThor, a receptor-ligand docking program).

Τα περισσότερα προγράμματα δέχονται σαν δεδομένα εισόδου είτε τις συντεταγμένες των μορίων (X-Y-Z), είτε αρχεία σε PDB μορφοποίηση. Οι δομές της PDB, περιέχουν μόρια νερού λόγω των συνθηκών πειραματικού προσδιορισμού τους, τα οποία όμως γενικά πρέπει να απομακρυνθούν με εξαίρεση αν είναι γνωστό εξ αρχής ότι έχουν κάποιο σημαντικό ρόλο. Επίσης οι δομές αυτές δεν περιέχουν υδρογόνα, επομένως θα πρέπει ο κάθε χρήστης να πρωτονιώσει την κάθε δομή (εξειδικευμένα λογισμικά) ή πραγματοποιείται από τα προγράμματα docking αυτόματα τις περισσότερες φορές. Όλα αυτά τα αρχικά βήματα συνιστούν προσοχή καθώς μπορεί να γίνει και λάθος πρωτονίωση, ενώ αμινοξέα όπως γλουταμικό, ασπαρτικό και ιστιδίνη χρήζουν ιδιαίτερης επεξεργασίας λόγω των ομάδων δοτών τους και τη στροφή γωνιών τους (ιστιδίνη), ενώ οι πλευρικές αλυσίδες δομής από την PDB μπορεί να είναι και λάθος. Αξίζει να τονιστεί ότι οι δομές στην PDB που έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, δίνουν πληροφορία για την ηλεκτρονιακή πυκνότητα και όχι τις θέσεις των ατόμων στο χώρο. Όσον αφορά τον ligand, είναι απαραίτητη η αξιοπιστία της δομής για την έναρξη της διαδικασίας. Στον ligand, μόνο οι γωνίες στροφής γύρω από τους δεσμούς μεταβάλλονται, ενώ η πρωτονίωση επηρεάζει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.

1.6.3 Αλγόριθμοι Αναζήτησης και Βαθμολόγησης

Ο αλγόριθμος Αναζήτησης (search algorithm), ουσιαστικά παράγει έναν αριθμό από πιθανές στερεοδιατάξεις στη θέση πρόσδεσης των δύο βιομορίων που εξετάζονται. Ο αλγόριθμος αυτός, προσπαθεί να εντοπίσει την πιο σταθερή κατάσταση του συμπλόκου (ενεργειακό ελάχιστο) στο ενεργειακό πεδίο, έχοντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις στο δυναμικό του: 1) πλήρης αναζήτηση χώρου και 2) μία σταδιακή αναζήτηση του χώρου διαμόρφωσης με διαχωρισμό σε δύο ανεξάρτητες διαδικασίες αναζήτησης, ανάλογα με το αν η θέση πρόσδεσης του ligand είναι γνωστή ή όχι (Balbes, Mascarella, & Boyds, 1994). Στην πρώτη περίπτωση γίνεται αναζήτηση σε όλο το χώρο της μοριακής επιφάνειας, με έναν προκαθορισμένο συστηματικό τρόπο, έχοντας ως δεδομένο τους 6 βαθμούς ελευθερίας από τα δύο βιομόρια εισόδου και τους επιπλέον λόγω της αλληλεπίδρασής τους (Protein-Protein Docking). Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση πραγματοποιείται αναζήτηση είτε με μερικώς

τυχαίο τρόπο είτε βάσει κάποιων κριτηρίων, είτε παράγοντας σημεία προσαρμογής. Περιλαμβάνει κυρίως αλγορίθμους Monte Carlo (MC), μοριακή δυναμική (MD) και εξελικτικούς αλγορίθμους όπως γενετικοί αλγόριθμοι (GA) και αναζήτηση Tabu (Halperin et al. 2002).

Με όποιον αλγόριθμο και να πραγματοποιηθεί αναζήτηση, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι ένας πληθυσμός από δομικά σύμπλοκα, όπου το καθένα θα έχει εκτιμηθεί και από μία ενεργειακή συνάρτηση, είτε ελαστική (όπως στο rigid docking), είτε πιο αυστηρή όπως συμβαίνει στους αλγορίθμους MC, MD και μεθόδους ελαχιστοποίησης. Οι αλγόριθμοι διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στον τρόπο των υπολογιστικών μεθόδων (γενετικοί αλγόριθμοι, θεωρία γραφημάτων, μοριακή δυναμική, Monte Carlo κλπ.), όσο και στα φυσικοχημικά κριτήρια, τα οποία με τη σειρά τους καθορίζουν τη συνάρτηση βαθμολόγησης (δεσμοί υδρογόνου, φορτία, αλληλεπίδραση με ζεύγη αμινοξέων, ενέργεια διαλυτοποίησης, ομοιότητα με γνωστό ligand, κλπ.). Επίσης να σημειωθεί ότι οποιοσδήποτε αλγόριθμος χρησιμοποιείται στις δομικές συγκρίσεις, μπορεί να εφαρμοστεί σε rigid docking (D. Fischer, Lin, Wolfson, & Nussinov, 1995; Nussinov & Wolfson, 1991) και το αντίστροφο, οποιοσδήποτε αλγόριθμος βασίζεται στη γεωμετρία μπορεί να εφαρμοστεί σε μελέτες δομικών συγκρίσεων, ανεξάρτητα από την αμινοξική ακολουθία.

Ο ιδανικός αλγόριθμος βαθμολόγησης, είναι αυτός που μπορεί να υπολογίσει με ακρίβεια τη συγγένεια πρόσδεσης δύο βιομορίων. Ουσιαστικά εντοπίζει τα βιολογικά δραστικά μόρια και κατατάσσει υψηλότερα τους πιθανούς τρόπους πρόσδεσης των βιολογικά δραστικών μορίων έναντι των μη δραστικών. Έπειτα κατατάσσει υψηλότερα τους σωστούς τροπους πρόσδεσης των βιολογικά δραστικών μορίων έναντι των λανθασμένων, και έτσι ταυτοποιεί το σωστό τρόπο πρόσδεσης που έγκειται σε ένα σύμπλοκο με χαμηλό rmsd σε σχέση με την κρυσταλλογραφική δομή (Root Mean Square Deviation – ένα μέτρο «συμπληρωματικότητας» της μίας δομής με την άλλη, δηλαδή πόσο κοντά είναι οι δύο δομές) σε εύλογο χρονικό διάστημα. Η ροή του αλγορίθμου αυτού μπορεί να χωριστεί σε δύο ομάδες: ολοκληρωμένοι αλγόριθμοι (στο εξής, integrated algorithm) και τμηματικοί αλγόριθμοι (στο εξής, edge algorithm). Στις πρώτες, η βαθμολόγηση είναι ενσωματώμενη στο στάδιο της αναζήτησης και φιλτράρει όλες τις πιθανές λύσεις, ενώ στη δεύτερη κατηγορία η βαθμολόγηση εφαρμόζεται στο τέλος του σταδίου της αναζήτησης. Οι integrated αλγόριθμοι εντοπίζονται κυρίως στους γενετικούς αλγόριθμους αναζήτησης και στους αλγόριθμους αγκυροβόλησης (αλγόριθμοι που τμηματοποιούν το βιομόριο) (Gardiner, Willett, & Artymiuk, 2001; Morris et al. 1998). Ο αλγόριθμος βαθμολόγησης θα πρέπει να συμπεριλάβει επίσης και το ενδομοριακό σκορ, ενώ η ίδια η βαθμολόγηση μπορεί να προσδιοριστεί βάσει: 1) άλλων αποτελεσμάτων που εξήγαγε το πρόγραμμα, 2) μία γνωστή δομή ή 3) του ίδιου αποτελέσματος. Γενικώς, τα αποτελέσματα δίνονται σε μορφή συσσωματωμάτων (στο εξής, clusters), τα οποία θα περιέχουν τις λύσεις με τα χαμηλότερα rmsd που έχουν βρεθεί βάσει μίας επικρατέστερης δομής (ή θα δίνεται μία «μέση» λύση, που έχει εξαχθεί από ένα σύνολο clusters). Επίσης, εκτός από το κριτήριο του rmsd (όσο πιο χαμηλό, τόσο πιο κοντά στο «σωστό» αποτέλεσμα), πολλές φορές ως κριτήριο βαθμολόγησης συγκαταλέγεται και το μέγεθος των clusters (όσο μεγαλύτερο, τόσο πιο κοντά στη «σωστή» πρόβλεψη πρόσδεσης). Επιπρόσθετα, η βαθμολόγηση εξαρτάται και από το σχήμα της περιοχής πρόσδεσης· για παράδειγμα, προβλέπεται ένας μεγαλύτερος αριθμός αποτελεσμάτων όταν η περιοχή πρόσδεσης είναι επίπεδη σε σύγκριση με περιοχές που σχηματίζουν κοιλότητες.

Γενικά, οι παράμετροι της βαθμολόγησης μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες: τις συνολικές και τις ατομικές. Αυτές που ανήκουν στις συνολικές, αναφέρονται σε μία ιδιότητα η οποία με τη σειρά της χαρακτηρίζει ολόκληρο το βιομόριο, ενώ οι ατομικές αναφέρονται σε ένα συγκεκριμένο άτομο ή κατάλοιπο. Ένα παράδειγμα συνολικής παραμέτρου είναι αυτή της διαμέτρου που χρησιμοποιείται στο μακρομοριακό docking, ενώ παράδειγμα ατομικής παραμέτρου είναι τα ζεύγη δεσμών αμινοξέων (PAB, η πιθανότητα του αμινοξέος A να έρχεται σε επαφή με το αμινοξύ B) που χρησιμοποιείται στον αλγόριθμο BiGGER.

Συγκεκριμένα, οι πιο σύνθετοι αλγόριθμοι βαθμολόγησης που χρησιμοποιούνται στο docking, περιλαμβάνουν την ελαχιστοποίηση της ενέργειας του rigid docking (για να χαρακτηριστεί ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο θα πρέπει να βρίσκεται στην ελάχιστη ενέργεια το βιομόριο), την ελαχιστοποίηση της διαμόρφωσης συμπεριλαμβανομένων των πλευρικών αλυσίδων, τη διαλυτοποίηση, τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις, τον όρο van der Waals στην έκφραση της ελεύθερης ενέργειας ή μιας ψευδο-ενοποιημένης ελαχιστοποίησης Monte Carlo, με κάθε έναν όρο να διαθέτει κάποιο συντελεστη βαρύτητας (Totrov & Abagyan 1994). Τα απλούστερα και ταχύτερα συστήματα βαθμολόγησης περιλαμβάνουν στοιχεία όπως η γεωμετρική συμπληρωματικότητα, έλεγχοι πρόσδεσης και αλληλοεπικάλυψης, μέτρημα δεσμών υδρογόνου, έλεγχοι φορτίων, έκταση της ολικής θαμμένης πολικής/μη πολικής επιφάνειας. Το κάθε πρόγραμμα docking υλοποιεί και βαθμολογεί διαφορετικά αυτές τις λειτουργίες. Με βάση τη λειτουργία τους, οι αλγόριθμοι αυτοί διακρίνονται σε κατηγορίες, κάθε μία από τις οποίες εντοπίζεται στα προγράματα docking: 1) Πεδία δυνάμεων (Forcefield-based), 2) Εμπειρικοί (Empirical) και 3) Δυναμικά βασισμένα σε πρότερη γνώση (Knowledge-base potentials). Η πρώτη κατηγορία συναντάται στα προγράμματα DOCK, AutoDock και στον αλγόριθμο βαθμολόγησης του GOLD, GoldScore και βασίζεται σε πεδία δυνάμεων που χρησιμοποιούνται στις μεθόδους μοριακής μηχανικής. Η δεύτερη, στον αλγόριθμο ChemScore του GOLD, στον αλγόριθμο PLP και στον αλγόριθμό Glide SP/XP της πλατφόρμας του Maestro, όπου οι παράμετροί τους προκύπτουν από πειραματικές προσδιορισμένες συγγένειες πρόσδεσης. Τέλος, η τρίτη κατηγορία συναντάται στους αλγόριθμους PMF, DrugScore, ASP και προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των πειραματικά προσδιορισμένων δομών των συμπλόκων (Halperin et al. 2002).

1.6.4 Προγράμματα Docking και αξιολόγησή τους

Υπάρχει μία τεράστια λίστα από λογισμικά που πραγματοποιούν docking, καθώς και εργαλεία στο ίντερνετ άλλα ελεύθερα στο χρήστη άλλα με συνδρομή (Halperin et al., 2002; Warren et al., 2006; Cross et al., 2009; Pagadala, Syed, & Tuszynski, 2017). Το καθένα από αυτά μπορεί να ειδικεύεται τόσο στο είδος του βιομορίου για το οποίο μπορει να εξεταστεί η αλληλεπίδραση, όσο και στους αλγορίθμους αναζήτησης και βαθμολόγησης, γι' αυτό και είναι απαραίτηση και η αξιολόγησή τους, μία διαδικασία δύσκολη και απαιτητική (Rodrigues & Bonvin, 2014; Taylor et al., 2002).

Γενικά, όπως υπάρχουν οι διαγωνισμοί CASP και CAFASP που αφορούν την πρόγνωση της δομής των πρωτεϊνών και την αξιολόγησή τους, έτσι λοιπόν υπάρχει και για το docking ο διαγωνισμός **CAPRI** (Critical Assessment of PRediction of Interactions, <u>https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/capri/capri.html</u>). Το CAPRI είναι μία συνεχής διαδικασία στην οποία οι ερευνητές καλούνται να εφαρμόσουν τις επιθυμητές τους μεθοδολογίες για το docking δύο βιομορίων (πρωτεϊνών συνήθως) σε ένα σύνολο δεδομένων που αποτελείται και από βιομόρια των οποίων οι δομές έχουν προσδιοριστεί πρόσφατα, οι οποίες όμως παραμένουν κρυφές με τη συναίνεση των ίδιων των ερευνητών που πέτυχαν τον πειραματικό αυτό προσδιορισμό. Γενικά, κατά τη διάρκεια ενός διαγωνισμού CAPRI, οι επιστήμονες που κάνουν την πρόγνωση δεν γνωρίζουν τη δομή, αλλά και οι αξιολογητές δεν γνωρίζουν το δημιουργό της κάθε πρόγνωσης. Ο διαγωνισμός αυτός υφίσταται από το 2001, και από τότε πραγματοποιείται κάθε 2 με 4 φορές το χρόνο, με διάρκεια 3 έως 6 εβδομάδες.

Υπάρχει λοιπόν μία συνεχόμενη εξέλιξη στις μεθόδους του docking και συνεχώς υπάρχει η ελπίδα για επίτευξη του τέλειου αποτελέσματος. Ένας από τους πιο άμεσους στόχους που θα βοηθήσει μετέπειτα τις μεθόδους του docking, αφορα στην παραγωγή ολοένα και πιο ρεαλιστικών δομικών μοντέλων, μέσω της ενσωμάτωσης της πειραματικής πληροφορίας στα προγράμματα. Έχουμε ήδη αναφέρει τη χρησιμότητα του Protein-Ligand Docking στο τομέα του σχεδιασμού νέων φαρμάκων, παρόλα αυτά το Protein-Protein Docking, είναι αυτό που μπορεί να δώσει απαντήσεις σε θέματα βιολογικής λειτουργίας συμπλόκων, τεταρτοταγούς δομής, αλληλεπιδράσεων, μηχανισμών δράσης ενζύμων κ.ά.

1.7 <u>Σκοπός</u>

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, υπήρξε η μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της καλμοδουλίνης (αγρίου τύπου) με πεπτιδικές περιοχές του RyR2, μέσω προσομοιώσεων docking καθώς και η μελέτη μεταλλαγμάτων της CaM, που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με καρδιακές δυσλειτουργίες και πώς αυτές επηρεάζουν ή όχι το μηχανισμό αλληλεπίδρασης με τον RyR2.

Εξαιτίας της απουσίας δομικής πληροφορίας για τον RyR2, έγιναν προσπάθειες de novo σύνθεσης πεπτιδίων με αμινοξική ακολουθία, περιοχές όπου με πρόσφατα βιοφυσικά πειράματα, έχουν βρεθεί να δεσμεύουν με μεγάλο βαθμό συγγένειας την Ca²⁺/CaM. Για την CaM, χρησιμοποιήθηκε μία «μέση» δομή, με δεδομένα που λήφθηκαν από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB, που παρέχει δομική πληροφορία, η οποία προέκυψε με μεθόδους μηχανικής μάθησης (μέθοδος clustering). Έτσι λοιπόν σχεδιάστηκαν δύο πεπτίδια του ανθρώπινου RyR2, που έχουν αναγνωριστεί ως κανούργιες περιοχές δέσμευσης της Ca²⁺/CaM, με αμινοξικές περιοχές τις:

Πεπτίδια	Αμινοξική ακολουθία	Μοριακό Βάρος (MW)	Ισοηλεκτρικό Σημείο (pI)
ΠεπτίδιοΒ	[3584-3602]	2220.7	11.17
Πεπτίδιο _F	[4255-4271]	2061.71	11.93

για τα πεπτίδια **B** και **F** να έχει βρεθεί με βιοφυσικές μεθόδους ότι αποτελούν την κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των πεπτιδίων B και F επιλέχθηκαν υψηλής απόδοσης τεχνολογίες docking, ενώ έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων τους για την εξαγωγή ορθότερου συμπεράσματος όπως θα αναλυθεί σε επόμενα κεφάλαια.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε μεταλλαξογένεση στην CaM με σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων, οι οποίες έχουν βρεθεί να σχετίζονται με καρδιακές παθήσεις, όπως οι CPVT (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia), LQTS (long QT-syndrome) και IVF (idiopathic ventricular fibrillation). Μέχρι και σήμερα έχουν εντοπιστεί 17 παρανοηματικές μεταλλάξεις, οι οποίες και προκλήθηκαν σε μία δομή πρότυπο της ανθρώπινης CaM δεσμευμένης με Ca²⁺, σε ένα περιβάλλον υψηλής τεχνολογίας για μοριακές μοντελοποιήσεις και προσομοιώσεις. Έτσι λοιπόν δεδομένου του ασαφούς μοριακού μηχανισμού αλληλεπίδρασης Ca²⁺/CaM με RyR2, και της άγνωστης επίδρασης των μεταλλαγμάτων της Ca²⁺/CaM στην αλληλεπίδραση Ca²⁺/CaM – RyR2, υπήρξε η ανάγκη διευρεύνησης των τριών πιθανών σεναρίων μέσα από τα οποία η παρουσία μεταλλάξεων στη CaM μπορεί να οδηγήσει σε παθογενείς καταστάσεις, και συγκεκριμένα των:

- Μεταβολή της συγγένειας της CaM για τα ιόντα Ca²⁺
- Μεταβολή της συγγένειας της Ca²⁺/CaM για τον υποδοχέα RyR2
- Εμφάνιση σοβαρών επιπτώσεων στη θερμοσταθερότητα του συμπλόκου Ca²⁺/CaM RyR2

Τέλος, αφού τα μεταλλάγματα της CaM επεξεργάστηκαν με ελαχιστοποίηση ενέργειας, μελετήθηκαν όλες οι πιθανές δομικές και ενεργειακές μεταβολές συγκριτικά με την αντίστοιχη κάθε φορά αγρίου τύπου καλμοδουλίνη, με σκοπό την αποδοχή ή απόρριψη του εκάστοτε σεναρίου που μελετάται.

Όλες οι παραπάνω προσπάθειες και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν συμβάλλουν στην απόκτηση δομικής πληροφορίας του τρόπου αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων περιοχών του ανθρώπινου RyR2 με την Ca²⁺/CaM, καθώς και του πιθανότερου μοριακού μηχανισμού σύμφωνα με τον οποίο μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κατάλοιπα της CaM μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση διαφόρων τύπων αρρυθμιών που μέχρι πρόσφατα χαρακτηρίζονταν ως αγνώστου αιτιολογίας.

II. Πειραματικό μέρος

2.1 <u>Πορεία εργασίων</u>

Για την διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας ακολουθήθηκε μία συγκεκριμένη πορεία πειραμάτων και αξιολόγησή τους, που παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω (Εικόνα 28):



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της πορείας εργασιών της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Παρουσιάζονται τα βήματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν μαζί με τα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν

Το <u>αρχικό ερώτημα</u>:

Πράγματι η CaM εμφανίζει υψηλή συντήρηση πρωτοταγούς-τριτοταγούς δομής ανάμεσα στους οργανισμούς από τους οποίους έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα;

- Συλλογή δεδομένων πρωτοταγούς δομής της CaM (αμινοξική ακολουθία) από βιολογική βάση δεδομένων (UniProt), από όλους τους οργανισμούς που έχει απομονωθεί μέχρι και σήμερα, μόνο των καλά σχολιασμένων δομών (Swiss-Prot)
- ο Χρήση εργαλείου για πολλαπλή στοίχιση των δεδομένων (T-coffee)
- Διόρθωση από το χρήστη της πολλαπλής στοίχισης, με εξειδικευμένο εργαλείο (JalView), έχοντας ως σκοπό τη στοίχιση των αμινοξικών καταλοίπων που αποτελούν μέρος αποκλειστικά της CaM (για παράδειγμα η μεθειονίνη πρέπει να αφαιρείται)
- Συλλογή δεδομένων τριτοταγούς δομής της CaM, από βιολογική βάση δεδομένων (PDB), από όλους τους οργανισμούς που έχει απομονωθεί μέχρι και σήμερα, και με οποιαδήποτε πειραματική τεχνική προσδιορισμού και συγκεκριμένα των μορφών: apo-CaM, Ca²⁺/CaM, CaM/πρωτεΐνη, CaM/πεπτίδιο, CaM/ligand. Εξαίρεση οποιοδήποτε μετάλλαγμα της CaM
- Σύγκριση των δεδομένων δομικής πληροφορίας με βιολογική βάση δεδομένων που διαθέτει αποκλειστικά δομική πληροφορία της CaM (Calmodulin, Proteopedia, life in 3D)

Επόμενο στάδιο επεξεργασίας:

- Υπέρθεση δομών από το σύνολο δεδομένων δομικής πληροφορίας όλων των ισομορφών της CaM που έχει συλλεχθεί, επιλέγοντας κυρίως αυτές που είναι κοντά στην επιθυμητή δομή πρότυπο που θα αναλυθεί και παρακάτω (UCSF Chimera)
- Χρήση εξειδικευμένου μοριακού περιβάλλοντος (MOE) για εξαγωγή πληροφορίας του δείκτη rmsd από τη δομική στοίχιση του προηγούμενου βήματος
- Βάσει της πληροφορίας αποστάσεων, εφαρμογή μεθόδων μηχανικής μάθησης για μείωση διαστασιμότητας (PCA) και δημιουργία συστάδων (clustering), μέσω εξειδικευμένου στατιστικού πακέτου (R). Από το αποτέλεσμα της κάθε συστάδας, επιλογή της κοντινότερης δομής από το κέντρο της - δημιουργία πρότυπου CaM
- Ακολουθεί de novo σχεδιασμός πεπτιδίων μέσω του PEP-FOLD. De novo σχεδιασμός κρυσταλλικού βιομορίου που απομονώθηκε από τη δομή πρότυπο της καλμοδουλίνης (αποτελέσμα clustering). Επιβεβαίωση αποτελέσματος και με αλγορίθμους πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής (PSIPRED)

Επόμενο ερώτημα:

αν και με ποιο τρόπο η CaM αλληλεπιδρά με τα συντιθέμενα πεπτίδια του ανθρώπινου RyR2;

- Χρήση δομής πρότυπο της Ca²⁺/CaM και των de novo πεπτιδίων του RyR2, τόσο με server (ClusPro) όσο και με λογισμικό docking (GOLD) για τη μελέτη της αλληλεπίδρασής της με τα συντιθέμενα πεπτίδια. Ως δείγμα control χρησιμοποιήθηκε η δομή πρότυπο Ca²⁺/CaM με τα συντιθέμενα κρυσταλλικά πεπτίδια
- ο Σύγκριση αποτελεσμάτων βάσει control δειγμάτων (Chimera MOE) και των προγραμμάτων μεταξύ τους
- Αξιολόγηση αποτελεσμάτων του server που χρησιμοποιήθηκε για docking μέσω του server FlexPepDock για εύρεση όλων των πιθανών στερεοδιατάξεων του συμπλόκου. Τα αποτελέσματά του αναλύθηκαν μέσω του εργαλείου CONSRank, για εξαγωγή του καλύτερου δυνατού σκορ – επαλήθευση δομής συμπλόκου
- Καταλήγοντας σε δομή συμπλόκου πιο κοντά στη φυσική κατάσταση, πραγματοποιείται ανάλυση αυτής μέσω του server COCOMAPS, για εξαγωγή ποσοτικής-ποιοτικής πληροφορίας των δύο επιφανειών που αλληλεπιδρούν

<u>Τελικό ερώτημα</u>:

Πώς επηρεάζουν τα μεταλλάγματα της CaM τη δομή της και κυρίως το βαθμό συγγένειας για τα πετίδια του RyR2, των ιόντων Ca²⁺ καθώς επίσης και τη θερμοσταθερότητα του συμπλόκου της με τον RyR2;

- Μεταλλαξογένεση στην CaM βάσει των 17 παρανοηματικών μεταλλάξεών της που έχουν εντοπιστεί μέχρι και σήμερα, με χρήση του MOE
- Ενεργειακή ελαχιστοποίηση, με σκοπό την εύρεση της πιο σταθερής δομής (MOE) και σύγκριση με την αγρίου τύπου για τον εντοπισμό διαφορών σε τυχόν μετατόπιση της περιοχής πρόσδεσης του Ca²⁺
- Χρήση του server iStable για εξωγή πληροφορίας φυσικοχημικών παραμέτρων (ΔΔG) συμπέρασμα βάσει και πειραματικών αποτελεσμάτων από μεθόδους βιοφυσικής

2.2 Α Μέρος: Συλλογή δεδομένων και ανάλυσή τους

Για τη συλλογή των δεδομένων της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τρείς βιολογικές βάσεις δεδομένων όπως έχει αναφερθεί παραπάνω:

- Uniprot (https://www.uniprot.org/)
- PDB (https://www.rcsb.org/)
- Calmodulin, Proteopedia, life in 3D (<u>http://proteopedia.org/wiki/index.php/Calmodulin</u>)

Η UniProt (Bateman et al. 2017), η οποία αποτελεί στην ουσία μία προσπάθεια ενοποίησης των βάσεων δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών SwissProt, TrEMBL και PIR-PSD, έχει ως στόχο να συγκεντρώσει όσο το δυνατόν περισσότερη πληροφορία για τις πρωτεϊνικές ακολουθίες η οποία ήταν διαμοιρασμένη στις παραπάνω βάσεις εμπλουτίζοντας το σχολιασμό κάθε εγγραφής καθώς και να ελαχιστοποιήσει τα λάθη που μπορεί να περιέχονται. Για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία επιλέχθηκαν δεδομένα μόνο από τη SwissProt, που περιέχει και τις καλύτερα σχολιασμένες εγγραφές.

Η Protein Data Bank (PDB), είναι η μόνη βάση δεδομένων μέχρι και σήμερα στην οποία είναι κατατεθειμένες οι τρισδιάστατες δομές βιολογικών μακρομορίων (Berman et al. 2006). Εξαιτίας της τεχνολογικής εξέλιξης και των νέων μεθόδων προσδιορισμού δομών, ολοένα και αυξάνεται ο διαθέσιμος αριθμός βιολογικών αρχιτεκτονιών. Σήμερα στη βάση υπάρχουν δομές που έχουν προσδιοριστεί κυρίως με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και με cryo-EM. Επίσης σε κάθε εγγραφή υπάρχει ένα πλήθος πληροφορίων κάθε φορά, από τις συνθήκες πειράματος, τη βιολογική λειτουργία μέχρι και τις βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες συναντάται αυτή η εγγραφή. Για τους στόχους του πειράματος, από την PDB πάρθηκαν δεδομένα για τις μορφές της CaM: apo-CaM, Ca²⁺/CaM, CaM/πρωτεΐνη, CaM/πεπτίδιο, CaM/lignad, χωρίς να υπάρχει κανένα μετάλλαγμα στην CaM.

Τέλος η βάση Calmodulin, Proteopedia, life in 3D, αποτελεί μία συγκεκριμένη εκδοχή της βάσης Proteopedia (Hodis et al. 2008), η οποία είναι ένας διαδραστικός ιστότοπος wiki, με πληροφορίες για τη δομή των βιομορίων (συνδέσμους PDB) και τη σύνδεσή τους με τη βιολογική λειτουργία. Επιλέχθηκε ως μέτρο σύγκρισης των δεδομένων που συλλέχθηκαν από την PDB με τα δεδομένα που περιέχει η ίδια, καθώς περιλαμβάνει δομική πληροφορία για τις μορφές (με ← επισημαίνονται οι κατηγορίες ενδιαφέροντος):

- Native CaM (Ca²⁺/CaM)
- Mutant CaM (μεταλλαγμένη CaM)
- Apo-CaM
- CaM N-terminal (Ν-τελική περιοχή)
- CaM C-terminal (C -τελική περιοχή)
- CaM + cations (not calcium) (CaM και άλλα ιόντα, εκτός Ca²⁺)
- CaM small molecules complex (σύμπλοκα CaM με μικρά μόρια) ←
- CaM complexed with protein CBD domain (σύμπλοκα CaM με πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή πρόσδεσης Ca²⁺- CBD) ←
- Calmodulin complex with myosin (σύμπλοκα CaM με μυοσίνη)
- Calmodulin complex with ion channels (σύμπλοκα CaM με ιοντικά κανάλια)
- Calmodulin complex with other proteins (σύμπλοκα CaM με άλλες πρωτεΐνες) \leftarrow

2.2.1 Σύνολο δεδομένων από UniProt

Από τη βάση δεδομένων UniProt συλλέχθηκε η αμινοξική ακολουθία της CaM που έχει βρεθεί από **89** διαφορετικούς οργανισμούς. Η πληροφορία της πρωτοταγούς δομής της CaM δεν προήλθε από τη δέσμευσή της με κάποιο άλλο μόριο, παρά την ίδια την πρωτεΐνη που έχει βρεθεί στους οργανισμούς αυτούς. Παρακάτω (Πίνακας 6), δίνονται συγκεντρωτικά οι πληροφορίες αυτές, για τις οποίες όπως αναφέρθηκε και παραπάνω συλλέχθηκαν μόνο οι καλά σχολιασμένες (Swiss-Prot).

Πίνακας 6: Δεδομένα από τη UniProt. Περιέχει πληροφορίες για το όνομα της πρωτεΐνης, το όνομα του γονιδίου το όποιο απομονώθηκε από το συγκεκρίμενο οργανισμό (N/A, δεν υπάρχει διαθέσιμη πληροφορία), τον οργανισμό στον οποίο βρέθηκε καθώς και τον κωδικό της εγγραφής στη βάση UniProt (Accession number/AC).

Πρωτεΐνη	Γονίδιο	Οργανισμός	Κωδικός UniProt
Calmodulin-1	CALM1	Homo sapiens (Human)	P0DP23
Calmodulin-1	Calm1	Mus musculus (Mouse)	P0DP26
Calmodulin-1	Calm1	Rattus norvegicus (Rat)	P0DP29
Calmodulin	CALM	Bos taurus (Bovine)	P62157
Calmodulin	CALM	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	P62160
Calmodulin	calm	Electrophorus electricus (Electric eel) (Gymnotus electricus)	P02594
Calmodulin	N/A	Tetrahymena pyriformis	P02598
Calmodulin	calA	Dictyostelium discoideum (Slime mold)	P02599
Calmodulin	N/A	Chlamydomonas reinhardtii (Chlamydomonas smithii)	P04352
Calmodulin	N/A	Spinacia oleracea (Spinach)	P04353
Calmodulin	N/A	Triticum aestivum (Wheat)	P04464
Calmodulin	cam1	Schizosaccharomyces pombe (Fission yeast)	P05933
Calmodulin	CMD1	Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast)	P06787
Calmodulin	CAM	Paramecium tetraurelia	P07463
Calmodulin-1	CAM1	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	P0DH95
Calmodulin	N/A	Euglena gracilis	P11118
Calmodulin	N/A	Pyuridae sp. (Sea squirt)	P11121
Calmodulin-1	PCM1	Solanum tuberosum (Potato)	P13868
Calmodulin	CMD1	Achlya klebsiana	P15094
Calmodulin	CAL1	Medicago sativa (Alfalfa)	P17928
Calmodulin	CALA2	Trypanosoma cruzi	P18061
Calmodulin	N/A	Stichopus japonicus (Sea cucumber)	P21251
Calmodulin	CMD1	Candida albicans (Yeast)	P23286
Calmodulin	N/A	Plasmodium falciparum	P24044
Calmodulin	CALM1	Solanum lycopersicum (Tomato) (Lycopersicon esculentum)	P27161
Calmodulin	CMD1	Phytophthora infestans (Potato late blight fungus) (Botrytis infestans)	P27165
Calmodulin	N/A	Stylonychia lemnae (Ciliate)	P27166
Calmodulin	CALM1	Zea mays (Maize)	P41040
Calmodulin	N/A	Pneumocystis carinii	P41041
Calmodulin	CAM	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)	P48976
Calmodulin, flagellar	CAM1	Naegleria gruberi (Amoeba)	P53440
Calmodulin	camA	Emericella nidulans (Aspergillus nidulans)	P60204
Calmodulin	cmdA	Aspergillus oryzae (Yellow koji mold)	P60205

Calmodulin	CAM1	Ajellomyces capsulatus (Darling's disease fungus) (Histoplasma capsulatum)	P60206
Calmodulin	cmd-1	Neurospora crassa	P61859
Calmodulin	N/A	Colletotrichum trifolii	P61860
Calmodulin	N/A	Colletotrichum gloeosporioides (Anthracnose fungus) (Glomerella cingulata)	P61861
Calmodulin	CALM	Anas platyrhynchos (Mallard) (Anas boschas)	P62144
Calmodulin	CAM	Aplysia californica (California sea hare)	P62145
Calmodulin-1	N/A	Branchiostoma floridae (Florida lancelet) (Amphioxus)	P62147
Calmodulin	N/A	Tetronarce californica (Pacific electric ray) (Torpedo californica)	P62151
Calmodulin-A	N/A	Halocynthia roretzi (Sea squirt) (Cynthia roretzi)	P62153
Calmodulin	N/A	Locusta migratoria (Migratory locust)	P62154
Calmodulin	calm	Oncorhynchus sp. (Salmon)	P62156
Calmodulin	CAM	Hordeum vulgare (Barley)	P62162
Calmodulin-2	CAM-2	Glycine max (Soybean) (Glycine hispida)	P62163
Calmodulin	N/A	Renilla reniformis (Sea pansy)	P62184
Calmodulin-1	CAM81	Petunia hybrida (Petunia)	P62199
Calmodulin-1	CAM-1	Daucus carota (Wild carrot)	P62200
Calmodulin	N/A	Lilium longiflorum (Trumpet lily)	P62201
Calmodulin	PF14_0323	Plasmodium falciparum (isolate 3D7)	P62203
Calmodulin	N/A	Trypanosoma brucei brucei	P69097
Calmodulin	N/A	Trypanosoma brucei gambiense	P69098
Calmodulin	N/A	Agaricus bisporus (White button mushroom)	P84339
Calmodulin	CCM1	Capsicum annuum (Bell pepper)	P93087
Calmodulin	CAM	Helianthus annuus (Common sunflower)	P93171
Calmodulin-1	CAM1	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)	Q0JNS6
Calmodulin	CAMF1	Fagus sylvatica (Beechnut)	Q39752
Calmodulin	N/A	Macrocystis pyrifera (Giant kelp) (Fucus pyrifer)	Q40302
Calmodulin	CALM	Pongo abelii (Sumatran orangutan) (Pongo pygmaeus abelii)	Q5RAD2
Calmodulin	calm	Ctenopharyngodon idella (Grass carp) (Leuciscus idella)	Q6IT78
Calmodulin	calm1a	Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio)	Q6PI52
Calmodulin	calm	Oreochromis mossambicus (Mozambique tilapia) (Tilapia mossambica)	Q6R520
Calmodulin	CALM2	Ovis aries (Sheep)	Q6YNX6
Calmodulin	N/A	Pythium splendens (Leaf rot fungus)	Q71UH5
Calmodulin	calm	Perca flavescens (American yellow perch) (Morone flavescens)	Q71UH6
Calmodulin	calm	Epinephelus akaara (Hong Kong grouper) (Serranus akaara)	Q7T3T2
Calmodulin	N/A	Euphorbia characias (Albanian spurge)	Q7Y052
Calmodulin	N/A	Strongylocentrotus intermedius (Sea urchin)	Q8STF0
Calmodulin	N/A	Halichondria okadai (Marine sponge) (Reniera okadai)	Q95NI4
Calmodulin	N/A	Metridium senile (Brown sea anemone) (Frilled sea anemone)	Q95NR9
Calmodulin	N/A	Lumbricus rubellus (Humus earthworm)	Q9GRJ1
Calmodulin	CMD1	Blastocladiella emersonii (Aquatic fungus)	Q9HFY6
Calmodulin	N/A	Myxine glutinosa (Atlantic hagfish)	Q9U6D3

Calmodulin-2	CAM2	Branchiostoma lanceolatum (Common lancelet) (Amphioxus lanceolatum)	Q9UB37
Calmodulin	CMD1	Magnaporthe oryzae (Rice blast fungus) (Pyricularia oryzae)	Q9UWF0
Calmodulin-2	CAM2	Oryza sativa subsp. indica (Rice)	A2Y609
Calmodulin	N/A	Pfiesteria piscicida (Dinoflagellate)	A3E3H0
Calmodulin	N/A	Prorocentrum minimum (Dinoflagellate) (Exuviaella minima)	A3E4D8
Calmodulin	N/A	Karlodinium veneficum (Dinoflagellate) (Karlodinium micrum)	A3E4F9
Calmodulin	N/A	Alexandrium fundyense (Dinoflagellate)	A4UHC0
Calmodulin	cam	Saccharina japonica (Sweet kelp) (Laminaria japonica)	A8CEP3
Calmodulin	N/A	Heterocapsa triquetra (Dinoflagellate) (Glenodinium triquetrum)	A8I1Q0
Calmodulin	N/A	Ciona intestinalis (Transparent sea squirt) (Ascidia intestinalis)	O02367
Calmodulin	cmd-1	Caenorhabditis elegans	O16305
Calmodulin	CMD1	Kluyveromyces lactis (Yeast) (Candida sphaerica)	O60041
Calmodulin	N/A	Mougeotia scalaris (Green alga) (Sphaerocarpus scalaris)	O82018
Calmodulin	CMD1	Pleurotus ostreatus (Oyster mushroom) (White-rot fungus)	O94739

2.2.2 Σύνολο δεδομένων από PDB

Από τη βάση δεδομένων PDB, συλλέχθηκαν δομές της CaM σε μορφή συμπλόκου είτε με μικρό πεπτίδιο, είτε με πρωτεΐνη, είτε με μόρια που εμφανίζουν την περιοχή δέσμευσης ασβεστίου (CBD). Έτσι λοιπόν τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν, κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το είδος του μορίου που αλληλεπιδρά η CaM (Πίνακες 7, 8 & 9). Βασικά κριτήρια αναζήτησης ήταν η πειραματική μέθοδος προσδιορισμού να είναι είτε NMR, είτε κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, η CaM να βρίσκεται δεσμευμένη με Ca²⁺ και να μην υπάρχει καμία μετάλλαξη στο μόριό της. Όπου εμφανίζεται πληροφορία δύο οργανισμών απομόνωσης, ο πρώτος αναφέρεται στην CaM, ενώ ο δεύτερος στο μόριο με το οποίο συμπλοκοποιείται.

I. <u>Σύμπλοκα της CaM με πρωτεΐνη</u>

Πίνακας 7: Δεδομένα δομικής πληροφορίας των συμπλόκων της CaM με πρωτεΐνες. Περιέχει πληροφορίες για την ονομασία του συμπλόκου (κώδικας 3 γραμμάτων αντιστοιχεί στην ονομασία του προσδέτη βάσει της PDB), τον οργανισμό από τον οποίο απομονώθηκε, το είδος του πειραματικού προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και τον κωδικό εγγραφής της PDB (HEADER).

Σύμπλοκο	Οργανισμός	Μέθοδος Προσδιορισμού	Κωδικός PDB
CaMK	Mus musculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.65Å)	1HKX
CaM/DOT	Homo sapiens, Bacillus anthracis	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.6Å)	1LVC
CaM/DOT	Bacillus anthracis, Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.3Å)	1PK0
CaM/POP/CMP	Bacillus anthracis, Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.2Å)	1SK6

CaM/POP	Bacillus anthracis Xenopus laevis	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.6Å)	1Y0V
CaM/GOL	Drosophila melanogaster Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.4Å)	2BKH
CaM/Myosin VI	Gallus gallus, Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.9Å)	2BKI
CaM/vacuolar calcium ATPase BCA1 peptide	Glycine max	NMR	2L1W
CaM/L-selectin	Homo sapiens	NMR	2LGF
CaM/4DY	Homo sapiens	NMR	2N27
CaM/Myosin VI	Gallus gallus, Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.3Å)	2VB6
CaM/Myosin VI	Sus scrofa, Drosophila melanogaster	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.2Å)	2X51
CaM/Myosin VI	Drosophila melanogaster, Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.7Å)	3GN4
CaM/Myosin VI/TBU	Drosophila melanogaster, Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.2Å)	3L9I
CaM/Myosin VI (MDinsert2-GFP fusion)	Sus scrofa, Aequorea victoria, Drosophila melanogaster	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.6Å)	4ANJ
CaM/Myosin 1c	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.74Å)	4BYF
CaM/Myosin VI	Drosophila melanogaster, Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.2Å)	4DBP
CaM/Myosin VI	Drosophila melanogaster, Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.6Å)	4DBQ
CaM/ Sodium channel protein type 5 subunit alpha	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.2Å)	4DCK
CaM/ Sodium channel protein type 5 subunit alpha	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.35Å)	4DJC
CaM/spindle pole body protein Spc110	Kluyveromyces lactis, Saccharomyces cerevisiae	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.15Å)	4DS7
CaM/Fibroblast growth factor 13	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.02Å)	4JPZ
CaM/ Sodium channel protein type 5 subunit alpha/FGF12B	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.84Å)	4JQ0
CaM/Myosin 1b	Homo sapiens,Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.3Å)	4L79
CaM/IQCG	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.1Å)	4M1L
CaM/ Sodium channel protein type 5 subunit alpha/MSE	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.8Å)	40VN
CaM/Myosin VI	Drosophila melanogaster, Sus scrofa	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.6Å)	4PJJ

CaM/Calcineurin (binding side)	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.95Å)	4Q5U
CaM/Plectin	Homo sapiens, Mus musculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.8Å)	4Q57
CaM/Myosin 1c	Mus musculus, Xenopus laevis	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.503Å)	4 R 8G
CaM/Myosin Va	Mus musculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.502Å)	4ZLK
CaM/Myosin X	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.15Å)	5101
CaM/chimeric Kv7.2 - Kv7.3 proximal C- terminal Domain	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.0Å)	5J03

ΙΙ. Σύμπλοκα της CaM με πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή πρόσδεσης Ca²⁺- CBD

Πίνακας 8: Δεδομένα δομικής πληροφορίας των συμπλόκων της CaM με πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή πρόσδεσης Ca²⁺- CBD. Περιέχει πληροφορίες για την ονομασία του συμπλόκου (κώδικας 3 γραμμάτων αντιστοιχεί στην ονομασία του προσδέτη βάσει της PDB), τον οργανισμό από τον οποίο απομονώθηκε, το είδος του πειραματικού προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και τον κωδικό εγγραφής της PDB (HEADER).

Σύμπλοκο	Οργανισμός	Μέθοδος Προσδιορισμού	Κωδικός PDB
CaM/Protein (Calcium Pump)	Xenopus laevis, Homo sapiens	NMR	1CFF
CaMK	Xenopus laevis,Rattus norvegicus	NMR	1CKK
CaMKI	Drosophila melanogaster, Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.7Å)	1MXE
CaM/Glutamate decarboxylase	Xenopus laevis, Petunia hybrida	NMR	1NWD
CaM/RyR1 peptide	Gallus gallus, Oryctolagus cuniculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.0Å)	2BCX
CaM/CaV1.2 IQ domain	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.0Å)	2BE6
CaM/Voltage- dependent L-type calcium channel alpha- 1C subunit	Homo sapiens, Cavia porcellus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.45Å)	2F3Y
CaM/IQ-AA domain	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.6Å)	2F3Z
CaM/alpha-II spectrin Spectrin	Homo sapiens, Bos taurus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.45Å)	2FOT
CaM/Glutamate NMDA receptor subunit zeta 1	Rattus norvegicus, Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.9Å)	2HQW
CaMKI G	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.7Å)	2JAM
CaMKI D	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.3Å)	2JC6

CaM/Calcineurin	Homo saniens	NMR	2.171
(binding side)			2021
CaM/Myosin	Homo sapiens	NMR	2K0F
CaM/ATPase, Ca2 ⁺	Homo ganions	NIMD	JENE
membrane 4	Homo suprens	INIVIK	2 MINE
CaM/Myosin light			AL 1 /(
chain kinase 2	Homo sapiens	INMR	21.00
CaM/Peptide from			
Cyclic nucleotide-gated	Homo sapiens,Rattus norvegicus	NMR	2M0J
Olfactory channel			
Cuelie pueleotide gated	Homo sapiens, Rattus	NIMD	2 M0K
olfactory channel	norvegicus	INIVIK	21110K
CaM/Alpha-synuclein	Homo sapiens	NMR	2M55
CaM/Disks large			
homolog 4	Xenopus laevis, Homo sapiens	NMR	2MES
CaM/HIV 1 matrix	Pattus nomenious Human		
cam/miv-1 mairix	immunodeficiency virus 1	NMR	2MGU
protein	immunodeficiency virus 1		
CaM/Myosin peptide	Gallus gallus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	205G
	Santas gantas	(1.08A)	2000
CaM/Binding domain	Caller a ller Maranna and	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	20(0
of neuronal muric oxide	Gallus gallus, Mus musculus	(1.55Å)	2000
CaM/Calcineurin		Κουσταλλογοαφία Ακτίνων-Χ	
peptide	Homo sapiens	(1.86Å)	2R28
$C_{\pi}M/C_{\pi}V1110$			
CaM/CaVI.IIQ	Homo sapiens	κρυσταλλογραφία Ακτίνων-χ	2VAY
рерше		(1.94A)	
CaM/Calcineurin A	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	2W73
peptide		(1.45Å)	
CaM/CaMKII D	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	2WEL
$\Omega = M/\Omega = 1$		(1.9A)	
Exchanger 1	Kanus norvegicus, Homo	κρυσταλλογραφία Ακτινών-λ	2YGG
CaM/P/O-type calcium	suprens	(2.22711)	
channeL (CaV2.1) IO	Rattus norvegicus, Homo	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	3BXK
domain	sapiens	(2.55A)	
C M/D (1 :			
clam/R-type calcium	Rattus norvegicus, Homo	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	2DVI
domain	sapiens	(2.3Å)	JDAL
CaM/Glutamate		Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	
[NMDA] receptor	Homo sapiens	(1.85Å)	ЗВҮА
subunit zeta-1 peptide	Home agricus Orestal	Kongrad)) outoriale Autority V	
Calvi/Calv 2.2 IQ	Homo sapiens, Oryctolagus	κρυσταλλογραφια Ακτινών-Χ	3DVE
uomani	cuniculus	(2.33A)	

CaM/CaV2.2 IQ domain	Homo sapiens, Oryctolagus cuniculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.8Å)	3DVJ
CaM/CaV2.3 IQ domain complex	Homo sapiens, Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.3Å)	3DVK
CaM/CaV2.1 IQ domain complex	Homo sapiens, Oryctolagus cuniculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.6Å)	3DVM
CaM/Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.4Å)	3EWT
CaM/Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.6Å)	3EWV
CaM/Cav1.2 C- terminal regulatory domain dimer	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.1Å)	3G43
CaM/Nitric oxide synthase, inducible	Gallus gallus, Mus musculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.45Å)	3GOF
CaM/peptide CaMKII	Homo sapiens, Gallus gallus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.46Å)	3GP2
CaM/Nitric oxide synthase, inducible	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.5Å)	3HR4
CaM/CaV1.2 pre-IQ/IQ domain	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.55Å)	30XQ
CaM/Small conductance calcium- activated potassium channel protein 2	Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.9Å)	3SJQ
CaM/trpv1 c-terminal peptide	Homo sapiens, Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.95Å)	3SUI
CaM/Calcium- Transporting ATPase 8	Arabidopsis thaliana	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.95Å)	4AQR
CaM/Calcium release- activated calcium channel protein 1	Rattus norvegicus, Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.9005Å)	4EHQ
CaM/Small conductance calcium- activated potassium channel protein 2	Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.65Å)	4G27
CaM/Small conductance calcium- activated potassium channel protein 2	Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.63Å)	4G28
CaM/Kv7.4 (KCNQ4) B	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.6Å)	4GOW
CaM/Small conductance calcium-	Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.51Å)	4J9Y

activated potassium			
CaM/Small conductance calcium- activated potassium channel protein 2	Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.66Å)	4J9Z
CaM/Kv7.1 proximal C-terminal Domain	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (3.0Å)	4UMO
CaM/Inosito- Trisphosphate 3-Kinase	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.34Å)	4UPU
CaM/Kv7.1 proximal C-terminal Domain	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.86Å)	4V0C
CaM/NaV1.5	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.25Å)	5DBR
CaM/Chloride anion exchanger	Homo sapiens, Mus musculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.7Å)	5DOW
CaM/Potassium voltage-gated channel subfamily H member 1	Gallus gallus, Mus musculus	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.85Å)	5HIT
CaMK/CAMK2 protein kinase	Salpingoeca rosetta (strain ATCC 50818 / BSB-021)	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.75Å)	5IG0
CaMK/CAMK2 protein kinase	Salpingoeca rosetta (strain ATCC 50818 / BSB-021)	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (2.9Å)	5IG1
CaMKII-alpha hub	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.75Å)	5IG3
CaM/Eukaryotic elongation factor 2 kinase	Homo sapiens	NMR	5J8H
CaM/STRA6 CaMBP2- site peptide	Homo sapiens, Danio rerio	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ (1.739Å)	5K8Q
CaM/Estrogen receptor peptide	Homo sapiens, Xenopus laevis	NMR	5T0X

III. <u>Σύμπλοκα της CaM με μικρά μόρια</u>

Πίνακας 9: Δεδομένα δομικής πληροφορίας των συμπλόκων της CaM με μικρά μόρια. Περιέχει πληροφορίες για την ονομασία του συμπλόκου (κώδικας 3 γραμμάτων αντιστοιχεί στην ονομασία του προσδέτη βάσει της PDB), τον οργανισμό από τον οποίο απομονώθηκε, το είδος του πειραματικού προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και τον κωδικό εγγραφής της PDB (HEADER).

Σύμπλοκο	Οργανισμός	Μέθοδος Προσδιορισμού	Κωδικός PDB
CaM/Trifluoperazine (1:2)	Bos taurus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (2.74Å)	1A29
CaMKII	Bos taurus, Rattus norvegicus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (2.0Å)	1CDM
CaM/Trifluoperazine (1:4)	Bos taurus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (2.0Å)	1LIN
CaM/WW7	Xenopus laevis	NMR	1MUX

CaM/DPD (1:2)	Bos taurus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (2.64Å)	1QIV
CaM/DPD	Bos taurus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (2.3Å)	1QIW
CaM/KAR-2	Bos taurus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (2.12Å)	1XA5
CaM/Protein unc-13 homolog A	Xenopus laevis	NMR	2KDU
CaM/connexin-36 peptide hybrid	Homo sapiens	NMR	2N6A
CaM/SPU	Bos taurus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (1.6Å)	3IF7
CaM/TPO	Xenopus laevis, Homo sapiens	NMR	5J7J
CaM/Myosin light chain kinase	Homo sapiens	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (1.8Å)	5JQA
CaM/Unconventional myosin-VIIa	Homo sapiens, Mus musculus	Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (2.33Å)	5WSV

2.2.3 Πολλαπλή Στοίχιση συνόλου δεδομένων UniProt

Τη λύση στο αρχικό ερώτημα που έχει δοθεί για το αν και κατά πόσο υπάρχει ομοιότητα της αμινοξικής ακολουθίας της CaM, θα δώσει ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης, αυτό της στοίχισης ακολουθιών. Η ύπαρξη ομοιότητας μεταξύ των ακολουθιών τις περισσότερες φορές δηλώνει ομολογία (δηλαδή, κοινή εξελικτική προέλευση) και κατά συνέπεια για τις πρωτεΐνες ειδικά, παρόμοια τρισδιάστατη δομή και παρόμοια λειτουργία. Γενικά, χρησιμοποιείται πλέον ο εμπειρικός κανόνας για το χαρακτηρισμό της ομοιότητας μεταξύ δύο ακολουθιών «30% ομοιότητα σε μήκος στοίχισης μεγαλύτερο από 80 αμινοξικά κατάλοιπα», κανόνας που απαιτεί όμως περισσότερη ακρίβεια.

Αφού συλλέχθηκαν οι αμινοξικές ακολουθίες των εγγραφών που συγκεντρώθηκαν σε fasta format (μορφή κειμένου όπου η αμινοξική ακολουθία αντιπροσωπεύεται με κωδικό ενός γράμματος, με χαρακτηριστικό αναγνωριστικό σημείο έναρξης για εύκολο χειρισμό από εφαρμογές και γλώσσες προγραμματισμού το σύμβολο: >), πραγματοποιήθηκε προοδευτική πολλαπλή στοίχιση με χρήση του προγράμματος **T-coffee** (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/) (Notredame, Higgins, & Heringa, 2000). Μέσω της μεθόδου αυτής, δίνεται η δυνατότητα πολλές φορές να εντοπιστούν συντηρημένα τμήματα σε μία ομάδα πρωτεϊνικών ακολουθιών και έπειτα να προκύψει χαρακτηρισμός της αντίστοιχης οικογένειας, ανάλυση φυλογενετικών σχέσεων κ.ά. Αν βρεθεί μία οικογένεια πρωτεϊνών, αυτόματα μπορεί να εξαχθεί δομική και βιολογική πληροφορία (λειτουργία πρωτεΐνης), καθώς η δομή συντηρείται περισσότερο από την ακολουθία. Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν ένα αρχείο εισόδου με όλες τις ακολουθίες που συγκεντρώθηκαν σε fasta μορφή (**Εικόνα 29**), με επιλογή ως πίνακα ομοιότητας τον **BLOSUM** και ως μορφή εξόδου το format του **CLUSTALW**. Το T-coffee, εσωτερικά χρησιμοποιεί τον κώδικα του αλγορίθμου CLUSTALW και κάνει προοδευτική πολλαπλή στοίχιση παρόμοια με τον αλγόριθμο αυτό, δηλαδή:

- Αρχικά, κατά ζεύγη στοίχιση όλων των ακολουθιών
- Βάσει των αρχικών στοιχίσεων, κατασκευή πίνακα αποστάσεων και ενός δέντρου οδηγού (guide tree)
- Προοδευτική στοίχιση των πιο όμοιων ακολουθιών μεταξύ τους μέχρι τέλους

Το πλεονέκτημα του σε σχέση με άλλους μοντέρνους αλγορίθμους πολλαπλής στοίχισης είναι η αυτόματη δημιουργία μιας «εκτεταμένης βιβλιοθήκης», κατά την οποία ένας πίνακας αντικατάστασης ειδικός ανά θέση, αντιστοιχίζεται σε κάθε ζεύγος ακολουθιών, και έτσι αντανακλά το κατά πόσο η στοίχιση δύο ακολουθιών συμβαδίζει με την υπόλοιπη βιβλιοθήκη. Γενικά, συνδυάζει χαρακτηριστικά του CLUSTALW, LALIGN και άλλων αλγορίθμων, δίνει αποτέλεσμα γρήγορα και ταυτόχρονα ελέγχει στα διάφορα βήματά του τη συνέπειά τους, με αποτέλεσμα να αποφεύγονται λάθη. Πολλές φορές όμως, λαμβάνοντας το αποτέλεσμα της στοίχισης, χρειάζεται διόρθωσή της από τον κάθε χρήστη, καθώς όλοι οι υπολογισμοί αυτών των αλγορίθμων σχεδόν ποτέ
δεν είναι ακριβείας [το T-coffee δεν δίνει πληροφορία για το e-value (η πιθανότητα ένα αμινοξύ που έχει στοιχιστεί να έχει τοποθετηθεί τυχαία), συγκριτικά με την τοπική στοίχιση, καθώς κάνει απλή αναζήτηση].

STEP 1 - Enter your input sequences	
Enter or paste a set of	
PROTEIN	Ŧ
sequences in any supported format:	
Or <u>upload</u> a file: Choose File No file chosen	See example inputs
STED 2 Set your Parameters	
STEF 2 - Set your Farameters	
OUTPUT FORMAT:	
ClustalW	▼
MATRIX ORDER	
BLOSUM v aligned v	

Εικόνα 29: Αρχική σελίδα T-coffee. Βήμα 1: επιλέχθηκε το είδος των ακολουθιών που θα στοιχιστούν (πρωτεΐνες), οι οποίες ακολουθίες (89 συνολικά) συλλέχθηκαν σε ένα αρχείο όλες ως fasta μορφή για να αναλυθούν. Βήμα 2: επιλέγονται τα αποτελέσματα να είναι σε μορφή ClustalW και η στοίχιση να γίνει βάσει του πίνακα ομοιότητας BLOSUM.

Με σκοπό τη μορφοποίηση, διόρθωση και ορθότερη οπτικοποίηση του αποτελέσματος (χρωματικός κώδικας αμινοξικών καταλοίπων) της στοίχισης, χρησιμοποιήθηκε η Desktop εφαρμοφή JalView (http://www.jalview.org/) (Clamp et al. 2004), η οποία δέχεται ως αρχείο εισόδου το αρχείο με το αποτέλεσμα της προβλεπόμενης στοίχισης. Δίνει τη δυνατότητα χρωματισμού των αμινοξικών καταλοίπων που έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να μπορούν να εντοπιστούν ακόμα πιο εύκολα υψηλά συντηρημένες περιοχές, ενώ παραθέτει πληροφορίες για γνωστή ή προβλεφθείσα δευτεροταγής δομή (μέσω του Jmol) παράλληλα με τη στοίχιση, καθώς και ένα μοντέλο HMM (μοντέλο Hidden Markov Model, μοντέλο αμινοξικής ακολουθίας που έχει προκύψει από δεδομένα πολλαπλής στοίχισης με πιθανοθεωρητικό χαρακτήρα) που προκύπτει από αυτή τη στοίχιση και την ανάλυση ενός φυλογενετικού δέντου.

2.2.4 <u>Δομική στοίχιση-Υπέρθεση συνόλου δεδομένων PDB</u>

Έχοντας ένα σύνολο **109** δομών συμπλόκων της CaM με άλλα βιομόρια, πραγματοποιήθηκε υπέρθεση του δομικού αυτού συνόλου (και από τις τρεις κατηγορίες που αναλύθηκαν παραπάνω), με σκοπό τη δημιουργία ενός μοντέλου με δομές όσο το δυνατόν κοντινότερες (πιο όμοιες) με την κρυσταλλική δομή του RyR1/Ca²⁺-CaM (κεφάλιο 1.5.1, δομή με μία κοιλότητα στο κέντρο της όπου γίνεται η πρόσδεση του πεπτιδίου), με μετέπειτα σκοπό την εύρεση μιας «μέσης» δομής Ca²⁺/CaM, που θα χρησιμοποιηθεί ως δομή πρότυπο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης με τα πεπτίδια του RyR2, επιλέγοντας κάθε φορά από το δομικό αυτό σύνολο μόνο τη δομή της Ca²⁺/CaM και όχι και του βιομορίου που αλληλεπίδρα.

εκτέλεση της υπέρθεσης γρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα UCFC Chimera Για την το (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/) (Pettersen et al. 2004), το οποίο διατίθεται δωρεάν για ακαδημαϊκή και προσωπική χρήση. Δημιουργήθηκε από το Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI), το οποίο εν μέρει υποστήριζεται από το Εθνικό Σύστημα Υγείας. Το πρόγραμμα αυτό δίνει τη δυνατότητα για διαδραστική απεικόνιση βιομορίων, ανάλυση μοριακών δομών και άλλων δεδομένων όπως γάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, υπερμοριακά σύμπλοκα, αποτέλεσματα docking, μοριακή δυναμική κ.ά. Μπορούν επιπλέον να δημιουργηθούν εικόνες και βίντεο υψηλής ανάλυσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ελεύθερα.

Όσον αφορά, τη διαδικασία της υπέρθεσης, ουσιαστικά μελετάται η διαδικασία της σχετικής μετακίνησης της μίας δομής σε σχέση με την άλλη, χωρίς όμως η θέση και η διάταξη των ατόμων της ίδιας της πρωτεΐνης να αλλάζει και έτσι αυτές οι δύο δομές έρχονται όσο το δυνατόν πιο κοντά γίνεται. Το μέτρο που αποδίδει αυτή την ομοιότητα, είναι το RMSD (Root Mean Square Deviation), όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω και υπολογίζεται σύμφωνα με:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \delta_i^2}$$

όπου δ_i είναι η απόσταση μεταξύ του ατόμου i είτε της μίας δομής αναφοράς ή της μέσης θέσης των N ζευγαριών ατόμων που συγκρίνονται. Αυτό συχνά υπολογίζεται για τα κύρια άτομα της ανθρακικής αλυσίδας C, N, O και C_a ή κυρίως μόνο για τα άτομα C_a, καθώς κάνει τους υπολογισμούς ευκολότερους και γενικότερα οι C_a καθορίζουν τη γενικότερη δομή της πρωτεΐνης, ενώ η τιμή του δίνεται σε Å.

Εξετάστηκαν μία προς μία οι δομές που είχαν περιεληφθεί σε αυτό το σύνολο δεδομένων και έγινε απόρριψη αυτών που εμφανίζονταν πολύ απομακρυσμένα από την επιθυμητή δομή πρότυπο (μεγάλο RMSD), ενώ η δομική τους στοίχιση έγινε με τις προκαθορισμένες (στο εξής, default) παραμέτρους του Chimera:

Further restrict m to current sele	atching [ction	- Further r to cur	estrict matching rent selection
Chain pairing			1
 Best-aligning pair of cl between re 	hains eference and match	structure	
C Specific chain in refere with best-a	ence structure ligning chain in matc	h structure	
C Specific chain(s) in ref with specifi	ference structure c chain(s) in match s	tructure	
Alignment algorithm: Nee	dleman-Wunsch —	Matrix:	BLOSUM-62 😐
Gap opening penalt	ty 12	Gap extensi	on penalty 1
☑ Include secondary stru	icture score (30%)	Show para	meters
Compute secondary st	ructure assignments		
🗌 Show pairwise alignme	ent(s)		
Matching			
Iterate by pruning long	ng atom pairs until no	pair excee	ds:
	2.0 angstrom	s	
After superposition, co	ompute structure-ba	sed multiple	sequence alignment
Save settings		Reset to	o defaults
		ОК Арр	oly Cancel Help

Εικόνα 30: Παράμετοι που χρησιμοποιήθηκαν για την υπέρθεση δομών στο Chimera. Ο αλγόριθμος στοίχισης που επιλέχθηκε ήταν ο Needleman και Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970), ο οποίος πραγματοποιεί ολική στοίχιση δύο ακολουθιών (global alignment), με ομοιότητας **BLOSUM62** πίνακα τον [πίνακας υποκατάστασης (substitution matrix) που γρησιμοποιούμε για το ύψος της ποινής για τα κενά που ενδέχεται να εισαχθούν (gap penalties) κατά τη στοίχιση]. Οι πίνακες BLOSUM, έχουν εξελικτική ερμηνεία, δημιουργούνται από πραγματικά δεδομένα και χρησιμοποιούνται για τη στοίχιση απομακρυσμένων ακολουθιών και την εύρεση τοπικών ομοιοτήτων. Ο BLOSUM62 είναι πίνακας «ενδιάμεσης» ομοιότητας (Henikoff & Henikoff, 1992).

2.3 Β' Μέρος: Ανάκτηση των υπό εξέταση δομών

2.3.1 <u>Δομή Ca²⁺/CaM</u>

Επόμενο στάδιο υπήρξε η εύρεση «μέσης» δομής από το μοντέλο με τις αλληλοεπικαλυπτόμενες δομές που έχει προκύψει. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αφορά την ομαδοποίηση των δομών σε συστάδες (στο εξής, clustering), με σκοπό την εύρεση των πιο κοντινών δομών στο κεντρομερές από κάθε συστάδα που έχει προκύψει. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος k-means clustering, ενώ η διεργασία πραγματοποιήθηκε στη στατιστική πλατφόρμα R.

Η ομαδοποίηδη των δομών σε συστάδες έγινε βάσει του δείκτη RMSD (η δομή με το χαμηλότερο RMSD σε σχέση με το κεντρομερές της συστάδας, θα επιλεχθεί), επομένως απαραίτητο βήμα πριν το clustering υπήρξε η εξαγωγή σε έναν πίνακα δεδομένων των RMSD αποτελεσμάτων της κάθε δομής μεταξύ τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο μοριακό περιβάλλον **MOE**-Molecular Operating Environment (http://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Operating_Environment.htm). Το MOE είναι μία πλατφόρμα λογισμικού για την εύρεση φαρμάκων που ενσωματώνει οπτικοποίηση, μοντελοποίηση και προσομοιώσεις, καθώς και την ανάπτυξη μεθοδολογίας σε ένα πακέτο, το οποίο όμως δε διατίθεται δωρεάν. Τα κύρια πεδία της εφαρμογής του περιλαμβάνουν το σχεδιασμό δομής, το σχεδιασμό θραυσμάτων, την εύρεση φαρμακοφόρου, εφαρμογές ιατρικής χημείας, βιολογικές εφαρμογές, μοντελοποίηση πρωτεΐνης και αντισώματος, μοριακός σχεδιασμός και προσομοίωση, cheminformatics και QSAR και άλλα πολλά, ενώ είναι πλήρως εξοπλισμένο με τα περισσότερα πεδία δυνάμεων Amber, CHARMM, MMFF, OPLS-AA (ο χρήστης μπορεί να προσθέσει και το ενεργειακό πακέτο που επιθυμεί). Η επιστημονική διανυσματική γλώσσα (SVL- Scientific Vector Language) είναι η ενσωματωμένη εντολή, scripting και γλώσσα ανάπτυξης εφαρμογών του MOE.

Αφού το μοντέλο υπέστει μία προ-επεξεργασία που αφορούσε κυριώς την πρωτονίωση της με τις default παραμέτρους και εδώ:



Εικόνα 31: Παράμετοι για την πρωτονίωση του πρωτεϊνικού μοντέλου. Χρήση του πακέτου Protonate 3D, του ΜΟΕ για πρωτονίωση μορίων.

στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκ νέου δομική στοίχιση του μοντέλου στο MOE, με εξαγωγή ενός διαγράμματος RMSD, το οποίο λήφθηκε σε μορφή .csv για να μορφοποιηθεί κατάλληλα σε αρχείο excel, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως αρχείο εισόδου στο clustering.

Επόμενο βήμα ήταν η επεξεργασία των δεδομένων των αποστάσεων μέσω clustering. Με τον όρο clustering (ομαδοποίηση), εννοείται η οργάνωση μίας συλλογής δεδομένων από αντικείμενα-στοιχεία (objects) σε ομάδες (clusters) με βάση κάποιο μέτρο ομοιότητας. Τα αντικείμενα-στοιχεία είναι διανύσματα ή σημεία σε πολυδιάστατο χώρο, όπου για την παρούσα διπλωματική εργασία υπήρξε ένα σύνολο από σημεία-αποστάσεις σε **61** διαστάσεις (βλέπε **Παράρτημα VI**). Ο τρόπος που «βρίσκει» ομάδες είναι ο εξής: τα σημεία της ίδιας

συστάδας θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο όμοια μεταξύ τους, και διαφορετικής να είναι όσο το δυνατόν λιγότερα όμοια μεταξύ τους. Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι και μεθοδολογίες που πραγματοποιούν clustering. Για την επεξεργασία των παρόντων δεδομένων, επιλέχθηκε ο αλγόριθμος **k-means** (partitioning methods) (Hartigan & Wong, 1979; Z. Huang, 1998).

Ο k-means αλγόριθμος είναι ο πιο συχνός αλγόριθμος μηχανικής μάθησης χωρίς επίβλεψη (unsupervised machine learning) [μηχανική μάθηση, είναι η δημιουργία προτύπων ή μοντέλων από ένα σύνολο δεδομένων μέσω ενός υπολογιστικού συστήματος, το οποίο μπορεί από μόνο του να ανακαλύψει συσχετίσεις ή ομάδες του συνόλου δημιουργώντας αυτά τα πρότυπα, χωρίς να είναι γνωστό αν υπάρχουν, πόσα και ποιά είναι] για την κατανομή ενός συνόλου δεδομένων σε ένα σύνολο ομάδων k, όπου το k αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ομάδων που έχουν ορισθεί από τον ίδο το χρήστη (έλεγχος από το χρήστη υπάρξης ομάδων). Στην ομαδοποίηση k-means, κάθε cluster αντιπροσωπεύεται από το κέντρο της (δηλαδή ένα κεντροειδές ή αλλιώς κεντρομερές) που αντιστοιχεί στο μέσο όρο των σημείων που αντιστοιχούν σε αυτό το cluster. Η διαδικασία που ακολουθεί ο αλγόριθμος είναι απλή:

- Καθορίζεται από το χρήστη ο αριθμός των k ομάδων (για ελαχιστοποίηση μεταβλητότητας στο εσωτερικό του cluster total within-cluster variation)
- Ο αλγόριθμος ξεκινά διαλέγοντας k τυχαία σημεία από το σύνολο δεδομένων, ως τα κέντρα των ομάδων
- Αναθέτεται κάθε σημείο στην ομάδα της οποίας το κέντρο είναι πιο κοντά (μικρότερη απόσταση) σε αυτό το σημείο
- Υπολογίζει για κάθε ομάδα το μέσο όρο όλων των σημείων της (μέσω διανύσματος) και ορίζει αυτό ως νέο κέντρο της
- Επανάληψη των δύο τελευταίων βημάτων για έναν προκαθορισμένο αριθμό βημάτων ή μέχρι να μην υπάρχει καμία αλλαγή στο διαχωρισμό των σημείων σε ομάδες.

Αν και πλέον υπάρχουν πολλές παραλλαγές του αλγόριθμου k-means, ο πρωτότυπος αλγόριθμος είναι ο αλγόριθμος των Hartigan-Wong (1979), ο οποίος ορίζει τη συνολική μεταβλητότητα μέσα στο cluster ως το άθροισμα των τετραγωνικών αποστάσεων των Ευκλείδειων αποστάσεων μεταξύ στοιχείων και του αντίστοιχου κεντροειδούς. Είναι αντιληπτό λοιπόν πως ο υπολογισμός της απόστασης ως μέτρο ομοιότητας είναι από τα πιο κρίσιμα βήματα κατά το clustering, καθώς είναι αυτό που θα επηρεάσει τον αριθμό και το σχήμα των clusters. Τα δύο πιο χαρακτηριστικά μέτρα αποστάσεων (ομοιότητα) είναι οι αποστάσεις Euclidean και Manhattan (συχνά τιμές στο 0 και 1), ενώ ανομοιότητας σύνηθεις είναι οι αποστάσεις που βασίζονται στη συσχέτιση (υπολογισμός = 1-συντελεστής συσχέτισης) και υπολογίζονται μέσω των Pearson correlation distance, Spearman correlation distance και Kendall correlation distance (ελάχιστη τιμή 0, όταν είναι ίδια).

Καθώς η R (βλέπε παρακάτω) στα στατιστικά της πακέτα για την υλοποίηση του k-means clustering, διαθέτει μόνο τις αποστάσεις Euclidean και Manhattan και εξαιτίας της δομής του τρέχοντος αλγορίθμου, το μέτρο ομοιότητας που επιλέχθηκε ήταν η Ευκλίδεια απόσταση η οποία ορίζεται (για περισσότερες από 2 διαστάσεις):

$$d_e(i,j) = \sqrt{\sum_{k=1}^d (x_k(i) - x_k(j))^2}$$

με i και j, τα 2 υπό εξέταση σημεία.

Όλα τα παραπάνω διεξήχθησαν στο στατιστικό πακέτο της γλώσσας **R**, μία γλώσσα προγραμματισμού και ένα περιβάλλον ελεύθερου λογισμικού για στατιστικούς υπολογισμούς και γραφικών που υποστηρίζεται από το Ιδρυμα Στατιστικής Πληροφορικής (<u>https://www.rstudio.com/</u>). Με εφαρμογή του κώδικα του αλγορίθμου (βλέπε παράρτημα VI), εξήχθησαν τα αποτελέσματα τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, ενώ ταυτόχρονα με τον αλγόριθμό πραγματοποίηθηκε και μείωση των διαστάσεων του χώρου (δεδομένα σε διαστάσεις 61 × 61), μέσω Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA-Principal, Components Analysis), με σκοπό να επιτευχθεί οπτικό αποτέλεσμα μέσω των γραφικών αναπαραστάσεων των clusters που δημιουργούνταν κάθε φορά καθώς και τη κατανομή του συνόλου δεδομένων σε διαστάσεις PC1 × PC2. Η PCA είναι μία στατιστική μέθοδος (machine learning), πολυμεταβλητής ανάλυσης με κύριο σκοπό τη μείωση του χώρου που απεικονίζονται τα δεδομένα, διατηρώντας τη στατιστική διακύμανση των δεδομένων (Dunteman, 1989). Τέλος ύστερα από την εύρεση του

αριθμού των clusters, πραγματοποιήθηκε επαλήθευση του αποτελέσματος μέσω τριών συναρτήσεων που διαθέτει η R. Τις μεθόδους:

- Elbow
- Silhouette
- Gap Statistics

Τα αποτελέσματα αυτόματα οπτικοποιούνται για την καλύτερη ερμηνεία τους. Γενικά ο αλγόριθμος k-means είναι αρκετά ευαίσθητος σε σημαντικά outliers δεδομένων (δεδομένα αρκετά απομακρυσμένα από το σύνολο) και αυτή είναι και η αιτία που στο τελικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν μόνο δομές που είναι κοντά στο επιθυμητό πρότυπο.

2.3.2 Δομή πεπτιδίων RyR2

Για την απόκτηση δομής των πεπτιδίων του ανθρώπινου υποδοχέα RyR2, πραγματοποιήθηκε de novo σύνθεση αυτών μέσω του εργαλείου PEP-FOLD 3 (<u>http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/</u>) (J. Maupetit, Derreumaux, & Tuffery 2009). Συγκριμένα συντέθηκαν τα πεπτίδια (Πίνακας 10):

Πίνακας 10: Αμινοξική ακολουθία των υπό σύνθεση πεπτιδίων. Περιέχει την ονομασία του κάθε πεπτιδίου, την υπό μελέτη αμινοξικη περιοχή με τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα που περιέχονται.

Πεπτίδο	Αμινοξική Ακολουθία RyR2 _{Human}	Αμινοξικά Κατάλοιπα
В	[3584-3602]	KAVWHKLLSKQRKRAVVAC
F	[4255-4271]	LMRMLSLKSLKKQMKKV
Control Πεπτίδιο _A		MMHRQETVDCLKKFNARRKLKGAILTTMLATRNFSA

Το PEP-FOLD, είναι μια διαδικτυακή εφαρμογή, που στοχεύει στη μοντελοποίηση de novo τρισδιάστατων διαμορφώσεων για πεπτίδια που αποτελούνται από 9 έως και 25 αμινοξικά κατάλοιπα σε υδατικό διάλυμα. Η καινούργια έκδοση που δόθηκε τον Ιούλιο του 2016 (Lamiable et al. 2016) δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης πεπτιδίων με αμινοξικό μήκος 5-50 κατάλοιπα. Χρησιμοποιώντας ένα hidden Markov Model βασισμένο στη δομική αλφάβητο (SA-HMM) (Camproux, Gautier, & Tufféry, 2004), συγκεκριμένα 27 γραμμάτων ανά τέσσερα κατάλοιπα, το PEP-FOLD αρχικά προβλέπει τα προφίλ των γραμμάτων SA από την αμινοξική ακολουθία και στη συνέχεια συναρμολογεί τα προβλέπει τα προφίλ των γραμμάτων SA από την αμινοξική ακολουθία και στη συνέχεια συναρμολογεί τα προβλέπει τα προφίλ των γραμμάτων SA από την αμινοξική ακολουθία και στη συνέχεια συναρμολογεί τα προβλέπει τα προφίλατα με μία «άπληστη» (στο εξής, greedy) διαδικασία από την τροποποιημένη έκδοση του πεδίου δυνάμεων OPEP. Ξεκινώντας από μία ακολουθία αμινοξέων, το PEP-FOLD εκτελεί μια σειρά από 50 προσομοιώσεις και επιστρέφει τις πιο αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις που προσδιορίζονται βάσει της ενέργειας και του πληθυσμού των διαμορφώσεων που προέκυψαν. Από πειράματα των διαδικασιών, βρέθηκε ότι κατά μέσο όρο το PEP-FOLD δημιουργεί διαμορφώσεις ελάχιστης ενέργειας, που διαφέρουν κατά 2.6 Å του RMSD C_a των δομών που έχουν προσδιοριστεί με NMR.

Γενικά ο τρόπος λειτουργίας του server είναι ο εξής (**Εικόνα 32**): Αρχικά, εισάγεται η αμινοξική ακολουθία της οποίας επιθυμείται η δομική πρόβλεψη και ακολουθεί η πρόβλεψη του προφίλ HMM-SA, ενώ το προβλεπόμενο προφίλ μπορεί να αναπαρασταθεί και με πληροφορία δευτεροταγούς δομής μέσω του εργαλείου **PSIPRED**, αν το επιθυμεί ο χρήστης. Μέσω ενός greedy αλγορίθμου γίνεται η αναπάρασταση της τρισδιάστασης δομής (50 επαναλήψεις), όπου το καλύτερο μοντέλο που θα προκύψει ανασχηματίζεται μέσω προσομοίωσης Monte Carlo, 300.000 βημάτων. Ακολουθεί εφαρμογή του ενεργειακού πεδίου sOPEP, στη δομή που έχει προκύψει, το οποίο βασίζεται στον τρόπο που πραγματοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις των πλευρικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα την πιο ομαλή αλληλεπίδραση σε κοντινές αποστάσεις μειώνοντας έτσι τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις κατά τη διάρκεια της άκαμπτης συναρμολόγησης. Κάθε πολυπεπτίδιο υπόκειται σε έναν κύκλο των 50 greedy προσομοιώσεων που διαφέρουν ως προν την αρχική θέση κάθε φορά, και τη τυχαιότητα των υπό εξέταση καταλοίπων σε κάθε θέση. Η ποικιλία των διαμορφώσεων των 50 μοντέλων που προκύπτουν στη συνέχεια επεξεργάζονται με ανάλυση clustering, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τη μέθοδο του μακρινότερου γείτονα (complete linkage) και ένα κατώφλι των 2Å cRMSD για πεπτίδια μικρότερα των 20 αμινοξέων και 3Å

για παραπάνω. Για κάθε cluster που προκύπτει ως τελικό αποτέλεσμα δίνεται η διαμόρφωση αυτή με το χαμηλότερο ενεργειακό κεντροειδές. Εξαιτίας του greedy αλγορίθμου και του πεδίου sOPEP, οι πλευρικές αλυσίδες όλων των ατόμων τοποθετούνται μέσω μίας γρήγορης διαδικασίας που βασίζεται στην κύρια πεπτιδική αλυσίδα που πραγματοποιείται στον server SABBAC (Julien Maupetit, Gautier, & Tuffery, 2006). Τέλος για τη λήψη δομών υψηλής ποιότητας, πραγματοποιείται γρήγορη ενεργειακή ελαχιστοποίηση με το GROMACS (Van Der Spoel et al. 2005). Έτσι λοιπόν λαμβάνονται αρχεία PDB, με τις καλύτερες δομές που έχουν προκύψει μέσω clustering, ένα διάγραμμα δύο διαστάσεων του πληθυσμού του cluster και της αντίστοιχης ενέργειας του, καθώς και που εντοπίζεται η χαμηλότερη ενέργεια και έπειτα μία εικόνα του κεντροειδούς του κάθε cluster. Αν ο χρήστης έχει προσθέσει και κάποια δομή αναφοράς δίνονται επιπλέον οι πληροφορίες για τα cRMSD, τα score των GDT-TS (Zemla, 2003) και TM (Y. Zhang & Skolnick, 2004) κάθε μοντέλου. Τέλος, είναι διαθέσιμο ένα αρχείο που περιέχει όλες τις διαμορφώσεις των κεντροειδών κάθε cluter καθώς και τη χαμηλότερη ενεργειακή διαμόρφωση (lowest energy conformation-LEC, μορφή PDB). Η γενική μορφή λειτουργίας του PEP-FOLD (**Εικόνα 32**), είναι ίδια ανά τις εκδόσεις, με μικρές διαφοροποίησεις στην τελευταία όσον αφορά:



Εικόνα 32: Διάγραμμα ροής του PEP-FOLD

Η γενική μορφή λειτουργίας του PEP-FOLD,είναι ίδια σε όλες τις εκδόσεις, με τη διαφορά ότι στην τελευταία, χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί αλγόρθμοι για τη δημιουργία 3D αναπαράστασης (Forward Backtrack αλγόριθμος ή Taboo Sampling αλγόριθμος). Οι πλευρικές αλυσίδες προστίθενται με χρήση του Oscar-star (Liang et al. 2011) και η γρήγορη ενεργειακή ελαχιστοποίηγη με Gromacs 5 συγκεκριμένα. Το τελικό αποτέλεσμα του clustering, δεν βασίζεται στο δείκτη RMSD, αλλά στο BCscore. Και εδώ πραγματοποιείται complete linkage clustering, χρησιμοποιώντας την απόσταση d=1-BCscore και ένα όριο κατωφλιού, ισοδύναμο με μία τιμή BCscore του 0.8 πάνω από το οποίο, τα αποτελέσματα της σύνθεσης θεωρούνται πολύ κοντά στη φυσική κατάσταση. Τα αποτελέσματα του clustering ταξινομούνται τελικώς είτε με χρήση της συνάρτησης βαθμολόγησης sOPEP ή Apollo. (Αναπροσαρμογή από Maupetit et al., 2009)

Έτσι λοιπόν στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν τα πεπτίδια του RyR2 με την εξής διαδικασία:

PE	EP-F(3.5	9	Run Reset Help pages advanced options		
v In	put Data						
* F	Peptide amin	o acid seq	uence 🥹				
	paste	db	upload			edit	clear
	Enter your da	ata below:					
	KAVWHKLLSK	2RKRAVVAC					
¥ 0	ptions						
* F	Run label 🥹	PEPFOLD	100 ▼				
* S	Sort models	by 😣 sOP	EP V				

Εικόνα 33: Σύνθεση πεπτιδίων του ανθρώπινου RyR2. Στην εικόνα παρουσιάζεται ο τρόπος σύνθεσης του Πεπτιδίου_B, με χρήση των default παραμέτρων. Με τον ίδιο τρόπο συντέθηκαν και τα υπόλοιπα πεπτίδια.

Με σκοπό την επιβεβαίωση της πρόβλεψης του PEP-FOLD χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής PSIPRED (από τα μόνα εργαλεία που δέχονται ως είσοδο μικρό αριθμό αμινοξικών καταλοίπων) (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) (McGuffin, Bryson, & Jones, 2000). Το PSIPRED είναι ένα εργαλείο το οποίο ενσωματώνει δύο feed-forward νευρωνικά δίκτυα (Graupe, 2013), τα οποία εκτελούν την ανάλυση σε αποτελέσματα που έχουν παρθεί με χρήση του <u>PSI-BLAST</u> (Position Specific Iterated - BLAST) (Altschul et al. 1997). Η βελτιωμένη έκδοση του PSIPRED, περιλαμβάνει ένα νέο αλγόριθμό ο οποίος κατά βάση υπολογίζει το μέσο όρο των αποτελεσμάτων μέχρι και 4 νευρικών δικτύων κατά την πρόβλεψη, με αποτελέσμα όπως δίνεται και από τους συγγραφείς να έχει ένα ποσοστό επιτυχίας της τάξης του 78%. Εισάγεται, επομένως η επιθυμητή αμινοξική ακολουθία για να ληφθεί το αποτέλεσμα της πρόβλεψης, ως εξής:

Input Sequence Filter		
Choose Prediction Methods		Εικόνα 54: Ειδάγωγη αμινοξικής ακολουθίας
✓ PSIPRED v3.3 (Predict Secondary Structure)	DISOPRED3 (Disorder Prediction)	στο ποόνοσιμα
pGenTHREADER (Profile Based Fold Recognition)	MEMSAT3 & MEMSAT-SVM (Membrane Helix Prediction)	πρόβλεψης PSIPRED.
BioSerf v2.0 (Automated Homology Modelling)	DomPred (Protein Domain Prediction)	Υπογρεωτικά πεδία για το
FFPred 3 (Eukaryotic Function Prediction)	GenTHREADER (Rapid Fold Recognition)	
MEMPACK (SVM Prediction of TM Topology and Helix Packing)	pDomTHREADER (Fold Domain Recognition)	εργαλείο είναι η είδοοος
DomSerf v2.0 (Automated Domain Modelling by Homology)		της αμινοξικής ακολουθίας
Help		και η αναννωριστική
Input Sequence (Single sequence or Multiple Sequence	alignments; as raw sequence or fasta format)	ονομασία της υποβολής.
KAVWHKLLSKOBKRAVVAC		Στην εικόνα φαίνεται η υλοποίηση που ακολουθήθηκε και το
Help If you wish to test these services follow this link to retrieve a test fasta segu	ence.	πεπτίδιο Β. Η ίδια
Submission Details		διαδικασία επαναλήφθηκε
Email Address for job completion alert (optional)		και για τα υπόλοιπα πεπτίδια.
Password (only required for licenced commercial e-mail addresses) Help		
Short identifier for submission		
Predict Clear form		

Να σημειώθεί ότι πραγματοποιείται de novo σύνθεση του κρυσταλλικού βιομορίου που βρέθηκε να αλληλεπιδρά η δομή πρότυπο της CaM που πρόκυψε μέσω clustering, με σκοπό τη χρήση του ως δείγμα control (μάρτυρας). Καθώς διαθέτουμε την πειραματικά προσδιορισμένη δομή, υπήρξε η ανάγκη της εκ νέου μελέτης της αλληλεπίδρασης των δύο αυτών βιομορίων μέσω του docking για την αξιολόγηση της απόδοσης όλων των προσομοιώσεων που θα πραγματοποιηθούν στη συνέχεια.

Έπειτα από τη σύνθεση όλων των πεπτιδίων και με τη χρήση του προγράμματος MOE πραγματοποιήθηκε υπέρθεση των δομών αυτών για εξαγωγή διαγράμματος RMSD, βάσει του οποίου κρίνεται αν μεταξύ των μοντέλων που προβλέπει το PEP-FOLD (5 κορυφαία μοντέλα) για κάθε δομή, παρατηρούνται σημαντικές αποκλίσεις ή όχι.

2.4 <u>Γ' Μέρος: Docking - Μελέτη αλληλεπίδρασης</u>

Καταλήγοντας στη δομή πρότυπο της Ca^{2+}/CaM από τα αποτελέσματα του clustering και από τις δομές των de novo πεπτιδίων του ανθρώπινου υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου 2, RYR2 και του control πεπτιδίου, επόμενο βήμα υπήρξε η μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτών των δύο βιομορίων ($Ca^{2+}/CaM - Πεπτίδιo_B, Ca^{2+}/CaM - Πεπτίδιo_F$ και $Ca^{2+}/CaM - Πεπτίδιo_{control}$). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο προγράμματα docking, ένα εργαλείο που πραγματοποιεί <u>rigid</u> docking πρωτεΐνης – πρωτεΐνης, το **ClusPro** (<u>https://cluspro.org/help.php</u>), και το λογισμικό **GOLD** (<u>https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/</u>), που πραγματοποιεί <u>flexible</u> docking, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του με αυτά του ClusPro και την αξιολόγησή του.

2.4.1 ClusPro Docking

Το ClusPro (Kozakov et al. 2017) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο (web server) για τη μελέτη αγκυροβόλησης πρωτεϊνών-πρωτεϊνών. Ο διακομιστής παρέχει μια απλή αρχική σελίδα για βασική χρήση, η οποία απαιτεί μόνο δύο αρχεία εισόδου σε μορφή PDB. Ωστόσο, το ClusPro προσφέρει επίσης μια σειρά προηγμένων επιλογών για την τροποποίηση της αναζήτησης, συμπεριλαμβανομένης της αφαίρεσης των μη δομημένων πρωτεϊνικών περιοχών, της εφαρμογής της έλξης ή απομάκρυνσης, της καταγραφής των περιορισμών των ζευγών απόστασης, της κατασκευής ομοπολυμερών homo, της εξέτασης των δεδομένων της σκέδασης ακτίνων-Χ μικρής γωνίας (small-angle X-ray scattering-SASAXS) και του εντοπισμού των θέσεων πρόσδεσης της ηπαρίνης. Báσει του τύπου της πρωτεΐνης που εξετάζεται, μπορούν να εφαρμοστούν έξι διαφορετικά ενεργειακά πεδία. Το docking με κάθε σετ παραμέτρων ενέργειας έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δέκα μοντέλων που ορίζονται από τα κέντρα των clusters, τα οποία αποτελούνται από μεγάλο πληθυσμό των χαμηλότερων ενεργειακά δομών. Παρόλο που ο server χρησιμοποιείται από μεγάλο αριθμό χρηστών, οι δοκιμές συνήθως ολοκληρώνονται σε λιγότερο από 4 ώρες.

Ο τρόπος λειτουργείας του ClusPro είναι ο εξής:



Εικόνα 35: Τρόπος λειτουργίας του ClusPro. Έπειτα από κάθε βήμα εξάγεται ένας αριθμός δομών, όπως φαίνεται στο κουτί χρώματος ματζέντα, με τελική έξοδο το σύνολο των 10 δομών (Αναπροσαρμογή από Kozakov et al. 2017).

1. Rigid-Docking (FFT)-PIPER

Αυτό το βήμα, χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο PIPER (Kozakov et al. 2006), έναν αλγόριθμο docking που βασίζεται στην προσέγγιση συσγέτισης γρήγορου μετασγηματισμού Fourier (Fast Fourier Transform, στο εξής FFT). Η προσέγγιση FFT, που εισήχθη από τον Katchalski-Katzir και τους συναδέλφους (Katchalski-Katzir et al. 1992) το 1992, οδήγησε σε σημαντική πρόοδο στο rigid-docking πρόσδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Σε αυτή τη μέθοδο όπως έχει αναλυθεί και παραπάνω, μία από τις πρωτεΐνες (υποδοχέας) τοποθετείται στην αρχή του συστήματος συντεταγμένων σε ένα σταθερό πλέγμα και η δεύτερη πρωτεΐνη (προσδέτης) τοποθετείται σε ένα κινητό πλέγμα με την ενέργεια αλληλεπίδρασης να καταγράφεται με τη μορφή μιας συνάρτησης συσχέτισης (ή ως άθροισμα μερικών συναρτήσεων συσγετισμού). Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών προέργεται από το γεγονός ότι τέτοιες ενεργειακές αλληλεπιδράσεις μπορούν να υπολογιστούν με ακρίβεια χρησιμοποιώντας FFTs και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξαντλητική δειγματοληψία δισεκατομμυρίων διαμορφώσεων των δύο αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών, αξιολογώντας τις ενέργειες σε κάθε σημείο του πλέγματος. Έτσι, ο αλγόριθμος βασισμένος σε FFT επιτρέπει την αγκυροβόληση των πρωτεϊνών χωρίς να χρειάζεται η πληροφορία σχετικά με τη δομή του συμπλόκου. Ο αλγόριθμος PIPER που χρησιμοποιείται στη σημερινή έκδοση του ClusPro και με την εφαρμογή του FFT, χρησιμοποιεί μία συνάρτηση βαθμολόγησης που περιλαμβάνει έναν όρο για την αλληλεπίδραση ανά ζεύγος βάσει δομής και με το συνδυασμό της και με τους άλλους όρους των ενεργειακών συναρτήσεων, αυξάνει ουσιαστικά την ακρίβεια του docking, έχοντας ως αποτέλεσμα, δομές πιο κοντά στη φυσική τους κατάσταση (Kozakov et al. 2006).

Ο PIPER αντιπροσωπεύει την ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας μία έκφραση της μορφής $E = w_1 E_{rep} + w_2 E_{attr} + w_3 E_{elec} + w_4 E_{DARS}$, όπου τα E_{rep} και E_{attr} υποδηλώνουν τις απωστικές και ελκτικές συνεισφορές στην ενέργεια αλληλεπίδρασης van der Waals, ενώ η Eelec είναι ένας όρος της ηλεκτροστατικής ενέργειας. Ο όρος Edars είναι ένα δυναμικό ανά ζεύγος που βασίζεται στη δομή και κατασκευάστηκε από την προσέγγιση "δολώματα ως κατάσταση αναφοράς" (decoys as the reference state -DARS) (Chuang et al. 2008) και αντιπροσωπεύει κατά κύριο λόγο συνεισφορές στην αποδιαλύτωση, δηλαδή την αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια λόγω της απομάκρυνσης των μορίων νερού από τη διεπιφάνεια του μορίου (Kozakov et al. 2006). Οι συντελεστές w_1 , w_2 , w_3 και w_4 ορίζουν τα βάρη των αντίστοιχων όρων και επιλέγονται κάθε φορά ανάλογα με το είδος docking που καλείται να πραγματοποιηθεί. Με εξαίρεση το διαφορετικό ορισμό από τις προηγμένες επιλογές, το ClusPro παράγει τέσσερα σύνολα μοντέλων χρησιμοποιώντας συστήματα βαθμολόγησης στα ενεργειακά πεδία: (α)ισορροπίας, (β)ηλεκτροστατικά, (γ)υδροφοβικά και (δ)ηλεκτροστατικά μαζί με van der Waals. Στην πραγματικότητα τα βάρη σε αυτή τη συνάρτηση έχουν εισαχθεί εμπειρικά και επιλέχθηκαν για να βελτιστοποιήσουν τα ποσοστά επιτυχίας για τις διαφορετικές κατηγορίες πρωτεϊνικών συμπλόκων. Επειδή λοιπόν ο PIPER, δεν αποσκοπεί στην εκτίμηση της πραγματικής ενέργειας αλληλεπίδρασης και το σκορ (βαθμολόγηση) που παρέγεται από το ClusPro δεν πρέπει να θεωρείται ως μέτρο συγγένειας δέσμευσης, τα πιο πιθανά μοντέλα του συμπλόκου επιλέγονται με βάση τον πληθυσμό των clusters (όσο μεγαλύτερος είναι ο πληθυσμός των δομών σε ένα cluster, αυτό θεωρείται και το πιο κοντινό μοντέλο στη φυσική κατάσταση).

2. Clustering

Το δεύτερο βήμα του ClusPro είναι η ανάλυση μέσω clustering των 1000 πιο χαμηλών ενεργειακά αγκυροβολημένων δομών, χρησιμοποιώντας ως μέτρο απόσταστης το IRMSD για κάθε ζεύγος (Comeau et al. 2004; Kozakov et al. 2005). Υπολογίζονται οι τιμές IRMSD για κάθε ζεύγος μεταξύ των 1000 δομών και εντοπίζεται η δομή που έχει το μεγαλύτερο αριθμό γειτόνων σε ακτίνα 9Å IRMSD. Αυτή η δομή θα οριστεί ως το κέντρο του πρώτου cluster και οι δομές εντός της γειτονιάς IRMSD των 9 Å του κέντρου θα αποτελέσουν την πρώτη ομάδα. Τα μέλη αυτού του cluster, αφαιρούνται στη συνέχεια και επιλέγεται η δομή με τον μεγαλύτερο αριθμό γειτόζι των υπόλοιπων δομών μέχρι το επόμενο κέντρο του cluster. Αυτοί οι γείτονες θα αποτελέσουν το επόμενο cluster. Με αυτό τον τρόπο, σε κάθε βήμα επανάληψης δημιουργούνται έως και 30 ομάδες.

3. Ελαχιστοποίηση CHARMM

Μετά το clustering, πραγματοποιείται ελαχιστοποίηση ενέργειας των συμπλοκοποιημένων δομών, με 300 επαναλήψεις διορθώνοντας κάθε φορά την κύρια πρωτεϊνική αλυσίδα με χρήση μόνο του όρου van der Waals του δυναμικού CHARMM (Brooks et al. 1983). Η ελαχιστοποίηση αφαιρεί τις στερεοχημικές αλληλοεπικαλύψεις, αλλά γενικά παράγει μόνο πολύ μικρές αλλαγές διαμορφώσεων. Στη βασική λειτουργία του, το ClusPro εξάγει τις δομές των κέντρων που ανήκουν στα 10 clusters με το μεγαλύτερο πληθυσμό (δηλαδή, κάθε φορά ως αποτέλεσμα λαμβάνονται τα clusters εκείνα με το μεγαλύτερο πλήθος αποτελεσμάτων και ως δομή παρουσιάζεται το κέντρο-κεντρομερές του κάθε cluster).

To ClusPro, την τελευταία δεκαετία, παρουσιάζει αποτελέσματα με ολοένα και μεγαλύτερη ακρίβεια και δομές αντιπροσωπευτικές στο φυσικό τους δίπλωμα, σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο server docking, όπως δείχνεται και από την αξιολόγηση CAPRI (Kozakov et al. 2017).

Έχοντας λοιπόν τις δομές σε μορφή PDB όπως έχουν απομονωθεί (clustering για την Ca²⁺/CaM και Πεπτίδια Β και F) αλλά και της αντίστοιχης κρυσταλλικής δομής, ως control δείγμα, Ca²⁺/CaM και de novo κρυσταλλικό πεπτίδιο, αφού πρωτονιώθηκαν οι δομές της CaM μέσω του MOE, μελετήθηκε η αλληπίδρασή τους στο ClusPro, «φορτώνοντας» τις δομές στον server, με τις default παραμέτρους για να ληφθούν τα αποτελέσματα που θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 36: Αρχική σελίδα του ClusPro. Με κόκκινα βέλη εμφανίζονται τα υποχρεωτικά πεδία συμπλήρωσης. Αρχικά ο χρήστης είναι υπογρεωμένος να πραγματοποιήσει εγγραφή, μέσω της οποίας θα λαμβάνει και αποθηκευμένα τα αποτελέσματα της πρόβλεψης, να παραχωρήσει το όνομα της διεργασίας που επιθυμεί, στη συνέχεια είτε με απευθείας χρήση του κωδικού PDB, είτε μέσω αρχείου δίνει στο server τις υπο μελέτη δομές, ενώ έγει τη δυνατότητα και για προηγμένες επιλογές και τέλος με την εντολή Dock, εκτελεί την πρόγνωση. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για τα υπό μελέτη δεδομένα της παρούσας διπλωματικής:

- $Ca^{2+}/CaM Πεπτίδιο_B$
- $Ca^{2+}/CaM Πεπτίδιο_F$
- $Ca^{2+}/CaM Πεπτίδιο_{control}$

Τα αποτελέσματα των κρυσταλλικών δομών, συγκρίθηκαν στη συνέχεια με τις αντίστοιχες πειραματικές δομές, μέσω υπέρθεσης δομών στο MOE για εξαγωγή ενός διαγράμματος RMSD και αξιολόγηση της πρόγνωσης docking του ClusPro.

2.4.2 GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) Docking

Με σκοπό την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων docking ενός server σε σχέση με ένα δοκιμασμένο λογισμικό, χρησιμοποιήθηκε το GOLD (<u>https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/</u>), από το Κέντρο Δεδομένων Κρυσταλλογραφίας του Cambridge (The Cambridge Crystallographic Data Centre – CCDC). Το λογισμικό αυτό δεν διατίθεται δωρεάν, πραγματοποιεί flexible docking, αλλά μέσω παραμετροποιήσεων μπορεί να πραγματοποιήσει και rigid docking (Jones et al. 1997; Jones, Willett, & Glen, 1995).

Όπως και τα περισσότερα προγράμματα docking, το GOLD απολείται από τρία βασικά μέρη:

1. Μία συνάρτηση βαθμολόγησης, για την ταξινόμηση των διάφορων τύπων πρόσδεσης.

Η συνάρτηση Goldscore, είναι μία τύπου μοριακή μηχανική συνάρτηση με 4 συνιστώσες:

$$GOLD \ Fitness = S_{hb_ext} + S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int}$$

όπου ο όρος S_{hb_ext} είναι το σκορ των δεσμών υδρογόνου πρωτεΐνης-ligand, S_{vdw_ext} το van der Waals σκορ της πρωτεΐνης-προσδέτη, S_{hb_int} είναι η συνεισφορά στη Fitness λόγω ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου στον ligand και S_{vdw_int} είναι η συνεισφορά λόγω ενδομοριακής παραμόρφωσης στον ligand.

To GOLD, δίνει τη δυνατότητα επιλογής στον κάθε χρήστη μεταξύ **6** διαφορετικών scoring functions, κάθε μία και με διαφορετική λειτουργία. Και συγκεκριμένα τις:

- GoldScore (το πεδίο δυνάμεων του GOLD, όπως αναλύθηκε παραπάνω)
- ChemScore (μία εμπειρική συνάρτηση για τα τις λιποφιλικές περιοχές πρόσδεσης)
- Astex Statistical Potential (συνάρτηση που λαμβάνει δεδομένα από την PDB και επαναπροσδιορίζει το σκορ πειραμάτων)
- ο ChemPLP (συνάρτηση βαθμολόγησης, πιο αποτελεσματική από την GoldScore)
- ChemScore RDS (επαναπροσδιορίζει το score σε διαδικασίες του GOLD, όπως είναι η εικονική σάρωση
 Virtual Screening, διαδικασία απαραίτητη κατά το σχεδιασμό φαρμάκων)
- Target Specific Parameters

2. Έναν μηχανισμό για την τοποθέτηση του ligand στη θέση πρόσδεσης.

Το GOLD χρησιμοποιεί μία μοναδική μέθοδο για να γίνει αυτό, η οποία βασίζεται σε σημεία προσαρμογής. Ουσιαστικά, προσθέτει σημεία προσαρμογής σε ομάδες δέσμευσης υδρογόνου, τόσο σε πρωτεΐνη όσο και σε ligand και χαρτογραφεί τα σημεία δέκτη του ligand και τα σημεία δότη στην πρωτεΐνη και αντίστροφα. Επιπρόσθετα, το GOLD παράγει υδρόφοβα σημεία προσαρμογής στην κοιλότητα της πρωτεΐνης πάνω στην οποία χαρτογραφούνται ομάδες -CH του ligand.

3. Έναν αλγόριθμο αναζήτησης για τη διερεύνηση των πιθανών τρόπων σύνδεσης.

Το GOLD χρησιμοποιεί έναν γενετικό αλγόριθμο (GA) στον οποίο οι ακόλουθες παράμετροι είναι τροποποιημένες/βελτιστοποιημένες: (α) δύεδρες γωνίες των περιστρεφόμενων δεσμών του ligand, β) γεωμετρίες δακτυλίων του ligand (με περιστροφή γωνιών των δακτυλίων), (γ) δίεδρες γωνίες πρωτεΐνης των ομάδων OH και NH3⁺ και (δ) τις απεικονίσεις των σημείων προσαρμογής (δηλαδή τη θέση του ligand στη θέση πρόσδεσης). Βέβαια, στην αρχή μιας εκτέλεσης docking, όλες αυτές οι μεταβλητές είναι τυχαίες. Οι ρυθμίσεις του GA επηρεάζουν άμεσα τους χρόνους εκτέλεσης ενός docking στο GOLD και την πιθανότητα να βρεθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα σε συνολικό επίπεδο. Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν το χρόνο και την ακρίβεια είναι ο αριθμός των λειτουργιών GA σε κάθε docking. Η ροή του GOLD μπορεί να τερματιστεί νωρίτερα αν αναπαραχθέι πολλές φορές η καλύτερη δυνατή διαμόρφωση και βάσει των συναρτήσεων βαθμολόγησης. Από προεπιλογή και μόνο εάν η επιλογή αυτή είναι ενεργοποιημένη, το GOLD τερματίζει τη διαδικασία όταν οι τρεις πρώτες δομές docking βρίσκονται σε απόσταση 1,5Å μεταξύ τους (Verdonk et al. 2003).

Η διαδικασία docking στο GOLD, είναι κάπως πιο περίπλοκη από αυτή του ClusPro, επομένως έχοντας τις δομές:

- $Ca^{2+}/CaM \Pi \epsilon \pi \tau i \delta \iota o_{control}$
- $Ca^{2+}/CaM \Pi \epsilon \pi \tau i \delta \iota o_B$
- $Ca^{2+}/CaM \Pi \epsilon \pi \tau i \delta \iota o_F$

χωρίς να πρωτονιωθεί αυτή τη φορά η CaM, μιας και το GOLD το εκτελεί αυτόματα, ακουλουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

1.



2. □ × 83

_

GOLD	Setup	
------	-------	--

- 🗆 🗙

Wizard step 2: Protein setup At this point you have the chance to edit your protein structure if required e.g. add hydrogens, delete waters..





Wizard steps: 1. Select a protein 2. Protein setup 3. Define the binding site 4. Configuration template 5: Select ligands 6. Choose a fitness function 7. GA search options 8. Finish View O Point - select atoms to define a centroid or edit XYZ X: Y: Z: View Reset One or more ligands A, A:ID O List of atoms or residues ... View Filename: Select all atoms within 4 Å Generate a cavity atoms file from the selection Refine Selection Detect cavity - restrict atom selection to solvent-accessible surface Force all H bond donors/acceptors to be treated as solvent accessible Add Definition as a Selection < Back Next > Cancel Wizard Help 🍋

5.

😻 GOLD Setup \times Wizard step 5: Select ligands Choose one or more ligands to be docked into the protein by clicking the 'Add' button. Global Options ID Wizard steps: 1. Select a protein 2. Protein setup 3. Define the binding site 4. Configuration template 5: Select ligands 6. Choose a fitness function 7. GA search options 8. Finish Liqand File GA Runs First Liqand Last Liqand 1 2wel_control_peptide.mol2 10 1 last Add Delete Show full file paths Reference ligand: Help < Back Next > Cancel Wizard

7.

obal Options ID		
Vizard steps: . Select a protein . Portein setup . Define the binding site . Configuration template : Select ligands . Chosea a finess function . Cho search options . Finish	Automatic Preset User defined	Less <<
	Search efficiency:	x ops 125000 Default Very Flexible

0

GOLD Setup	- 0
Conf file:	Load Save
Global Options ID	
Wizard Templates Proteins Select Ligands Configure Waters Ligand Flexibility Fitness & Search Options GA Settings Output Options GoldMine	File Format Options Information in File Selecting Solutions Output file format: O same as input O SD file Mol2 Output directory:
Parallel GOLD > Constraints Atom Typing	Save solutions to one file: Use alternative bestranking list filename: Create links for different binding modes (based on RMSD dustering) Detrance between dusters: 7.75 Å

6.

D offers several different scoring fiking.	a TITNESS TUNCTION unctions - the original GoldScore is the	default. Please choose the	e one you wish to use for this
obal Options ID Ward steps: 1. Select a protein 2. Portien setup 3. Define the binding site 4. Configuration template 5: Select ligands 6. Choose a fitness function 7. GA search options 3. Finish	Cording Scoring Function: CHEMPLP Parameter file: DEFAULT Rescore Scoring Function: CHEMPLP		• Less <<
	Parameter file: DEFAULT Allow early termination Generate diverse solutions Use the internal ligand energy o Read hydrophobic fitting points	ffset File: [ft_pts.mol2	Rescore Options Early Termination Option Diverse Solution Option

8.

Conf file:		Load Sav
Global Options ID		
Wizard Templates Proteins Define Binding Site Select Ligands Configure Waters Ligand Flexibility Fitness & Search Options GA Settings Output Options GoldMine Parallel GOLD > Constraints Atom Typing	Flip pyramidal N Detect Internal H bonds Explore ring conformations flip ring corners Flip al planar R-NR IR2 Ring N-R ® flip O rotate CRing N-R IR2 ® flip O rotate (D=C)-CH ® flip O rotate Use Torsion Angle Distributions Flie: DEFAULT	Flp amide bonds Match template conformations fix fix
	Postprocess Rotatable Bonds File: DEFAULT Fix Ligand Rotatable Bonds Fix Ligand Rotatable Bonds fix all fix all fix all but terminal	fix specific Specify Bands

- 1. Εισαγωγή της υπό μελέτης δομής της Ca²⁺/CaM με το βιομόριο που αλληλεπιδρά σε μορφή PDB
- Προετοιμασία της δομής, προσθέτοντας υδρογόνα και αφαιρώντας τυχόν υπάρχοντα μόρια H₂O, από τη λυμένη κρυσταλλογραφική δρομή
- Αφαίρεση του προσδέτη της Ca²⁺/CaM και αποθήκευσή του σε μορφή Mol2, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως προσδέτης αναφοράς για την περιοχή πρόσδεσης
- 4. Ορισμός της περιοχής πρόσδεσης βάσει του βήματος 3. Αλλαγή της επιλογής ατόμων στα 6Å
- 5. Είσοδος του ligand του οποίου η περιοχή πρόσδεσης μελετάται (μορφή mol2 και εδώ)
- 6. Επιλογή προτειμούμενης συνάρτησης βαθμολόγησης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε η ChemPLP, καθώς έχει δειχθεί πως στατιστικά έχει καλύτερα αποτελέσματα
- 7. Default ρυθμίσεις του αλγορίθμου αναζήτησης GA
- 8. Επιλέγοντας τις προηγμένες επιλογές, δίνεται η δυνατότητα για ορισμό rigid-docking, ενεργοποιώντας τη τη διόρθωση περιστροφής όλων των δεσμών του ligand
- 9. Ο χρήστης καλείται να αποθηκεύσει τα αποτελέσματα στη μορφή που επιθυμεί (επιλογή mol2) καθώς και να ορίσει πόσα αποτελέσματα θα λάβει (επιλογή όλων)

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για το control δείγμα και για τα δείγματα Ca^{2+}/CaM -RyR2. Στην περίπτωση του GOLD, εξαιτίας του πεδίου ορισμού μιας περιοχής δέσμευσης αναφοράς, χρησιμοποιείται το κρυσταλλικό πεπτίδιο ως δομή αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιοχής αυτής, προκειμένου να πραγματοποιηθεί docking με το αντίστοιχο de novo πεπτίδιο (control δείγμα). Το κρυσταλλικό σύμπλοκο χρησιμοποιήθηκε και ως δομή αναφοράς για την πραγματοποίηση docking και με τα πεπτίδια B και F. Για επεξήγηση όλων των πεδίων του GOLD και των παραμέτρων, υπάρχουν αναλυτικές οδηγίες καθώς και μαθήματα για τη σωστή εκπαίδευση του χρήστη (https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/).

2.4.3 <u>Αξιολόγηση και ανάλυση αποτελεσμάτων Docking</u>

Τα αποτελέσματα του προγράμματος docking που εν τέλει επιλέχθηκε, επεξεργάστηκαν από μία σειρά εργαλείων για καλύτερη τόσο δομική πληροφορία όσο και ανάλυση των scores της κάθε δομής.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Επιλέχθηκε 1 σύνολο των καλύτερων δομών από το πρόγραμμα docking, βάσει των κριτηρίων βαθμολόγησής του, το οποίο αναλύθηκε μέσω του εργαλείου FlexPepDock, με σκοπό να ληφθεί δομική πληροφορία για όλες τις πιθανές στερεοδιατάξεις του πεπτιδίου με το οποίο αλληλεπιδρά η Ca²⁺/CaM. Αποτελέσματα από το πρόγραμμα docking που εν τέλει επιλέχθηκε, αναλύθηκαν μέσω του εργαλείου CONSRank με σκοπό να παραχθεί ένα άλλο σκορ, σε κάθε δομή συμπλόκου, της συνάρτησης βαθμολόγησης του εργαλείου αυτού και να συγκριθούν με τα αντίστοιχα του προγράμματος docking
- Τα 10 μοντέλα που προέκυψαν από την ανάλυση του FlexPepDock, επεξεργάστηκαν μέσω του εργαλείου CONSRank, με σκοπό την ανάκτηση της καλύτερης στερεοδιάταξης των συμπλόκων από τη συνάρτηση βαθμολόγησης του server (αποτέλεσμα σε μορφή score)
- 3. Τέλος, από όλες τις αναλύσεις, έχοντας καταλήξει στη δομή συμπλόκου της Ca²⁺/CaM με τα δύο πεπτίδια του RyR2 B και F βάσει του score του CONSRank, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για κάθε ένα από τα σύμπλοκα αυτά στο εργαλείο COCOMAPS, με σκοπό τη σύγκριση της αλληλεπίδρασης των δύο επιφανειών (πρωτεΐνης πεπτιδίου)

1. FlexPepDock

Ο server FlexPepDock (<u>http://flexpepdock.furmanlab.cs.huji.ac.il/</u>) παρέχει μία διεπαφή με ένα πρωτόκολλο docking υψηλής ανάλυσης πεπτιδίων (βελτιοστοποίηση) για τη μοντελοποίηση συμπλόκων πεπτιδίου-πρωτεΐνης, που εφαρμόζεται στο πλαίσιο της Rosetta (πλατφόρμα για μοντελοποίηση και ανάλυση πρωτεϊνικών δομών) (London et al. 2011). Έχοντας τη δομή του υποδοχέα-πρωτεΐνης και ενός κατά προσέγγιση, πιθανώς ανακριβούς μοντέλου του πεπτιδίου εντός της θέσης πρόσδεσης του υποδοχέα, ο server FlexPepDock βελτιώνει το πεπτίδιο σε υψηλή ανάλυση, επιτρέποντας πλήρη <u>ευελιξία</u> στο σκελετό του πεπτιδίου και σε όλες τις πλευρικές αλυσίδες. Ξεκινώντας από ένα μοντέλο της αλληλεπίδρασης, εκτελεί μία μέθοδο που βασίζεται σε ελαχιστοποίηση Monte Carlo για να βελτιώσει όλους τους βαθμούς ελευθερίας του πεπτιδίου (προσανατολισμός άκαμπτου-rigid σώματος, ευελιξία του σκελετού και της πλευρικής αλυσίδας) καθώς και τις στερεοδιατάξεις των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης-υποδοχέα.

Inp	out PDB file:	Choose File No file	e chosen	- c	or Use Demo File
You Opt	ur e-mail: ional but ommended				
Ad	vanced Options (<u>click to toggle)</u>				
	Share this job	job <u>Learn more</u>			
	Insert a refere	• Learn more	Choose File	No file chosen	
	Insert a const	raint file Learn more	Choose File	No file chosen	
	Specify number	er of low resolution	n structures (0-	300) 100	Learn more
	Specify number	er of high resolutio	on structures (0	-300) 100	
	Select column	s to appear in dat	a file:		
	🗷 score	hbond_sc	🗖 rama	I_sc	🗆 pep_sc
	rmsBB_if	🗖 fa_atr	🗖 fa_pair	pep_sc_nore	ef 🔲 rmsALL_if
	□ fa_rep	🔲 fa_dun	🗹 rmsBB	🔲 fa_sol	startRMSbb
			Run FlexPepDo	ck	
		CON:-	FlexPepDo	ck	~
		Z	\rightarrow	SAT	1 sept
	1-			1	The
		in the second			
	Input	model Nativ	e structure	FlexPepDock	prediction

Εικόνα 37: Αρχική σελίδα του FlexPepDock. Στον server φορτώθηκε το σύνολο των καλύτερων μοντέλων που προέκυψαν από το πρόγραμμα docking και αφορούν τα σύμπλοκα Ca²⁺/CaM-Πεπτίδιo_B, Ca²⁺/CaM-Πεπτίδιο_F και Ca²⁺/CaM-Πεπτίδιο_{control} με σκοπό να μελετηθούν όλες οι δυνατές στερεοδιατάζεις των πεπτιδίων που αλληλεπιδρά η Ca²⁺/CaM. Χρησιμοποιήθηκαν οι προεπιλεγμένες επιλογές, με αποτελέσμα τη πρόβλεψη συνολικά 200 δομών. Δίνεται και η επιλογή για έναν αριθμό προηγμένων επιλογών που στην περίπτωση τη συγκεκριμένη δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο περαιτέρω βήμα, εκτός από τα επιλεγμένα κουτιά που εμφανίζονται. Ως αποτέλεσμα λαμβάνονται για το κάθε σύμπλοκο οι καλύτερες 10 δυνατές στερεοδιατάξεις του.

Η κύρια είσοδος στο FlexPepDock είναι ένα αρχείο PDB του εκτιμώμενου συμπλόκου μεταξύ της πρωτεΐνηςυποδοχέα (πρώτη αλυσίδα) και του πεπτιδίου (δεύτερης αλυσίδας), όπου θα εκτελέσει docking ξεκινώντας από αυτή την αρχική στερεοδιάταξη. Εάν η φυσική διαμόρφωση του πεπτιδίου βρίσκεται εντός της αποτελεσματικής περιοχής του πρωτοκόλλου, θα παραχθούν μοντέλα υψηλής ανάλυσης για αυτή την αλληλεπίδραση. Χρησιμοποιώντας τις προεπιλεγμένες επιλογές, ο server θα εκτελέσει 100 προσομοιώσεις σε πλήρη ατομική λειτουργία και 100 προσομοιώσεις που περιλαμβάνουν προηγούμενο πρωτόκολλο βελτιστοποίησης βασισμένο σε κεντρομερή με χαμηλή ανάλυση (Raveh, London, & Schueler-Furman, 2010). Στη συνέχεια θα ταξινομήσει το σύνολο των 200 μοντέλων που έχουν δημιουργηθεί με το ενεργειακό σκορ της Rosetta, και έτσι το τελικό αποτέλεσμα που θα λάβει ο χρήστης θα είναι τα **10** καλύτερα προβλεπόμενα μοντέλα για αυτήν την αλληλεπίδραση, καθώς και το σκορ και το bb-RMSD από την αρχική στερεοδιάταξη. Επιπλέον, μία γραφική παράσταση που δείχνει το σκορ έναντι του RMSD για καθένα από τα 200 μοντέλα που δημιουργήθηκαν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συνολική δειγματοληψία.

Να σημειώθεί ότι το FlexPepDock, έχει όριο αμινοξικών καταλοίπων περίπου 25-30 για τα πεπτίδια που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνη, αν και ορθότερη πρόβλεψη σύμφωνα με τους δημιουργούς πραγματοποιεί για μήκος 5-15 καθώς δεν εγγυάται η ορθότητα των προβλέψεών του για μεγαλύτερο μήκος. Στην παρούσα μελέτη, κρίθηκε απαραίτητη η μείωση αμινοξικών καταλοίπων του κρυσταλλικού πεπτιδίου στη δομή του συμπλόκου που πρόκυψε από το πρόγραμμα docking για το control δείγμα μέσω του Chimera. Συγκεκριμένα η τελική αμινοξική ακολουθία του κρυσταλλικού πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Control Πεπτίδιο VDCLKKFNARRKLKGAILTTMLATRNFSA

2. CONSRank

Είναι ένας server (<u>https://www.molnac.unisa.it/BioTools/consrank/</u>) για την ανάλυση, τη σύγκριση και την κατάταξη των μοντέλων docking, που έχουν προκύψει από μία πρόβλεψη, με βάση τις επαφές μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων (Chermak et al. 2015). Ουσιαστικά είναι μία συναινετική προσέγγιση (στο εξής, consensus) για τη βαθμολόγηση και την κατάταξη των μοντέλων docking (CONSRANK Consensus-RANKing), η οποία κατατάσσει τα μοντέλα με βάση την ικανότητά τους να ταιριάζουν με τις πιο συντηρημένες επαφές στο σύνολο που ανήκουν. Εκτός από μοντέλα docking που προκύπουν από μελέτες αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, στο CONSRank, μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση μοντέλων docking πρωτεϊνης-DNA και πρωτεΐνης-RNA.

Ο τρόπος λειτουργίας του είναι ο εξής:

a server for the analysis, comparison and ranking of docking models based on inter-residue contacts						
	τ	Jpload data				
	Job Name optional					
	Email _{optional} Chain/s Molecule 1					
	e.g A or A B Chain/s Molecule 2 e.g A or A B					
	File Upload PDB file or PDB archive (ZIP, TAR, TAR.GZ) Max Upload Size 1GB Load Precalculated	Choose File No file chosen	0			
	Data Example Case	SUBMIT				

Εικόνα 38: Αρχική σελίδα του CONSRank. Τα δύο πρώτα πεδία είναι προαιρετικά. Έπειτα ονομάζοναι οι δύο αλυσιδές των μορίων που αλληλεπιδρούν, στη συγκεκριμένη περίπτωση της Ca²⁺/CaM (ονομασία αλυσίδας από το χρήστη, με χρήση του MOE) και των πεπτιδίων B και F, καθώς και του control δείγματος. Όλα τα μοντέλα που έχουν προκύψει από τη πρόβλεψη του PepFlexDock, μέσω ενός αρχείου ZIP, TAR, TAR.GZ φορτώνονται στον server. Για την παρούσα διπλωματική εργασία, για κάθε τύπο μοντέλα από τον PepFlexDock, και ανέβηκαν στο server ως .zip αρχείο, με σκοπό την ταξινόμησή τους βάσει του σκορ του CONSRank (μεγαλύτερο σκορ, δομή συμπλόκου πιο κοντά στη φυσική κατάσταση).

Στη συνέχεια λαμβάνονται τα αποτελέσματα είτε στη σελίδα του CONSRank, είτε μέσω αποστολής στο χρήστη σε μορφή .zip. Τα αποτελέσματα, περιλαμβάνουν πίνακες που καταγράφουν: i) μία λίστα των επαφών μεταξύ των καταλοίπων που παρατηρήθηκαν σε τουλάχιστον 1% των μοντέλων, με σχετικό ρυθμό συντήρησης (Vangone, Oliva, & Cavallo, 2012), (ii) την κατάταξη των υποβληθέντων μοντέλων με βάση το κανονικοποιημένο score του CONSRank (Oliva, Vangone, & Cavallo, 2013) και (iii) τις παραμέτρους (C50, C70, C90) που αντανακλούν τη συνολική συντήρηση που παρατηρείται στις επαφές μεταξύ των καταλοίπων στο σύνολο των μοντέλων (Vangone, Oliva, & Cavallo, 2012). Επίσης εμφανίζει έναν στατικό consensus χάρτη, όπου επιλέγοντάς τον παρέχεται ένας διαδραστικός χάρτης που μπορεί να μεγενθυνθεί κανείς και να πλοηγηθεί στην απεικόνιση των καταλοίπων σε ζεύγη που αντιστοιχούν σε μία δεδομένη επαφή (dot) και το ρυθμό διατήρησής της. Τέλος, παρέχεται μία διαδραστική 3D απεικόνιση του χάρτη συναίνεσης, στον οποίο επαφές με ρυθμό συντήρησης μικρότερο από 0,01 (δηλαδή σε <1% των μοντέλων) δεν εμφανίζονται. Περαιτέρω ανάλυση μπορεί να γίνει και σε κάθε μοντέλο docking ξεχωριστά, όπως και η ανάλυση μέσω COCOMAPS, του μοντέλου αυτού μιας και στεγάζονται στον ίδιο server αυτά τα δύο εργαλεία.

Από τα απολέσματα ταξινόμησης του CONSRank, επιλέγεται η καλύτερη πρόγνωση στερεοδιάταξης για κάθε σύμπολοκο που μελετάται, ενώ για τελική αξιολόγηση πρόγνωσης χρησιμοποιείται το αποτέλεσμα του control δείγματος ως δομή σύγκρισης με την πειραματική δομή από την PDB, μέσω υπέρθεσης δομών με χρήση του Chimera.

3. COCOMAPS

Καταλήγοντας σε 1 προβλεπόμενη δομή συμπλόκου για κάθε πεπτίδιο, μέσω της τελικής ανάλυσης του CONSRank:

- Ca²⁺/CaM-Πεπτίδιο_B
- Ca²⁺/CaM-Πεπτίδιο_F

Πραγματοποιείται ανάλυση αυτών, μέσω του εργαλείου COCOMAPS (<u>https://www.molnac.unisa.it/BioTools/cocomaps/</u>), με σκοπό την ποσοτική ανάλυση, σύγκριση και οπτικοποίηση των επιφανειών που αλληλεπιδρούν στο σύμπλοκο (Vangone et al. 2011; Vangone, Oliva, & Cavallo, 2012). Το COCOMAPS (bioCOmplexes COntact MAPS), χρησιμοποιείται για την εύκολη και αποτελεσματική ανάλυση και απεικόνιση της διεπιφάνειας βιολογικών συμπλόκων, όπως είναι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-πρωτεϊνών-πρωτεϊνών-DNA και πρωτεϊνών-RNA, με τη χρήση χαρτών ενδομοριακών επαφών.

Data Entry

4-letter PDB code (e.g 2ZA4)		9	
Chain/s Molecule 1 (e.g A or A B)		9	
Chain/s Molecule 2 (e.g C or C D)		9	
OPTION 2: U nolecules.	polad coordinates of one	or two PDB files and enter the chain identifiers of the interact	ing
OPTION 2: U nolecules.	polad coordinates of one	or two PDB files and enter the chain identifiers of the interact 2 files	ing
OPTION 2: U nolecules. . file ® PDB File	polad coordinates of one Choose File No file chosen	or two PDB files and enter the chain identifiers of the interact 2 files 3	ing
OPTION 2: U nolecules. file PDB File Chain Molecule 1 (e.g A or A B)	Choose File No file chosen	or two PDB files and enter the chain identifiers of the interact 2 files	ing
OPTION 2: U nolecules. I file PDB File Chain Molecule 1 (e.g. A or A B) Chain Molecule 2 (e.g. C or C D)	Choose File No file chosen	or two PDB files and enter the chain identifiers of the interact 2 files	ing
OPTION 2: U molecules. I file PDB File Chain Molecule 1 (e.g A or A B) Chain Molecule 2 (e.g C or C D) Cut-Off	Choose File No file chosen	or two PDB files and enter the chain identifiers of the interact 2 files	ing

Εικόνα 39: Αρχική σελίδα COCOMAPS. Χρησιμοποιούνται τα PDB αρχεία των 2 υπό μελέτη συμπλόκων με όλες τις default παραμέτρους (απόσταση κατωφλιού των αλληλεπιδρόντων καταλοίπων 8Å). Από τις προηγμένες επιλογές δεν συμπεριλήφθηκε καμία. Τα αποτελέσματά του, εμφανίζονται σε HTML μορφή με δυνατότητα απόκτησης όλων των συμπιεσμένων αρχείων, δίνοντας κάθε φορά ένα πλήθος αποτελεσμάτων:

- Παρέχει τρεις χάρτες γραφικής αναπαράστασης των επαφών που προσδιορίζουν τη διεπιφάνεια του συμπλόκου που έχει αναλυθεί. Ο πρώτος είναι ένας κλασικός διαμοριακός χάρτης επαφών, στον οποίο απεικονίζεται μία μαύρη κουκίδα για κάθε «διασταύρωση» των καταλοίπων i και j (με i και j τις υπομονάδες του συμπλόκου), η οποία βρίσκεται κάτω από το όριο απόστασης που έχει επιλέξει ο χρήστης (η προεπιλεγμένη τιμή είναι 8 Å). Ο δεύτερος χάρτης, ο οποίος ονομάζεται «χάρτης επαφών με βάση την απόσταση» (distance range contact map), αποτυπώνει με διαφορετικό χρωματικό κώδικα αλληλεπιδράσεις επαφών μεταξύ των καταλοίπων, καθώς αυξάνονται οι αποστάσεις τους (7, 10, 13 και 16Å). Ο τρίτος χάρτης επαφής, ο οποίος ονομάζεται «χάρτης ιδιοτήτων επαφής» (property contact map), είναι παρόμοιος με τον πρώτο, αλλά κάθε επαφή είναι χρωματισμένη σύμφωνα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των δύο αλληλεπιδρώντων καταλοίπων, δηλαδή υδρόφοβο-υδρόφοβο, υδρόφιλο-υδρόφιλο και υδρόφοβο-υδρόφιλο.
- Πίνακες με λεπτομερείς πληροφορίες, σχετικά με: (i) αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα που ορίζονται με βάση ένα όριο απόστασης (αυτό που έχει καθοριστεί από το χρήστη), (ii) κατάλοιπα της διεπιφάνειας, τα οποία καθορίζονται με βάση τη θαμμένη επιφάνεια κατά το σχηματισμό του συμπλόκου και (iii) ενδομοριακοί δεσμοί Η, με προσδιορισμό των ατόμων δέκτη και δότη.
- Μια τρισδιάστατη (3D) απεικόνιση του συμπλόκου στο Jmol, με επισημασμένα τα αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα.

2.5 <u>Δ' Μέρος : Μεταλλαξογένεση της Ca²⁺/CaM – Μελέτη της επίδρασης στη δομή του</u> μορίου

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της Ca^{2+}/CaM με τα πεπτίδια που συντέθηκαν του ανθρώπινου RyR2, σειρά είχε η μελέτη των μέχρι σήμερα καταγεγραμμένων μεταλλάξεων της CaM που σχετίζονται με σοβαρές καρδιακές αρρυθμίες και καρδιακή ανεπάρκεια (βλέπε κεφάλαιο 1.4.3) και τη μελέτη της δομικής μεταβολής λόγω των μεταλλάξεων ως προς τις περιοχές πρόσδεσης του υποδοχέα RyR2, των ιόντων ασβεστίου και τη μεταβολή στη θερμοσταθερότητα του συμπλόκου CaM/RyR2. Έχει βρεθεί από τη βιβλιογραφία πως αυτές οι μεταλλάξεις της CaM επηρεάζουν κυρίως το βαθμό συγγένειας με τον οποίο προσδένεται το Ca²⁺ στην πρωτεΐνη και όχι τόσο την αλληλεπίδραση της CaM με άλλα βιομόρια (βιοφυσικά πειράματα), παρόλα αυτά επιβεβαιωτικά δεδομένα δεν υπάρχουν και για τα τρία πιθανά σενάρια μεταβολών (Crotti et al., 2013; Nomikos et al., 2014; Makita et al., 2014; Søndergaard et al., 2015). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο πρότυπες δωμές της CaM: η 1CLL, που αποτελεί την ανοιχτή δομή της CaM (δέσμευση μόνο με Ca²⁺), για τη μελέτη πιθανών αλλαγών στις περιοχές δέσμευσης του Ca²⁺ (σενάριο 1°) και η δομή-πρότυπο που προέκυψε από το βήμα του clustering (κλειστή δομή – εμφάνιση κοιλότητας), για τη μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων στην αλληλεπίδραση της Ca²⁺ (σενάριο 2°). Για τη μελέτη της θερμοσταθερότητας χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο πρότυπες δομές για καλύτερη διεξαγωγή συμπερασμάτων (σενάριο 3°). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε σε αυτό το στάδιο, χωρίζεται σε δύο βήματα:

- I. Είσοδος των μεταλλάξεων της CaM που έχουν βρεθεί στη βιβλιογραφία μέσω του MOE, ενεργειακή ελαχιστοποίηση της κάθε δομής και σύγκριση της μεταλλαγμένης CaM με την αγρίου τύπου για τον εντοπισμό (μέσω RMSD) της μετακίνησης των περιοχών δέσμευσης Ca²⁺
- II. Χρήση του εργαλείου iStable, με σκοπό τον υπολογισμό της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔΔG, σε κάθε μετάλλαγμα της CaM και εξαγωγή συμπερασμάτων (βάσει σύγκρισης αποτελεσμάτων) από υπάρχοντα δεδομένα από πειράματα βιοφυσικών τεχνικών (φασματοσκοπία φθορισμού).



Εικόνα 40: Δομή της 1CLL, Ca²⁺/CaM. Πηγή: <u>https://www.rcsb.org/3d-view/1CLL/1</u>

2.5.1 <u>Μεταλλαξογένεση της Ca²⁺/CaM μέσω MOE</u>

Για το βήμα αυτό χρησιμοποίηθηκαν 2 δομές πρότυπο της Ca²⁺/CaM, η ισομορφή της καλμοδουλίνης Ca²⁺/CaM με κωδικό PDB: 1CLL, που έχει απομονωθεί από τον άνθρωπο με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (ατομική ανάλυση 1.7Å) και η κρυσταλλική δομή της Ca²⁺/CaM που προέκυψε από τα αποτελέσματα του clustering του προηγούμενου μέρους, έχοντας αφαιρέσει από αυτή το βιομόριο με το οποίο αλληλεπιδρά. Συνεπώς ως πρότυπα της CaM, έχουμε δύο στερεοδιατάξεις της: μία ανοιχτή δομή (πρόσδεση μόνο με Ca²⁺) και μία κλειστή στην οποία σχηματίζεται μία κεντρική κοιλότητα (αλληλεπίδραση με βιομόριο), για το σκοπό που αναλύθηκε και παραπάνω.

Πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις κάθε φορά και στα δύο μόρια της CaM, που περιελάμβαναν τα εξής σημεία:

Πίνακας 11: Μεταλλάξεις της CaM. Περιέχει πληροφορίες για την περιοχή της μετάλλαξης, το γονίδιο στο οποίο έχει εντοπιστεί με τον αντίστοιχο φαινότυπο που έχει βρεθεί.

Μετάλλαξη	Γονίδιο	Φαινότυπος	
110101000	1 0 0 000	Ασθενούς	
N54I	CALM1	CPVT	
F90L	CALM1	IVF	
D96H	CALM3	LQTS	
D96V	CALM2	LQTS	
N98I	CALM2	LQTS	
N98S	CALM1 & CALM2	CPVT	
A103V	CALM3	LQTS	
E105A	CALM1	LQTS	
D130G	CALM1 & CALM3	LQTS	
D132E	CALM2	CPVT, LQTS	
D132H	CALM2	LQTS	
D132V	CALM1	LQTS	
D134H	CALM2	LQTS	
Q136P	CALM2	CPVT, LQTS	
E141G	CALM1	LQTS	
E141K	CALM3	LQTS	
F142L	CALM1 & CALM3	LQTS	

Με έλεγχο κάθε φορά της σωστής αρίθμησης της αμινοξικής ακολουθίας και στις δύο πρωτεΐνες, με πρωτονίωση και των δύο δομών και με χρήση της λειτουργίας της πρωτεϊνικής μηχανικής (Protein Builder) του MOE, για κάθε μία μετάλλαξη ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία (επεξήγηση της διαδικασίας με χρήση της 1CLL):

Με χρήση της 1CLL, εντοπίζεται το κατάλοιπο N (Asn) στη θέση **51** (αλλαγή της αρίθμησης λόγω της μορφής αρίθμησης που υπάρχει στην PDB). Μέσω της επιλογής Protein Builder, και συγκεριμένα του Mutate (μετάλλαξη), επιλέγεται το κατάλοιπο I (Ile) για τη μετέλετη της σημειακής μετάλλαξης **N54I**. Η αλλαγή στην αμινοξική ακολουθία δείχνεται με το κόκκινο βέλος, ενώ το αμινοξικό κατάλοιπο που εντοπίζεται η μετάλλαξη στη δομή, με ροζ χρώμα.



Απαραίτητη διαδικασία στη συνέχεια είναι η εφαρμογή ενεργειακής ελαχιστοποίησης (energy minization), με σκοπό η στερεοδιάταξη που θα προκύψει (CaM_{MT} -mutant), να ανταποκρίνεται στην πιο σταθερή δομή της, μιας και οι μέθοδοι πειραματικού προσδιοριμού (NMR, κρυσταλλογραφία ακτίνων-X), μπορεί να περιέχουν λάθη.

Για το σκοπό αυτό για την εφαρμογή του ενεργειακού ελαχίστου στην CaM_{MT}, χρησιμοποιήθηκε το ενεργειακό πακέτο Amber 10: EHT (Case et al. 2008), μεταξύ των πολλών πεδίων που διαθέτει το MOE όπως αναλύθηκε και παραπάνω, καθώς κρίθηκε καταλληλότερο για τον τύπο δομής της CaM (εφαρμόζεται κυριώς σε πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα μικρού μεγέθους).

🗾 Energy N	tinimize — 🗆 🗙	📝 Potential Setup - Amber10:EHT 🛛 — 🗆 🗙			
General	Input Data: All Atoms ? Selected Entries Only Calculate Partial Charges Preserve Existing Chirality	Forcefield Parameters Restraints Wall Load Amber10:EHT c:/moe2015/lib/amber10eht.ff			
	Source: Output:	AMBER parameters for proteins and nucleic acids (ff10).			
Domain	Restraints: Mode Deviation Distance Atoms Tether v 0.5 v 2 Interface Tether v 0.5 v 2	Group II ion and Group VIII parameters from OPLS-AA.			
	Other Atoms in System are Inert ? Forcefield: O Amber10:EHT; R-Field 1:80; Cutoff [8,10]	Enable: ✓ Bonded ✓ van der Waals ✓ Electrostatics ✓ Restraints			
MOPAC	Cell: O No Periodicity Charges: O H Atoms Require Adjustment Cenetrative Fixed OI Back Learth	Cutoff: ✓ Enable Solvation: R-Field ▼ Scale Like: 1 On: 8 Dielectric: 1 Unlike: 0 Off 10 Exterior S0 Wild: 1			
QM	Vigid Water Molecules Planar Systems Are Rigid Bodies Conduct to a larger View Rigid Bodies	Threads: ● ▼ This computer has 4 CPUs.			
	Optimally Orient OH Groups OK Cancel	Fix Hydrogens Hydrogens/LonePairs require adjustment.			
		Hydrogens and/or partial charges require adjustment.			

Ενεργειακή ελαχιστοποίηση, είναι η τεχνική του υπολογισμού της ελάχιστης δυναμικής ενέργειας ενός μορίου ή ενός συμπλόκου σα συνάρτηση των μεταβλητών του συστήματος (δηλαδή δίεδρες γωνίες, αποστάσεις κ.ά.), η οποία υπολογίζει τα ενεργειακά ελάχιστα. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που υπολογίζουν την ελαχιστοποίηση της ενέργειας, από τις οποίες μεγάλη ακρίβεια εμφανίζουν αυτές που χρησιμοποιούν δεύτερες

παραγώγους αυτής της συνάρτησης και λιγότερο αυτές που χρησιμοποιούν πρώτες παραγώγους. Η ενεργειακή ελαχιστοποίηση, με εξαίρετη την υπό μελέτη δομή, αποτελεί τη βασικότερη παράμετρο κατά την πραγματοποίηση μοριακής δυναμικής και μοριακής μηχανικής. Η μοριακή μηχανική, υπολογίζει την ενέργεια του βιομορίου κοντά στην κατάσταση ισορροπίας, δίνοντας λεπτομερή μοντέλα στερεοδιατάξεων, ενώ η μοριακή δυναμική μελετά τις δυνάμεις που εφαρμόζονται στο μοντέλο συναρτήσει του χρόνου (σταθερότητα δομής στο χρόνο). Η συνάρτηση ενέργειας που χρησιμοποιείται μαζί με ένα σύνολο εμπειρικών παραμέτρων είναι γνωστή ως πεδίο δύναμης. Έτσι λοιπόν και το Amber, αποτελεί ένα από τα πιο ισχυρά πεδία δυνάμεων που χρησιμοποιούνται στις σύγχρονες μελέτες μοριακών προσομοιώσεων.

Στις μέρες μας τα ενεργειακά πακέτα προσομοιώσεων Amber (Assisted Model Building with Energy Refinement) αυξάνονται και γίνονται πιο εξειδικευμένα (πακέτα των πεδίων Amber: <u>http://ambermd.org/</u>), με συνεχείς αλλαγές στις παραμέτρους του κάθε πακέτου, δυσκολεύοντας έτσι τον κάθε ερευνητή να επιλέξει το σωστό πακέτο βάσει του τύπο των μορίων που μελετά. Στην ουσία όμως, οι διαφορές αυτές από πακέτο σε πακέτο είναι μικρές. Ο όρος πεδίο δύναμης Amber, γενικά αναφέρεται στη λειτουργική μορφή που χρησιμοποιείται από την οικογένεια των πεδίων δύναμης του Amber, η οποία περιλαμβάνει διάφορες παραμέτρους. Κάθε μέλος της οικογένειας των πεδίων δυνάμεων Amber, παρέχει τιμές για αυτές τις παραμέτρους και έχει το δικό του όνομα. Αναλυτική περιγραφή για τις παραμέτρους και τη βελτιστοποίηση αυτών, του πεδίου δυνάμεων του Amber εξηγείται από τους Hornak et al. 2006.

Επόμενο βήμα ανάλυσης υπήρξε η συλλογή όλων των δομών των μεταλλαγμάτων της CaM και η σύγκρισή τους με την αγρίου τύπου CaM (και για τις δύο πρότυπες δομές), μέσω υπέρθεσης δομών, με σκοπό την εξαγωγή ενός RMSD διαγράμματος για την ανάλυση της μετακίνησης των περιοχών πρόσδεσης Ca²⁺ στην CaM, με χρήση του **MOE**.

2.5.2 Μελέτη μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας (ΔΔG)

Η μετάλλαξη ενός και μόνο αμινοξικού καταλοίπου μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δομή μιας πρωτεΐνης, η οποία μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει σε απώλεια πρωτεϊνικής λειτουργίας, μιας και η δομή μιας πρωτεΐνης σχετίζεται άμεσα με τη βιολογική της λειτουργία. Πέραν της δομικής αλλαγής, μεταβάλλει τη δομική σταθερότητα μιας πρωτεΐνης μειώνοντας την ελεύθερη ενέργεια (ΔG) μετά την αναδίπλωση, καθώς η πρωτεΐνη στη φυσική της διπλωμένη κατάσταση έχει τη μικρότερη δυνατή ελεύθερη ενέργεια, ενώ η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας κατά την αναδίπλωση μεταξύ άγριου τύπου και μεταλλαγμένης πρωτεΐνης (ΔΔG) συχνά θεωρείται ως δείκτης των μεταβολών πρωτεϊνικής σταθερότητας.

Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs, ΔG ορίζεται ως εξής:

$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$

όπου ΔG η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος της πρωτεΐνης, η οποία σε καταστάσεις ισορροπίας τείνει στο ελάχιστο, ΔΗ η ενθαλπία των εσωτερικών αλληλεπιδράσεων, ΔS η εντροπία, η οποία κατά την αναδίπλωση της πρωτεΐνης πρέπει να αυξάνεται και αυτό το πετυχαίνει με το σχηματισμό ενός υδρόφοβου πυρήνα, ενώ Τ είναι η απόλυτη θερμοκρασία. Επίσης η διαφορά ενέργειας μεταξύ διπλωμένης και μη-διπλωμένης πρωτεΐνης, δίνεται από τη σχέση:

$\Delta G = G_N - G_U = -RTlnK$

όπου, G_N η ελεύθερη ενέργεια της διπλωμένης πρωτεΐνης (native) και G_U αυτή της αποδιπλωμένης (unfolded) ενώ, R η παγκόσμια σταθερά αερίων, T η απόλυτη θερμοκρασία και k η σταθερά του Boltzmann. Μέσω της πληροφορίας της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα της ΔΔG των μεταλλαγμάτων της CaM που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία, δίνεται η δυνατότητα για την εξερεύνηση ενός νέου πιθανού μηχανισμού ενεργοποίησης των ασθενειών που έχουν καταγραφεί μέχρι και σήμερα σε νεαρά άτομα.

Για την εκτίμηση των ΔΔG (ΔΔG=ΔG_{WT}-ΔG_{MT}) χρησιμοποιήθηκε o server **iStable** (<u>http://predictor.nchu.edu.tw/istable/about.php</u>), ένα εργαλειο το οποίο χρησιμοποιεί Μηχανή Διανυσμάτων Υποστήριξης (στο εξής, support vector machine-**SVM**) (Steinwart & Christmann, 2008) για την πρόβλεψη μεταβολών της σταθερότητας των πρωτεϊνών μετά από σημειακές μεταλλάξεις αμινοξικών καταλοίπων (C.-W. Chen, Lin, & Chu, 2013). O server αυτός ενσωματώνει και άλλα προγνωστικά εργαλεία μελέτης της

πρωτεϊνικής σταθερότητας με σκοπό να χρησιμοποιήσει την ισχύ των μετα-προβλέψεων για καλύτερη απόδοση, από την κάθε μία μέθοδο ξεχωριστά.

Ο χρήστης μπορεί να εισάγει είτε ένα αρχείο της υπό μελέτης δομής (μορφή PDB), είτε την αμινοξική ακολουθία μόνο, καθώς πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η πληροφορία της ακολουθίας αρκεί για την αποτελεσματική πρόβλεψη των επιδράσεων της μετάλλαξης (Capriotti, Fariselli, & Casadio, 2004; Capriotti, Fariselli, & Casadio, 2005). Στη συνέχεια χρησιμοποιεί **5** διαφορετικά προγνωστικά εργαλεία (υπάρχουν ως μεμονωμένοι servers) για να εξάγει αποτελέσμα, τα οποία είναι:

- I-Mutant2.0: υιοθετεί ένα μοντέλο <u>SVM</u> για να προσεγγίσει τη τιμή ΔΔG της πρωτεΐνης και προβλέπει την κατεύθυνση της μεταβολής της σταθερότητας (σταθερή ή μη σταθερή πρωτεΐνη). Για την κατασκευή του iStable χρησιμοποιήθηκαν οι πληροφορίες και της αλληλουχίας (I-Mutant_SEQ) και της δομής (I-Mutant_PDB).
- AUTO-MUTE: υπολογίζει τη διαταραχή στο περιβάλλον που προκαλείται από μία μόνο μετάλλαξη αμινοξέος. Από τα τέσσερα μοντέλα πρόγνωσης που είναι διαθέσιμα στο AUTO-MUTE, επιλέχθηκε αυτό του <u>Random Forest</u> (RF) (AUTO-MUTE_RF) και του <u>SVM</u> (AUTO-MUTE_SVM) για την κατασκευή του μοντέλου του iStable.
- 3. MUPRO: υιοθετεί ένα μοντέλο <u>SVM</u> για την πρόβλεψη μεταβολών σταθερότητας εξαιτίας των σημειακών μεταλλάξεων, κυρίως από πληροφορίες ακολουθίας, μαζί με τη χρήση προαιρετικών δομικών πληροφοριών που έχουν δοθεί. Το αποτέλεσμα προβλέπει μόνο εάν η αλλαγή θα οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση ή όχι, χωρίς την παροχή μιας πραγματικής τιμής ΔΔG. Συγκεκριμένα, χρησιμοποίεται το μοντέλο SVM (MUPRO_SVM) ως πρόβλεψη στοιχείων.
- 4. PoPMuSiC2.0: εφαρμόζει μία συνάρτηση που βασίζεται στην ενέργεια και χρησιμοποιεί την αλλαγή του όγκου μιας πρωτεΐνης κατά τη μετάλλαξη ενός μόνο αμινοξέος, για να προβλέψει τη μεταβολή της σταθερότητας.
- 5. CUPSAT: προβλέπει αλλαγές στη σταθερότητα των πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας ατομικά δυναμικά και δυναμικά γωνίας στρέψης. Με την χρήση ενός αρχείου PDB στον server πραγματοποιείται η πρόγνωση με αυτό το εργαλείο.



Εικόνα 41: Τρόπος λειτουργίας του iStable. Αφού ο χρήστης εισάγει την υπό μελέτη δομή (είτε με τη χρήση της αμινοξικής ακολουθίας), ορίσει τη θερμοκρασία και το pH που επιθυμεί να πραγματοποιηθεί η ανάλυση και επιλέξει τη θέση που πραγματοποιείται η μετάλλαξη καθώς και το αμινοξύ που αντικαθιστά, ένα κυλιόμενο παράθυρο των 11

αμινοξικών καταλοίπων «διαβάζει» συνεχώς την αμινοξική ακολουθία με το μεταλλαγμένο κατάλοιπο. Στη συνέχεια εφαρμόζονται τα 5 προγνωστικά στοιχεία και μέσω ενός SVM μοντέλου που διαθέτει το εργαλείο αυτό, πραγματοποιείται η τελική πρόγνωση (C.-W. Chen, Lin, & Chu, 2013).

Όπως και στην μελέτη της μεταλλαξογένεσης του προηγούμενου βήματος, έτσι και εδώ χρησιμοποιήθηκαν οι δομές 1CLL και η κρυσταλλική δομή της Ca²⁺/CaM που προέκυψε από τα αποτελέσματα του clustering. Συγκεκριμένα για τη μετάλλαξη N54I πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

PDB ID	Chain	Wild-type	Position*	Mutant	(°C, 0-100)	рН (0-14)
1CLL	A	Ν	53(53)	I (ILE) ▼	25	7.4
Protein sequ	ence(no h	eaders)				
ADQLTEEQIAEF FPEFLTMMARKM DIDGDGQVNYEE	>CHAIN KEAFSLFDKI IKDTDSEEEIF FVQMMTAK	I:A)GDGTITTKELGTVMR XEAFRVFDKDGNGYIS	SLGQNPTEAELQD/ AAELRHVMTNLGEI	MINEVDADGNGTID KLTDEEVDEMIREA	Reset Options Submit	8

Τοποθετείται ο κωδικός της PDB, ορίζεται η αλυσίδα του μορίου που εξετάζεται, η μετάλλαξη που πραγματοποιείται (θέση και κατάλοιπο), η θερμοκρασία στους 25°C και το pH στο 7.4. Στη συνέχεια πραγματοποείται η πρόγνωση. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για όλες τις μεταλλάξεις και στην άλλη δομή της Ca²⁺/CaM. Τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν για την εξαγωγή ορθού συμπεράσματος βάσει συγκρίσεων με αποτελέσματα μεταλλαγμάτων της CaM που έχουν προσδιοριστεί με μεθόδους προσδιορισμόυ φασματοσκοπίας φθορισμού.

III. Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1 <u>Αναλυση συνόλων δεδομένων</u>

Το πρώτο μέρος της πειραματικής πορείας της παρούσας εργασίας αφορούσε την ανάλυση των δεδομένων που συγκεντρώθηκαν τόσο σε επίπεδο ακολουθίας όσο και σε επίπεδο δομής. Έτσι λοιπόν χωρίστηκε σε δύο μέρη, στην πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών της CaM, που συγκεντρώθηκαν από όσο το δυνατόν περισσότερους οργανισμούς από τους οποίους έχει απομονωθεί η υπό μελέτη πρωτεΐνη και στη δομική στοίχιση (υπέρθεση δομών) της κλειστής στερεοδιάταξης της CaM (δεσμευμένη με πρωτεΐνη ή πεπτίδιο), των προσδιορισμένων πειραματικά δομών που συλλέχθηκαν. Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα από τις παραπάνω αναλύσεις.

3.1.1 Πολλαπλή στοίχιση αμινοξικής ακολουθίας

Από τη βάση δεδομένων UniProt, όπως αναλύθηκε και σε προήγουμενο κεφάλαιο, συλλέχθηκαν αμινοξικές ακολουθίες μόνο της CaM, από **89** διαφορετικούς οργανισμούς, με σκοπό να πραγματοποιηθεί πολλαπλή στοίχιση μέσω του T-coffee και να παρατηρηθεί κατά πόσο είναι ή όχι συντηρημένη σε επίπεδο ακολουθίας η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μέσω ενός αρχείου, στη συνέχεια επεξεργάστηκαν και οπτικοποιήθηκαν μέσω του JalView. Το αποτέλεσμα της πολλαπλής στοίχισης επεξεργάστηκε χειροκίνητα, με σκοπό την εισαγωγή κενών όπου χρειαζόταν ή τη διαγραφή καταλοίπων τα οποία δεν ήταν μέρος της στοίχισης. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μορφή του χρωματικού κώδικα του Clustal X για ολόκληρη τη στοίχιση, σύμφωνα με τον οποίο:

- Μπλε: Υδρόφοβα κατάλοιπα (A, I, L, M, F, W, V, C)
- Κόκκινα: Θετικά κατάλοιπα (K, R)
- Ματζέντα: Αρνητικά κατάλοιπα (E, D)
- Πράσινο: Πολικά κατάλοιπα (N, Q, S, T)
- Ροζ: Κυστεΐνη (C)
- Πορτοκαλί: Γλυκίνη (G)
- Κίτρινο: Προλίνη (P)
- Γαλάζιο: Αρωματικά κατάλοιπα (Η, Υ)
- Λευκό: Μη συντηρημένα κατάλοιπα (και τα κενά)

Μαζί με το χρωματικό κώδικα του Clustal X, επιλέχθηκε και η δυνατότητα οπτικοποίησης βάσει συντήρησης, με σκοπό την καλύτερη οπτική παρατήρηση, των στοιχισμένων καταλοίπων. Το κατώφλι της επεξεργάσιας της συντήρησης μέσω του Clustal, επιλέχθηκε για ομοιότητα ακολουθίας 30%.

Τα αποτελέσματα της στοίχισης αρχικά φαίνονται ομαδοποιημένα παρακάτω:

spi0600411CALM_KLULA/1-144MSONL TEED I AEFKEAFALFDKDNSGS I SASELATVMRSLGLSPSEAEVADLMNE I DVDGNHAI EFSEFLALMSROLKCNDSEDELLEAFKVFDKNGDGL I SAAELKHVLTS I GEKLAFAEVDEMLREVSDGSGE I NIKOFAALLSK spi0667871CALM_YEAS771-147MSSNL TEED I AEFKEAFALFDKDDNGS I SSELATVMRSLGLSPSEAEVNDLMNE I DVDGNHÖ I EFSEFL	
spip0DP23 (CALM1_HUMAN1-14{MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELODMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK	
spip0DH95jCALM1_ARATH/1-145MADQLTDEQ ISEFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMAKKMKDTDSEEELKEAFRVFDKDQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVEEMIREADVDGDGQINYEEFVKIMMAK	
spip0DP26(CALM1_MOUSE/1-14:MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK	
spip0DP29(CALM1_RA77/-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELODMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK	
splQ0JNS6 CALM1_ORYSJ/1-14{MADQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKMKDTDSEEELKEAFRVFDKDQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKVMMAK	
splQ77372/CALM_EPIAK/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELODMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARK/MKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQIMTAK	
spip69998 CALM_TRYBG/1-149MADQLSNEQ ISEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDQDGSGTIDFPEFLTLMARKMQDSDSEEEIKEAFRVFDKDGNGFISAAELRHIMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKMMMSK	
spip62199 CALM1_PETHY/1-149 MADQLTDDQ ISEFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSLGONPTEAELCDMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARK/MKDTDSEEELKEAFRVFDKDQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQ INVEEFVKVMMAK	
spip84339 CALM_AGABU1-149MADQLSEEQ ISEFKEAFSLFDKDGDGT ITTKELGTVMRSLGONPSQAELEDM INEVDADGNGT IDFPEFLTMMARKMRDTDSEEE IKEAFKVFDKDGNGY ISAAELRHVMTNLGEKLTDSEVDEM I READVDGDGQ INVEEFVKMMLSK	
splQ9HFY6 CALM_BLAEM/1-149 MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELLVMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARK/MKDSDSEEEIKEAFKVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLSEDEVEEMIREADVDGDGQINYEEFVKMMMSK	
spip23286[CALM_CANAX1-149MAEKLSEQQIAEFKEAFSLFDKDSDGKITTKELGTVMRSLGQNPSESELTDMINEVDVNSDGSIDFPEFLTMMARK/MKDTDSEAEIAEAFKVFDRNGDGKISAAELRHLLTSIGEKLSDADVDQMIKEADTNNDGEIDIQEFTSLLAAK	
spl002367 CALM_C/0/N/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQVNYEEFVNMMTNK	
splQ6/778/CALM_CTE/D/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARK/MKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK	
spip02594[CALM_ELEEL/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMAKKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK	
spiQ6P/52 CALM_DANRE/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARK/MKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK	
spiQ7Y052 CALM_EUPCH/1-149MADQLTDDQ ISEFKEAFSLFDKDGDGC ITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDM INEVDADGNGT IDFPEFLNLMARKMKDTDSEEELKEAFRVFDKDQNGF ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEM IREADVDGDGQ INYEEFVKVMMAK	
spla8/1/20/CALM_HETTR/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDSDGNGTIDFPEFLSLMARK/MKDTDTEEELIEAFKVFDRDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKMMMAK	
spip24044[CALM_PLAFA/1-149MADKLTEEQ ISEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEIDTDGNGTIDFPEFLTLMARKLKDTDTEEELIEAFRVFDRDGDGVISADELRHVMTNLGEKLTNEEVDEMIREADIDGDGQINYEEFVKMMIAK	
spla8cep3 (calm_SACJA/1-149MADQLTEEQ I AEFKEAFSLFDKDGDGT I TTKELGTVMRSLGONPTEAELADM I NEVDADGNGT I DFPEFLTMMARKMKDTDSEEE I LEAFKVFDKDGNGF I SAAELRH I MTNLGEKLTDEEVDEM I READ I DGDGQ I NYEEFVKMMMSK	
spip21251 CALM_STIJA/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVTMMTSK	
spip62151 CALM_TETCF/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK	
spip18861 CALM_TRYCR/1-149MADQLSNEQ ISEFKEAFSLFDKDGDGT ITTKELGTVMRSLGONPTEAELQDMINEVDQDGSGT IDFPEFLTLMARKMQDSDSEEE IKEAFRVFDKDGNGF ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQ INYEEFVKMMMSK	
spigey NX6 CALM_SHEEP/1-149 MADQLTEED AEFKEAFSLFDKDGDGT TTKELGTVMRSLGONPTEAELODM NEVDADGNGT DFPEFLTMMARKMKDTDSEEE REAFRVFDKDGNGY SAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEM READ DGDGQVNYEEFVQMMTAK	
spip62153 CALMA_HALRO/1-149MADOLTEEDIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELODMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGOVNYEEFVTMMTSK	
spla3e4D8]CALM_PROMN/1-149MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLSLMARKMKDTDTEEELIEAFKVFDRDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKMMMAK	
splp62163jCALM2_SOYBN/1-149MADOLTDDOIAEFKEAFSLFDKDGDGCITTKELGTVMRSLGONPTEAELODMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKMKDTDSEEELKEAFRVFDKDONGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGDGOINYEEFVKVMMAK	
spip15094[CALM_ACHKL/1-149MADOLTEEDIAEFKEAGSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSVGONPTEAELDDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEILEAFGGFDKDGNGFISAAELRHMMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGOINYEEFVKMMMSK	
sp/p80206(CALM_AJECG/1-149MADSLTEEQVSEYKEAFSLFDKOGDGOLTTKELGTVMRSLGONPSESELODMINEVDADNIGTIOFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFISAAELRHVMTSIGEKLTDDEVDEMIREADODGDGRIDYNEFVOLMMOK	
sp/p60205[CALM_ASPOR1-149MADSLTEEDVSEYKEAFSLFDROGDGGTTTKELGTVMRSLGONPSESELDDMINEVDADNIGTTOFPELTMMARKMINDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFTSAELRHVMTSTGENLTDDEVDEMIREAD0DGDGGTTYKELGTVMRSLGONPSESELDDMINEVDADNIGTTOFPELTMMARKMINDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFTSAELRHVMTSTGENLTDDEVDEMIREAD0DGDGGTTYKELGTVMRSLGONPSESEL0DMINEVDADNIGTTOFPELTMMARKMINDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFTSAELRHVMTSTGENLTDDEVDEMIREAD0DGDGGTTYKELGTVMRSLGONPSESEL0DMINEVDADNIGTTOFPELTMMARKMINDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFTSAELRHVMTSTGENLTDDEVDEMIREAD0DGDGGTTYKELGTVMRSLGONPSESEL0DMINEVDADNIGTTOFPELTMMARKMINDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFTSAELRHVMTSTGENLTDDEVDEMIREAD0DGDGGTTYKELGTVMRSLGONPSESEL0DMINEVDADNIGTTOFPELTMMARKMINDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFTSAELRHVMTSTGENLTDDEVDEMIREAD0DGDGGTTYKELGTVMRSLGONPSESEL0DMINEVDADNIGTTOFPELTMMARKMINDTDSEEEIREAFKVFDRDNNGFTSAELRHVMTSTGENLTDDEVDEMIREAD0DGDGGTTOFNEUR	
sp[016305]CALM_CAEEU1-149MADGLIEEGIAEFKEAFSLFDROGDGTTTTRELGTVMRSLGONPTEAELODMINEVDADGNGTTDFPEFLTMMARKMRDIDSEEEIREAFRVFDRDGNGFTSAELRHVMINEGENLTDEEVDEMIREADIDGDGGVNWEEFVTMMITK	
spleabling Calm Coll R1-149 MADSLIEED VSER EAFSLIP ROBORD GOOD THEED THE COMPSESSED DMINE VOLMMOR	
spleozo4(calm_emervid-rate = marked object = m	
SPIP 1988 CALM SOUTH / 149	
spig5rad21calm_ponab/1-149Madol TEEQ IAEFKEAFSLFDKDGDGT I TTKELGTVMRSLGONPTEAELODM I NEVDADGNGT I DFPEFL TMMARKMKD TDSEEE I REAFRVFDKDGNGY I SAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEM I READ I DGDGQVNYEEFVQMMTAK	



Εικόνα 42: Αποτέλεσματα πολλαπλής στοίχισης μέσω οπτικοποίησης με JalView. Εμφάνιση παραλλαγών του χρωματικού κώδικου του Clustal, καθώς έχει συμπεριληφθεί η επιλογή απεικόνισης βάσει συντήρησης των αμινοξικών καταλοίπων σε ολόκληρη τη στοίχιση με αποτελέσμα, κατάλοιπα λιγότερο συντηρημένα να εμφανίζονται με πιο ανοιχτά χρώματα συγκριτικά με τα περισσότερο συντηρημένα και κατάλοιπα με καθόλου συντήρηση να εμφανίζονται με λευκό χρώμα. Αυτό μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί και από το μοντέλο συντήρησης (μοντέλο ΗΜΜ) που δίνεται τελικώς από το JalView στο οποίο δίνεται χρωματική απόδοση του κάθε αμινοξέος στην ακολουθία με βάση την πιθανότητα εμφάνισης. Δηλαδή κατάλοιπα με μεγάλο ποσοστό εμφάνισης θα έχουν μεγαλύτερο λογότυπο και πιο έντονο χρώμα. Κάθε λογότυπο – κωδικός ενός γράμματος καταλοίπων αντιστοιχεί και σε ένα ποσοστό συχνότητας εμφάνισης. Η αρίθμηση των καταλοίπων εμφανίζεται σε δεκάδες.

Βάσει των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται πως το μόριο της CaM, εμφανίζει υψηλή συντήρηση ανάμεσα στους οργανισμούς (μεγάλο ποσοστό ομοιότητας), ενώ το μήκος της αμινοξικής ακολουθίας της κυμαίνεται από 147-150 αμινοξικά κατάλοιπα περίπου, με μέσο όρο τα 149. Αυτό το μεγάλο ποσοστό ομοιότητας, μαρτυρά την κοινή τους εξελικτική πορεία (ελάχιστες διαφορές στο πέρας της εξέλιξης), γεγονός που έπειτα οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει κοινό δίπλωμα στη φυσική της κατάσταση μεταξύ των διάφορων οργανισμών και επομένως κοινή βιολογική λειτουργία. Την υψηλή συντήρηση σε επίπεδο ακολουθίας έρχονται να επιβεβαιώσουν και τα διατηρημένα δομικά μοτίβα της CaM που απομονώθηκαν με σκοπό την εύρεση της δομής-πρότυπο Ca²⁺/CaM στο επόμενο βήμα.

3.1.2 <u>Υπέρθεση δομών</u>

Από το σύνολο των **109** δομών που συγκεντρώθηκαν από τη βάση PDB, θέτοντας τα κριτήρια που αναλύθηκαν και παραπάνω :

- Μη μεταλλαγμένες δομές της CaM
- Απαραίτητη η δέσμευση Ca²⁺ στο μόριο της CaM
- Όχι τμήματα της CaM (καρβοξυ- ή αμινοτελική περιοχή μόνο)
- Δομές της CaM με αλληλεπίδραση με πρωτεΐνη, πεπτίδια, βιομόρια που έχουν CBD domain
- Προτίμηση στην κλειστή δομή κυρίως της CaM όταν αλληλεπιδρά με άλλο βιομόριο (εμφάνιση κεντρικής κοιλότητας), καθώς έχει βρεθεί πως αυτή η στερεοδιάταξη της προσδίδει και τη βιολογική λειτουργία της

Έτσι λοιπόν, εξετάζοντας το σύνολο δεδομένων για κάθε μία από τις δομές μέσω του Chimera και πραγματοποιώντας δομική στοίχιση, προέκυψε το παρακάτω μοντέλο με σύνολο 61 δομές και συγκεκριμένα τις:

Πίνακας 12: Δομές της Ca²⁺/CaM για την κατασκευή του μοντέλου. Περιέχει πληροφορίες για τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του γενικού μοντέλου της Ca²⁺/CaM με τον κωδικό της PDB (4 ψηφία) και την αντίστοιχη αλυσίδα που απομονώθηκε (η αλυσίδα αντιστοιχεί μόνο στο μόριο της Ca²⁺/CaM, καθώς οποιοδήποτε άλλο βιομόριο αλληλεπιδρούσε αφαιρέθηκε).

Κωδικός PDB	Αλυσίδα CaM	Κωδικός PDB	Αλυσίδα CaM	Κωδικός PDB	Αλυσίδα CaM
1QIW	А	2FOT	А	3HR4	D
1XA5	А	2HQW	А	3OXQ	А
1CTR	А	2JZI	А	3SUI	А
1A29	А	2L7L	А	4DBP	С
1QIV	А	2M0J	А	4DJC	А
1CDM	А	2MES	А	4JPZ	С
1MXE	А	205G	А	4JQ0	С
1LIN	А	3BYA	А	4M1L	А
2060	А	3DVE	А	4Q5U	А
2VAY	А	3BXK	С	4DPQ	В
2WEL	D	3BXL	А	4ANJ	В
2W73	В	3DVJ	А	4ZLK	В
2YGG	В	3DVK	А	4AQR	А
2BKH	В	3DVM	А	4EHQ	А
2BKI	В	3GN4	В	4UPU	А
2L1W	А	3L9I	С	5J7J	А
2LGF	А	3IF7	А	5JQA	А
2BCX	А	3EWT	А	5WSV	С
2BE6	С	3EWV	А	5K8Q	А
2F3Y	А	3GOF	А		
2F3Z	А	3GP2	А		

Ενώ το μοντέλο που προέκυψε ήταν το εξής:



Εικόνα 43: Μοντέλο Ca²⁺/CaM, με συστοιχισμένες 61 δομές μέσω του Chimera. Από την κάθε δομή της CaM έχει αφαιρεθεί το βιομόριο με το οποίο αλληλεπιδρά, καθώς το μόριο ενδιαφέροντος αφορά μόνο την CaM. Παρουσιάζεται το τελικό μοντέλο, όπου η κάθε δομή αποδίδεται και με διαφορετικό χρώμα, μέσα από πέντε διαφορετικές οπτικές πλευρές, με εμφάση στην κεντρική κοιλότητα που δημιουργείται και διατηρείται ακόμα και μετά από την προσθήκη μεγάλου συνόλου δομών.

Πέραν του αλληλεπιδρώντος βιομορίου που υπήρχε στην αρχική πειραματική δομή της Ca²⁺/CaM, αφαιρέθηκαν τα μόρια νερού καθώς και οποιοσδήποτε υποκαταστάτης παρέμενε προσδεδεμένος στο μόριο από την πειραματική πορεία για τη λύση της δομής του συμπλόκου. Παρατηρείται πως το μεγαλύτερο πλήθος δομών υϊοθετούν μία κλειστή στερεοδιάταξη με μία κεντρική κοιλότητα στην οποία προσδένεται το βιομόριο με το οποίο αλληλεπιδρά η CaM. Με σκοπό να υπάρξει και ένας έλεγχος του αποτελέσματος του clustering στο επόμενο βήμα, διατηρήθηκαν στην υπέρθεση και κάποιες δομές με πιο ανοιχτή διαμόρφωση όπως φαίνεται και παραπάνω (ξεδιπλωμένη αμινοτελική περιοχή της CaM).

3.2 Δομές αλληλεπιδρώντων μορίων

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της μεθοδολογίας που έλαβε χώρα για τη διεξαγωγή δομών της Ca²⁺/CaM καθώς και των πεπτίδιων του ανθρώπινου RyR2, B και F, των οποίων η αλληλεπίδραση θα μελετηθεί σε επόμενο στάδιο.

3.2.1 <u>Δομή της Ca²⁺/CaM</u>

Σκοπός της δημιουργίας του παραπάνω συνόλου δομών, πέραν της αποδείξεως της υιοθέτησης ενός συγκεκριμένου μοτίβου αναδίπλωσης της CaM όταν αλληλεπιδρά με κάποιο βιομόριο, υπήρξε η εύρεση μιας «μέσης» δομής Ca²⁺/CaM, μιας δομής πρότυπο που θα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αλληλεπίδρασής της με τα πεπτίδια του RyR2. Για το λόγο αυτό χρησιμοποίηθηκε μέθοδος clustering βάσει των αποστάσεων RMSD (παράρτημα VI) που προέκυψαν από την υπέρθεση των 61 δομών. Η μεθοδολογία του clustering χωρίζεται σε τρία μέρη:

- Μέθοδος PCA, για γραφική αναπαράσταση της κατανομής των αποτελεσμάτων
- K-means και δοκιμή αριθμού ομάδων κάθε φορά, μαζί με την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων (παράρτημα VI)
- Στατιστική επαλήθευση μέσω ειδικών συναρτήσεων για τον τελικό αριθμό clusters

Τα αποτελέσματα κάθε μεθοδολόγιας (κώδικας στη γλώσα R, παράρτημα VI), εμφανίζονται κυριώς χρησιμοποιώντας τα γραφικά πακέτα του R_{studio} και αφορούν:



Εικόνα 44: Κατανομή του συνόλου δεδομένων σε κοινές ομάδες βάσει της κοινής διακύμανσής τους. Το σύνολο δεδομένων με τα αποτελέσματα του RMSD αποτελείται από 61 × 61 διαστασείς, συνεπώς για καλύτερη οπτικοποίηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων κρίθηκε απαραίτητη η μείωση των διαστάσεών του, με εφαρμογή PCA.



Εικόνα 45: Κατανομή του συνόλου δεδομένων σε διαστάσεις PC1 × PC2. Το κάθε νούμερο αντιπροσωπεύει και μία δομή, με χρωματικό κώδικα ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκει βάσει της κοινής διακύμανσής τους. Όπως επιβεβαιώνει και το παραπάνω διάγραμμα, υπάρχει μία μεγάλη ομάδα (κίτρινο χρώμα), ενώ σε πολύ κοντινή απόσταση διακρίνεται μία ακόμα με μικρότερο σύνολο (ανοιχτό καφέ) και σε μεγαλύτερη απόσταση δύο μικρές ομάδες (μπλέ και γκρι χρώμα).

Ακολουθεί η ανάλυση clustering για k=2 ομάδες με δύο διαφορετικές αναπαραστάσεις:



Εικόνα 46: Κατανομή των δεδομένων σε 2 clusters. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται το cluster₁, το οποίο έχει ως κεντρομερές έναν μεγάλο κύκλο, όπου γύρω του κατανέμονται τα δείγματα το καθένα με χαρακτηριστική απόσταση. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται το cluster₂, το οποίο ως κεντρομερές έχει ένα τρίγωνο, όπου και εδώ τα δείγματα κατανέμονται σε χαρακτηριστικές αποστάσεις. Το cluster₂ όπως παρατηρείται αποτελείται από μικρό αριθμό δειγμάτων συγκριτικά με το πρώτο.

Εναλλακτικά:



Εικόνα 47: Κατανομή των δεδομένων σε 2 clusters. Με αυτόν το τρόπο της γραφικής αναπαράστασης, διαγράφονται καλύτερα τα κέντρα των clusters (● cluster₁ και ▲ cluster₂), τα νούμερα του κάθε δείγματος και σε ποια ομάδα κατανέμονται, ενώ με ευθείες γραμμές φαίνονται ευδιάκριτα οι αποστάσεις του κάθε δείγματος από το κέντρο του cluster.

Ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα των ελέγχων για όλες τις πιθανές ομάδες που μπορεί να υπάρχουν (δηλαδή για k=3, k=4, k=5 και k=6), λαμβάνονται τα εξής διαγραμμάτα:



Εικόνα 48: Ομαδοποίηση αποτελεσμάτων για έλεγχο clusters με k=3, k=4, k=5 και k=6. • cluster₁, ▲ cluster₂, ■ cluster₃, + cluster₄, × cluster₅, και * cluster₆. Παρατηρείται πως όσο αυξάνεται ο αριθμός των ομάδων, αυτές υποδιαιρούνται σε άλλες μικρότερες, αλλά σε πολύ κοντινές αποστάσεις μεταξύ τους. Αυτή η εικόνα αντανακλά το συμπέρασμα πως αυτές οι μικρότερες ομάδες αφορούν στην ουσία το ίδιο cluster, χωρισμένο σε υποομάδες και όχι σε κάποιο καινούργιο cluster, όπως θα επιβεβαιώσουν παρακάτω και οι στατιστικοί έλεγχοι.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, αρχίζει να γίνεται εμφανές πως από το σύνολο των 61 δομών προκύπτουν τελικά 2 clusters, καθένα από τα οποία αποτελείται από έναν ικανοποιητικό αριθμό δεδομένων. Για την επιβεβαίωση αυτού του συμπεράσματος πραγματοποιείται έλεγχος με τις συναρτήσεις:





Εικόνα 49: Αποτελέσματα συνάρτησης Elbow. Στον x άξονα, δίνεται ο μεγαλύτερος δυνατός αριθμός clusters που μπορεί να προβλέψει και στον y άξονα δίνεται το ολικό άθροισμα τετραγώνων για το σύνολο δεδομένων. Παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο πληθος δεδομένων κατανέμεται σε ένα cluster, έπειτα με μικρότερο αριθμό σε ένα δεύτερο cluster, με πολύ κοντινές τιμές στο δεύτερο σχηματισμός ενός τρίτου με μικρό αριθμό δειγμάτων, ενώ από τον αριθμό 4 και έπειτα είναι εμφανές πως δεν υπάρχει καμία σχεδόν μεταβολή στη σύσταση και στην απόσταση των clusters (κάθετη διακεκομμένη γραμμή, εικόνα που αντανακλά πως τα ήδη υπάρχοντα clusters που έχουν προβλεφθεί, αρχίζουν να υποδιαιρούνται σε όλο και μικρότερα).





Εικόνα 50: Αποτελέσματα συνάρτησης Silhuette. Στον x άξονα, δίνεται ο μεγαλύτερος δυνατός αριθμός clusters που μπορεί να προβλέψει και στον y άξονα δίνεται ο μέσος όρος του πλάτους της μεθόδου silhouette. Παρόμοια προβλέπεται πως ο ορθότερος αριθμός clusters είναι το 2 (διακεκομμένη γραμμή), καθώς από την εμφάνιση του τρίτου cluster και έπειται παρατηρείται ελάχιστη διακύμανση στην κατανομή των δειγμάτων σε ομάδες.

✓ Gap Statistic



Εικόνα 51: Αποτελέσματα συνάρτησης Gap Statistic. Στον x άξονα, δίνεται ο μεγαλύτερος δυνατός αριθμός clusters που μπορεί να προβλέψει και στον y άζονα δίνεται η μέθοδος Gap Statistic που εφαρμόζεται για κάθε αριθμό clusters που προβλέπει. Αποτελεί το τελευταίο κριτήριο αξιολόγησης που χρησιμοποιήθηκε για τον αριθμό των clusters, όπου και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μεγάλη απόσταση και απότομη αλλάγη μεταξύ πρώτου και δεύτερου cluster, ενώ στη συνέχεια οι διακυμάνσεις μεταξύ κάθε cluster είναι μικρές με ελαφριές αλλαγές κάθε φορά.

Συγκεντρώνοντας όλα τα αποτελέσματα των προβλέψεων από την ανάλυση των δεδομένων με clustering, επιλέγεται ως τελικός αριθμός ομάδων, η ύπαρξη 2 clusters, καθώς εντοπίζοντας το συνολικό αριθμό δομών που βρίσκονται σε κάθε cluster, προκύπτει ότι:

- ✓ Για k=2 cluster₁: 54 δομές
 - ▲ cluster₂: 7 δομές
- ✓ Για k=3 cluster₁: 4 δομές
 - **▲** cluster₂: **52** δομές
 - cluster₃: 5 δομές

συμπεραίνοντας πως καθώς ο αριθμός των ομάδων αυξάνεται (από 3 και πάνω) τα πρωταρχικά cluster (δηλαδή clusters τα οποία στο σύνολό τους είναι όμοια), αρχίζουν να διαιρούνται σε μικρότερα, αποτέλεσμα που δεν είναι επιθυμητό καθώς αναζητάται η «μέση» δομή, εκείνη που βρίσκεται πιο κοντά στο κεντρομερές ενός μεγάλου συνόλου δείγματος.

Έτσι λοιπόν υπολογίζοντας τις αποστάσεις του κάθε δείγματος από το κέντρο τους για κάθε cluster και στη συνέχεια εντοπίζοντας το δείγμα εκείνο το οποίο σε κάθε cluster απέχει το λιγότερο από το κεντρομερές του, εντοπίζονται τα εξής:

- cluster1: δομή 2WEL
- ▲ cluster₂: δομή **2W73**

Εξαιτίας της έντονης πλαστικότητας που εμφανίζει η Ca²⁺/CaM, μπορεί να δεσμεύεται σε έναν πολύ μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών στόχων μέσω μίας ποικιλίας μεταβολών στερεοδιατάξεων (ανοιχτή – κλειστή δομή). Η πιο κλασική περίπτωση (και επιθυμητή στην παρούσα εργασία) είναι αυτή που περιλαμβάνει την εκτύλιξη και κάμψη της έλικας που συνδέεται με τα μοτίβα, με αποτελέσμα η καρβοξυτελική να πλησιάζει αρκετά την αμινοτελική
περιοχή δημιουργώντας μία εσωτερική κοιλότητα στην οποία προσδένονται με υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις η α-έλικα της πρωτεΐνης στόχου. Εκτός από τον κλασικό τρόπο πρόσδεσης, η CaM έχει δειχθεί ότι υιοθετεί και μία εκτεταμένη στερεοδιάταξη, για να δεσμεύει και άλλους τύπους πρωτεϊνικών στόχων. Ένας από αυτούς τους μη κλασσικούς τρόπους δέσμευσης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της CaM με την αντλία Ca²⁺ στη μεμβράνη πλάσματος (Yong Zhang et al. 2008). Η επιλογή των δύο clusters, περιλαμβάνουν δύο δομές Ca²⁺/CaM δεσμευμένες με πεπτίδιο εκ των οποίων η μία υιοθετεί ανοιχτή στερεοδιάταξη και η άλλη κλειστή (σχηματισμός κοιλότητας). Βάσει βιβλιογραφίας, η οποία πλέον έχει αποδείζει ότι η <u>ανοιχτή</u> στερεοδιάταξη της Ca²⁺/CaM δεσμευμένη με πεπτίδιο εντοπίζεται στις αλληλεπιδράσεις κυρίως ιοντικών καναλιών (αντλία Ca²⁺ στη μεμβράνη πλάσματος και κανάλι K⁺), η ανοιχτή στερεοδιάταξη που υιοθετεί η δομή **2W73** από το cluster₂ <u>απορρίπτεται</u> καθώς στη μετέπειτα επεξεργασία της δεν θα λαμβάνονταν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Καταλήγοντας, η δομή CaM που προκύπτει και πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης με τα πεπτίδια του RyR2, είναι αυτή με κωδικό PDB: **2WEL**:



Εικόνα 52: Κρυσταλλική δομή της 2WEL (CaM δεσμευμένη με SU6656-bound calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta). Με κόκκινο χρώμα απεικόνίζεται η καλμοδούλινη, με μπλε η πρωτεΐνη που αλληλεπίδρά. Αρχικά απεικονίζεται το σύμπλοκο όπως προσδιορίστηκε με κρυσταλογραφία ακτίνων-Χ στα 1.9Å, έπειτα το σύμπλοκο της καλμοδουλίνης με το πεπτίδιο που αλληλεπιδρά από ολόκληρη την πρωτεΐνη με την οποία έχει συμπλοκοποιηθεί και τελικώς το μόριο της Ca²⁺/CaM και του πεπτιδίου, ξεχωριστά. Οι εικόνες επεξεργάστηκαν με χρήση του Chimera, ενώ το πεπτίδιο και η CaM, απομονώθηκαν με τη διαγραφή μη επιθυμητών αμινοξικών καταλοίπων και μίας αλυσίδας αντίστοιχα.

3.2.2 Πεπτίδια Β και F του RyR2_{human}

Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο για τη σύνθεση των επιθυμητών πεπτιδίων του υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου 2 και του πεπτιδίου της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της CaM (κωδικός PDB: 2WEL) ως δείγμα control, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο PEP-FOLD και συγκεκριμένα η έκδοση 3.5. Στην προσπάθεια επαλήθευσης της πρόβλεψης, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής PSIPRED για κάθε πεπτίδιο βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας (Πίνακας 13):

Πίνακας 13: Αμινοξική ακολουθία των πεπτιδίων που συντέθηκαν. Περιέχει την ονομασία του κάθε πεπτιδίου και την υπό μελέτη αμινοξική περιοχή με τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα που περιέχονται.

Πεπτίδο	Αμινοξική Ακολουθία RyR2 _{Human}	Αμινοξικά Κατάλοιπα
В	[3584-3602]	KAVWHKLLSKQRKRAVVAC
F	[4255-4271]	LMRMLSLKSLKKQMKKV
Control Πεπτίδιο2wel		MMHRQETVDCLKKFNARRKLKGAILTTMLATRNFSA

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ως οι καλύτερες δομές πρόβλεψης αφορούν:

Πεπτίδιο Β

Summary	PSIPRE	DI	Download	s														
Secondary	y Structu	re Map)															
Feature p	redictions	are co	lour code	d onto	the sequ	ience aco	ording to	the sequ	ence fea	ture key	shown t	pelow.						
1 K	Α	V	W	н	К	L	L	S	к	Q	R	к	R	Α	V	V	Α	c
KEY Annotation	15		Helix	S	iheet L	Disc	ordered		Disc proi	ordered tein bind	ing		D B	ompred oundary		Don Bou	nSSEA ndary	
Start	Resubm	ssion	_	_		_					_		_		_		_	Stop 19
																Se	lect Met	hods

Εικόνα 53: Αποτέλεσμα πρόγνωσης PSIPRED για το πεπτίδιο Β. Παρατηρείται πως σχεδόν σε όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα έχει γίνει προσδιορισμός δευτεροταγούς δομής α-έλικας (μωβ χρωματισμός).

Επιβεβαίωση διπλώματος πεπτίδιου μέσω του PEP-FOLD:



Εικόνα 54: Αποτέλεσμα πρόγνωσης της de novo σύνθεσης του PEP-FOLD για το πεπτίδιο B. Συνδιαστικά με τη πρόβλεψη του αλγορίθμου πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής και το εργαλείο PEP-FOLD, προβλέπεται δίπλωμα σε σχεδόν ολόκληρο το μήκος του πεπτιδίο σε α-έλικα (απόδοση εικόνας με χρήση του Chimera).

✓ Г	Ιεπτ	ίδιο F																
Summ	ary	PSIPRED	Dow	nloads														
Seco	ndary	Structure	е Мар															
Feat	ture pre	edictions a	are colour	coded c	onto the sec	quence ac	cording to	the sequ	ence feat	ure key sh	own belo	w.	0		v	v	v	
			ĸ			3		ĸ	3		ĸ	ĸ	Ŷ		ĸ	ĸ	v	
KEY			н	elix	Sheet	Di	sordered		Diso prote	rdered ein binding			Domp Bound	red Jary	1	DomSSEA Boundary		
Anno	tations		м		L	E	l		Ē				A.			D		
Sequ	ence R	Resubmis	sion															
Start 1																		Stop 17
															[Select Me	thods	

Εικόνα 55: Αποτέλεσμα πρόγνωσης PSIPRED για το πεπτίδιο F. Παρατηρείται πως σχεδόν σε όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα έχει γίνει προσδιορισμός δευτεροταγούς δομής α-έλικας (μωβ χρωματισμός).

Επιβεβαίωση διπλώματος πεπτίδιου μέσω του PEP-FOLD:



Εικόνα 56: Αποτέλεσμα πρόγνωσης της de novo σύνθεσης του PEP-FOLD για το πεπτίδιο F. Συνδιαστικά με τη πρόβλεψη του αλγορίθμου πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής και το εργαλείο PEP-FOLD, προβλέπεται δίπλωμα σχεδόν σε ολόκληρο το μήκος του πεπτιδίο σε α-έλικα (απόδοση εικόνας με χρήση του Chimera).

✓ Δομή control πεπτιδίου της 2WEL

Δεδομένου πως η πληροφορία της πειραματικής δομής του συγκεκριμένου πεπτιδίου είναι γνωστή, η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής μέσω του αλγορίθμου του PSIPRED δεν είναι απαραίτητη, συνεπώς πραγματοποιείται μόνο de novo σύνθεση του πεπτιδίου μέσω του PEP-FOLD:



Εικόνα 57: Α. Αποτέλεσμα πρόγνωσης της de novo σύνθεσης του PEP-FOLD για το control πεπτίδιο. Β. Δομή κρυσταλλικού πεπτιδίου του συμπλόκου 2WEL. Παρατηρείται πως το PEP-FOLD προβλέπει για το μεγαλύτερο μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του πεπτιδίου, δίπλωμα σε α-έλικα (εικόνα A), αποτέλεσμα που συνάδει κατά μεγάλο ποσοστό με την κρυσταλλική δομή του πεπτιδίου που έχει προσδιοριστεί (εικόνα B). Στην είσοδο της αμινοξικής ακολουθίας στο PEP-FOLD για το control πεπτίδιο, αποκλείστηκαν τα κατάλοιπα AKSLLKKPDGVKESTESSN, που βρίσκονται στο τέλος της ακολουθίας του πεπτίδιου και για τα οποία απουσιάζει ο χαρακτηρισμός τριτοταγούς δομής από την PDB (απόδοση εικόνας με χρήση του Chimera).

Στα αποτελέσματα της de novo σύνθεσης, λαμβάνονται κάθε φορά τα καλύτερα **5** προγνωστικά μοντέλα. Στα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, απεικονίζεται για κάθε πεπτίδιο το πρώτο καλύτερο μοντέλο που προέκυψε από το αντίστοιχο cluster. Προκειμένου να αιτιολογηθεί η επιλογή του πρώτου από το σύνολο των 5 μοντέλων, πραγματοποίηθηκε για κάθε πεπτίδιο, υπέρθεση των **5** δομών πρόγνωσης για το καθένα, με σκοπό να διερευνηθεί η εμφάνιση ή μη αποκλίσεων στη μεταξύ τους δομή, λαμβάνοντας κάθε φορά και το αντίστοιχο διάγραμμα RMSD έτσι ώστε να υπάρχει και ποσοτικοποίηση της όποιας διαφοράς. Η δομική στοίχιση πραγματοποιήθηκε με χρήση του MOE για:



Πεπτίδιο Β

Εικόνα 58: Συνολικό αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών και των 5 μοντέλων πρόβλεψης για το πεπτίδιο B. Παρατηρείται πως οι μετατοπίσεις στις στερεοδιατάξεις των μοντέλων είναι αρκετά μικρές, ενώ σε δύο από τα μοντέλα αυτά (model4 και model5) εμφανίζεται με μεγαλύτερο μήκος η ξεδιπλωμένη δομή, αιτία της ελαφριάς αυτής μετατόπισης στο τελειώμα της στερεοδιάταξης του μοντέλου.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω υπέρθεσης δομών των μοντέλων, ποσοτικοποιούνται βάσει του κριτηρίου απόστασης RMSD, στοιχίζοντας κάθε φορά ανά δύο τις δομές. Ο μέσος όρος του RMSD των ζευγών των δομών είναι 2.278Å, μέτρηση επιθυμητή καθώς όσο πιο χαμηλό είναι το RMSD, τόσο πιο «ακριβές» είναι το ταίριασμα δύο βιομορίων:

	Pairwise R	MSD Matrix	: RMSD = 2	2.278 A		
	1	2	3	4	5	4.0
1: model1	0.00	0.61	0.95	3.01	2.80	3.5
2: model2	0.61	0.00	0.97	2.91	2.41	3.0 2.5
3: model3	0.95	0.97	0.00	2.82	2.58	2.0
4: model4	3.01	2.91	2.82	0.00	1.98	1.5
5: model5	2.80	2.41	2.58	1.98	0.00	0.5
						0.0

Εικόνα 59: Αποτελέσματα μέτρησης των ανά δύο RMSD για τα 5 μοντέλα πρόβλεψης του πεπτιδίου B. Τα αποτελέσματα αποδίδονται και με χρωματικό κώδικα ανάλογα με την τιμή που έχει προσδιοριστεί (τιμές μικρότερες του 1.0Å μπλε χρώμα, ενώ όσο αυξάνεται αυτή η τιμή, κόκκινο χρώμα). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωνουν και τη δομή των αλληλοεπικαλυπτόμενων δομών καθώς τα μοντέλα 4 και 5 εμφανίζουν μεγαλύτερο δείκτη RMSD, συγκριτικά με τα τρία πρώτα. Οι διαφορές στα τρία πρώτα μοντέλα της μεταξύς τους αποστάσης είναι πολύ μικρής κλίμακας γι' αυτό και η επιλογή οποιουδήποτε μοντέλου από αυτά τα 3, για το πεπτίδιο B είναι ορθή (με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το χαμηλότερο RMSD στη δομή βάσει της οποίας στοιχίστηκαν και οι υπόλοιπες).

✓ Πεπτίδιο F



Εικόνα 60: Συνολικό αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών και των 5 μοντέλων πρόβλεψης για το πεπτίδιο F. Όσον αφορά το πεπτίδιο F, παρατηρείται πως στις επικαλύψεις των 5 μοντέλων δεν υπάρχει σχεδόν καμία σχετική μετατόπιση, και πως όλες οι προβλέψεις είναι σχεδόν ταυτόσημες.

Η παραπάνω ταύτιση των δομών κατά την υπέρθεσή τους επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις RMSD, όπου εδώ η μέση τιμή του δείκτη βρέθηκε στα **0.207Å**, δεικτής πολύ κοντά στο 0, δηλαδή στην ακριβή ταύτιση.

	Pairwise R	MSD Matrix	: RMSD = 0).207 A		Pairwise RMSD Matrix: RMSD = 0.207 A							
	1	2	3	4	5		4.0						
1: model1	0.00	0.16	0.20	0.24	0.17		3.5						
2: model2	0.16	0.00	0.24	0.17	0.28		3.0						
3: model3	0.20	0.24	0.00	0.16	0.14		2.0						
4: model4	0.24	0.17	0.16	0.00	0.26		1.5						
5: model5	0.17	0.28	0.14	0.26	0.00		1.0 0.5						
							0.0						

Εικόνα 61: Αποτελέσματα μέτρησης των ανά δύο RMSD για τα 5 μοντέλα πρόβλεψης του πεπτιδίου F. Πράγματι, παρατηρείται πως και τα 5 μοντέλα εμφανίζουν δείκτη RMSD κατώ από τη μονάδα, υποδηλώνοντας πως οποιαδήποτε επιλογή μοντέλου είναι ορθή.



✓ Control πεπτίδιο

Εικόνα 62: Συνολικό αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών και των 5 μοντέλων πρόβλεψης για το control πεπτίδιο μαζί με το κρυσταλλικό πεπτίδιο που έχει απομονωθεί από το σύμπλοκο της 2WEL. Η μεγάλη μετατόπιση που απεικονίζεται, οφείλεται στο κρυσταλλικό πεπτίδιο που έχει απομονωθεί από τη δομή του συμπλόκου της CaM. Τα μοντέλα πρόβλεψης έχουν σχεδόν ταυτόσημη επικάλυψη.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται με το δείκτη RMSD, ο οποίος παρουσιάζεται σχετικά αυξημένος (μέση τιμή 4.676Å)

Pairwise RMSD Matrix: RMSD = 4.676 A								
	1	2	3	4	5	6	_	
1: 2wel_peptide_crys	0.00	7.48	7.34	7.05	7.23	7.56	4.0	
2: model1	7.48	0.00	2.35	2.78	3.19	1.16	3.0	
3: model2	7.34	2.35	0.00	1.47	2.81	2.17	2.5	
4: model3	7.05	2.78	1.47	0.00	2.40	2.28	2.0	
5: model4	7.23	3.19	2.81	2.40	0.00	2.91	1.0	
6: model5	7 56	1 16	2 17	2 28	2 01	0 00	0.5	
0. 1000215	7.50	1.10	2.1/	2.20	2.91	0.00	0.0	

Εικόνα 63: Αποτελέσματα μέτρησης των ανά δύο RMSD για τα 5 μοντέλα πρόβλεψης για το control πεπτίδιο μαζί με το κρυσταλλικό πεπτίδιο που έχει απομονωθεί από το σύμπλοκο της 2WEL. Πράγματι όλες οι μετρήσεις με το κρυσταλλικό πεπτίδιο ξεπερνούν το επιθυμητό κατώφλι RMSD του MOE (3.5 Å), ενώ η δομική στοίχιση των μοντέλων πρόβλεψης μεταξύ τους είναι αρκετά κοντά στα επιθυμητά αποτελέσματα, επομένως και εδώ η επιλογή οποιαδήποτε μοντέλου από τα 5 είναι ορθή, καθώς παρατηρούνται ελαφριές μετατοπίσεις στο καθένα.

Συνοψίζοντας για κάθε de novo πεπτίδιο που συντέθηκε, χρησιμοποιήθηκε το πρώτο μοντέλο πρόβλεψης για τη διεξαγωγή των επόμενων βημάτων ανάλυσης. Επίσης στις παραπάνω απεικονίσεις έχουν παραληφθεί οι πλευρικές αλυσίδες όλων των μοντέλων για βελτιστοποίηση της απεικόνισης.

3.3 Αποτελέσματα Docking

Έχοντας ως δομές εισόδου πλέον, τη δομή πρότυπο της Ca²⁺/CaM και των πεπτιδίων control, B και F, πραγματοποιείται μελέτη της αλληλεπίδρασης τους μέσω docking με σκοπό την απόκτηση δομικής πληροφορίας των αλληλεπιδράσεων CaM/RyR2 και της επιβεβαίωσης των περιοχών πρόσδεσης του RyR2 στην CaM, που μέχρι τώρα έχουν προσδιοριστεί μόνο με βιοφυσικές τεχνικές.

3.3.1 <u>Αποτελέσματα ClusPro</u>

Πραγματοποιήθηκε με τη σειρά ανάλυση docking των:

- Ca^{2+}/CaM και control πεπτίδιο
- Ca²⁺/CaM και πεπτίδιο B
- Ca^{2+}/CaM και πεπτίδιο F

έχοντας πρωτονιώσει αρχικά τη δομή της Ca²⁺/CaM.

Για κάθε υπό μελέτη ζεύγος, το τελικό αποτέλεσμα επιλέχθηκε βάσει του μεγέθους του cluster που προβλέπει το συγκεκριμένο εργαλείο. Ο προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης γίνεται βάσει **4** ενεργειακών κατηγοριών (ισορροπίας, ηλεκτροστατικές, υδροφοβικές και vdW με ηλεκτροστατικές), όπως έχει αναλυθεί παραπάνω, όπου σε κάθε μία παρουσιάζεται ένας αριθμός clusters κάθε φορά. Για το control δείγμα, επιλέχθηκε το cluster εκείνο που απεικονίζει μία μέση δομή της πρόβλεψης, με το μεγαλύτερο πλήθος δομών, από οποιαδήποτε ενεργειακή κατηγορία. Βάσει της ενεργειακής κατηγορίας που άνηκε το cluster του control δείγματος, έγινε επιλογή και για τα υπόλοιπα δύο ζεύγη αλληλεπιδρώντων μορίων, για τα οποία ως τελικό αποτέλεσμα επιλέχθηκε εκείνο το cluster με το μεγαλύτερο πλήθος προβλεπόμενων δομών της κατηγορίας αυτής. Τα υπόλοιπα μοντέλα πρόβλεψης παρουσιάζονται στο **παράρτημα VI**.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα:

Ca²⁺/CaM και control πεπτίδιο





Εικόνα 64: Αποτελέσματα docking για Ca²⁺/CaM-control πεπτίδιο. Απεικονίσεις διαφορετικών οπτικών πλευρών του καλύτερου μοντέλου του συμπλόκου που επιλέχθηκε από την κατηγορία **Balanced**, από το cluster **0** με **568** μέλη (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).

Πίνακας 14: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το control πεπτίδιο για το πεδίο ισορροπίας. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	596	Κέντρο	-1189.6
0	580	Χαμηλότερη ενέργεια	-1359.8
1	216	Κέντρο	-1234.6
	510	Χαμηλότερη ενέργεια	-1253.0
2	50	Κέντρο	-1128.9
2	58	Χαμηλότερη ενέργεια	-1206.5
3	56	Κέντρο	-1066.8
	56	Χαμηλότερη ενέργεια	-1340.3

Ca²⁺/CaM και πεπτίδιο B





Εικόνα 65: Αποτελέσματα docking για Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο Β. Απεικονίσεις διαφορετικών οπτικών πλευρών του καλύτερου μοντέλου του συμπλόκου που επιλέχθηκε από την κατηγορία Balanced, από το cluster 0 με 436 μέλη (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).

Πίνακας 15: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο B για το πεδίο ισορροπίας. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	126	Κέντρο	-1295.7
0	430	Χαμηλότερη ενέργεια	-1306.0
1	214	Κέντρο	-1028.1
1	214	Χαμηλότερη ενέργεια	-1331.8
2	100	Κέντρο	-1081.0
Z	199	Χαμηλότερη ενέργεια	-1208.7
3	151	Κέντρο	-1054.4
	151	Χαμηλότερη ενέργεια	-1349.2

Ca²⁺/CaM και πεπτίδιο F





Εικόνα 66: Αποτελέσματα docking για Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο F. Απεικονίσεις διαφορετικών οπτικών πλευρών του καλύτερου μοντέλου του συμπλόκου που επιλέχθηκε από την κατηγορία **Balanced**, από το cluster **0** με **345** μέλη (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).

Πίνακας 16: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο F για το πεδίο ισορροπίας. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	245	Κέντρο	-945.9
0	545	Χαμηλότερη ενέργεια	-984.5
1	280	Κέντρο	-797.5
1	289	Χαμηλότερη ενέργεια	-907.0
2	220	Κέντρο	-873.3
Z	239	Χαμηλότερη ενέργεια	-1101.8
2	124	Κέντρο	-807.8
3	124	Χαμηλότερη ενέργεια	-919.2
1	2	Κέντρο	-799.4
4	3	Χαμηλότερη ενέργεια	-799.4

Σύμφωνα και με τους ίδιους τους δημιουργούς του εργαλείου του ClusPro, ο καλύτερος τρόπος να βαθμολογούνται τα μοντέλα πρόβλεψης είναι βάσει του μεγέθους του κάθε cluster και αυτός είναι και ο τρόπος με τον οποίο αποδίδονται τα αποτελέσματα της καλύτερης πρόβλεψης από τον server. Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί το ClusPro κατά την πρόβλεψη μοντέλων είναι ο εξής:

- Περιστροφή του προσδέτη κατά 70.000 περιστροφές. Για κάθε περιστροφή, «μεταφράζεται» ο προσδέτης ως συντεταγμένες x, y, z σε σχέση με τον υποδοχέα κάθε φορά, σε ένα πλέγμα. Επιλέγεται η θέση με το καλύτερο score από κάθε περιστροφή.
- Από τις 70.000 περιστροφές, επιλέγονται οι 1000 συνδυασμοί περιστροφής/θέσης που έχουν το χαμηλότερο σκορ.
- Πραγματοποιείται clustering των 1000 θέσεων του προσδέτη μέσω μίας greedy διαδικασίας με RMSD ακτίνα των C_a, 9 Å. Αυτό σημαίνει ότι εντοπίζεται η θέση του προσδέτη με τους περισσότερους "γείτονες" σε 9 Å, και δημιουργείται σε αυτή τη θέση το κεντρομερές του cluster και οι «γείτονές» του τα μέλη του cluster. Αυτά, στη συνέχεια αφαιρούνται από το σετ και έπειτα αναζητείται ένα δεύτερο κέντρο cluster και ούτω καθεξής.

Σημειώνεται επίσης ότι στο αρχικό βήμα υπάρχουν περίπου 10⁹ θέσεις του προσδέτη σχετικές με τον υποδοχέα. Από αυτές τις 10⁹, επιλέγονται 1000 (ή 10³ θέσεις). Αυτό σημαίνει ότι αυτά τα 1000 μοντέλα που έχουν βρεθεί, είναι τα καλύτερα από ένα σύνολο της τάξης των 10⁹ θέσεων, και σε αυτό το επίπεδο, η λειτουργία βαθμολόγησης είναι πολύ δύσκολη για να διακρίνει ουσιαστικές διαφορές μεταξύ αυτών των 1000 θέσεων. Ο σκοπός της λειτουργίας της βαθμολόγησης είναι να εξάγει τις 1000 θέσεις από το αρχικό σύνολο των 10⁹ θέσεων και μόνο (Kozakov et al. 2017). Επομένως όλα τα αποτελέσματα που δείχνονται στους παραπάνω πίνακες που αφορούν τους υπολογισμούς των σκορ σε κάθε cluster του κάθε ενεργειακού πεδίου (βλεπε Παράρτημα VI), δεν αποτελούν κανένα κριτήριο για την επιλογή του καλύτερου προβλεπόμενου μοντέλου, παρά μόνο το μέγεθος του cluster σε όποιο ενεργειακό πεδίο εντοπιστεί.

Η αρχική επιλογή αποτελέσματος του ClusPro, βάσει μεγέθους του cluster για το control δείγμα, υπήρξε το μοντέλο **0** από το <u>ηλεκτροστατικό</u> πεδίο με **767** μέλη, αλλά λόγω αλλοιωμένης δομής του control πεπτιδίου προκειμένου να πραγματοποιήσει docking, **απορρίφθηκε**.

Εικόνα 67: Μοντέλο πρόβλεψης docking του συμπλόκου Ca²⁺/CaMcontrol με αλλοιωμένη δομή πεπτιδίου. Βάσει του μεγέθους του cluster που ανήκει το συγκεκριμένο μοντέλο, αποτελέι την ορθή επιλογή για το control δείγμα, αλλά απορρίπτεται καθώς παρουσίαζει μία ξεδιπλωμένη περιοχή στην α-έλικα του πεπτιδίου, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αγκυροβόληση.



3.3.2 <u>Αποτελέσματα GOLD</u>

Έχοντας ως αρχεία εισόδου την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της Ca²⁺/CaM (**2WEL**, control δείγμα) και το de novo πεπτίδιο που σχεδιάστηκε βάσει της αμινοξικής ακολουθίας του αντίστοιχου κρυσταλλικού πεπτιδίου, πραγματοποιείται ανάλυση docking μέσω του GOLD για το control δείγμα, με χρήση της συνάρτησης βαθμολόγησης ChemPLP.

* Ca²⁺/CaM-control πεπτίδιο

Λαμβάνονται τα αποτελέσματα του καλύτερου μοντέλου πρόβλεψης:



Συγκρίνοντας τα αποτέλεσματα του GOLD, με τα αντίστοιχα του ClusPro του μοντέλου που επιλέχθηκε και με την κρυσταλλική δομή που έχει απομονωθεί, πραγματοποιήθηκε υπέρθεση αυτών των **3** δομών μέσω του Chimera:







Εικόνα 69: Αποτελέσματα υπέρθεσης των αγυροβολημένων συμπλόκων για Ca²⁺/CaM-control πεπτίδιο μέσω του ClusPro και GOLD, και του κρυσταλλικού συμπλόκου. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται το κρυσταλλικό πεπτίδιο, με μπλε το πεπτίδιο από την πρόβλεψη του GOLD και με ροζ αυτό του ClusPro (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera). Και τα δύο εργαλεία πραγματοποιούν πολύ καλές προβλέψεις καθώς παρατηρείται πως πράγματι το πεπτίδιο έχει δεσμευτεί στην κεντρική κοιλότητα της Ca²⁺/CaM και όχι σε διαφορετική περιοχή πρόσδεσης.

Ca²⁺/CaM- πεπτίδιο B





Εικόνα 70: Αποτελέσματα docking για Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο B. Απεικονίσεις διαφορετικών οπτικών πλευρών του καλύτερου μοντέλου του συμπλόκου που επιλέχθηκε βάσει του σκορ της συνάρτησης βαθμολόγησης -319.3273 (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera)

Συγκρίνοντας τα αποτέλεσματα του GOLD, με τα αντίστοιχα του ClusPro για το μοντέλο με το πεπτίδιο B, πραγματοποιήθηκε υπέρθεση αυτών των 2 δομών μέσω του Chimera:





Εικόνα 71: Αποτελέσματα υπέρθεσης των αγυροβολημένων συμπλόκων για Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο B μέσω του ClusPro και GOLD. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το πεπτίδιο από την πρόβλεψη του GOLD και με γαλάζιο αυτό του ClusPro. Παρατηρείται πως και τα δύο εργαλεία έχουν πολύ κοντινές προβλέψεις, με αυτή του ClusPro να έχει τοποθετήσει το πεπτίδιο περισσότερο θαμμένο στο εσωτερικό της κοιλότητας σε σχέση με το αντίστοιχο του GOLD(επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).





Εικόνα 72: Αποτελέσματα docking για Ca²⁺/CaMπεπτίδιο F. Απεικονίσεις διαφορετικών οπτικών πλευρών του καλύτερου μοντέλου του συμπλόκου που επιλέχθηκε βάσει του σκορ της συνάρτησης βαθμολόγησης -275.3200 (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).

Ca²⁺/CaM- πεπτίδιο F

Συγκρίνοντας τα αποτέλεσματα του GOLD, με τα αντίστοιχα του ClusPro για το μοντέλο με το πεπτίδιο F, πραγματοποιήθηκε υπέρθεση αυτών των 2 δομών μέσω του Chimera:



Εικόνα 73: Αποτελέσματα υπέρθεσης των αγυροβολημένων συμπλόκων για Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο F μέσω του ClusPro και GOLD. Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται το πεπτίδιο από την πρόβλεψη του GOLD και με γαλάζιο αυτό του ClusPro. Παρατηρείται πως και τα δύο εργαλεία έχουν πολύ κοντινές προβλέψεις, με αυτή του ClusPro να έχει τοποθετήσει το πεπτίδιο περισσότερο θαμμένο στο εσωτερικό της κοιλότητας σε σχέση με το αντίστοιχο του GOLD (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα docking και από τα δύο εργαλεία, συμπεραίνεται πως και τα δύο εκτελούν προβλέψεις πολύ κοντινές στις κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες (σύγκριση των control δειγμάτων με το κρυσταλλικό σύμπλοκο), με τη διαφορά ότι τα αποτελέσματα του ClusPro όσον αφορά τα πεπτίδια B και F του RyR2, είναι πιο κοντά στη φυσική δομή του συμπλόκου Ca²⁺/CaM-RyR1 που έχει κρυσταλλωθεί (πεπτίδια περισσότερο θαμμένα στο εσωτερικό της κοιλότητας της Ca²⁺/CaM). Καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία και έχει αναλυθεί ήδη και στο εισαγωγικό μέρος της παρούσας εργασίας, ο υποδοχέας ρυανοδίνης τύπου Ι με τον τύπου ΙΙ, μοιράζονται μία ομολογία κατά την πρωτοταγή τους δομή της τάξης του 60-70%, συμπεραίνοντας πως περάν της παρόμοιας βιολογικής λειτουργίας, θα μοιράζονται και εξαιτίας της δομής χειρισμού του GOLD, που προαπαιτεί τον ορισμό της περιοχής δέσμευσης του προσδέτη, επιλέγονται τα αποτελέσματα πρόβλεψης του **ClusPro**, για όλες τις υπό μελέτη δομές και που τελικά αφορούν συνοπτικά:







Εικόνα 74: Τελικά αποτελέσματα docking του ClusPro.

Α. Μοντέλο πρόβλεψης control δείγματος, Β. Μοντέλο πρόβλεψης συμπλόκου Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο Β και Γ.
Μοντέλο πρόβλεψης συμπλόκου Ca²⁺/CaM-πεπτίδιο F.
Όλες οι εικόνες επεξεργάστηκαν μέσω του Chimera.

3.4 Αποτελέσματα ανάλυσης μοντέλων

Με σκοπό την ανάλυση των επιλεγμένων μοντέλων από τις προβλέψεις του ClusPro για τις καλύτερες δυνατές στερεοδιατάξεις όπως και για την αλληλεπίδραση των δύο επιφανειών (υποδοχέα-προσδέτη) χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία, τα οποία έχουν ήδη αναλυθεί παραπάνω και αφορούν το:

- PepFlexDock
- CONSRank
- COCOMAPS

3.4.1 PepFlexDock

Προκειμένου να επιτευχθεί ανάλυση όλων των πιθανών στερεοδιατάξεων στο μοντέλο του control δείγματος, κρίθηκε απαραίτητη η μείωση αμινοξικών καταλοίπων καθώς το PepFlexDock προβλέπει καλύτερα για μήκος 5-15 αα. Επομένως μέσω του chimera πραγματοποιήθηκε μείωση στο μήκος του control πεπτιδίου κατά 7 αμινοξικά κατάλοιπα και η δομή εισόδου που προέκυψε ήταν:



Εικόνα 75: Δομή εισόδου της Ca²⁺/CaM με το control πεπτίδιο για ανάλυση του PepFlexDock. Μείωση της α-έλικας κατά 7 αμινοξικά κατάλοιπα (επεξεργασία εικόνων μέσω του Chimera).

Για τα υπόλοιπα μοντέλα συμπλόκων (πεπτιδίων B και F), δεν κρίθηκε απαραίτητη καμία μορφοποίηση στα αρχεία εισόδου, για τα οποία λαμβάνονται με τη σειρά:

Ca²⁺/CaM – control πεπτίδιο



Εικόνα 76: Αποτέλεσμα FlexPepDock για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – control πεπτίδιο. Απεικονίζεται η υπέρθεση των 10 καλύτερων προβλεπόμενων στερεοδιατάξεων του control πεπτιδίου (χρωματικός κώδικας), για την οποία παρατηρείται ελάχιστη μετατόπιση κάθε φορά στο πεπτίδιο (απόδοση εικόνας από το ίδιο το FlexPepDock).



Εικόνα 77: Αποτέλεσμα FlexPepDock για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο B. Απεικονίζεται η υπέρθεση των 10 καλύτερων προβλεπόμενων στερεοδιατάξεων του πεπτιδίου B (χρωματικός κώδικας), για την οποία παρατηρείται ελάχιστη μετατόπιση κάθε φορά στο πεπτίδιο (απόδοση εικόνας από το ίδιο το FlexPepDock).

* $Ca^{2+}/CaM - πεπτίδιο F$



Εικόνα 78: Αποτέλεσμα FlexPepDock για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο F. Απεικονίζεται η υπέρθεση των 10 καλύτερων προβλεπόμενων στερεοδιατάξεων του πεπτιδίου F (χρωματικός κώδικας), για την οποία παρατηρείται ελάχιστη μετατόπιση κάθε φορά στο πεπτίδιο (απόδοση εικόνας από το ίδιο το FlexPepDock).

3.4.2 CONSRank

Για κάθε μοντέλο συμπλόκου που εισήχθει στο FlexPepDock, λαμβάνονται οι **10** καλύτερες στερεοδιατάξεις των πεπτιδίων. Αυτά τα 10 μοντέλα στη συνέχεια αναλύονται μέσω του εργαλείου CONSRank, όπου από το σκορ που προβλέπει (όσο μεγαλύτερο, τόσο πιο κοντά στη φυσική κατάσταση το μοντέλο), επιλέγεται το μοντέλο εκείνο που εν τέλει αντιπροσωπεύει την καλύτερη δυνατή φυσική κατάσταση της αλληλεπίδρασης.

* Ca^{2+}/CaM – control πεπτίδιο

Πίνακας 17: Αποτελέσματα βαθμολόγησης των μοντέλων του CONSRank για το Ca²⁺/CaM – control πεπτίδιο. Περιέχει με σειρά κατάταξης τον αριθμό του μοντέλου πρόβλεψης με το αντίστοιχο σκορ του.

Μοντέλο Πρόβλεψης	Σκορ
5°	0.74906
8°	0.74352
6°	0.72373
10°	0.72241
4º	0.72056
2°	0.70937
3°	0.70367
9°	0.68319
1°	0.66639
7°	0.66080

Συνεπώς το καλύτερο μοντέλο πρόβλεψης είναι το 5° με σκορ0.74906για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – control πεπτίδιο:





Εικόνα 79: Τελικό μοντέλο δομής για το σύμπλοκο $Ca^{2+}/CaM - control πεπτίδιο$ (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).

Με σκοπό την αξιολόγηση της τελικής πρόβλεψης, πραγματοποιείται υπέρθεση δομής με την αντίστοιχη κρυσταλλική δομή μέσω του Chimera:



Εικόνα 80: Υπέρθεση δομών τελικού μοντέλου πρόβλεψης για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – control πεπτίδιο με την αντίστοιχη κρυσταλλική δομή. Παρατηρείται πως και το de novo πεπτίδιο έχει τοποθετηθεί στην κεντρική κοιλότητα της Ca²⁺/CaM, με τις μετατοπίσεις που απεικονίζονται να μην επηρεάζουν τη βιολογική της λειτουργία, επιβεβαιώνοντας την ορθή πρόβλεψη των μέχρι τώρα εργαλείων (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).

Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο B

Πίνακας 18: Αποτελέσματα βαθμολόγησης των μοντέλων του CONSRank για το Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο B. Περιέχει με σειρά κατάταξης τον αριθμό του μοντέλου πρόβλεψης με το αντίστοιχο σκορ του.

Μοντέλο Πρόβλεψης	Σκορ
1°	0.81102
7°	0.80164
9°	0.79915
10°	0.78548
8°	0.76371
2°	0.75645
3°	0.75455
4°	0.73465
6°	0.63967
5°	0.48957



Πίνακας 19: Αποτελέσματα βαθμολόγησης των μοντέλων του CONSRank για το Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο F. Περιέχει με σειρά κατάταξης τον αριθμό του μοντέλου πρόβλεψης με το αντίστοιχο σκορ του.

Μοντέλο Πρόβλεψης	Σκορ
4º	0.78000
1°	0.76342
9°	0.76303
2°	0.75610
5°	0.75191
10°	0.75191
6°	0.73571
3°	0.71750
8°	0.69752
7°	0.36518

Τελικώς, το καλύτερο μοντέλο πρόβλεψης είναι το 4° με σκορ0.78000για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο F:





Εικόνα 82: Τελικό μοντέλο δομής για το σύμπλοκο $Ca^{2+}/CaM - \pi \epsilon \pi \tau i \delta$ ιο F (επεξεργασία εικόνας μέσω του Chimera).



3.4.3 <u>COCOMAPS</u>

Τα **2** καλύτερα μοντέλα πρόβλεψης της αλληλεπίδρασης Ca²⁺/CaM με τα πεπτίδια B και F, αναλύονται μέσω του COCOMAPS, με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση της αλληλεπίδρασης των δύο επιφανειών του υποδοχεά και του προσδέτη. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά πρωτονιώθηκαν μέσω του MOE στις συνθήκες διαλύτη των κρυσταλλογραφικών πειραμάτων από τα οποία προέκυψαν.

Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο B

Πίνακας 20: Αποτελέσματα των ειδών των αλληλεπιδράσεων στην περιοχή πρόσδεσης της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο B. Περιέχει αναλυτικά το είδος των αλληλεπιδράσεων που καταγράφονται στα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής αυτής μαζί με τον αντίστοιχο αριθμό που εντοπίζει το COCOMAPS.

Αλληλεπιδράσεις	Αριθμος Αλληλεπιδράσεων
Αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα της Ca ²⁺ /CaM	113
Αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα πεπτιδίου Β	19
Αλληλεπίδραση Υδροφιλικών - Υδροφοβικών καταλοίπων	254
Αλληλεπίδραση Υδροφιλικών - Υδροφιλικών καταλοίπων	104
Αλληλεπίδραση Υδροφοβικών - Υδροφοβικών καταλοίπων	98

Πίνακας 21: Αποτελέσματα ανάλυσης των παραμέτρων ASA (solvent accessible surface area, επιφάνεια προσβάσιμη στο διαλύτη) για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο B. Περιέχει πληροφορίες για όλες τις παραμέτρους ASA, για τις οποίες πραγματοποιεί ανάλυση το COCOMAPS με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που καταγράφει.

Παράμετροι ΑSA	Αποτέλεσμα
Θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του $Ca^{2+}/CaM - \pi \epsilon \pi \tau$ ίδιο B (Å ²)	3056.0
Θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του Ca ²⁺ /CaM – πεπτίδιο B (%)	24.34
Περιοχή διεπιφάνειας (Ų)	1528.0
Περιοχή διεπιφάνειας CaM (%)	14.82
Περιοχή διεπιφάνειας Πεπτιδίου Β (%)	68.00
Πολική θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του $Ca^{2+}/CaM - \pi$ επτίδιο B (Å ²)	2458.5
Πολική διεπιφάνεια (%)	80.45
Πολική περιοχή διεπιφάνειας (Ų)	1229.25
Μη πολική θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του $Ca^{2+}/CaM - \pi \epsilon \pi \tau$ ίδιο B (Å ²)	597.5
Μη πολική διεπιφάνεια (%)	19.55
Μη πολική περιοχή διεπιφάνειας (Ų)	298.75
Κατάλοιπα στη διεπιφάνεια (συνολικός αριθμός)	66
Κατάλοιπα στη διεπιφάνεια της CaM	47
Κατάλοιπα στη διεπιφάνεια του πεπτιδίου Β	19

Συμπεραίνεται λοιπόν πως 47 κατάλοιπα της επιφάνειας της CaM, αλληλεπιδρούν με 19 κατάλοιπα του πεπτιδίου B (όσα είναι και το πεπτίδιο), ενώ το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας αλληλεπίδρασης είναι πολικό (2458.5 Å²).

Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο F

Πίνακας 22: Αποτελέσματα των ειδών των αλληλεπιδράσεων στην περιοχή πρόσδεσης της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο F. Περιέχει αναλυτικά το είδος των αλληλεπιδράσεων που καταγράφονται στα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής αυτής μαζί με τον αντίστοιχο αριθμό που εντοπιζει το COCOMAPS.

Αλληλεπιδράσεις	Αριθμος Αλληλεπιδράσεων
Αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα της Ca ²⁺ /CaM	99
Αλληλεπιδρώντα κατάλοιπα πεπτιδίου F	17
Αλληλεπίδραση Υδροφιλικών - Υδροφοβικών καταλοίπων	228
Αλληλεπίδραση Υδροφιλικών - Υδροφιλικών καταλοίπων	83
Αλληλεπίδραση Υδροφοβικών - Υδροφοβικών καταλοίπων	115

Πίνακας 23: Αποτελέσματα ανάλυσης των παραμέτρων ASA (solvent accessible surface area, επιφάνεια προσβάσιμη στο διαλύτη) για το σύμπλοκο Ca²⁺/CaM – πεπτίδιο F. Περιέχει πληροφορίες για όλες τις παραμέτρους ASA, για τις οποίες πραγματοποιεί ανάλυση το COCOMAPS με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που καταγράφει.

Παράμετροι ΑSA	Αποτέλεσμα
Θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του $Ca^{2+}/CaM - \pi \epsilon \pi \tau$ ίδιο F (Å ²)	2804.2
Θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του $Ca^{2+}/CaM - \pi$ επτίδιο B (%)	23.01
Περιοχή διεπιφάνειας (Ų)	1402.1
Περιοχή διεπιφάνειας CaM (%)	13.98
Περιοχή διεπιφάνειας Πεπτιδίου F (%)	65.02
Πολική θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του $Ca^{2+}/CaM - \pi$ επτίδιο F (Å ²)	2165.2
Πολική διεπιφάνεια (%)	77.21
Πολική περιοχή διεπιφάνειας (Ų)	1082.6
Μη πολική θαμμένη κάτω από την επιφάνεια του $Ca^{2+}/CaM - \pi$ επτίδιο F (Å ²)	639.0
Μη πολική διεπιφάνεια (%)	22.79
Μη πολική περιοχή διεπιφάνειας (Ų)	319.5
Κατάλοιπα στη διεπιφάνεια (συνολικός αριθμός)	63
Κατάλοιπα στη διεπιφάνεια της CaM	46
Κατάλοιπα στη διεπιφάνεια του πεπτιδίου F	17

Τελικώς, στην αλληλεπίδραση $Ca^{2+}/CaM - \pi \epsilon \pi \tau$ ίδιο F, **46** κατάλοιπα της επιφάνειας της CaM, αλληλεπιδρούν με **17** κατάλοιπα του πεπτιδίου F (όσα είναι και το πεπτίδιο), ενώ το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας αλληλεπίδρασης είναι πολικό (**2165.2** Å²).

3.5 <u>Αποτελέσματα μεταλλαγμάτων της Ca²⁺/CaM</u>

Τελικό βήμα της παρούσας εργασίας υπήρξε η μελέτη των μεταλλαγμάτων της Ca²⁺/CaM, που έχουν βρεθεί μέχρι και σήμερα να επηρεάζουν τη μη φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα RyR2 με αποτελέσματα την εμφάνιση σοβαρών αρρυθμιών μέχρι και καρδιακή ανεπάρκεια σε νεαρούς κυρίως ασθενείς. Για το σκοπό αυτό, όπως αναλύθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο επιλέχθηκαν δύο στερεοδιατάξεις της Ca²⁺/CaM, μία ανοιχτή με κωδικό PDB: **1CLL** και μία κλειστή δομή με κωδικό PDB: **2WEL** (η δομή πρότυπο που προέκυψε από την ανάλυση clustering, χωρίς το πεπτίδιο). Τα αποτελέσματα δίνονται συνολικά, με υπέρθεση δομών για κάθε μία από τις πρωτεΐνες που πραγματοποιείται μετάλλαξη, με σκοπό την απόδοση πιθανών αλλαγών στη στερεοδιάταξη της Ca²⁺/CaM, με έμφαση κυρίως στα σημεία πρόσδεσης του Ca²⁺. Έπειτα ακολουθεί ανάλυση της κάθε στερεοδιάταξης με σκοπό τον υπολογισμό της διαφοράς της ελεύθερης ενέργειας για κάθε μετάλλαξη της Ca²⁺/CaM και εξαγωγή συμπεράσματος από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα πειραματικά, προσδιορισμένων με βιοφυσικές μεθόδους.

3.5.1 Δομικές μελέτες μεταλλαγμάτων της Ca²⁺/CaM

Αφού πραγματοποιήθηκε ενεργειακή ελαχιστοποιήση σε κάθε στερεοδιάταξη της Ca²⁺/CaM που υπέστη μεταλλαξογένεση, το πλήθος των συνολικών δομών συγκρίθηκαν με αυτή της αγρίου τύπου για εξαγωγή συμπερασμάτων.

≻ 1CLL





Εικόνα 83: Αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών των 17 σημειακών μεταλλάξεων που προκλήθηκαν στη 1CLL με την αγρίου τύπου 1CLL. Δίνεται έμφαση στα 4 EF-hand μοτίβα της ανοιχτής στερεοδιάταξης της Ca²⁺/CaM, στα οποία παρατηρείται έντονη μετατόπιση σε κάθε μετάλλαξη της περιοχής δέσμευσης του Ca²⁺. Σχεδόν κανένα Ca²⁺, δεν εντοπίζεται στην ίδια θέση πρόσδεσης μετά την εφαρμογή έστω και μίας σημειακής μετάλλαξης στην CaM (σενάριο 1°). Στην υπόλοιπη στερεοδιάταξη της Ca²⁺/CaM, δεν εντοπίζονται ιδιαίτερες αλλαγές, καθώς το «καλούπι» της διατηρείται.

≻ 2WEL





Εικόνα 84: Αποτέλεσμα υπέρθεσης δομών των 17 σημειακών μεταλλάξεων που προκλήθηκαν στη 2WEL με την αγρίου τύπου 2WEL. Δίνεται έμφαση στα 4 EF-hand μοτίβα της ανοιχτής στερεοδιάταξης της Ca²⁺/CaM από την οποία έχει αφαιρεθεί το πεπτίδιο με το οποίο αλληλεπιδρά και παρατηρείται σχετικά μικρότερη μετατόπιση σε κάθε μετάλλαξη της περιοχής δέσμευσης του Ca²⁺, συγκριτικά με τα σημεία πρόσδεσης της ανοιχτής στερεοδιάταξής της. Παρατηρείται πως η κεντρική κοιλότητα σχηματισμού της Ca²⁺/CaM διατηρείται, υποδηλώνοντας πως οι μεταλλάξεις της Ca²⁺/CaM, δεν μπορούν να επηρεάσουν την πρόσδεση βιομορίων και ειδικότερα του ανθρώπινου υποδοχέα RyR2 (σενάριο 2°).

Η δομική πληροφορία που λαμβάνεται παραπάνω, παρατηρείται πως συμβαδίζει με τις πρόσφατες βιοφυσικές μελέτες που δείχνουν πως τα μεταλλάγματα της CaM, επηρεάζουν την πρόσδεση του ασβεστίου (Crotti et al., 2013; Nomikos et al., 2014; Makita et al., 2014; Søndergaard et al., 2015), καθώς οι ματαλλάξεις αυτές εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε κατάλοιπα εντός των περιοχών των EF-hand μοτίβων της CaM, όπως έχει αναλυθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο. Συνήθως οι μεταλλάξεις που προκαλούν αρκετά μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης με Ca^{2+} έγουν συνδεθεί με LQTS (LQTS-CaMs) φαινότυπους. Αντίθετα, τα μεταλλάγματα της CaM που σχετίζονται με CPVT (CPVT-CaMs) έχουν φυσιολογική ή μέτρια συγγένεια με Ca²⁺ και εμφανίζουν αυθόρμητα κύματα Ca²⁺ και αυθόρμητη δραστηριότητα σπινθήρων, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάρκεια ανοίγματος του καναλιού RyR2. Παρατηρείται, πως η στερεοδιάταξη της 2WEL, έπειτα από την εφαρμογή της μεταλλαξογένεσης δεν έχει επηρεαστεί καθόλου, υποδηλώνοντας πως η πρόσδεση του RyR2 μπορεί να πραγματοποιηθεί κανονικά σε όλες τις περιπτώσεις. Δίνεται λοιπόν μία πρώτη εικόνα της επίδρασης όλων των μεταλλάξεων της CaM που έχουν καταγραφεί μέχρι και σήμερα, σε δύο στερεοδιατάξεις της (ανοιχτή- κλειστή δομή). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν επηρρεάζουν σημαντικά τη διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης με τον RyR2, αλλα αντίθετα έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στις θέσεις δέσμευσης Ca²⁺, μεταβάλλοντας τις σχετικές αποστάσεις σημαντικών καταλοίπων αλληλεπίδρασης και κατά συνέπεια και τη συγγένειά τους για τα ιόντα. Η αλλαγή αυτή της συγγένειας για τα Ca^{2+} οδηγεί και σε διαφορετικούς χρόνους απόκρισης της CaM σε αλλαγές στη [Ca²⁺], με μεγάλη πιθανότητα να απορρυθμίσει τον καλά συγχρονισμένο κύκλο καρδιακής συστολής-διαστολής. Με βάση τα παραπάνω δομικά δεδομένα, αυτός είναι και ο πιθανότερος μοριακός μηγανισμός σύμφωνα με τον οποίο μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κατάλοιπα της CaM μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση διαφόρων τύπων αρρυθμιών που μέγρι πρόσφατα γαρακτηρίζονταν ως αγνώστου αιτιολογίας.

3.5.2 Υπολογισμός ΔΔG

Για τον υπολογισμό της διαφοράς της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των μεταλλαγμάτων της Ca²⁺/CaM και της αγρίου τύπου Ca²⁺/CaM, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψή της μέσω του server iStable. Τα αποτελέσματα για τη κάθε δομή που χρησιμοποιήθηκε δίνονται σε μορφή πινάκων και για τις 17 σημειακές μεταλλάξεις.

> 1CLL

Πίνακας 24: Αποτελέσματα πρόβλεψης ΔΔG για κάθε μετάλλαξη της Ca²⁺/CaM στην 1CLL. Περιέχει τη μετάλλαξη κάθε φορά που πραγματοποίειται, τα αποτελέσματα των ενσωματωμένων εργαλείων που περιέχει ο iStable, με τη μορφή (+): αύξηση του ΔΔG, (-): μείωση του ΔΔG, null δε βρέθηκε κανένα αποτέλεσμα με το συγκεκριμένο εργαλείο και τέλος δίνεται το τελικό αποτέλεσμα πρόβλεψης του ΔΔG (kcal/mol), από όλα τα αποτελέσματα που έχουν συγκεντρωθεί.

Μετάλλαξη	i-Mutant 2.0 (PDB)	i-Mutant 2.0 (SEQ)	AUTO- MUTE SVM	AUTO- MUTE RF	MUpro	PopMuSiC	CUPSAT	iStable
N54I	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	null	null	(+)
	0.69	null	-0.38	-0.18	_	null	null	0.542702
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
F90L	-0.95	-1.28	-0.72	-0.91		null	null	-0.704435
DOCH	(-)	null	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
D96H	-0.68	-0.97	-1.48	0.27	_	null	null	-0.656496
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
D96V	-0.27	-0.51	-1.48	0.07	_	null	null	-0.392981

	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	null	null	(+)
N98I	-0.36	0.78	-0.82	0.67		null	null	0.222206
	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	null	null	(-)
N98S	-0.92	-0.79	-0.47	-0.26		null	null	-0.568934
	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	null	null	(+)
A103V	0.41	0.21	0.27	0.22				0 165545
	-0.41	-0.31	-0.57	0.22	-		11U11 av11	0.105545
E105A	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.77	-0.83	0.43	-0.54	-	null	null	-0.235887
D130C	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
D130G	-0.67	-0.97	-2.03	-1.06	_	null	null	-0.89135
D122E	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
DISZE	-0.11	-0.13	-3.62	-0.21	_	null	null	-0.900252
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
D132H	-0.10	null	-2.62	-0.19		null	null	-0.612177
	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
D132V	0.08	-0.11	-2.86	-0.21			null	-0 560734
	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	null	null	(-)
D134H								
	-0.61	-0.82	-0.12	-0.62	-	null	null	-0.28774
0136D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
Q1501	-1.30	-0.95	-1.05	0.38	_	null	null	-0.94372
E141C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
£141G	-1.02	-1.15	-0.10	-0.71	_	null	null	-0.564137
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
E141K	-0.78	-0.53	0.59	-1.06	_	null	null	-0.230627
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
F142L	-0.86	-1.03	-0.11	-1 23				-0 493622
	0.00	1.05	0.11	1.40	=	nun	nun	-0.7/3022

≻ 2WEL

Πίνακας 25: Αποτελέσματα πρόβλεψης ΔΔG για κάθε μετάλλαξη της Ca²⁺/CaM στην 2WEL. Περιέχει τη μετάλλαξη κάθε φορά που πραγματοποίειται, τα αποτελέσματα των ενσωματωμένων εργαλείων που περιέχει ο iStable, με τη μορφή (+): αύξηση του ΔΔG, (-): μείωση του ΔΔG, null δε βρέθηκε κανένα αποτέλεσμα με το συγκεκριμένο εργαλείο και τέλος δίνεται το τελικό αποτέλεσμα πρόβλεψης του ΔΔG (kcal/mol), από όλα τα αποτελέσματα που έχουν συγκεντρωθεί.

Μετάλλαξη	i-Mutant 2.0 (PDB)	i-Mutant 2.0 (SEQ)	AUTO- MUTE SVM	AUTO- MUTE RF	MUpro	PopMuSiC	CUPSAT	iStable
N54I	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	null	null	(+)
	0.86	1.74	-0.50	-0.18	_	null	null	0.632263
F90L	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.89	-1.28	-0.60	-0.87	-	null	null	-0.628133
D96H	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.55	-0.97	-1.77	-0.65	-	null	null	-0.711351
D96V	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.23	-0.51	-1.89	-0.73	-	null	null	-0.533632
N98I	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	null	null	(+)
	-0.26	null	-0.21	0.67	-	null	null	0.0108974
N98S	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.88	-0.79	0.10	-0.26	-	null	null	-0.382939
A103V	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	null	null	(+)
	-0.52	-0.31	-0.21	-0.39	-	null	null	0.234739
E105A	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	null	null	(+)
	-0.90	-0.83	-0.29	-0.43	-	null	null	0.516719
D130G	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.66	-0.97	-1.25	-1.15	-	null	null	-0.672704
D132E	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.06	-0.13	-1.56	-0.36	-	null	null	-0.301229
D132H	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.12	-0.32	-1.34	-0.38	-	null	null	-0.282248
D132V	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.03	-0.11	-1.44	-0.40	-	null	null	-0.250173
D134H	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	null	null	(-)
	-0.59	-0.82	0.37	-0.59	-	null	null	-0.135495

	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
Q136P	-1.34	-0.95	-1.06	0.38	_	null	null	-0.97327
F1410	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
E14IG	-1.10	-1.15	0.52	-0.81	_	null	null	-0.451052
F1 41 17	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	null	null	(-)
E141K	-0.88	-0.53	1.29	-1.15	_	null	null	-0.107911
F1/17I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	null	null	(-)
F 144L	-0.98	-1.03	-0.67	-1.36	_	null	null	-0.738927

Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με δεδομένα από πειράματα φθορισμού κατά τη χημική μετουσιώση αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών CaM που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος (Nomikos et al. 2014). Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι η επίδραση των μεταλλάξεων στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου είναι πολύ μικρή (<0.6 kcal/mol). Αυτή η μικρή μεταβολή δε θεωρείται αρκετα σημαντική ώστε να επηρεάσει το ενεργειακό φράγμα μεταξύ λειτουργικών και μη-λειτουργικών πρωτεΐνικών διαμορφώσεων. Άρα η παρουσία των μεταλλάξεων δεν επηρρεάζει ουσιαστικά τη θερμοδυναμική σταθερότητα των μορίων (σενάριο 3°).

Ι . Συμπεράσματα

Ένας από τους πιο συχνούς λόγους νοσηλείας για ασθενείς άνω των 65 ετών στο δυτικό πολιτισμό αφορά την καρδιακή ανεπάρκεια, με συχνότητα εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό 2%. Μελέτες των τελευταίων ετών, συσχετίζουν διάφορες μορφές καρδιακής ανεπάρκειας με τη μη-φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου-2, **RyR2**. O RyR2, ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων ρυανοδίνης (Ryanodine Receptors) και αποτελούν εξειδικευμένα κανάλια που ρυθμίζουν την απελεύθερωση Ca^{2+} από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα. Η ισομορφή τύπου 2 του RyR2, απαντάται κυρίως στον καρδιακό μυϊκό ιστό συμμετέχοντας ενεργά στο μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-διαστολής (ECC) της καρδιας (Otsu et al. 1990). Κατά τη διάρκεια ενός παλμού επομένως, εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα των καρδιακών κυττάρων μία σημαντική ποσότητα Ca^{2+} , από τον εξωκυττάριο χώρο και από το ΣΔ μέσω του RyR2, με αποτέλεσμα να αυξάνεται έως και 10 φορές τοπικά η συγκέντρωση του Ca^{2+} και έτσι να ενεργοποιείται η μυϊκή συστολή της καρδιάς μέσω του συμπλέγματος ακίνης-μυοσίνης των μυοϊνιδίων (D. M. Bers, 2002).

Οι RyRs αποτελούνται από **τέσσερα** μονομερή (MB μονομερούς: ~565 kDa) τα οποία αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν ένα λειτουργικό κανάλι απελευθέρωσης Ca²⁺ (MB: ~2.3 MDa) σε σχήμα **μανιταριού**, καθιστώντας τους υποδοχείς αυτούς το μεγαλύτερο γνωστό πρωτεϊνικό κανάλι Ca²⁺ (F. A. Lai et al. 1989). Τα τέσσερα αυτά μονομερή, περιβάλλουν έναν κεντρικό διαμεμβρανικό πόρο (καρβοζυτελικό άκρο) και αποτελούν την κυτταροπλασματική περιοχή, η οποία αποκαλείται και "πόδι" (the foot) και αποτελεί μία μεγάλη περιοχή με κοιλότητες και μικρο-δομές που διευκολύνουν την **αλληλεπίδραση** με διαλύτες, μικρά μόρια και πρωτεΐνες-ρυθμιστές (αμινοτελικό άκρο).

Μία από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη λειτουργία των RyRs και συγκεκριμένα του RyR2, είναι η καλμοδουλίνη (CaM). Αποτελεί μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών που δεσμεύουν ασβέστιο, εξού και θεωρείται αγγελιοφόρος πρωτεΐνη. Αποτελεί μία υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη όσον αφορά την αμινοξική της ακολουθία με περίπου 149 αμινοξικά κατάλοιπα κατά μέσο όρο. Στους ανώτερους οργανισμούς η CaM κωδικοποιείται από 3 μη αλληλόμορφα γονίδια (CALM1, CALM2 και CALM3) τα οποία μοιράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και κωδικοποιούν μία πανομοιότυπη πρωτεΐνη. Από δομικής πλευράς, αποτελείται από 2 συμμετρικούς σφαιρικούς domains (περιοχές, αμινο- και καρβοξυτελικές περιοχές), καθένας από τους οποίους αποτελείται από 2 μοτίβα EF-hand, συνολικά επομένως 4 EF-hand μοτίβα. Κάθε μοτίβο αποτελείται από δύο α-έλικες και ένα βρόγχο, ο οποίος αποτελείται από 12 αμινοξικά κατάλοιπα, 5 από τα οποία συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση Ca²⁺ μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, επομένως κάθε μοτίβο δεσμεύει και από ένα Ca²⁺. Συγκεκριμένα, οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων αυτών πρέπει να περιέχουν ένα ατόμο O2 (προτίμηση σε Glu ή Asp), όπου με μόρια Η2Ο δημιουργούν ένα έντονο ηλεκτροστατικό πεδίο, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση με Ca^{2+} , ενώ έχει βρεθεί πως το 6° αμινοξύ στο βρόγχο θα πρέπει να είναι Gly, καθώς η πλευρική αλυσίδα οποιουδήποτε άλλου καταλοίπου θα παρεμπόδιζε τη χαρακτηριστική αυτή δομή του μοτίβου. Βάσει της λυμένης κρυσταλλογραφικής δομής της CaM, έγει βρεθεί πως η CaM υιοθετεί μία στερεοδιάταξη τύπου αλτήρα (dumbbell) με τους δύο λοβούς (domains) να συνδέονται μέσω μίας εύκαμπτης α-έλικας. Αυτή η στεροδιάταξη είναι που προσδίδει μεγάλη ευελιξία στον κύριο ανθρακικό σκελετό της CaM, με αποτελέσμα να υιοθετεί τελικά κυρίως **3** διαφορετικές στερεοδιατάξεις, αρχικά με το αν αλληλεπιδρά με ασβέστιο ή οχι (Ca^{2+}/CaM ή apo-CaM αντίστοιχα) και με τη δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με μία πληθώρα πρωτεϊνών (περισσότερες από 30) (Chin & Means, 2000). Το ασβέστιο στην CaM αλληλεπιδρά με μεγαλύτερη συγγένεια στο αμινοτελικό λοβό (Kd περίπου 10 μM) συγκριτικά με το καρβοζυτελικό λοβό (Kd περίπου 1 μM), με αποτέλεσμα η πρόσδεσή του να προκαλεί μεγαλύτερη στερεοδιατακτική αλλαγή στον αμινοτελικό λοβό (ελαφρύ ξεδίπλωμα), ενώ ο καρβοξυτελικός είναι πιο διατηρημένος δομικά.

Η CaM αλληλεπιδρά άμεσα με τα κανάλια του υποδοχέα RyR2 τόσο απουσία όσο και παρουσία Ca²⁺ με συγκέντρωση της τάξης μM και στοιχειομετρία **4** μόρια CaM ανά τετραμερές. Παρουσία Ca²⁺ σε υψηλές συγκεντρώσεις (της τάξης των sub-mM έως μM), αλλα και παρουσία συγκεντρώσεων της τάξης των nM, η πρόσδεση της CaM συνδέεται με την **αναστολή** του RyR2. Επίσης υπάρχουν ερευνητές που υποστηρίζουν ότι η CaM σε υψηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺ παρεμποδίζει τον RyR2, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺ (τάξης 100 nM, apo-CaM) δεν επιφέρει καμία επίδραση στη λειτουργία του RyR2 (Fruen et al. 2000). Εξαιτίας της ανασταλτικής της δράσης στη ρύθμιση του RyR2, η CaM εμπλέκεται στον τερματισμό απελευθέρωσης Ca²⁺ από το ΣΔ κατά τη διάρκεια του **καρδιακού παλμού**. Προκειμένου να επέλθει η χαλάρωση του καρδιακού μυ, απαιτείται ο τερματισμός της δημιουργίας σπινθήρων Ca²⁺, στη διάρκεια του μηχανισμού αυτού, με μείωση της

συγκέντρωσης Ca²⁺ στο ΣΔ εντός ενός ορίου, που ονομάζεται <u>όριο τερματισμού</u> (Domeier, Blatter, & Zima, 2009).

Από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί πως μεταλλάξεις της CaM που εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή των EF-hand μοτίβων της πρωτεΐνης, αποτρέπουν την πρόσδεση ασβεστίου κυρίως στο C-λοβό, με αποτέλεσμα να καθυστερείται ο τερματισμός απελευθέρωσης Ca²⁺ (μειώση ορίου τερματισμού), ο RyR2 να εμφανίζεται ασυνήθιστα ενεργός και να εμφανίζεται τελικά, μειώμένη ικανότητα κολπικής συστολής, ακανόνιστη συστολή ή/και ανεπιθύμητη ηλεκτρική δραστηριότητα με ταυτόχρονη εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων (Fischer, Maier, & Sossalla, 2013). Από το 2013 και έπειτα, έχουν εντοπιστεί σε νεαρούς ασθενείς μεταλλάξεις στα γονίδια της CaM, οι οποίες παρουσιάζουν παθολογικούς φαινοτύπους και συγκεκριμένα διάφορες μορφές καρδιακών διαταραχών όπως είναι το **CPVT** (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia), **LQTS** (long QT-syndrome) και το **IVF** (idiopathic ventricular fibrillation) (Crotti et al. 2013; Makita et al. 2014; Marsman et al. 2014; Nyegaard et al. 2012).

Ο τρόπος με τον οποίο ο RyR2 ρυθμίζεται από την CaM, δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός, γεγονός που οφείλεται στην έλλειψη δομικής πληροφορίας για τον υποδοχέα. Από παλαιότερες μελέτες για τον αντίστοιχο υποδογέα των σκελετικών μυοκυττάρων RyR1 (~70% ομολογία με τον RyR2 σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής), βρέθηκαν 2 περιοχές που αλληλεπιδρούν με την CaM: η αα 3614-3643, γνωστή και ως CaMBD (CaM-binding domain) και η 4064-4210, γνωστή και ως CaMLD (CaM like domain). Αντίστοιγα στον RyR2, η περιογή 3583-3603, εμφανίζει πολύ υψηλή ομολογία με την αντίστοιγη CaMBD του RyR1 και βάσει ερευνών με μεταλλάξεις κρίσιμων καταλοίπων στην περιοχή αυτή, έχει βρεθεί να αναστέλλεται η αλληλεπίδραση CaM-RyR2, όπως ακριβώς με τον RyR1, υποδηλώνοντας ότι η περιοχή 3583-3603 αποτελεί την αντίστοιχη CaMBD περιοχή του RyR2. Εξαιτίας της υψηλής ομολογίας σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής που εμφανίζουν αυτές οι δύο περιογές διευκολύνεται η μελέτη του RyR2 και μέσω υπαρκτών συμπερασμάτων από βιοφυσικές και βιογημικές μελέτες του RyR1. Πλέον υπάρχει διαθέσιμη δομική πληροφορία, μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, για το σύμπλοκο $Ca^{2+}/CaM-RyR1_{3614-3643}$, που αποδεικνύει ότι το πεπτίδιο προσδένεται αντιπαράλληλα στην Ca^{2+}/CaM , χωρίς να έρχονται σε επαφή οι δύο λοβοί κατά την αλληλεπίδραση, ενώ ο καρβοξυτελικός λοβός της Ca²⁺/CaM αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το πεπτίδιο από ό,τι ο αμινοτελικός λοβός, ο οποίος μπορεί και να απουσιάζει για να πραγματοποιήθει η αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο, αλλοιώνοντας όμως έτσι την επιθυμητή βιολογική δράση του συμπλόκου (Maximciuc et al. 2006).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία με σκοπό τη μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του RyR2 από την CaM και την ανάγκη δομικής πληροφορίας για τον τρόπο αλληλεπίδρασης, εξετάστηκε μία επιπλέον περιοχή του RyR2, εκτός της CaMBD, που μέσω βιοφυσικών πειραμάτων υπήρχαν ενδείξεις ότι εμπλέκεται στην πρόσδεση της CaM στον υποδοχέα RyR2. Τέλος, μελετέθηκε η επίδραση όλων των γνωστών μέχρι τώρα μεταλλαγμάτων της CaM σε **2** στερεοδιατάξεις της Ca²⁺/CaM, με έμφαση κυρίως στα σημεία πρόσδεσης του ασβεστίου.

Για το σκοπό της *in silico* μελέτης της αλληλεπίδρασης Ca²⁺/CaM- RyR2, υπήρξε η ανάγκη εύρεσης μίας δομής προτύπου της Ca²⁺/CaM και της de novo σύνθεσης των επιθυμητών πεπτιδίων του RyR2 που έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με την CaM από πειράματα με βιοφυσικές τεχνικές. Η «μέση» δομή της Ca²⁺/CaM (υιοθετεί μία κλειστή στερεοδιάταξη – ύπαρξη κοιλότητας), βρέθηκε μέσω ανάλυσης clustering από ένα μοντέλο 61 δομικά στοιχισμένων πρωτεΐνων Ca²⁺/CaM που αλληλεπιδρούν είτε με πεπτίδια, είτε με πρωτεΐνες τα οποία έχουν αφαιρεθεί από το τελικό μοντέλο. Το σύνολο δεδομένων που αναλύθηκε προέκυψε από τη βιολογική βάση δεδομένων για στοιχεία τριτοταγούς δομής πρωτεϊνών, PDB, ενώ στο τελικό μοντέλο επικρατέστερες στερεοδιατάξεις της Ca²⁺/CaM, υπήρξαν αυτές με την κλειστή δομή – σχηματισμός κοιλότητας στο κέντρο της και της ανοιχτής δομής με σχεδόν εντελώς ξεδιπλωμένη τη αμινοτελική περιοχή. Παρόλο που η δεύτερη στερεοδιάταξη (βάσει και του κρυσταλλομένου συμπλόκου Ca²⁺/CaM- RyR1₃₆₁₄₋₃₆₄₃), είναι γνωστό πως δεν είναι η επιθυμητή συμπεριλήφθηκε στο μοντέλο και ως ένας εσωτερικός έλεγχος των αποτελεσμάτων του clustering. Παρόλα αυτά, πρωταρχικό βήμα της παρούσας εργασίας, υπήρξε η απόδειξη της συμφωνίας των βιολογικών δεδομένων πως η CaM αποτελεί μία αρκετά συντηρημένη πρωτεΐνη, μέσω πολλαπλής στοίχισης ενός συνόλου αμινοξικών ακολουθιών που απομονώθηκαν από πλήθος οργανισμών. Το σύνολο δεδομένων συλαλαλέχθηκε από τη βιολογική βάση δεδομένων τως η CaM αποτελεί μία αρκετά συντηρημένη πρωτεΐνη, μέσω πολλαπλής στοίχισης ενός συνόλου αμινοξικών ακολουθιών που απομονώθηκαν από πλήθος οργανισμών. Το σύνολο δεδομές των πρωτεϊνών.

Πράγματι, η ανάλυση του clustering είχε τα επιθυμητά αναμενόμενα αποτελέσματα, καταλήγοντας στην ύπαρξη 2 ομαδών • cluster₁: 54 δομές και ▲ cluster₂: 7 δομές, με την πρώτη ομάδα να αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο σύνολο, των κλειστών στερεοδιατάξεων που επιλέχθηκαν και τη δεύτερη, τις ανοιχτές

στερεοδιατάξεις. Τελικά, έπειτα και από μεθόδους επαλήθευσης της ανάλυσης clustering και λόγω του βιολογικού ενδιαφέροντος της μελέτης της αλληλεπίδρασης της Ca²⁺/CaM με τον RyR2, επιλέγεται η κλειστού τύπου στερεοδιάταξη της CaM με κωδικό PDB: **2WEL**. Όλες οι λυμένες δομές που βρέθηκαν καταχωρημένες στη βάση δεδομένων, μελετήθηκαν λεπτομερώς, ενώ σημειώνεται πως κατά την υπέρθεσή τους, το μεγαλύτερο σύνολο αυτών παρουσίαζαν υψηλή δομική συντήρηση στο καρβοξυτελικό λοβό σε σχέση με τον αμινοτελικό, ο οποίος κάθε φορά παρουσίαζε είτε έντονο είτε ελαφρύ ξεδίπλωμα κατά την αλληλεπίδραση της CaM με κάποιο άλλο βιομόριο, γεγονός που έρχεται σε **συμφωνία** και με τα βιολογικά δεδομένα των στερεοδιατάξεων της CaM κατά την πρόσδεση των Ca²⁺.

Για τη σύνθεση των υπό μελέτη πεπτιδίων του RyR2, **B** και **F**, χρησιμοποιήθηκε ένα από τα πιο σύγχρονα εργαλεία *de novo* σύνθεσης πεπτιδίων, το **PEP-FOLD**. Τα αποτελέσματα στη σύνθεση των πεπτιδίων ήρθαν σε πλήρη συμφωνία με τη χρήση αλγορίθμου πρόγνωσης δευτοταγούς δομής, τον **PSIPRED**, αποκαλύπτωνας πεπτίδια που διπλώνονται σε όλο το μήκος της αμινοξικής τους ακολουθίας σε **α-έλικα**. Για τον εσωτερικό έλεγχο του βήματος της αλληλεπίδρασης, συντίθεται και ένα **control** πεπτίδιο βάσει της αμινοξικής ακολουθίας του αντίστοιχου κρυσταλλικού πεπτιδίου που αλληλεπιδρά η CaM από το σύμπλοκο της 2WEL.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης επιλέχθηκαν τελικά και μέσα από σύγκριση επιδόσεων (αποτελέσματα GOLD), τελευταίας τεχνολογίας εργαλεία τα οποία κάθε χρόνο έρχονται πρώτα στις επιδόσεις στο διαγωνισμό CAPRI. Με την επιλογή του ClusPro, μελετάται η αλληλεπίδραση Ca²⁺/CaM- RyR2 μέσω docking, αποκαλύπτωντας πως τόσο το control δείγμα, όσο και τα πεπτίδια B και F αλληλεπίδρούν ισχυρά με την Ca²⁺/CaM, καθώς προσδένονται στο εσωτερικό της κοιλότητάς της, συμβαδίζοντας με τα πειραματικά αποτελέσματα από την κρυσταλλική δομή της Ca²⁺/CaM- RyR1₃₆₁₄₋₃₆₄₃, χωρίς να έρχονται σε επαφή οι δύο λοβοί της CaM. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και από το λογισμικό GOLD, του οποίου τα αποτελέσματα τελικά δεν χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση, καθώς προϋπέθετε τον εξαρχής ορισμό μίας περιοχής πρόσδεσης αναφοράς. Το ClusPro με τη σειρά του, κατά την επεξεργασία του docking και στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων, αγνοεί στα μοντέλα την ύπαρξη ετεροατόμων όπως είναι το Ca²⁺ στη συγκεκριμένη περίπτωση, ενώ για την εύρεση του καλύτερου μοντέλου για κάθε σύμπλοκο που μελετάται, χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο το μεγέθους του cluster που συνιστούν και οι ίδιοι οι δημιουργοί του εργαλείου. Με βάση αυτό το κριτήριο τελικά επιλέγονται **3** μοντέλα για τα σύμπλοκα:

- Ca^{2+}/CaM και control πεπτίδιο
- Ca^{2+}/CaM και πεπτίδιο B
- Ca^{2+}/CaM και πεπτίδιο F

Για κάθε ένα μοντέλο που επιλέχθηκε, για το κάθε σύμπλοκο πραγματοποιήθηκε ανάλυση μέσω του **PepFlexDock** με σκοπό να βρεθεί η καλύτερη δυνατή **στερεοδιάταξη** του πεπτιδίου που προσδένετει στην Ca²⁺/CaM. Λαμβάνεται για κάθε σύμπλοκο ένα σύνολο των καλύτερων **10** στερεοδιατάξεων, όπου μέσω της συνάρτησης βαθμολόγησης του **CONSRank**, επιλέγεται το καλύτερο μοντέλο. Έχοντας καταλήξει σε **1** τελική δομή για κάθε υπό μελέτη σύμπλοκο, πραγματοποιείται ανάλυση μέσω του **COCOMAPS**, με σκοπό τη μελέτη της επιφάνειας των δύο αλληλεπιδρώντων μορίων και την εξαγωγή ποσοτικών αποτελεσμάτων των παραμέτρων **ASA** (solvent accessible surface area, επιφάνεια προσβάσιμη στο διαλύτη).

Τελευταίο βήμα της παρούσας εργασίας υπήρξε η μελέτη των **17 μεταλλαγμάτων** της CaM, που έχουν βρεθεί μέχρι και σημέρα να συνδέονται με διάφορες μορφές καρδιακών διαταραχών (CPVT, LQTS και το IVF), και υπάρχει η πιθανότητα να επηρεάζουν διαφορετικά κάθε φορά είτε το βαθμό συγγένειας πρόσδεσης των ιόντων Ca²⁺ στο μόριο της CaM, είτε το βαθμό συγγέγενειας της CaM στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα RyR2, είτε τελικά τη θερμοσταθερότητα του συμπλόκου CaM/RyR2. Για το σκοπό αυτό και υπό την κατεύθυνση και άλλων βιβλιογραφικών μελετών επιλέχθηκαν **2** στερεοδιατάξεις της CaM, μία **ανοιχτή** (συνδεδεμένη CaM με Ca²⁺, κωδικός PDB: **1CLL**), για τη μελέτη του αρχικού σεναρίου και μία **κλειστή** (αλληλεπίδραση CaM με πεπτίδιο-εμφάνιση κοιλότητας, κωδικός PDB: **2WEL**), για τη μελέτη του δεύτερου πιθανού σεναρίου. Οι μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν μέσω του **MOE**, ήταν <u>σημειακές</u>, ενώ έπειτα κάθε δομή υπέστει ενεργειακή ελαχιστοποίηση μέσω του ενεργειακού πεδίου **Amber 10: EHT**, με σκοπό να βρεθεί η πιο σταθερή κατάσταση της δομής αυτής. Τα αποτελέσματα και για τις 2 στερεοδιατάξεις δόθηκαν με υπέρθεση δομών, συγκρίνοντας το σύνολο των μεταλλαγμάτων της CaM με τη στερεοδιατάξεις που δείχουν πως τα μεταλλαγμάτα της CaM με τη στερεοδιατάξεις δόθηκαν με υπέρθεση δομών, συγκρίνοντας το σύνολο των μεταλλαγμάτων της CaM με τη στερεοδιατάξεις που δείχουν πως τα μεταλλάγματα της CaM επηρεάζουν την πρόσδεση του ασβεστίου. Το τελικό αποτελέσμα της μεταλλαξογένεσης στην **1CLL**, προδίδει

μειωμένη συγγένια πρόσδεσης με Ca^{2+} , καθώς όλα τα ασβέστια που εντοπίζονται εντός των περιοχών των EFhand είναι μετατοπισμένα. Αντίθετα, το αποτελέσμα της επίδρασης στην 2WEL, προδίδει φυσιολογική ή μέτρια συγγένεια με Ca^{2+} , που συνεπάγεται με εμφάνιση αυθόρμητων κυμάτων Ca^{2+} και αυθόρμητη δραστηριότητα σπινθήρων, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάρκεια ανοίγματος του καναλιού RyR2 και την **αυξημένη** συγγένεια δέσμευσης με τον **RyR2**, καθώς παρατηρείται εμφάνώς μικρότερη μετατόπιση των Ca^{2+} στα EF-hand μοτίβα συγκριτικά με την 1CLL, ενώ η κεντρική κοιλότητα σχηματισμού που επιτρέπει τη πρόσδεση του πεπτιδίου, δεν επηρεάστηκε καθόλου.

Βάσει και των αποτελεσμάτων των σημειακών μεταλλάξεων στην CaM, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σταθερότητας της δομής που έχει υποστεί μετάλλαξη, μέσω του υπολογισμού της διαφοράς της ελεύθερης ενεργείας $\Delta \Delta G$ ($\Delta \Delta G = \Delta G_{WT} - \Delta G_{MT}$), από τον server **iStable**, για τη μελέτη του τρίτου πιθανού σεναρίου. Από τα αποτελέσματα λαμβάνονται, μία τελική τιμή για την ελεύθερη ενέργεια καθώς και ένα συμπέρασμα για το αν αυξήθηκε ή μειώθηκε η ενέργεια έπειτα από την επίδραση της μετάλλαξης ερμηνεύοντας αντίστοιχα την επίδρασή της στη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης.

Έτσι λοιπόν, αποκτάται πλέον δομική πληροφορία και μια πρώτη κατανόηση του μηγανισμού αλληλεπίδρασης της CaM με πεπτίδια του υποδογέα RyR2, που θέτουν τη βάση περαιτέρω μελέτης και ανάλυσης. Από την άλλη πλευρά, η δομική πληροφορία που λαμβάνεται από τα πειράματα μεταλλαξογένεσης, παρατηρείται πως συμβαδίζει με τις πρόσφατες βιοφυσικές μελέτες που δείγνουν πως τα μεταλλάγματα της CaM, επηρεάζουν την πρόσδεση του ασβεστίου καθώς οι ματαλλάξεις αυτές εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε κατάλοιπα εντός των περιοχών των EF-hand μοτίβων της CaM, όπως έχει ήδη αναλυθεί – επιβεβαίωση 1^{ου} σεναρίου (στερεοδιάταξη 1CLL). Αντίθετα η στερεοδιάταξη της 2WEL, έπειτα από την εφαρμογή της μεταλλαξογένεσης, δεν έγει επηρεαστεί καθόλου, υποδηλώνοντας πως η πρόσδεση του RyR2 μπορεί να πραγματοποιηθεί κανονικά σε όλες τις περιπτώσεις - απόρριψη 2^{ου} σεναρίου. Από τα αποτελέσματα της μελέτης της θερμοσταθερότητας για τις δύο στερεοδιατάξεις της CaM, παρατηρήθηκε μικρή επίδραση σε αυτή, της τάξης των <0.6 kcal/mol, αποτελέσματα που συμβαδίζουν και με δεδομένα από πειράματα φθορισμού κατά τη χημική μετουσιώση αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών CaM, που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος. Αυτή η μικρή μεταβολή δε θεωρείται αρκετα σημαντική ώστε να επηρεάσει το ενεργειακό φράγμα μεταξύ λειτουργικών και μη-λειτουργικών πρωτεΐνικών διαμορφώσεων. Άρα η παρουσία των μεταλλάξεων δεν επηρρεάζει ουσιαστικά τη θερμοδυναμική σταθερότητα των μορίων απόρριψη 3^{ου} σεναρίου. Δίνεται λοιπόν μία πρώτη εικόνα της επίδρασης όλων των μεταλλάξεων της CaM που έχουν καταγραφεί μέχρι και σήμερα, σε δύο στερεοδιατάξεις της (ανοιχτή- κλειστή δομή). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν επηρρεάζουν σημαντικά τη διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης με τον RyR2, αλλα αντίθετα έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στις θέσεις δέσμευσης Ca^{2+} , μεταβάλλοντας τις σχετικές αποστάσεις σημαντικών καταλοίπων αλληλεπίδρασης και κατά συνέπεια και τη συγγένειά τους για τα ιόντα. Η αλλαγή αυτή της συγγένειας για τα Ca^{2+} οδηγεί και σε διαφορετικούς χρόνους απόκρισης της CaM σε αλλαγές στη $[Ca^{2+}]$, με μεγάλη πιθανότητα να απορρυθμίσει τον καλά συγχρονισμένο κύκλο καρδιακής συστολής-διαστολής. Με βάση τα παραπάνω δομικά δεδομένα, αυτός είναι και ο πιθανότερος μοριακός μηγανισμός σύμφωνα με τον οποίο μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κατάλοιπα της CaM μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση διαφόρων τύπων αρρυθμιών που μέχρι πρόσφατα χαρακτηρίζονταν ως αγνώστου αιτιολογίας.
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

αα	Αμινοξική ακολουθία
Å	Ångström
Apo-CaM	Apo-Calmodulin
ATP	Adenosin triphosphate
AVRD	Arrhythmogenic right ventricular dysplasia
CaM	Calmodulin
CaMBD	Calmodulin-binding domain
CaMLD	Calmodulin-like domain
CaV _{1.1}	Long-lasting Calcium Channels
CCD	Central Core Disease
CBD	Calcium Binding Domain
CICR	Ca ²⁺ -επαγόμενη απελευθέρωση Ca ²⁺
CPVT	Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
CRAC	Ca ²⁺ - Release Activated Ca ²⁺ Channels
Cryo-EM	Cryo-electron microscopy
C-terminal	Καρβοξυ-τελικό άκρο
DHPR	Dihydropyridine receptors
ECC	Excitation-contraction coupling
ECG	Electrocardiography
ER	Endoplasmic reticulum
GA	Genetic Algorithm
HF	Heart Failure
ICa-L	Long-lasting Calcium Channels
InsP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
IVF	Idiopathic ventricular fibrillation
LQTS	Long-QT syndrome
MC	Monte Carlo
MCU	Mitochondrial Ca ²⁺ Uniporter
MD	Molecular Dynamics
MH	Malignant Hyperthermia
MT	Mutant Type
MW	Molecular Weight
NCX	Sodium-calcium exchanger
NTD	N-terminal domains
N-terminal	Αμινο-τελικό άκρο
PCMA	Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RyR	Ryanodine Receptor
SBDD	Structure Based Drug Design
SECRA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SOCC	Store Operated Calcium Channels
SPCA	Secretory Pathway Ca ²⁺ ATPase
SR	Sarcoplasmic reticulum
	Transmembrane
TRPC	Transient Receptor Potential Channels
VOCCs	Voltage-Operated Calcium Channels

V. Βιβλιογραφία

- Ahern, Gerard P., Pauline R. Junankar, and Angela F. Dulhunty. 1994. "Single Channel Activity of the Ryanodine Receptor Calcium Release Channel Is Modulated by FK-506." *FEBS Letters* 352 (3): 369–374.
- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs." Nucleic Acids Research 25 (17): 3389–3402.
- Amador, F. J., S. Liu, N. Ishiyama, M. J. Plevin, A. Wilson, D. H. MacLennan, and M. Ikura. 2009. "Crystal Structure of Type I Ryanodine Receptor Amino-Terminal -Trefoil Domain Reveals a Disease-Associated Mutation 'Hot Spot' Loop." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (27): 11040–44. https://doi.org/10.1073/pnas.0905186106.
- Bähler, Martin, and Allen Rhoads. 2002. "Calmodulin Signaling via the IQ Motif." *FEBS Letters* 513 (1): 107–13. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03239-2.
- Balbes, Lisa M., S. Wayne Mascarella, and Donald B. Boyds. 1994. "A Perspective of Modern Methods in Computer-Aided Drugc Design." *Reviews in Computational Chemistry*, 337–379.
- Balshaw, David M., Le Xu, Naohiro Yamaguchi, Daniel A. Pasek, and Gerhard Meissner. 2001. "Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor)." *Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 20144–53. https://doi.org/10.1074/jbc.M010771200.
- Bateman, Alex, Maria Jesus Martin, Claire O'Donovan, Michele Magrane, Emanuele Alpi, Ricardo Antunes, Benoit Bely, et al. 2017. "UniProt: The Universal Protein Knowledgebase." *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D158–69. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099.
- Baughman, Joshua M., Fabiana Perocchi, Hany S. Girgis, Molly Plovanich, Casey A. Belcher-Timme, Yasemin Sancak, X. Robert Bao, Laura Strittmatter, Olga Goldberger, and Roman L. Bogorad. 2011. "Integrative Genomics Identifies MCU as an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter." *Nature* 476 (7360): 341.
- Belevych, Andriy E., Przemysław B. Radwański, Cynthia A. Carnes, and Sandor Györke. 2013. "Ryanopathy': Causes and Manifestations of RyR2 Dysfunction in Heart Failure." *Cardiovascular Research* 98 (2): 240– 47. https://doi.org/10.1093/cvr/cvt024.
- Benzaquen, Laura R., Carlo Brugnara, H. Randolph Byers, Sebastiano Gattoni-Celli, and José A. Halperin. 1995. "Clotrimazole Inhibits Cell Proliferation in Vitro and in Vivo." *Nature Medicine* 1 (6): 534–540.
- Berchtold, M. W., R. Egli, J. A. Rhyner, H. Hameister, and E. E. Strehler. 1993. "Localization of the Human Bona Fide Calmodulin Genes CALM1, CALM2, and CALM3 to Chromosomes 14q24-Q31, 2p21. 1-P21. 3, and 19q13. 2-Q13. 3." *Genomics* 16 (2): 461–465.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne. 2006. "The Protein Data Bank, 1999–." In *International Tables for Crystallography Volume F: Crystallography of Biological Macromolecules*, 675–84. International Tables for Crystallography. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1107/97809553602060000722.
- Berridge, M J. 1997. "Elementary and Global Aspects of Calcium Signalling." *The Journal of Physiology* 499 (2): 291–306. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021927.
- Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, and Peter Lipp. 1998. "Calcium-a Life and Death Signal." *Nature* 395 (6703): 645.
- Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, and H. Llewelyn Roderick. 2003. "Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling: Calcium." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (7): 517–29. https://doi.org/10.1038/nrm1155.
- Berridge, Michael J., Peter Lipp, and Martin D. Bootman. 2000. "The Versatility and Universality of Calcium Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (1): 11–21. https://doi.org/10.1038/35036035.
- Bers, D. 2004. "Macromolecular Complexes Regulating Cardiac Ryanodine Receptor Function." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (2): 417–29. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.026.
- Bers, Donald M. 2001. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2. ed. DICM 237. Dordrecht: Kluwer.
- Bers, Donald M. 2002. "Cardiac Excitation-Contraction Coupling" 415: 8.
- Bertolino, M, and R R Llinas. 1992. "The Central Role of Voltage-Activated and Receptor-Operated Calcium Channels in Neuronal Cells." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32 (1): 399–421. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.32.040192.002151.

- Blaustein, Mordecai P., and W. Jonathan Lederer. 1999. "Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications." *Physiological Reviews* 79 (3): 763–854.
- Blayney, Lynda M., and F. Anthony Lai. 2009. "Ryanodine Receptor-Mediated Arrhythmias and Sudden Cardiac Death." *Pharmacology & Therapeutics* 123 (2): 151–177.
- Bonvin, Alexandre MJJ. 2006. "Flexible Protein–Protein Docking." *Current Opinion in Structural Biology* 16 (2): 194–200.
- Bosanac, Ivan, Jean-René Alattia, Tapas K. Mal, Jenny Chan, Susanna Talarico, Frances K. Tong, Kit I. Tong, Fumio Yoshikawa, Teiichi Furuichi, and Miwako Iwai. 2002. "Structure of the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor Binding Core in Complex with Its Ligand." *Nature* 420 (6916): 696.
- Bosanac, Ivan, Haruka Yamazaki, Toru Matsu-ura, Takayuki Michikawa, Katsuhiko Mikoshiba, and Mitsuhiko Ikura. 2005. "Crystal Structure of the Ligand Binding Suppressor Domain of Type 1 Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor." *Molecular Cell* 17 (2): 193–203.
- Boulware, Michael J., and Jonathan S. Marchant. 2008. "Timing in Cellular Ca2+ Signaling." *Current Biology* 18 (17): R769–R776.
- Branden, Carl Ivar, and JohnTooze. 1999. Introduction to Protein Structure. Garland Science.
- Brandt, NeilR, AnthonyH Caswell, Tara Brandt, Keith Brew, and RonaldL Mellgren. 1992. "Mapping of the Calpain Proteolysis Products of the Junctional Foot Protein of the Skeletal Muscle Triad Junction." *The Journal of Membrane Biology* 127 (1). https://doi.org/10.1007/BF00232756.
- Brini, Marisa, and Ernesto Carafoli. 2009. "Calcium Pumps in Health and Disease." *Physiological Reviews* 89 (4): 1341–78. https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2008.
- Brooks, Bernard R., Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. a Swaminathan, and Martin Karplus. 1983. "CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations." *Journal of Computational Chemistry* 4 (2): 187–217.
- Buratti, Roberta, Gianfranco Prestipino, Paola Menegazzi, Susan Treves, and Francesco Zorzato. 1995. "Calcium-Dependent Activation of Skeletal-Muscle Ca2+ Release Channel (Ryanodine Receptor) by Calmodulin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 213 (3): 1082–1090.
- Buschmeier, Barbel, H. E. Meyer, and G. W. Mayr. 1987. "Characterization of the Calmodulin-Binding Sites of Muscle Phosphofructokinase and Comparison with Known Calmodulin-Binding Domains." *Journal of Biological Chemistry* 262 (20): 9454–9462.
- Camproux, A. C, R Gautier, and P Tufféry. 2004. "A Hidden Markov Model Derived Structural Alphabet for Proteins." *Journal of Molecular Biology* 339 (3): 591–605. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.005.
- Capriotti, Emidio, Piero Fariselli, and Rita Casadio. 2004. "A Neural-Network-Based Method for Predicting Protein Stability Changes upon Single Point Mutations." *Bioinformatics* 20 (suppl_1): i63–i68.
- Capriotti, Emidio, Piero Fariselli, and Rita Casadio. 2005. "I-Mutant2. 0: Predicting Stability Changes upon Mutation from the Protein Sequence or Structure." *Nucleic Acids Research* 33 (suppl_2): W306–W310.
- Carafoli, Ernesto. 2003. "The Calcium-Signalling Saga: Tap Water and Protein Crystals." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (4): 326–32. https://doi.org/10.1038/nrm1073.
- Carafoli, Ernesto, and Joachim Krebs. 2016. "Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator." *Journal of Biological Chemistry* 291 (40): 20849–57. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.735894.
- Case, David A., Tom A. Darden, TE 3rd Cheatham, Carlos L. Simmerling, Junmei Wang, Robert E. Duke, Ray Luo, MRCW Crowley, Ross C. Walker, and Wei Zhang. 2008. "Amber 10." University of California.
- Chagot, Benjamin, and Walter J. Chazin. 2011. "Solution NMR Structure of Apo-Calmodulin in Complex with the IQ Motif of Human Cardiac Sodium Channel NaV1. 5." *Journal of Molecular Biology* 406 (1): 106–119.
- Chattopadhyaya, Rajagopal, William E. Meador, Anthony R. Means, and Florante A. Quiocho. 1992. "Calmodulin Structure Refined at 1.7 \AA Resolution." *Journal of Molecular Biology* 228 (4): 1177–1192.
- Chen, Chi-Wei, Jerome Lin, and Yen-Wei Chu. 2013. "IStable: Off-the-Shelf Predictor Integration for Predicting Protein Stability Changes," 14.
- Chen, S. R., and David H. MacLennan. 1994. "Identification of Calmodulin-, Ca (2+)-, and Ruthenium Red-Binding Domains in the Ca2+ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum." *Journal of Biological Chemistry* 269 (36): 22698–22704.

- Cheng, H., M. R. Lederer, R.-P. Xiao, A. M. Gomez, Y.-Y. Zhou, B. Ziman, H. Spurgeon, E. G. Lakatta, and W. J. Lederer. 1996. "Excitation-Contraction Coupling in Heart: New Insights from Ca2+ Sparks." *Cell Calcium* 20 (2): 129–140.
- Chermak, Edrisse, Andrea Petta, Luigi Serra, Anna Vangone, Vittorio Scarano, Luigi Cavallo, and Romina Oliva. 2015. "CONSRANK: A Server for the Analysis, Comparison and Ranking of Docking Models Based on Inter-Residue Contacts." *Bioinformatics* 31 (9): 1481–83. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu837.
- Chin, David, and Anthony R. Means. 2000. "Calmodulin: A Prototypical Calcium Sensor." *Trends in Cell Biology* 10 (8): 322–328.
- Chuang, Gwo-Yu, Dima Kozakov, Ryan Brenke, Stephen R. Comeau, and Sandor Vajda. 2008. "DARS (Decoys As the Reference State) Potentials for Protein-Protein Docking." *Biophysical Journal* 95 (9): 4217–4227.
- Clamp, Michele, James Cuff, Stephen M. Searle, and Geoffrey J. Barton. 2004. "The Jalview Java Alignment Editor." *Bioinformatics* 20 (3): 426–27. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg430.
- Clapham, David E. 2007. "Calcium Signaling." Cell 131 (6): 1047–1058.
- Comeau, Stephen R., David W. Gatchell, Sandor Vajda, and Carlos J. Camacho. 2004. "ClusPro: An Automated Docking and Discrimination Method for the Prediction of Protein Complexes." *Bioinformatics* 20 (1): 45–50.
- Connolly, Michael L. 1983a. "Analytical Molecular Surface Calculation." *Journal of Applied Crystallography* 16 (5): 548–558.
- Connolly, Michael L. 1983b. "Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic Acids." *Science* 221 (4612): 709–713.
- Cordeiro, Jonathan M., Guillermo J. Perez, Nicole Schmitt, Ryan Pfeiffer, Vladislav V. Nesterenko, Elena Burashnikov, Christian Veltmann, et al. 2010. "Overlapping LQT1 and LQT2 Phenotype in a Patient with Long QT Syndrome Associated with Loss-of-Function Variations in KCNQ1 and KCNH2." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88 (12): 1181–90. https://doi.org/10.1139/Y10-094.
- Crick, Francis HC. 1953. "The Packing of α-Helices: Simple Coiled-Coils." *Acta Crystallographica* 6 (8–9): 689–697.
- Cross, Jason B., David C. Thompson, Brajesh K. Rai, J. Christian Baber, Kristi Yi Fan, Yongbo Hu, and Christine Humblet. 2009. "Comparison of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy." *Journal of Chemical Information and Modeling* 49 (6): 1455–74. https://doi.org/10.1021/ci900056c.
- Crotti, L., C. N. Johnson, E. Graf, G. M. De Ferrari, B. F. Cuneo, M. Ovadia, J. Papagiannis, et al. 2013. "Calmodulin Mutations Associated With Recurrent Cardiac Arrest in Infants." *Circulation* 127 (9): 1009– 17. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001216.
- De Stefani, Diego, Anna Raffaello, Enrico Teardo, Ildikò Szabò, and Rosario Rizzuto. 2011. "A Forty-Kilodalton Protein of the Inner Membrane Is the Mitochondrial Calcium Uniporter." *Nature* 476 (7360): 336.
- DesJarlais, Renee L., Robert P. Sheridan, J. Scott Dixon, Irwin D. Kuntz, and R. Venkataraghavan. 1986. "Docking Flexible Ligands to Macromolecular Receptors by Molecular Shape." *Journal of Medicinal Chemistry* 29 (11): 2149–2153.
- DesJarlais, Renee L., Robert P. Sheridan, George L. Seibel, J. Scott Dixon, Irwin D. Kuntz, and R. Venkataraghavan. 1988. "Using Shape Complementarity as an Initial Screen in Designing Ligands for a Receptor Binding Site of Known Three-Dimensional Structure." *Journal of Medicinal Chemistry* 31 (4): 722–729.
- Dobrev, Dobromir, Leif Carlsson, and Stanley Nattel. 2012. "Novel Molecular Targets for Atrial Fibrillation Therapy." *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (4): 275–91. https://doi.org/10.1038/nrd3682.
- Domeier, Timothy L., Lothar A. Blatter, and Aleksey V. Zima. 2009. "Alteration of Sarcoplasmic Reticulum Ca ²⁺ Release Termination by Ryanodine Receptor Sensitization and in Heart Failure: RyR Sensitization Decreases Termination Threshold of Ca ²⁺ Release." *The Journal of Physiology* 587 (21): 5197–5209. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.177576.
- Du, Guo Guang, Bimal Sandhu, Vijay K. Khanna, Xing Hua Guo, and David H. MacLennan. 2002. "Topology of the Ca2+ Release Channel of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum (RyR1)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (26): 16725–16730.
- Dunteman, George H. 1989. Principal Components Analysis. 69. Sage.

- Efremov, Rouslan G., Alexander Leitner, Ruedi Aebersold, and Stefan Raunser. 2015. "Architecture and Conformational Switch Mechanism of the Ryanodine Receptor." *Nature* 517 (7532): 39–43. https://doi.org/10.1038/nature13916.
- Eisner, David. 2014. "Calcium in the Heart: From Physiology to Disease: Calcium in the Heart: From Physiology to Disease." *Experimental Physiology* 99 (10): 1273–82. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.077305.
- El-Hayek, Roque, and Noriaki Ikemoto. 1998. "Identification of the Minimum Essential Region in the II-III Loop of the Dihydropyridine Receptor A1 Subunit Required for Activation of Skeletal Muscle-Type Excitation-Contraction Coupling." *Biochemistry* 37 (19): 7015–7020.
- Fabiato, A. 1985. "Simulated Calcium Current Can Both Cause Calcium Loading in and Trigger Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum of a Skinned Canine Cardiac Purkinje Cell." *The Journal of General Physiology* 85 (2): 291–320. https://doi.org/10.1085/jgp.85.2.291.
- Fan, Guizhen, Matthew L. Baker, Zhao Wang, Mariah R. Baker, Pavel A. Sinyagovskiy, Wah Chiu, Steven J. Ludtke, and Irina I. Serysheva. 2015. "Gating Machinery of InsP 3 R Channels Revealed by Electron Cryomicroscopy." *Nature* 527 (7578): 336.
- Feng, Wei, Jiancheng Tu, Tianzhong Yang, Patty S. Vernon, Paul D. Allen, Paul F. Worley, and Isaac N. Pessah. 2002. "Homer Regulates Gain of Ryanodine Receptor Type 1 Channel Complex." *Journal of Biological Chemistry*.
- Ferguson, Donald G., Harry W. Schwartz, and Clara Franzini-Armstrong. 1984. "Subunit Structure of Junctional Feet in Triads of Skeletal Muscle: A Freeze-Drying, Rotary-Shadowing Study." *The Journal of Cell Biology* 99 (5): 1735–1742.
- Fernández-Velasco, María, Angélica Rueda, Nicoletta Rizzi, Jean-Pierre Benitah, Barbara Colombi, Carlo Napolitano, Silvia G. Priori, Sylvain Richard, and Ana María Gómez. 2009. "Increased Ca2+ Sensitivity of the Ryanodine Receptor Mutant RyR2R4496C Underlies Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia." *Circulation Research* 104 (2): 201–209.
- Fill, Michael, and Julio A. Copello. 2002. "Ryanodine Receptor Calcium Release Channels." *Physiological Reviews* 82 (4): 893–922. https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2002.
- Fischer, Daniel, Shuo Liang Lin, Haim L. Wolfson, and Ruth Nussinov. 1995. "A Geometry-Based Suite of Moleculardocking Processes." *Journal of Molecular Biology* 248 (2): 459–477.
- Fischer, Niels, Andrey L. Konevega, Wolfgang Wintermeyer, Marina V. Rodnina, and Holger Stark. 2010. "Ribosome Dynamics and TRNA Movement by Time-Resolved Electron Cryomicroscopy." *Nature* 466 (7304): 329.
- Fischer, Thomas H., Lars S. Maier, and Samuel Sossalla. 2013. "The Ryanodine Receptor Leak: How a Tattered Receptor Plunges the Failing Heart into Crisis." *Heart Failure Reviews* 18 (4): 475–83. https://doi.org/10.1007/s10741-012-9339-6.
- Foyouzi-Youssefi, Reyhaneh, Serge Arnaudeau, Christoph Borner, William L. Kelley, Jürg Tschopp, Daniel P. Lew, Nicolas Demaurex, and Karl-Heinz Krause. 2000. "Bcl-2 Decreases the Free Ca2+ Concentration within the Endoplasmic Reticulum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (11): 5723– 5728.
- Fruen, Bradley R., Jennifer M. Bardy, Todd M. Byrem, Gale M. Strasburg, and Charles F. Louis. 2000. "Differential Ca²⁺ Sensitivity of Skeletal and Cardiac Muscle Ryanodine Receptors in the Presence of Calmodulin." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279 (3): C724–33. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.C724.
- Fruen, Bradley R., James R. Mickelson, and Charles F. Louis. 1997. "Dantrolene Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca2+ Release by Direct and Specific Action at Skeletal Muscle Ryanodine Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 272 (43): 26965–26971.
- Fukuda, Norio, Daisuke Sasaki, Shin'ichi Ishiwata, and Satoshi Kurihara. 2001. "Length Dependence of Tension Generation in Rat Skinned Cardiac Muscle: Role of Titin in the Frank-Starling Mechanism of the Heart." *Circulation* 104 (14): 1639–1645.
- Fukuyama, Megumi, Qi Wang, Koichi Kato, Seiko Ohno, Wei-Guang Ding, Futoshi Toyoda, Hideki Itoh, Hiromi Kimura, Takeru Makiyama, and Makoto Ito. 2014. "Long QT Syndrome Type 8: Novel CACNA1C Mutations Causing QT Prolongation and Variant Phenotypes." *Europace* 16 (12): 1828–1837.

- Furuichi, Teiichi, D. Furutama, Yasuhiro Hakamata, Junichi Nakai, Hiroshi Takeshima, and K. Mikoshiba. 1994. "Multiple Types of Ryanodine Receptor/Ca2+ Release Channels Are Differentially Expressed in Rabbit Brain." *Journal of Neuroscience* 14 (8): 4794–4805.
- Gaburjakova, Marta, Jana Gaburjakova, Steven Reiken, Fannie Huang, Steven O. Marx, Nora Rosemblit, and Andrew R. Marks. 2001. "FKBP12 Binding Modulates Ryanodine Receptor Channel Gating." *Journal of Biological Chemistry*.
- Gama-Carvalho, Margarida, Jorge Andrade, and Luis Brás-Rosário. 2014. "Regulation of Cardiac Cell Fate by MicroRNAs: Implications for Heart Regeneration." *Cells* 3 (4): 996–1026. https://doi.org/10.3390/cells3040996.
- Gangopadhyay, Jaya Pal, and Noriaki Ikemoto. 2006. "Role of the Met3534–Ala4271 Region of the Ryanodine Receptor in the Regulation of Ca2+ Release Induced by Calmodulin Binding Domain Peptide." *Biophysical Journal* 90 (6): 2015–2026.
- Gangopadhyay, Jaya P., and Noriaki Ikemoto. 2008. "Interaction of the Lys ³⁶¹⁴ –Asn ³⁶⁴³ Calmodulin-Binding Domain with the Cys ⁴¹¹⁴ -Asn ⁴¹⁴² Region of the Type 1 Ryanodine Receptor Is Involved in the Mechanism of Ca ²⁺ /Agonist-Induced Channel Activation." *Biochemical Journal* 411 (2): 415–23. https://doi.org/10.1042/BJ20071375.
- Gardiner, Eleanor J., Peter Willett, and Peter J. Artymiuk. 2001. "Protein Docking Using a Genetic Algorithm." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 44 (1): 44–56.
- Germani, Antonia, Giuliana Di Rocco, Federica Limana, Fabio Martelli, and Maurizio C. Capogrossi. 2007. "Molecular Mechanisms of Cardiomyocyte Regeneration and Therapeutic Outlook." *Trends in Molecular Medicine* 13 (3): 125–133.
- Ghosh, Smita, Deborah A. Nunziato, and Geoffrey S. Pitt. 2006. "KCNQ1 Assembly and Function Is Blocked by Long-QT Syndrome Mutations That Disrupt Interaction with Calmodulin." *Circulation Research* 98 (8): 1048–1054.
- Giannini, Giuseppe, Emilio Clementi, Roberta Ceci, Giovanna Marziali, and Vincenzo Sorrentino. 1992. "Expression of a Ryanodine Receptor-Ca2+ Channel That Is Regulated by TGF-Beta." *Science* 257 (5066): 91–94.
- Giannini, Giuseppe, Antonio Conti, Sandra Mammarella, Marina Scrobogna, and Vincenzo Sorrentino. 1995. "The Ryanodine Receptor/Calcium Channel Genes Are Widely and Differentially Expressed in Murine Brain and Peripheral Tissues." *The Journal of Cell Biology* 128 (5): 893–904.
- Godbout, Charles, Lysianne Follonier Castella, Eric A. Smith, Nilesh Talele, Melissa L. Chow, Adriano Garonna, and Boris Hinz. 2013. "The Mechanical Environment Modulates Intracellular Calcium Oscillation Activities of Myofibroblasts." *PLoS One* 8 (5): e64560.
- Gomez-Hurtado, N., D.O. Kryshtal, H.S. Hwang, C.N. Johnson, W.J. Chazin, N.J. Boczek, D.J. Tester, et al. 2014. "CALMODULIN MUTATION (CALM1-E141G) ASSOCIATED WITH LONG QT SYNDROME DISRUPTS CALMODULIN CALCIUM BINDING AND IMPAIRS L-TYPE CA CHANNEL INACTIVATION." *Heart Rhythm* 11 (11): 2135–36. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.09.031.
- Gomez-Hurtado, Nieves, Nicole J. Boczek, Dmytro O. Kryshtal, Christopher N. Johnson, Jennifer Sun, Florentin R. Nitu, Razvan L. Cornea, et al. 2016. "Novel CPVT-Associated Calmodulin Mutation in CALM3 (CALM3-A103V) Activates Arrhythmogenic Ca Waves and Sparks." Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 9 (8): e004161. https://doi.org/10.1161/CIRCEP.116.004161.
- Goodford, Peter J. 1985. "A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules." *Journal of Medicinal Chemistry* 28 (7): 849–857.
- Goodsell, David S., Garrett M. Morris, and Arthur J. Olson. 1996. "Automated Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock." *Journal of Molecular Recognition* 9 (1): 1–5.
- Graupe, Daniel. 2013. Principles of Artificial Neural Networks. Vol. 7. World Scientific.
- Gray, Jeffrey J. 2006. "High-Resolution Protein–Protein Docking." *Current Opinion in Structural Biology* 16 (2): 183–193.
- Groves, Matthew R., and David Barford. 1999. "Topological Characteristics of Helical Repeat Protein." *Current Opinion in Structural Biology* 9 (3): 383–389.

- Gu, Xiaonan, and Nicholas C. Spitzer. 1995. "Distinct Aspects of Neuronal Differentiation Encoded by Frequency of Spontaneous Ca2+ Transients." *Nature* 375 (6534): 784.
- Guerrini, Remo, Paola Menegazzi, Roberto Anacardio, Mauro Marastoni, Roberto Tomatis, Francesco Zorzato, and Susan Treves. 1995. "Calmodulin Binding Sites of the Skeletal, Cardiac, and Brain Ryanodine Receptor Ca2+ Channels: Modulation by the Catalytic Subunit of CAMP-Dependent Protein Kinase?" *Biochemistry* 34 (15): 5120–29. https://doi.org/10.1021/bi00015a024.
- Györke, Inna, Nichole Hester, Larry R. Jones, and Sandor Györke. 2004. "The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium." *Biophysical Journal* 86 (4): 2121–2128.
- Györke, Sandor, and Cynthia Carnes. 2008. "Dysregulated Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release: Potential Pharmacological Target in Cardiac Disease." *Pharmacology & Therapeutics* 119 (3): 340–354.
- Hakamata, Yasuhiro, Junichi Nakai, Hiroshi Takeshima, and Keiji Imoto. 1992. "Primary Structure and Distribution of a Novel Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel from Rabbit Brain." *FEBS Letters* 312 (2–3): 229–235.
- Halperin, Inbal, Buyong Ma, Haim Wolfson, and Ruth Nussinov. 2002. "Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions." *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 47 (4): 409–43. https://doi.org/10.1002/prot.10115.
- Harmat, Veronika, Zsolt Böcskei, Gábor Náray-Szabó, Imre Bata, Andrea S. Csutor, István Hermecz, Péter Arányi, Beáta Szabó, Károly Liliom, and Beáta G. Vértessy. 2000. "A New Potent Calmodulin Antagonist with Arylalkylamine Structure: Crystallographic, Spectroscopic and Functional Studies1." *Journal of Molecular Biology* 297 (3): 747–755.
- Harris, A. S., D. E. Croall, and J. S. Morrow. 1988. "The Calmodulin-Binding Site in Alpha-Fodrin Is near the Calcium-Dependent Protease-I Cleavage Site." *Journal of Biological Chemistry* 263 (30): 15754–15761.
- Hartigan, John A., and Manchek A. Wong. 1979. "Algorithm AS 136: A k-Means Clustering Algorithm." *Journal* of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics) 28 (1): 100–108.
- Henikoff, S., and J. G. Henikoff. 1992. "Amino Acid Substitution Matrices from Protein Blocks." *Proceedings* of the National Academy of Sciences 89 (22): 10915–19. https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10915.
- Hodis, Eran, Jaime Prilusky, Eric Martz, Israel Silman, John Moult, and Joel L. Sussman. 2008. "Proteopedia- a Scientific 'wiki' Bridging the Rift between Three-Dimensional Structure and Function of Biomacromolecules." *Genome Biology* 9 (8): R121. https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r121.
- Hornak, Viktor, Robert Abel, Asim Okur, Bentley Strockbine, Adrian Roitberg, and Carlos Simmerling. 2006.
 "Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65 (3): 712–25. https://doi.org/10.1002/prot.21123.
- Huang, X., Y. Liu, R. Wang, X. Zhong, Y. Liu, A. Koop, S. R. W. Chen, T. Wagenknecht, and Z. Liu. 2013. "Two Potential Calmodulin-Binding Sequences in the Ryanodine Receptor Contribute to a Mobile, Intra-Subunit Calmodulin-Binding Domain." *Journal of Cell Science* 126 (19): 4527–35. https://doi.org/10.1242/jcs.133454.
- Huang, Xiaojun, Bradley Fruen, Dinah T. Farrington, Terence Wagenknecht, and Zheng Liu. 2012. "Calmodulin-Binding Locations on the Skeletal and Cardiac Ryanodine Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 287 (36): 30328–35. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.383109.
- Huang, Zhexue. 1998. "Extensions to the K-Means Algorithm for Clustering Large Data Sets with Categorical Values." *Data Mining and Knowledge Discovery* 2 (3): 283–304. https://doi.org/10.1023/A:1009769707641.
- Hwang, Hyun Seok, Florentin R. Nitu, Yi Yang, Kafa Walweel, Laetitia Pereira, Christopher N. Johnson, Michela Faggioni, et al. 2014. "Divergent Regulation of Ryanodine Receptor 2 Calcium Release Channels by Arrhythmogenic Human Calmodulin Missense MutantsNovelty and Significance." *Circulation Research* 114 (7): 1114–24. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303391.
- Ikemoto, Noriaki, and Takeshi Yamamoto. 2000. "Postulated Role of Inter-Domain Interaction within the Ryanodine Receptor in Ca2+ Channel Regulation." *Trends in Cardiovascular Medicine* 10 (7): 310–316.
- Ikemoto, Noriaki, and Takeshi Yamamoto 2002. "Regulation of Calcium Release by Interdomain Interaction within Ryanodine Receptors." *Front Biosci* 7: d671–d683.

- Ikemoto, Takaaki, M. Iino, and Makoto Endo. 1995. "Enhancing Effect of Calmodulin on Ca (2+)-Induced Ca2+ Release in the Sarcoplasmic Reticulum of Rabbit Skeletal Muscle Fibres." *The Journal of Physiology* 487 (3): 573–582.
- Janssen, Paul M. L. 2010. "Myocardial Contraction-Relaxation Coupling." *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 299 (6): H1741–49. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00759.2010.
- Jayaraman, Thottala, A. M. Brillantes, A. P. Timerman, S. Fleischer, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, and A. R. Marks. 1992. "FK506 Binding Protein Associated with the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor)." *Journal of Biological Chemistry* 267 (14): 9474–9477.
- Jones, Gareth, Peter Willett, and Robert C. Glen. 1995. "Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation." *Journal of Molecular Biology* 245 (1): 43–53.
- Jones, Gareth, Peter Willett, Robert C Glen, Andrew R Leach, and Robin Taylor. 1997. "Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking11Edited by F. E. Cohen." *Journal of Molecular Biology* 267 (3): 727–48. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897.
- Katchalski-Katzir, Ephraim, Isaac Shariv, Miriam Eisenstein, Asher A. Friesem, Claude Aflalo, and Ilya A. Vakser. 1992. "Molecular Surface Recognition: Determination of Geometric Fit between Proteins and Their Ligands by Correlation Techniques." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (6): 2195–2199.
- Knollmann, Björn C., Nagesh Chopra, Thinn Hlaing, Brandy Akin, Tao Yang, Kristen Ettensohn, Barbara EC Knollmann, Kenneth D. Horton, Neil J. Weissman, and Izabela Holinstat. 2006. "Casq2 Deletion Causes Sarcoplasmic Reticulum Volume Increase, Premature Ca 2+ Release, and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (9): 2510–2520.
- Kobe, Bostjan, and Andrey V. Kajava. 2000. "When Protein Folding Is Simplified to Protein Coiling: The Continuum of Solenoid Protein Structures." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (10): 509–515.
- Kozakov, Dima, Ryan Brenke, Stephen R. Comeau, and Sandor Vajda. 2006. "PIPER: An FFT-Based Protein Docking Program with Pairwise Potentials." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65 (2): 392–406.
- Kozakov, Dima, Karl H. Clodfelter, Sandor Vajda, and Carlos J. Camacho. 2005. "Optimal Clustering for Detecting Near-Native Conformations in Protein Docking." *Biophysical Journal* 89 (2): 867–875.
- Kozakov, Dima, David R. Hall, Bing Xia, Kathryn A. Porter, Dzmitry Padhorny, Christine Yueh, Dmitri Beglov, and Sandor Vajda. 2017. "The ClusPro Web Server for Protein–Protein Docking." *Nature Protocols* 12 (2): 255–78. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169.
- Krebs, Joachim. 1981. "A Survey of Structural Studies on Calmodulin." *Cell Calcium* 2 (4): 295–311. https://doi.org/10.1016/0143-4160(81)90022-1.
- Kuboniwa, Hitoshi, Nico Tjandra, Stephan Grzesiek, Hao Ren, Claude B. Klee, and Ad Bax. 1995. "Solution Structure of Calcium-Free Calmodulin." *Nature Structural and Molecular Biology* 2 (9): 768.
- Kuntz, Irwin D., Jeffrey M. Blaney, Stuart J. Oatley, Robert Langridge, and Thomas E. Ferrin. 1982. "A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions." *Journal of Molecular Biology* 161 (2): 269– 288.
- Kuo, Tuan H., Hyeong-Reh Choi Kim, Liping Zhu, Yingjie Yu, Huei-Min Lin, and Wayne Tsang. 1998. "Modulation of Endoplasmic Reticulum Calcium Pump by Bcl-2." *Oncogene* 17 (15): 1903.
- Kuwajima, Goro, Akira Futatsugi, Michio Niinobe, Setsuko Nakanishi, and Katsuhiko Mikoshiba. 1992. "Two Types of Ryanodine Receptors in Mouse Brain: Skeletal Muscle Type Exclusively in Purkinje Cells and Cardiac Muscle Type in Various Neurons." *Neuron* 9 (6): 1133–1142.
- Lai, F. A., MANOJ Misra, Le Xu, H. A. Smith, and G. Meissner. 1989. "The Ryanodine Receptor-Ca2+ Release Channel Complex of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. Evidence for a Cooperatively Coupled, Negatively Charged Homotetramer." *Journal of Biological Chemistry* 264 (28): 16776–16785.
- Lai, F. Aa, M. Dent, C. Wickenden, Le Xu, G. Kumari, M. Misra, H. B. Lee, MADHABANANDA Sar, and G. Meissner. 1992. "Expression of a Cardiac Ca2+-Release Channel Isoform in Mammalian Brain." *Biochemical Journal* 288 (2): 553–564.
- Lamiable, Alexis, Pierre Thévenet, Julien Rey, Marek Vavrusa, Philippe Derreumaux, and Pierre Tufféry. 2016. "PEP-FOLD3: Faster de Novo Structure Prediction for Linear Peptides in Solution and in Complex." Nucleic Acids Research 44 (W1): W449-454. https://doi.org/10.1093/nar/gkw329.

- Lanner, J. T., D. K. Georgiou, A. D. Joshi, and S. L. Hamilton. 2010. "Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a003996–a003996. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996.
- Lau, Kelvin, Mandy M. Y. Chan, and Filip Van Petegem. 2014. "Lobe-Specific Calmodulin Binding to Different Ryanodine Receptor Isoforms." *Biochemistry* 53 (5): 932–46. https://doi.org/10.1021/bi401502x.
- Lau, Kelvin, and Filip Van Petegem. 2014. "Crystal Structures of Wild Type and Disease Mutant Forms of the Ryanodine Receptor SPRY2 Domain." *Nature Communications* 5 (1). https://doi.org/10.1038/ncomms6397.
- Leach, Andrew R., and Irwin D. Kuntz. 1992. "Conformational Analysis of Flexible Ligands in Macromolecular Receptor Sites." *Journal of Computational Chemistry* 13 (6): 730–748.
- Leavitt, Stephanie, and Ernesto Freire. 2001. "Direct Measurement of Protein Binding Energetics by Isothermal Titration Calorimetry." *Current Opinion in Structural Biology* 11 (5): 560–566.
- Lee, Byungkook, and Frederic M. Richards. 1971. "The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility." *Journal of Molecular Biology* 55 (3): 379–IN4.
- Lee, Han Gil, Hara Kang, and Woo Jin Park. 2001. "Interaction of HRC (Histidine-Rich Ca2+-Binding Protein) and Triadin in the Lumen of Sarcoplasmic Reticulum." *Journal of Biological Chemistry* 276 (43): 39533– 39538.
- Lee, Richard H., and George D. Rose. 1985. "Molecular Recognition. I. Automatic Identification of Topographic Surface Features." *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 24 (8): 1613–1627.
- Li, Yanxia, and Donald M. Bers. 2001. "A Cardiac Dihydropyridine Receptor II-III Loop Peptide Inhibits Resting Ca2+ Sparks in Ferret Ventricular Myocytes." *The Journal of Physiology* 537 (1): 17–26.
- Liang, Shide, Dandan Zheng, Chi Zhang, and Daron M. Standley. 2011. "Fast and Accurate Prediction of Protein Side-Chain Conformations." *Bioinformatics* 27 (20): 2913–2914.
- Limpitikul, Worawan B., Ivy E. Dick, Rosy Joshi-Mukherjee, Michael T. Overgaard, Alfred L. George, and David T. Yue. 2014. "Calmodulin Mutations Associated with Long QT Syndrome Prevent Inactivation of Cardiac L-Type Ca2+ Currents and Promote Proarrhythmic Behavior in Ventricular Myocytes." *Journal* of Molecular and Cellular Cardiology 74 (September): 115–24. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.022.
- Lobo, Paolo Antonio, and Filip Van Petegem. 2009. "Crystal Structures of the N-Terminal Domains of Cardiac and Skeletal Muscle Ryanodine Receptors: Insights into Disease Mutations." *Structure* 17 (11): 1505–14. https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.016.
- London, Nir, Barak Raveh, Eyal Cohen, Guy Fathi, and Ora Schueler-Furman. 2011. "Rosetta FlexPepDock Web Server—High Resolution Modeling of Peptide–Protein Interactions." *Nucleic Acids Research* 39 (suppl_2): W249–53. https://doi.org/10.1093/nar/gkr431.
- Lukyanenko, Valeriy, Theodore F. Wiesner, and Sandor Györke. 1998. "Termination of Ca²⁺ Release during Ca ²⁺ Sparks in Rat Ventricular Myocytes." *The Journal of Physiology* 507 (3): 667–77. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.667bs.x.
- Mackrill, John J. 2010. "Ryanodine Receptor Calcium Channels and Their Partners as Drug Targets." *Biochemical Pharmacology* 79 (11): 1535–43. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.014.
- Magi, Simona, Pasqualina Castaldo, Maria Loredana Macrì, Marta Maiolino, Alessandra Matteucci, Guendalina Bastioli, Santo Gratteri, Salvatore Amoroso, and Vincenzo Lariccia. 2016. "Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease." *BioMed Research International* 2016: 1–14. https://doi.org/10.1155/2016/6701324.
- Makita, N., N. Yagihara, L. Crotti, C. N. Johnson, B.-M. Beckmann, M. S. Roh, D. Shigemizu, et al. 2014. "Novel Calmodulin Mutations Associated With Congenital Arrhythmia Susceptibility." *Circulation: Cardiovascular Genetics* 7 (4): 466–74. https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000459.
- Marks, A. R., S. Fleischer, and P. Tempst. 1990. "Surface Topography Analysis of the Ryanodine Receptor/Junctional Channel Complex Based on Proteolysis Sensitivity Mapping." *Journal of Biological Chemistry* 265 (22): 13143–13149.
- Marks, Andrew R., Paul Tempst, Kwang S. Hwang, Mark B. Taubman, Makoto Inui, Christopher Chadwick, Sidney Fleischer, and Bernardo Nadal-Ginard. 1989. "Molecular Cloning and Characterization of the

Ryanodine Receptor/Junctional Channel Complex CDNA from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (22): 8683–8687.

- Marsman, Roos F., Julien Barc, Leander Beekman, Marielle Alders, Dennis Dooijes, Arthur van den Wijngaard, Ilham Ratbi, et al. 2014. "A Mutation in CALM1 Encoding Calmodulin in Familial Idiopathic Ventricular Fibrillation in Childhood and Adolescence." *Journal of the American College of Cardiology* 63 (3): 259– 66. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.07.091.
- Marx, Steven O., Steven Reiken, Yuji Hisamatsu, Marta Gaburjakova, Jana Gaburjakova, Yi-Ming Yang, Nora Rosemblit, and Andrew R. Marks. 2001. "Phosphorylation-Dependent Regulation of Ryanodine Receptors: A Novel Role for Leucine/Isoleucine Zippers." *The Journal of Cell Biology* 153 (4): 699–708.
- Marx, Steven O., Steven Reiken, Yuji Hisamatsu, Thotalla Jayaraman, Daniel Burkhoff, Nora Rosemblit, and Andrew R. Marks. 2000. "PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12. 6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts." *Cell* 101 (4): 365–376.
- Maupetit, J., P. Derreumaux, and P. Tuffery. 2009. "PEP-FOLD: An Online Resource for de Novo Peptide Structure Prediction." *Nucleic Acids Research* 37 (Web Server): W498–503. https://doi.org/10.1093/nar/gkp323.
- Maupetit, Julien, R. Gautier, and Pierre Tuffery. 2006. "SABBAC: Online Structural Alphabet-Based Protein BackBone Reconstruction from Alpha-Carbon Trace." *Nucleic Acids Research* 34 (suppl_2): W147–W151.
- Maximciuc, Adina A., John A. Putkey, Yousif Shamoo, and Kevin R. MacKenzie. 2006. "Complex of Calmodulin with a Ryanodine Receptor Target Reveals a Novel, Flexible Binding Mode." *Structure* 14 (10): 1547–56. https://doi.org/10.1016/j.str.2006.08.011.
- McCarthy, Tommie V., James JA Heffron, and John Mackrill. 2005. "Molecular and Clinical Genetics of RYR1 Disorders." In *Ryanodine Receptors*, 219–227. Springer.
- McGuffin, Liam J., Kevin Bryson, and David T. Jones. 2000. "The PSIPRED Protein Structure Prediction Server." *Bioinformatics* 16 (4): 404–5. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.4.404.
- Menegazzi, Paola, Fulvia Larini, Susan Treves, Remo Guerrini, Manfredo Quadroni, and Francesco Zorzato. 1994. "Identification and Characterization of Three Calmodulin Binding Sites of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor." *Biochemistry* 33 (31): 9078–84. https://doi.org/10.1021/bi00197a008.
- Meng, Xing, Bailong Xiao, Shitian Cai, Xiaojun Huang, Fei Li, Jeff Bolstad, Ramon Trujillo, Judith Airey, SR Wayne Chen, and Terence Wagenknecht. 2007. "Three-Dimensional Localization of Serine 2808, a Phosphorylation Site in Cardiac Ryanodine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 282 (35): 25929– 25939.
- Meyers, Marian B., Virginia M. Pickel, Shey-Shing Sheu, Virendra K. Sharma, Kathleen W. Scotto, and Glenn I. Fishman. 1995. "Association of Sorcin with the Cardiac Ryanodine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 270 (44): 26411–26418.
- Miller, David J. 2004. "Sydney Ringer; Physiological Saline, Calcium and the Contraction of the Heart." *The Journal of Physiology* 555 (3): 585–87. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.060731.
- Mohamed, Tamer MA, Delvac Oceandy, Min Zi, Sukhpal Prehar, Nasser Alatwi, Yanwen Wang, Mohamed A. Shaheen, Riham Abou-Leisa, Celine Schelcher, and Zeinab Hegab. 2011. "Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA4)-Neuronal Nitric-Oxide Synthase Complex Regulates Cardiac Contractility through Modulation of a Compartmentalized Cyclic Nucleotide Microdomain." *Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41520–41529.
- Moore, Catherine Porter, George Rodney, Jia-Zheng Zhang, Lucia Santacruz-Toloza, Gale Strasburg, and Susan L. Hamilton. 1999. "Apocalmodulin and Ca²⁺ Calmodulin Bind to the Same Region on the Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel[†]." *Biochemistry* 38 (26): 8532–37. https://doi.org/10.1021/bi9907431.
- Moore, Catherine Porter, Jia-Zheng Zhang, and Susan L. Hamilton. 1999. "A Role for Cysteine 3635 of RYR1 in Redox Modulation and Calmodulin Binding." *Journal of Biological Chemistry* 274 (52): 36831–34. https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.36831.
- Morris, Garrett M., David S. Goodsell, Robert S. Halliday, Ruth Huey, William E. Hart, Richard K. Belew, and Arthur J. Olson. 1998. "Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function." *Journal of Computational Chemistry* 19 (14): 1639–1662.

- Nakai, Junichi, Toshiaki Imagawa, Yasuhiro Hakamata, Munekazu Shigekawa, Hiroshi Takeshima, and Shosaku Numa. 1990. "Primary Structure and Functional Expression from CDN A of the Cardiac Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel." *FEBS Letters* 271 (1–2): 169–177.
- Nakanishi, Setsuko, Goro Kuwajima, and Katsuhiko Mikoshiba. 1992. "Immunohistochemical Localization of Ryanodine Receptors in Mouse Central Nervous System." *Neuroscience Research* 15 (1–2): 130–142.
- Needleman, Saul B., and Christian D. Wunsch. 1970. "A General Method Applicable to the Search for Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins." *Journal of Molecular Biology* 48 (3): 443–453.
- Neylon, Craig B., Steve M. Richards, Michelle A. Larsen, Alex Agrotis, and Alex Bobik. 1995. "Multiple Types of Ryanodine Receptor/Ca2+ Release Channels Are Expressed in Vascular Smooth Muscle." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215 (3): 814–821.
- Niggli, Ernst. 2009. "How to Shut down Ca²⁺ -Induced Ca²⁺ Release?" *The Journal of Physiology* 587 (21): 5003–4. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.181578.
- Nomikos, Michail, Angelos Thanassoulas, Konrad Beck, Vyronia Vassilakopoulou, Handan Hu, Brian L. Calver, Maria Theodoridou, et al. 2014. "Altered RyR2 Regulation by the Calmodulin F90L Mutation Associated with Idiopathic Ventricular Fibrillation and Early Sudden Cardiac Death." *FEBS Letters* 588 (17): 2898– 2902. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.07.007.
- Norel, Raquel, Shuo L. Lin, Haim J. Wolfson, and Ruth Nussinov. 1994. "Shape Complementarity at Protein– Protein Interfaces." *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 34 (7): 933–940.
- Notredame, Cédric, Desmond G Higgins, and Jaap Heringa. 2000. "T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment11Edited by J. Thornton." *Journal of Molecular Biology* 302 (1): 205–17. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042.
- Nussinov, Ruth, and Haim J. Wolfson. 1991. "Efficient Detection of Three-Dimensional Structural Motifs in Biological Macromolecules by Computer Vision Techniques." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (23): 10495–10499.
- Nyegaard, Mette, Michael T. Overgaard, Mads T. Søndergaard, Marta Vranas, Elijah R. Behr, Lasse L. Hildebrandt, Jacob Lund, et al. 2012. "Mutations in Calmodulin Cause Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death." *The American Journal of Human Genetics* 91 (4): 703–12. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.015.
- Oliva, Romina, Anna Vangone, and Luigi Cavallo. 2013. "Ranking Multiple Docking Solutions Based on the Conservation of Inter-Residue Contacts." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 81 (9): 1571–1584.
- Orrenius, Sten, Boris Zhivotovsky, and Pierluigi Nicotera. 2003. "Calcium: Regulation of Cell Death: The Calcium–Apoptosis Link." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (7): 552.
- Otsu, K., H. F. Willard, V. K. Khanna, F. Zorzato, N. M. Green, and D. H. MacLennan. 1990. "Molecular Cloning of CDNA Encoding the Ca2+ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Cardiac Muscle Sarcoplasmic Reticulum." *Journal of Biological Chemistry* 265 (23): 13472–13483.
- OTTINI, Laura, Giovanna MARZIALI, Antonio CONTI, Alexandra CHARLESWORTH, and Vincenzo SORRENTINO. 1996. "α and β Isoforms of Ryanodine Receptor from Chicken Skeletal Muscle Are the Homologues of Mammalian RyR1 and RyR3." *Biochemical Journal* 315 (1): 207–216.
- Oyamada, Hideto, Takashi Murayama, Tamotsu Takagi, Masamitsu Iino, Naoyuki Iwabe, Takashi Miyata, Yasuo Ogawa, and Makoto Endo. 1994. "Primary Structure and Distribution of Ryanodine-Binding Protein Isoforms of the Bullfrog Skeletal Muscle." *Journal of Biological Chemistry* 269 (25): 17206–17214.
- Pagadala, Nataraj S., Khajamohiddin Syed, and Jack Tuszynski. 2017. "Software for Molecular Docking: A Review." *Biophysical Reviews* 9 (2): 91–102. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1.
- Palma, P. Nuno, Ludwig Krippahl, John E. Wampler, and José JG Moura. 2000. "BiGGER: A New (Soft) Docking Algorithm for Predicting Protein Interactions." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 39 (4): 372–384.
- Perfetto, Livia, Pier Federico Gherardini, Norman E. Davey, Francesca Diella, Manuela Helmer-Citterich, and Gianni Cesareni. 2013. "Exploring the Diversity of SPRY/B30. 2-Mediated Interactions." *Trends in Biochemical Sciences* 38 (1): 38–46.

- Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, and Thomas E. Ferrin. 2004. "UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Journal of Computational Chemistry* 25 (13): 1605–12. https://doi.org/10.1002/jcc.20084.
- Pinton, Paolo, Davide Ferrari, Paulo Magalhães, Klaus Schulze-Osthoff, Francesco Di Virgilio, Tullio Pozzan, and Rosario Rizzuto. 2000. "Reduced Loading of Intracellular Ca2+ Stores and Downregulation of Capacitative Ca2+ Influx in Bcl-2–Overexpressing Cells." *The Journal of Cell Biology* 148 (5): 857–862.
- Pipilas, Daniel C., Christopher N. Johnson, Gregory Webster, Jurg Schlaepfer, Florence Fellmann, Nicole Sekarski, Lisa M. Wren, et al. 2016. "Novel Calmodulin Mutations Associated with Congenital Long QT Syndrome Affect Calcium Current in Human Cardiomyocytes." *Heart Rhythm* 13 (10): 2012–19. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2016.06.038.
- Pogwizd, Steven M., Klaus Schlotthauer, Li Li, Weilong Yuan, and Donald M. Bers. 2001. "Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Heart Failure: Roles of Sodium-Calcium Exchange, Inward Rectifier Potassium Current, and Residual β-Adrenergic Responsiveness." *Circulation Research* 88 (11): 1159– 1167.
- Ponting, Chris P. 2000. "Novel Repeats in Ryanodine and IP3 Receptors and Protein O-Mannosyltransferases." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (2): 47–50.
- Protasi, Feliciano. 2002. "Structural Interaction between RYRs and DHPRs in Calcium Release Units of Cardiac and Skeletal Muscle Cells." *Front Biosci* 7 (1–3): d650.
- Putney Jr, James W. 1986. "A Model for Receptor-Regulated Calcium Entry." Cell Calcium 7 (1): 1-12.
- Radermacher, Michael, Vibha Rao, Robert Grassucci, Joachim Frank, Anthony P. Timerman, Sidney Fleischer, and Terence Wagenknecht. 1994. "Cryo-Electron Microscopy and Three-Dimensional Reconstruction of the Calcium Release Channel/Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle." *The Journal of Cell Biology* 127 (2): 411–423.
- Raveh, Barak, Nir London, and Ora Schueler-Furman. 2010. "Sub-Angstrom Modeling of Complexes between Flexible Peptides and Globular Proteins." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78 (9): 2029–2040.
- Rhoads, A R, and F Friedberg. 1997. "Sequence Motifs for Calmodulin Recognition." *The FASEB Journal* 11 (5): 331–40. https://doi.org/10.1096/fasebj.11.5.9141499.
- Rodney, George G., Jack Krol, Barbara Williams, Kathy Beckingham, and Susan L. Hamilton. 2001. "The Carboxy-Terminal Calcium Binding Sites of Calmodulin Control Calmodulin's Switch from an Activator to an Inhibitor of RYR1." *Biochemistry* 40 (41): 12430–12435.
- Rodney, George G., Catherine Porter Moore, Barbara Y. Williams, Jia-Zheng Zhang, Jack Krol, Steen E. Pedersen, and Susan L. Hamilton. 2001. "Calcium Binding to Calmodulin Leads to an N-Terminal Shift in Its Binding Site on the Ryanodine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 276 (3): 2069–74. https://doi.org/10.1074/jbc.M008891200.
- Rodney, George G., Barbara Y. Williams, Gale M. Strasburg, Kathy Beckingham, and Susan L. Hamilton. 2000. "Regulation of RYR1 Activity by Ca2+ and Calmodulin." *Biochemistry* 39 (26): 7807–7812.
- Rodrigues, João PGLM, and Alexandre MJJ Bonvin. 2014. "Integrative Computational Modeling of Protein Interactions." *The FEBS Journal* 281 (8): 1988–2003.
- Roth, Charles M., Brian L. Neal, and Abraham M. Lenhoff. 1996. "Van Der Waals Interactions Involving Proteins." *Biophysical Journal* 70 (2): 977–987.
- Sahoo, Prasan Kumar, Hiren Kumar Thakkar, and Ming-Yih Lee. 2017. "A Cardiac Early Warning System with Multi Channel SCG and ECG Monitoring for Mobile Health." *Sensors (Basel, Switzerland)* 17 (4). https://doi.org/10.3390/s17040711.
- Samsó, Montserrat, and Terence Wagenknecht. 2002. "Apocalmodulin and Ca2+-Calmodulin Bind to Neighboring Locations on the Ryanodine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 277 (2): 1349–1353.
- Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, and P. Ruth. 2000. "Regulation of Intracellular Calcium by a Signaling Complex of IRAG, IP3 Receptor and CGMP Kinase." *Biophysical Journal* 78 (1): 314A–314A.
- Serysheva, Irina I., Susan L. Hamilton, Wah Chiu, and Steven J. Ludtke. 2005. "Structure of Ca2+ Release Channel at 14 \AA Resolution." *Journal of Molecular Biology* 345 (3): 427–431.

- Shaik, Noor A., Zuhier A. Awan, Prashant K. Verma, Ramu Elango, and Babajan Banaganapalli. 2018. "Protein Phenotype Diagnosis of Autosomal Dominant Calmodulin Mutations Causing Irregular Heart Rhythms." *Journal of Cellular Biochemistry*, June. https://doi.org/10.1002/jcb.26834.
- Sham, J. S., L. Cleemann, and M. Morad. 1995. "Functional Coupling of Ca2+ Channels and Ryanodine Receptors in Cardiac Myocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1): 121–25. https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.121.
- Sharma, Manjuli Rani, Loice H. Jeyakumar, Sidney Fleischer, and Terence Wagenknecht. 2006. "Three-Dimensional Visualization of FKBP12. 6 Binding to an Open Conformation of Cardiac Ryanodine Receptor." *Biophysical Journal* 90 (1): 164–172.
- Sharp, Alan H., Peter S. McPherson, Ted M. Dawson, Chiye Aoki, Kevin P. Campbell, and Solomon H. Snyder. 1993. "Differential Immunohistochemical Localization of Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate-and Ryanodine-Sensitive Ca2+ Release Channels in Rat Brain." *Journal of Neuroscience* 13 (7): 3051–3063.
- Sitsapesan, Rebecca, and Alan J. Williams. 1994. "Gating of the Native and Purified Cardiac SR Ca (2+)-Release Channel with Monovalent Cations as Permeant Species." *Biophysical Journal* 67 (4): 1484.
- Smedler, Erik, and Per Uhlén. 2014. "Frequency Decoding of Calcium Oscillations." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* 1840 (3): 964–69. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.015.
- Smith, Jeffrey S., TOSHIAKI Imagawa, Jianjie Ma, Michael Fill, KEVIN P. Campbell, and Roberto Coronado. 1988. "Purified Ryanodine Receptor from Rabbit Skeletal Muscle Is the Calcium-Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum." *The Journal of General Physiology* 92 (1): 1–26.
- Søndergaard, Mads T., Anders B. Sorensen, Louise L. Skov, Kasper Kjaer-Sorensen, Mikael C. Bauer, Mette Nyegaard, Sara Linse, Claus Oxvig, and Michael T. Overgaard. 2015. "Calmodulin Mutations Causing Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Confer Opposing Functional and Biophysical Molecular Changes." *The FEBS Journal* 282 (4): 803–816.
- Song, Dong Woo, Jung-Gyu Lee, Hyung-Seop Youn, Soo Hyun Eom, and Do Han Kim. 2011. "Ryanodine Receptor Assembly: A Novel Systems Biology Approach to 3D Mapping." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 105 (3): 145–61. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.09.021.
- Sorrentino, Vincenzo, Virginia Barone, and Daniela Rossi. 2000. "Intracellular Ca 2+ Release Channels in Evolution." *Current Opinion in Genetics & Development* 10 (6): 662–667.
- Steinwart, Ingo, and Andreas Christmann. 2008. Support Vector Machines. Springer Science & Business Media.
- Sternberg, Michael JE, Henry A. Gabb, and Richard M. Jackson. 1998. "Predictive Docking of Protein—Protein and Protein—DNA Complexes." *Current Opinion in Structural Biology* 8 (2): 250–256.
- Swindells, Mark B., and Mitsuhiko Ikura. 1996. "Pre-Formation of the Semi-Open Conformation by the Apo-Calmodulin C-Terminal Domain and Implications for Binding IQ-Motifs." *Nature Structural and Molecular Biology* 3 (6): 501.
- Takahashi, Kazuhiro, Taisuke Ishikawa, Naomasa Makita, Kiyotaka Takefuta, Taisuke Nabeshima, and Mami Nakayashiro. 2017. "A Novel de Novo Calmodulin Mutation in a 6-Year-Old Boy Who Experienced an Aborted Cardiac Arrest." *HeartRhythm Case Reports* 3 (1): 69–72. https://doi.org/10.1016/j.hrcr.2016.09.004.
- Takeshima, Hiroshi, Shinji Komazaki, Kenzo Hirose, Miyuki Nishi, Tetsuo Noda, and Masamitsu Iino. 1998. "Embryonic Lethality and Abnormal Cardiac Myocytes in Mice Lacking Ryanodine Receptor Type 2." *The EMBO Journal* 17 (12): 3309–3316.
- Takeshima, Hiroshi, Seiichiro Nishimura, Takeshi Matsumoto, Hiroyuki Ishida, Kenji Kangawa, Naoto Minamino, Hisayuki Matsuo, Masamichi Ueda, Masao Hanaoka, and Tadaaki Hirose. 1989. "Primary Structure and Expression from Complementary DNA of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor." *Nature* 339 (6224): 439.
- Takeshima, Hiroshi, T. Yamazawa, Takaaki Ikemoto, Hiroaki Takekura, Miyuki Nishi, Tetsuo Noda, and M. Iino. 1995. "Ca (2+)-Induced Ca2+ Release in Myocytes from Dyspedic Mice Lacking the Type-1 Ryanodine Receptor." *The EMBO Journal* 14 (13): 2999–3006.
- Taylor, Richard D., Philip J. Jewsbury, and Jonathan W. Essex. 2002. "A Review of Protein-Small Molecule Docking Methods." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 16 (3): 151–166.

- Tian, Xixi, Yijun Tang, Yingjie Liu, Ruiwu Wang, and S. R. Wayne Chen. 2013. "Calmodulin Modulates the Termination Threshold for Cardiac Ryanodine Receptor-Mediated Ca²⁺ Release." *Biochemical Journal* 455 (3): 367–75. https://doi.org/10.1042/BJ20130805.
- Timerman, Anthony P., Thottala Jayaraman, Greg Wiederrecht, Hitoshi Onoue, Andrew R. Marks, and Sidney Fleischer. 1994. "The Ryanodine Receptor from Canine Heart Sarcoplasmic Reticulum Is Associated with a Novel FK-506 Binding Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198 (2): 701–706.
- Totrov, Maxim, and Ruben Abagyan. 1994. "Detailed Ab Initio Prediction of Lysozyme–Antibody Complex with 1.6 \AA Accuracy." *Nature Structural and Molecular Biology* 1 (4): 259.
- Tripathy, Ashutosh, Le Xu, Geoffrey Mann, and Gerhard Meissner. 1995. "Calmodulin Activation and Inhibition of Skeletal Muscle Ca2+ Release Channel (Ryanodine Receptor)." *Biophysical Journal* 69 (1): 106–119.
- Tufty, Robert M., and Robert H. Kretsinger. 1975. "Troponin and Parvalbumin Calcium Binding Regions Predicted in Myosin Light Chain and T4 Lysozyme." *Science* 187 (4172): 167–169.
- Tung, Ching-Chieh, Paolo A. Lobo, Lynn Kimlicka, and Filip Van Petegem. 2010. "The Amino-Terminal Disease Hotspot of Ryanodine Receptors Forms a Cytoplasmic Vestibule." *Nature* 468 (7323): 585.
- Tunwell, Richard EA, Colin Wickenden, Bénédicte MA Bertrand, Valery I. Shevchenko, Martina B. Walsh, Paul D. Allen, and F. Anthony Lai. 1996. "The Human Cardiac Muscle Ryanodine Receptor-Calcium Release Channel: Identification, Primary Structure and Topological Analysis." *Biochemical Journal* 318 (2): 477– 487.
- Van Der Spoel, David, Erik Lindahl, Berk Hess, Gerrit Groenhof, Alan E. Mark, and Herman JC Berendsen. 2005. "GROMACS: Fast, Flexible, and Free." *Journal of Computational Chemistry* 26 (16): 1701–1718.
- Vander Heiden, Matthew G., Navdeep S. Chandel, Edward K. Williamson, Paul T. Schumacker, and Craig B. Thompson. 1997. "Bcl-XL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria." Cell 91 (5): 627–637.
- Vangone, Anna, Romina Oliva, and Luigi Cavallo. 2012. "CONS-COCOMAPS: A Novel Tool to Measure and Visualize the Conservation of Inter-Residue Contacts in Multiple Docking Solutions." BMC Bioinformatics 13 (4): S19. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S4-S19.
- Vangone, Anna, Raffaele Spinelli, Vittorio Scarano, Luigi Cavallo, and Romina Oliva. 2011. "COCOMAPS: A Web Application to Analyze and Visualize Contacts at the Interface of Biomolecular Complexes." *Bioinformatics* 27 (20): 2915–16. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr484.
- Vasington, Frank D., and Jerome V. Murphy. 1962. "Ca++ Uptake by Rat Kidney Mitochondria and Its Dependence on Respiration and Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 237 (8): 2670–2677.
- Velazquez-Campoy, Adrian, Stephanie A. Leavitt, and Ernesto Freire. 2004. "Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry." In *Protein-Protein Interactions*, 35–54. Springer.
- Verdonk, Marcel L., Jason C. Cole, Michael J. Hartshorn, Christopher W. Murray, and Richard D. Taylor. 2003. "Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 52 (4): 609–23. https://doi.org/10.1002/prot.10465.
- Vukcevic, Mirko, Marcus Broman, Gunilla Islander, Mikael Bodelsson, Eva Ranklev-Twetman, Clemens R. Müller, and Susan Treves. 2010. "Functional Properties of RYR1 Mutations Identified in Swedish Patients with Malignant Hyperthermia and Central Core Disease." Anesthesia & Analgesia 111 (1): 185–190.
- Wagenknecht, Terence, Michael Radermacher, Robert Grassucci, Jon Berkowitz, Hong-Bo Xin, and Sidney Fleischer. 1997. "Locations of Calmodulin and FK506-Binding Protein on the Three-Dimensional Architecture of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 272 (51): 32463–32471.
- Wang, Qing, Jiaxiang Shen, Igor Splawski, Donald Atkinson, Zhizhong Li, Jennifer L. Robinson, Arthur J. Moss, Jeffrey A. Towbin, and Mark T. Keating. 1995. "SCN5A Mutations Associated with an Inherited Cardiac Arrhythmia, Long QT Syndrome." Cell 80 (5): 805–811.
- Wang, Ruiwu, Wenqian Chen, Shitian Cai, Jing Zhang, Jeff Bolstad, Terence Wagenknecht, Zheng Liu, and SR Wayne Chen. 2007. "Localization of an NH2-Terminal Disease-Causing Mutation Hot Spot to the 'Clamp' Region in the Three-Dimensional Structure of the Cardiac Ryanodine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 282 (24): 17785–17793.

- Warren, Gregory L., C. Webster Andrews, Anna-Maria Capelli, Brian Clarke, Judith LaLonde, Millard H. Lambert, Mika Lindvall, et al. 2006. "A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions." *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (20): 5912–31. https://doi.org/10.1021/jm050362n.
- Wehrens, XHT, and AR Marks. n.d. "Ryanodine Receptors: Structure, Function and Dysfunction in Clinical Disease (Developments in Cardiovascular Medicine)," 353.
- Wemhöner, Konstantin, Corinna Friedrich, Birgit Stallmeyer, Alison J. Coffey, Andrew Grace, Sven Zumhagen, Guiscard Seebohm, Beatriz Ortiz-Bonnin, Susanne Rinné, and Frank B. Sachse. 2015. "Gain-of-Function Mutations in the Calcium Channel CACNA1C (Cav1. 2) Cause Non-Syndromic Long-QT but Not Timothy Syndrome." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 80: 186–195.
- Wodak, Shoshana J., Marie De Crombrugghe, and Joël Janin. 1987. "Computer Studies of Interactions between Macromolecules." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 49 (1): 29–63.
- Wodak, Shoshana J., and Joël Janin. 1978. "Computer Analysis of Protein-Protein Interaction." Journal of Molecular Biology 124 (2): 323-342.
- Wren, Lisa M., Juan Jimenez-Jaimez, Franck Potet, Christopher N. Johnson, Tatiana V. Abramova, Defne E. Egecioglu, Paul Burridge, Walter Chazin, and Alfred L. George. 2017. Genetic Mosaicism in Calmodulinopathy Associated With a Novel CALM3 Mutation. Am Heart Assoc.
- Xiong, Liang-Wen, Rhonda A. Newman, George G. Rodney, Oluwatoyin Thomas, Jia-Zheng Zhang, Anthony Persechini, Madeline A. Shea, and Susan L. Hamilton. 2002. "Lobe-Dependent Regulation of Ryanodine Receptor Type 1 by Calmodulin." *Journal of Biological Chemistry* 277 (43): 40862–70. https://doi.org/10.1074/jbc.M206763200.
- Xiong, Liangwen, Jia-Zheng Zhang, Rong He, and Susan L. Hamilton. 2006. "A Ca2+-Binding Domain in RyR1 That Interacts with the Calmodulin Binding Site and Modulates Channel Activity." *Biophysical Journal* 90 (1): 173–82. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066092.
- Yamaguchi, Naohiro, Chunlin Xin, and Gerhard Meissner. 2001. "Identification of Apocalmodulin and Ca²⁺ -Calmodulin Regulatory Domain in Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel, Ryanodine Receptor." *Journal* of Biological Chemistry 276 (25): 22579–85. https://doi.org/10.1074/jbc.M102729200.
- Yamaguchi, Naohiro, Le Xu, Daniel A. Pasek, Kelly E. Evans, and Gerhard Meissner. 2003. "Molecular Basis of Calmodulin Binding to Cardiac Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor)." *Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23480–86. https://doi.org/10.1074/jbc.M301125200.
- Yang, Y., T. Guo, T. Oda, A. Chakraborty, L. Chen, H. Uchinoumi, A. A. Knowlton, et al. 2014. "Cardiac Myocyte Z-Line Calmodulin Is Mainly RyR2-Bound, and Reduction Is Arrhythmogenic and Occurs in Heart Failure." *Circulation Research* 114 (2): 295–306. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302857.
- Yin, G., F. Hassan, A. R. Haroun, L. L. Murphy, L. Crotti, P. J. Schwartz, A. L. George, and J. Satin. 2014. "Arrhythmogenic Calmodulin Mutations Disrupt Intracellular Cardiomyocyte Ca2+ Regulation by Distinct Mechanisms." *Journal of the American Heart Association* 3 (3): e000996–e000996. https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000996.
- Yuchi, Zhiguang, Kelvin Lau, and Filip Van Petegem. 2012. "Disease Mutations in the Ryanodine Receptor Central Region: Crystal Structures of a Phosphorylation Hot Spot Domain." *Structure* 20 (7): 1201–1211.
- Yus-Nájera, Eva, Irene Santana-Castro, and Alvaro Villarroel. 2002. "The Identification and Characterization of a Noncontinuous Calmodulin-Binding Site in Noninactivating Voltage-Dependent KCNQ Potassium Channels." Journal of Biological Chemistry 277 (32): 28545–28553.
- Zalk, Ran, Oliver B. Clarke, Amédée des Georges, Robert A. Grassucci, Steven Reiken, Filippo Mancia, Wayne A. Hendrickson, Joachim Frank, and Andrew R. Marks. 2015. "Structure of a Mammalian Ryanodine Receptor." *Nature* 517 (7532): 44–49. https://doi.org/10.1038/nature13950.
- Zemla, Adam. 2003. "LGA: A Method for Finding 3D Similarities in Protein Structures." *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3370–3374.
- Zhang, Jia-Zheng, Yili Wu, Barbara Y. Williams, George Rodney, Frederic Mandel, Gale M. Strasburg, and Susan L. Hamilton. 1999. "Oxidation of the Skeletal Muscle Ca2+ Release Channel Alters Calmodulin Binding." American Journal of Physiology-Cell Physiology 276 (1): C46–C53.

- Zhang, Lin, Jeff Kelley, Glen Schmeisser, Yvonne M. Kobayashi, and Larry R. Jones. 1997. "Complex Formation between Junctin, Triadin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor Proteins of the Cardiac Junctional Sarcoplasmic Reticulum Membrane." *Journal of Biological Chemistry* 272 (37): 23389–23397.
- Zhang, Miao, Cameron Abrams, Liping Wang, Anthony Gizzi, Liping He, Ruihe Lin, Yuan Chen, Patrick J. Loll, John M. Pascal, and Ji-fang Zhang. 2012. "Structural Basis for Calmodulin as a Dynamic Calcium Sensor." *Structure* 20 (5): 911–923.
- Zhang, Tong, Lars S. Maier, Nancy D. Dalton, Shigeki Miyamoto, John Ross, Donald M. Bers, and Joan Heller Brown. 2003. "The ΔC Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure." *Circulation Research* 92 (8): 912–919.
- Zhang, Yang, and Jeffrey Skolnick. 2004. "Scoring Function for Automated Assessment of Protein Structure Template Quality." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 57 (4): 702–710.
- Zhang, Yong, Hongwei Tan, Zongchao Jia, and Guangju Chen. 2008. "Ligand-Induced Dimer Formation of Calmodulin." *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal* 21 (4): 267–274.
- Zhu, Li, Xiaowei Zhong, SR Wayne Chen, Nilesh Banavali, and Zheng Liu. 2013. "Modeling a Ryanodine Receptor Amino-Terminal Domain Connecting the Central Vestibule and the Corner Clamp Region." *Biophysical Journal* 104 (2): 444a.
- Zhu, Liping, Song Ling, Xiao-Dan Yu, L. K. Venkatesh, T. Subramanian, G. Chinnadurai, and Tuan H. Kuo. 1999. "Modulation of Mitochondrial Ca2+ Homeostasis by Bcl-2." *Journal of Biological Chemistry* 274 (47): 33267–33273.
- Zielenkiewicz, Piotr, and Andrzej Rabczenko. 1984. "Protein-Protein Recognition: Method for Finding Complementary Surfaces of Interacting Proteins." *Journal of Theoretical Biology* 111 (1): 17–30.
- Zima, A. V., E. Picht, D. M. Bers, and L. A. Blatter. 2008. "Termination of Cardiac Ca2+ Sparks: Role of Intra-SR [Ca2+], Release Flux, and Intra-SR Ca2+ Diffusion." *Circulation Research* 103 (8): e105–15. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.183236.
- Zorzato, Francesco, Junichi Fujii, Kinya Otsu, Michael Phillips, N. Michael Green, F. Anthony Lai, Gerhard Meissner, and David H. MacLennan. 1990. "Molecular Cloning of CDNA Encoding Human and Rabbit Forms of the Ca2+ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum." *Journal of Biological Chemistry* 265 (4): 2244–2256.

VI. Παράρτημα

i. <u>Κώδικας υλοποίησης clustering στην R</u>

###Εισαγωγή των απαραίτητων βιβλιοθηκών και πακέτων για τη στατιστική ανάλυση

install.packages("devtools") install.packages("tidyversity") install.packages("factoextra") install.packages("readxl") install.packages("ggplot2") install.packages("cluster") install.packages("stats") library("tidyversity") library("factoextra") library("readxl") library("ggplot2") library("cluster") library("tidyverse") library("stats")

###Είσοδος αρχείου δεδομένων RMSD_1 <- read.delim(file.choose()) data.f = RMSD_1 data.f\$Chains <- NULL

###Αρχική ανάλυση PCA του συνόλου δεδομένων

pca_existing <- prcomp(data.f, scale. = TRUE)
plot(pca_existing)</pre>

scores_existing_df <- as.data.frame(pca_existing\$x)
Εμφάνιση αποτελέσματος
head(scores_existing_df[1:2])
Διάγραμμα
plot(PC1~PC2, data=scores_existing_df,
 main= "Existing TB cases per 100K distribution",
 cex = .1, lty = "solid")
text(PC1~PC2, data=scores_existing_df,
 labels=rownames(data.f),
 cex=.8)</pre>

####Διάγραμμα με χρωματική ανάλυση στο σύνολο### ramp <- colorRamp(c("yellow", "blue")) colours_by_sum <- rgb(ramp(as.vector(rescale(rowSums(data.f),c(0,1)))), max = 255) plot(PC1~PC2, data=scores_existing_df,</pre>

main= "Existing TB cases per 100K distribution", cex = .1, lty = "solid", col=colours_by_sum) text(PC1~PC2, data=scores_existing_df, labels=rownames(data.f), cex=.8, col=colours_by_sum)

#######Υλοποίηση k-means clustering βάσει της Ευκλίδειας απόστασης######

##Για 2 ομάδες, δηλαδή k=2### set.seed(1234) k2 <- kmeans(data.f, centers = 2, nstart = 25) str(k2) print(k2) k2\$cluster k2\$centers k2\$size

###Υπολογισμός του μέσου κάθε μεταβλητής των συστάδων με χρήση των αρχικών δεδομένων aggregate(data.f, by=list(cluster=k2\$cluster), mean)

```
)
```

fviz_cluster(k2, data = data.f) ##εναλλακτικό διάγραμμα

```
###H ίδια διαδικασία υλοποίησης για k=3,4,5 και 6 κάθε φορά###
#k=3
set.seed(1234)
k3 <- kmeans(data.f, centers = 3, nstart = 25)
str(k3)
print(k3)
k3$centers
```

aggregate(data.f, by=list(cluster=k3\$cluster), mean)

```
fviz_cluster(k3, data = data.f,
    palette = c("#2E9FDF", "#00AFBB", "#E7B800", "#FC4E07"),
    ellipse.type = "euclid", # Concentration ellipse
    star.plot = TRUE, # Add segments from centroids to items
    repel = TRUE, # Avoid label overplotting (slow)
    ggtheme = theme_minimal()
```

```
)
```

fviz_cluster(k3, data = data.f) ##εναλλακτικό διάγραμμα

#k=4

```
set.seed(1234)
k4 <- kmeans(data.f, centers = 4, nstart = 25)
str(k4)
print(k4)</pre>
```

aggregate(data.f, by=list(cluster=k4\$cluster), mean)

```
fviz_cluster(k4, data = data.f,
    palette = c("#2E9FDF", "#00AFBB", "#E7B800", "#FC4E07"),
    ellipse.type = "euclid", # Concentration ellipse
    star.plot = TRUE, # Add segments from centroids to items
    repel = TRUE, # Avoid label overplotting (slow)
    ggtheme = theme_minimal()
```

```
)
```

fviz_cluster(k4, data = data.f) ##εναλλακτικό διάγραμμα

```
##k=5
set.seed(1234)
k5 <- kmeans(data.f, centers = 5, nstart = 25)</pre>
```

str(k5)
print(k5)

```
aggregate(data.f, by=list(cluster=k5$cluster), mean)
```

)

```
##fviz_cluster(k5, data = data.f) ##εναλλακτικό διάγραμμα
```

```
#k=6
set.seed(1234)
k6 <- kmeans(data.f, centers = 6, nstart = 25)
str(k6)
print(k6)
```

```
aggregate(data.f, by=list(cluster=k6$cluster), mean)
```

```
fviz_cluster(k6, data = data.f,
    palette = c("#2E9FDF", "#00AFBB", "#E7B800", "#FC4E07"),
    ellipse.type = "euclid", # Concentration ellipse
    star.plot = TRUE, # Add segments from centroids to items
    repel = TRUE, # Avoid label overplotting (slow)
    ggtheme = theme_minimal()
```

```
##fviz_cluster(k6, data = data.f) ##alternative
```

```
##Εμφάνιση διαγράμματος με όλα τα αποτελέσματα###
install.packages("gridExtra")
library(gridExtra)
library("factoextra")
p1 <- fviz_cluster(k2, geom = "point", data = data.f) + ggtitle("k = 2")
p2 <- fviz_cluster(k3, geom = "point", data = data.f) + ggtitle("k = 3")
p3 <- fviz_cluster(k4, geom = "point", data = data.f) + ggtitle("k = 4")
p4 <- fviz_cluster(k5, geom = "point", data = data.f) + ggtitle("k = 5")
p5 <- fviz_cluster(k6, geom = "point", data = data.f) + ggtitle("k = 6")
grid.arrange(p1, p2, p3, p4, p5, nrow = 2)</pre>
```

```
##Στατιστικοί υπολογισμοί για την εύρεση του σωστού αριθμού clusters ###
pkgs <- c("factoextra", "NbClust")
install.packages(pkgs)
```

library(factoextra) library(NbClust)

data.f\$Chains <- NULL

###Μέθοδος Elbow

set.seed(123)
fviz_nbclust(data.f, kmeans, method = "wss") +
geom_vline(xintercept = 4, linetype = 2)+
labs(subtitle = "Elbow method")

##fviz_nbclust(data.f, kmeans, method = "wss")

###Μέθοδος Silhouette set.seed(123) fviz_nbclust(data.f, kmeans, method = "silhouette")+ labs(subtitle = "Silhouette method")

###M&Bodoc Gap statistic # nboot = 50 to keep the function speedy. # recommended value: nboot= 500 for your analysis. # Use verbose = FALSE to hide computing progression. set.seed(123) fviz_nbclust(data.f, kmeans, nstart = 25, method = "gap_stat", nboot = 50)+ labs(subtitle = "Gap statistic method")

ii. <u>RMSD διάγραμμα</u>

Με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι ακραίες τιμές RMSD που βρέθηκαν από την ανά δύο στοίχιση των δομών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση κατώφλι ακραίας τιμής υπήρξαν τα 5Å, οποιαδήποτε τιμή υπερβαίνει αυτό το κατώφλι, μαρκάρεται με κόκκινο χρώμα.

Chains	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1CTR.A	0	1.85	12.34	14.58	2.68	2.57	0.68	0.97	0.92	2.07	1.96	1.37	3.2
2WEL.D	1.85	0	12.77	15.02	2.12	2.27	1.82	1.54	1.54	2.15	2.02	1.24	3.38
2W73.B	12.34	12.77	0	4.52	12.12	12.02	12.62	12.4	12.52	11.92	11.96	12.56	12.17
2YGG.B	14.58	15.02	4.52	0	14.72	14.63	14.85	14.6	14.7	13.96	14	14.86	14.71
ЗВХК.С	2.68	2.12	12.12	14.72	0	0.58	2.78	2.7	2.73	3.29	3.18	2.08	2.65
3BXL.A	2.57	2.27	12.02	14.63	0.58	0	2.66	2.69	2.71	3.34	3.23	2.06	2.51
3BYA.A	0.68	1.82	12.62	14.85	2.78	2.66	0	0.83	0.7	2.17	2.06	1.48	3.39
3DVE.A	0.97	1.54	12.4	14.6	2.7	2.69	0.83	0	0.32	1.72	1.6	1.46	3.52
3DVI.A	0.92	1.54	12.52	14.7	2.73	2.71	0.7	0.32	0	1.77	1.66	1.44	3.53
3DVK A	2.07	2.15	11.92	13.96	3.29	3.34	2.17	1.72	1.77	0	0.37	2.11	4.31
	1.96	2.02	11.96	14	3 18	3 23	2.06	16	1.66	0.37	0	1 94	4 18
	1 37	1 24	12.56	14.86	2.08	2.06	1 48	1.6	1.00	2 11	1 94	0	2 94
51714	3.2	3 38	12.30	14.00	2.00	2.00	3 30	3 5 2	3 5 3	4 31	4 18	2 94	0
5104.4	1.0	1 55	12.17	1/1 20	2.05	2.31	2.02	1.52	1.66	2.21	2 1 2	1.0	3.45
	1.5	2.00	12.10	14.50	2.5	2.45	2.02	1.50	1.00	4.21	4.12	2.67	2.45
	4.5	1.09	12.57	14.30	2.11	2.27	2 21	4.05	4.09	4.21	2.07	3.07	3.7
	5.50	1.02	12.91	15.10	2.50	2.00	2.21	2.00	2.92	2.97	2.07	2.0	4.50
	5.49	2.02	12.89	10.15	2.75	3.05	5.44	2.94	5.02	2.97	2.88	2.77	4.51
2LTW.A	6.94	6.99	9.02	10.45	7.04	7.05	7.22	0.85	6.95	0.31	0.33	6.92	6.64
2LGF.A	2.61	2.89	12./1	15.02	2.79	2.73	2./1	2.82	2.8	3.81	3.69	2.57	2.02
4DBP.C	3.36	1.86	12.82	15.06	2.62	2.91	3.31	2.86	2.92	2.88	2.78	2.6	4.41
4DJC.A	14.46	14.86	4.41	1.38	14.58	14.5	14.73	14.46	14.57	13.81	13.86	14.71	14.53
4JPZ.C	9.47	8.84	16.09	18.25	8.93	9.09	9.37	9.28	9.26	8.9	8.93	9.18	10.19
4JQ0.C	9.74	9.13	16.16	18.28	9.22	9.37	9.64	9.56	9.54	9.12	9.16	9.43	10.45
4M1L.A	0.63	1.66	12.46	14.66	2.77	2.7	0.69	0.7	0.64	1.9	1.8	1.42	3.3
4Q5U.A	3.02	2.28	12.33	14.76	1.67	1.78	3.16	3.03	3.05	3.6	3.46	2.3	2.1
4DBQ.B	3.52	2.01	12.89	15.11	2.71	3.02	3.46	2.99	3.05	3.06	2.97	2.8	4.52
3GN4.B	3.54	2.02	12.85	15.09	2.67	2.98	3.49	3.02	3.08	3.1	3	2.78	4.47
3L9I.C	3.34	1.95	12.86	15.12	2.68	2.93	3.3	2.85	2.91	2.9	2.8	2.63	4.41
4ANJ.B	3.69	2.36	13.08	15.4	3.03	3.31	3.62	3.21	3.26	3.41	3.34	3.05	4.79
1A29.A	0.44	1.86	12.37	14.64	2.61	2.48	0.6	0.97	0.91	2.21	2.1	1.34	3.1
1QIV.A	0.62	1.91	12.47	14.72	2.73	2.58	0.63	1.02	0.95	2.32	2.21	1.42	3.24
1CDM.A	1.45	1.1	12.25	14.44	2.52	2.58	1.51	1.05	1.1	1.43	1.31	1.27	3.53
4ZLK.B	5.2	4.05	12.02	14.44	3.88	4.17	5.29	4.88	4.95	4.14	4.15	4.51	5.86
3IF7.A	0.82	2.16	12.57	14.82	2.86	2.67	0.73	1.3	1.21	2.62	2.5	1.61	3.21
1MXE.A	2.76	1.2	13.06	15.29	2.25	2.51	2.77	2.46	2.45	2.62	2.51	1.85	3.63
1LIN.A	0.4	1.84	12.35	14.6	2.64	2.52	0.55	0.92	0.85	2.13	2.01	1.34	3.15
1XA5.A	1.94	2.93	11.5	13.56	3.53	3.46	2.15	1.92	2	2.63	2.55	2.68	3.74
2BCX.A	7.06	6.01	13.3	15.87	5.44	5.62	7.05	6.86	6.89	6.4	6.37	6.21	7.31
2BE6.C	2.67	2.3	12.03	14.72	0.68	0.68	2.79	2.8	2.82	3.39	3.28	2.09	2.58
2F3Y.A	3.7	3.01	11.92	14.51	1.71	1.81	3.85	3.73	3.77	4.23	4.12	3.06	2.34
2F37 A	3 75	3 11	11.97	14 55	1.89	1 94	3.89	3.81	3.84	4 36	4.25	3 14	2.27
2FOT A	27	1.87	12.01	14.33	2.48	2 72	2.81	2 32	24	2 42	2 37	2.5	3.9
	0.57	1.07	12.01	1/ 78	2.40	2.72	0.46	1.02	0.80	2.42	2.57	1/3	3.2
	1.97	3 70	12.50	1/ 70	1.50	2.05 1 71	1 80	1.02	4.57	2.20	4.53	/ 30	1 00
	7.04	1 /7	12.00	15.75		-1.7- 2.40	2.09	1.50	2.21	2.72	2.61	1.00	2 20
2L/L.A	2.50	1.47	12.99	15.25	2.25	2.40	2.57	2.5	2.51	2.75	2.01	1.99	5.59
	3.94	2.44	13.07	15.85	3.45	5.71	3.87	3.59	3.59	3.08	3.0	3.21	4.75
ZIVIES.A	3.83	5./5	12.52	15.17	2.69	2.55	3.95	4.14	4.13	4.93	4.81	3.30	1.64
205G.A	2.11	1.49	12.22	14.47	2.1	2.27	2.22	1.//	1.85	2.25	2.16	1.89	3.44
2060.A	2.34	1.35	12.93	15.07	2.87	3.05	2.21	1.8	1.8	2.17	2.12	2.18	4.14
2VAY.A	3./4	3.17	11.94	14.48	2.16	2.24	3.92	3.81	3.84	4.34	4.22	3.15	2.02
3EWI.A	0.66	1.9	12.57	14.82	2.7	2.55	0.52	1.06	0.96	2.39	2.28	1.44	3.2
3EWV.A	0.75	1.96	12.45	14.7	2.76	2.64	0.72	1.06	0.95	2.33	2.24	1.66	3.16
3GOF.A	1.41	1.47	12.5	14.78	2.27	2.27	1.52	1.52	1.49	2.36	2.25	1.35	2.56
3GP2.A	1.74	0.91	12.62	14.92	1.99	2.1	1.63	1.3	1.33	2.08	1.94	1.25	3.48
3HR4.D	2.32	1.47	12.72	15.18	1.57	1.64	2.27	2.23	2.22	2.84	2.72	1.64	3.47
30XQ.A	3.91	3.04	12.17	14.61	2.35	2.53	4.06	3.85	3.89	4.27	4.16	3.2	2.54
3SUI.A	1.16	1.45	12.48	14.64	2.81	2.82	1.08	0.65	0.67	1.44	1.31	1.36	3.59
4AQR.A	3.19	1.79	12.96	15.26	2.35	2.59	3.19	2.93	2.94	2.77	2.67	2.23	3.96
4EHQ.A	13.7	14.04	2.37	3.99	13.41	13.31	13.98	13.76	13.87	13.24	13.28	13.87	13.4
4UPU.A	3.04	1.99	12.26	14.56	2.05	2.31	3.16	2.84	2.88	2.99	2.9	2.43	2.97
5K8Q.A	12.48	13.17	13.52	12.77	13.71	13.56	12.47	12.45	12.47	12.18	12.22	12.99	13.74

Chains	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1CTR.A	1.9	4.3	3.36	3.49	6.94	2.61	3.36	14.46	9.47	9.74	0.63	3.02
2WEL.D	1.55	3.09	1.82	2.02	6.99	2.89	1.86	14.86	8.84	9.13	1.66	2.28
2W73.B	12.16	12.37	12.91	12.89	9.02	12.71	12.82	4.41	16.09	16.16	12.46	12.33
2YGG.B	14.38	14.58	15.16	15.13	10.45	15.02	15.06	1.38	18.25	18.28	14.66	14.76
3BXK C	23	3 11	2.58	2.75	7.04	2.79	2.62	14.58	8.93	9.22	2.77	1.67
3BXLA	2.0	3 37	2.88	3.05	7.05	2.73	2.02	14.5	9.09	9.37	27	1.78
3BVA A	2.45	<i>A A</i> 1	2.00	3.05	7.05	2.75	3 31	14.5	9.37	9.64	0.69	3.16
	1.58	4.03	2.86	2 94	6.85	2.71	2.86	14.75	0.28	9.56	0.05	3.03
	1.50	4.00	2.00	3.02	6.05	2.02	2.00	14.57	0.26	9.50	0.7	3.05
	2.21	4.09	2.92	2.02	6.21	2.0	2.92	12.01	9.20	0.12	1.0	3.05
	2.21	4.21	2.97	2.97	6.33	3.60	2.00	13.01	8.03	9.12	1.9	3.0
	1.0	2.67	2.07	2.00	6.02	2.09	2.70	14.71	0.95	9.10	1.0	2.40
	1.9	5.07	2.0	2.77	0.92	2.57	2.0	14.71	9.10	9.45	1.42	2.5
5J7J.A	5.45	3./	4.50	4.51	0.04	2.02	4.41	14.55	0.19	10.45	3.5	2.1
SJQA.A	0	3.13	2.57	2.03	0.54	2.92	2.03	14.22	9.22	9.50	1.09	2.40
SWSV.C	3.13	0	3.01	3.03	5.89	3.69	3.11	14.32	9.63	9.95	4.09	2.15
2BKH.B	2.57	3.01	0	0.72	7.26	4.07	0.39	15	8.53	8.82	3.21	2.86
2BKI.B	2.63	3.03	0.72	0	7.17	4.18	0.75	14.96	8.61	8.9	3.31	3.01
2L1W.A	6.54	5.89	7.26	7.17	0	6.81	7.23	10.04	13.03	13.2	6.86	6.46
2LGF.A	2.92	3.69	4.07	4.18	6.81	0	4.14	14.87	9.83	10.13	2.58	2.28
4DBP.C	2.63	3.11	0.39	0.75	7.23	4.14	0	14.9	8.46	8.74	3.22	2.93
4DJC.A	14.22	14.32	15	14.96	10.04	14.87	14.9	0	18.14	18.18	14.52	14.56
4JPZ.C	9.22	9.63	8.53	8.61	13.03	9.83	8.46	18.14	0	0.98	9.35	9.44
4JQ0.C	9.56	9.95	8.82	8.9	13.2	10.13	8.74	18.18	0.98	0	9.63	9.74
4M1L.A	1.69	4.09	3.21	3.31	6.86	2.58	3.22	14.52	9.35	9.63	0	2.98
4Q5U.A	2.46	2.15	2.86	3.01	6.46	2.28	2.93	14.56	9.44	9.74	2.98	0
4DBQ.B	2.64	2.98	0.76	0.62	7.24	4.18	0.72	14.95	8.48	8.77	3.35	2.97
3GN4.B	2.68	2.95	0.73	0.66	7.22	4.16	0.7	14.93	8.52	8.81	3.37	2.94
3L9I.C	2.67	3.3	0.79	1	7.33	4.18	0.74	14.97	8.64	8.91	3.21	3.05
4ANJ.B	3.06	3.5	1.68	1.68	7.61	4.38	1.71	15.21	8.7	9.01	3.53	3.48
1A29.A	1.91	4.3	3.38	3.52	6.99	2.51	3.39	14.51	9.55	9.82	0.66	2.95
1QIV.A	2.03	4.43	3.4	3.56	7.18	2.62	3.41	14.6	9.56	9.84	0.81	3.09
1CDM.A	1.43	3.49	2.35	2.44	6.46	3.09	2.35	14.28	9.27	9.54	1.23	2.73
4ZLK.B	4.37	4.32	3.17	3.14	7.51	6.01	3.07	14.25	7.58	7.79	5.11	4.55
3IF7.A	2.3	4.62	3.65	3.82	7.3	2.58	3.66	14.71	9.73	10	1.08	3.18
1MXE.A	2.04	2.67	1.56	1.74	7.12	3.3	1.61	15.11	8.47	8.77	2.58	2.19
1LIN.A	1.87	4.29	3.37	3.5	6.98	2.56	3.37	14.48	9.49	9.76	0.59	2.97
1XA5.A	2.02	4.43	4.13	4.18	6.18	3.04	4.15	13.43	10.16	10.48	1.86	3.56
2BCX.A	6.66	6.53	5.03	5.14	9.86	7.66	4.89	15.75	7.24	7.32	7.1	6.25
2BE6.C	2.56	3.48	2.88	3.07	7.21	2.86	2.9	14.57	8.87	9.15	2.8	1.9
2F3Y.A	3.07	2.25	3.32	3.43	6.43	2.86	3.38	14.3	9.57	9.88	3.71	1.23
2F37.A	3.24	2.34	3.47	3.6	6.42	2.79	3.54	14.35	9.7	10	3.77	1.27
2FOT A	1.12	2.73	2.31	2.32	6.35	3.51	2.38	14.05	8.94	9.29	2 47	2.66
2HOW A	2.07	4.37	3.45	36	7 1 2	2 52	3.46	14 66	9 5 3	9.8	0.66	3.06
2171 A	3.84	2 99	3.82	3.85	634	4.81	3.89	14 57	10.49	10.78	4 64	3 75
	2.09	29	2.06	2.18	7 1	2.69	2.13	15.08	8 39	8 71	2.36	22
	3 17	3 15	2.00	2.10	7.1	2.09	2.15	15.66	8.66	8 00	2.50	2.2
	J.17 A 1	4.02	2.12 A AQ	2.2 1.69	7.7	2.66	2.10	14.00	10.11	10.27	2.09	2.21
	0.55	2.02	2 21	4.00	6.57	2.00	2.20	14.99	0.12	0.45	1.01	2.50
2050.A	1.96	2.24	2.51	2.57	7.00	2.99	2.30	14.51	9.12	9.45	2.01	2.31
2060.A	2.10	2.20	2.1	2.19	7.09	3.49	2.14	14.92	8.55 0.76	0.00	2.01	3.12
	2.19	2.19	5.02	3./3	0.2	2.59	3.09	14.20	9.76	10.07	5./5	1.14
3EWT.A	2.08	4.42	2.41	3.57	7.22	2.61	3.42	14./	9.58	9.85	0.83	3.06
SEVVV.A	1.88	4.24	3.52	3.64	6.98	2.5	3.54	14.57	9.57	9.87	0.63	3.01
JGUF.A	1.79	3.27	2.99	3.11	6.56	1.92	3.03	14.61	9.22	9.51	1.24	2.11
3GP2.A	1.66	3.51	1.79	1.98	7.1	3.01	1.8	14./8	8.86	9.15	1.65	2.51
3HK4.D	2.33	3./	2.02	2.3	7.6	3.32	2.02	15.05	8.62	8.88	2.39	2.53
3OXQ.A	3.14	1.57	3.29	3.39	6.12	2.91	3.36	14.37	9.7	10.01	3.84	1.19
3SUI.A	1.8	4.01	2.74	2.83	6.85	2.93	2.72	14.49	9	9.26	0.86	3.06
4AQR.A	2.84	3.22	1.51	1.74	7.34	3.84	1.42	15.09	8	8.22	3.1	2.62
4EHQ.A	13.45	13.43	14.12	14.1	9.86	13.99	14.03	3.82	17.29	17.32	13.81	13.52
4UPU.A	2.09	1.7	2.43	2.49	6.07	2.83	2.5	14.36	9	9.31	2.85	1.51
5K8Q.A	12.97	14.14	13.7	13.74	12.69	13.24	13.58	13.03	15.59	15.67	12.52	13.85

Chains	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
1CTR.A	3.52	3.54	3.34	3.69	0.44	0.62	1.45	5.2	0.82	2.76	0.4	1.94
2WEL.D	2.01	2.02	1.95	2.36	1.86	1.91	1.1	4.05	2.16	1.2	1.84	2.93
2W73.B	12.89	12.85	12.86	13.08	12.37	12.47	12.25	12.02	12.57	13.06	12.35	11.5
2YGG.B	15.11	15.09	15.12	15.4	14.64	14.72	14.44	14.44	14.82	15.29	14.6	13.56
3BXK.C	2.71	2.67	2.68	3.03	2.61	2.73	2.52	3.88	2.86	2.25	2.64	3.53
3BXL.A	3.02	2.98	2.93	3.31	2.48	2.58	2.58	4.17	2.67	2.51	2.52	3.46
3BYA.A	3.46	3.49	3.3	3.62	0.6	0.63	1.51	5.29	0.73	2.77	0.55	2.15
3DVE.A	2.99	3.02	2.85	3.21	0.97	1.02	1.05	4.88	1.3	2.46	0.92	1.92
3DVJ.A	3.05	3.08	2.91	3.26	0.91	0.95	1.1	4.95	1.21	2.45	0.85	2
3DVK.A	3.06	3.1	2.9	3.41	2.21	2.32	1.43	4.14	2.62	2.62	2.13	2.63
3DVM.A	2.97	3	2.8	3.34	2.1	2.21	1.31	4.15	2.5	2.51	2.01	2.55
1QIW.A	2.8	2.78	2.63	3.05	1.34	1.42	1.27	4.51	1.61	1.85	1.34	2.68
5J7J.A	4.52	4.47	4.41	4.79	3.1	3.24	3.53	5.86	3.21	3.63	3.15	3.74
5JQA.A	2.64	2.68	2.67	3.06	1.91	2.03	1.43	4.37	2.3	2.04	1.87	2.02
5WSV.C	2.98	2.95	3.3	3.5	4.3	4.43	3.49	4.32	4.62	2.67	4.29	4.43
2BKH.B	0.76	0.73	0.79	1.68	3.38	3.4	2.35	3.17	3.65	1.56	3.37	4.13
2BKI.B	0.62	0.66	1	1.68	3.52	3.56	2.44	3.14	3.82	1.74	3.5	4.18
2L1W.A	7.24	7.22	7.33	7.61	6.99	7.18	6.46	7.51	7.3	7.12	6.98	6.18
2LGF.A	4.18	4.16	4.18	4.38	2.51	2.62	3.09	6.01	2.58	3.3	2.56	3.04
4DBP.C	0.72	0.7	0.74	1.71	3.39	3.41	2.35	3.07	3.66	1.61	3.37	4.15
4DJC.A	14.95	14.93	14.97	15.21	14.51	14.6	14.28	14.25	14.71	15.11	14.48	13.43
4JPZ.C	8.48	8.52	8.64	8.7	9.55	9.56	9.27	7.58	9.73	8.47	9.49	10.16
4JQ0.C	8.77	8.81	8.91	9.01	9.82	9.84	9.54	7.79	10	8.77	9.76	10.48
4M1L.A	3.35	3.37	3.21	3.53	0.66	0.81	1.23	5.11	1.08	2.58	0.59	1.86
4Q5U.A	2.97	2.94	3.05	3.48	2.95	3.09	2.73	4.55	3.18	2.19	2.97	3.56
4DBQ.B	0	0.41	1.05	1.71	3.54	3.57	2.51	3.14	3.83	1.71	3.53	4.22
3GN4.B	0.41	0	1.07	1.68	3.56	3.58	2.54	3.12	3.84	1.69	3.54	4.24
3L9I.C	1.05	1.07	0	1.78	3.37	3.38	2.36	3.18	3.64	1.79	3.35	4.15
4ANJ.B	1.71	1.68	1.78	0	3.71	3.71	2.83	3.52	3.97	2.29	3.71	4.44
1A29.A	3.54	3.56	3.37	3.71	0	0.44	1.51	5.28	0.6	2.8	0.23	1.93
1QIV.A	3.57	3.58	3.38	3.71	0.44	0	1.63	5.38	0.49	2.87	0.44	2.01
1CDM.A	2.51	2.54	2.36	2.83	1.51	1.63	0	4.25	1.92	1.92	1.46	2.35
4ZLK.B	3.14	3.12	3.18	3.52	5.28	5.38	4.25	0	5.68	3.56	5.25	5.84
3IF7.A	3.83	3.84	3.64	3.97	0.6	0.49	1.92	5.68	0	3.11	0.64	2.14
1MXE.A	1.71	1.69	1.79	2.29	2.8	2.87	1.92	3.56	3.11	0	2.77	3.66
1LIN.A	3.53	3.54	3.35	3.71	0.23	0.44	1.46	5.25	0.64	2.77	0	1.89
1XA5.A	4.22	4.24	4.15	4.44	1.93	2.01	2.35	5.84	2.14	3.66	1.89	0
2BCX.A	5.03	4.98	5	5.33	7.08	7.1	6.41	3.43	7.3	5.55	7.06	8.02
2BE6.C	3.03	2.98	2.94	3.28	2.59	2.69	2.65	4.01	2.81	2.51	2.63	3.64
2F3Y.A	3.39	3.33	3.48	3.75	3.63	3.76	3.43	4.46	3.86	2.88	3.66	4.15
2F3Z.A	3.55	3.48	3.64	3.91	3.67	3.81	3.53	4.71	3.88	3.02	3.71	4.25
2FOT.A	2.34	2.38	2.48	2.87	2.74	2.88	1.87	3.7	3.17	1.96	2.7	2.76
2HQW.A	3.62	3.63	3.44	3.76	0.43	0.46	1.59	5.42	0.55	2.84	0.41	2.06
2JZI.A	3.81	3.83	4.06	4.45	4.87	4.95	4.02	5.43	5.08	3.37	4.83	4.87
2L7L.A	2.12	2.12	2.25	2.56	2.59	2.68	2.1	4.09	2.88	1.42	2.57	3.42
2M0J.A	2.18	2.24	2.4	2.72	4	4.06	3	3.89	4.26	1.89	3.97	4.77
2MES.A	4.65	4.59	4.58	4.87	3.71	3.81	4.11	5.9	3.74	3.9	3.78	4.64
205G.A	2.39	2.43	2.39	2.84	2.12	2.23	1.48	4.05	2.52	1.83	2.08	2.38
2060.A	2.2	2.22	2.24	2.44	2.39	2.46	1.6	4.09	2.72	1.72	2.36	3.1
2VAY.A	3.69	3.63	3.8	4.09	3.68	3.83	3.53	4.89	3.91	3.05	3.71	4.07
3EWT.A	3.57	3.59	3.39	3.72	0.44	0.41	1.63	5.41	0.43	2.85	0.47	2.12
3EWV.A	3.65	3.68	3.53	3.81	0.62	0.78	1.61	5.42	0.88	2.87	0.59	1.87
3GOF.A	3.13	3.12	3.09	3.39	1.4	1.6	1.55	4.88	1.74	2.11	1.4	2.41
3GP2.A	1.98	1.99	1.85	2.38	1.71	1.74	1.16	4.08	1.97	1.65	1.71	2.85
3HR4.D	2.25	2.21	2.09	2.48	2.27	2.27	2.03	3.8	2.44	1.86	2.3	3.62
30XQ.A	3.34	3.27	3.52	3.79	3.86	4	3.47	4.64	4.12	2.76	3.88	4.22
3SUI.A	2.87	2.9	2.71	3.13	1.22	1.29	0.96	4.68	1.58	2.27	1.16	2.22
4AQR.A	1.71	1.67	1.63	2.36	3.23	3.29	2.39	2.95	3.52	1.32	3.21	4.32
4EHQ.A	14.1	14.06	14.07	14.35	13.73	13.83	13.55	13.22	13.92	14.28	13.71	12.87
4UPU.A	2.49	2.47	2.66	3.07	3.05	3.23	2.33	3.82	3.43	1.72	3.03	3.5
5K8Q.A	13.64	13.68	13.61	13.73	12.54	12.45	12.74	14.19	12.46	13.66	12.49	11.94

Chains	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1CTR.A	7.06	2.67	3.7	3.75	2.7	0.57	4.84	2.56	3.94	3.83	2.11	2.34	3.74
2WEL.D	6.01	2.3	3.01	3.11	1.87	1.9	3.79	1.47	2.44	3.75	1.49	1.35	3.17
2W73.B	13.3	12.03	11.92	11.97	12.01	12.56	13.04	12.99	13.67	12.52	12.22	12.93	11.94
2YGG.B	15.87	14.72	14.51	14.55	14.22	14.78	14.79	15.23	15.83	15.17	14.47	15.07	14.48
3BXK.C	5.44	0.68	1.71	1.89	2.48	2.78	4.59	2.23	3.45	2.69	2.1	2.87	2.16
3BXL.A	5.62	0.68	1.81	1.94	2.72	2.63	4.74	2.48	3.71	2.55	2.27	3.05	2.24
3BYA.A	7.05	2.79	3.85	3.89	2.81	0.46	4.89	2.57	3.87	3.95	2.22	2.21	3.92
3DVE.A	6.86	2.8	3.73	3.81	2.32	1.02	4.56	2.3	3.59	4.14	1.77	1.8	3.81
3DVJ.A	6.89	2.82	3.77	3.84	2.4	0.89	4.57	2.31	3.59	4.13	1.85	1.8	3.84
3DVK.A	6.4	3.39	4.23	4.36	2.42	2.26	4.61	2.73	3.68	4.93	2.25	2.17	4.34
3DVM.A	6.37	3.28	4.12	4.25	2.37	2.16	4.53	2.61	3.6	4.81	2.16	2.12	4.22
1QIW.A	6.21	2.09	3.06	3.14	2.5	1.43	4.32	1.99	3.21	3.36	1.89	2.18	3.15
5J7J.A	7.31	2.58	2.34	2.22	3.9	3.2	4.99	3.39	4.75	1.64	3.44	4.14	2.02
5JQA.A	6.66	2.56	3.07	3.24	1.12	2.07	3.84	2.09	3.17	4.1	0.55	1.86	3.19
5WSV.C	6.53	3.48	2.25	2.34	2.73	4.37	2.99	2.9	3.15	4.02	2.94	3.38	2.19
2BKH.B	5.03	2.88	3.32	3.47	2.31	3.45	3.82	2.06	2.12	4.49	2.31	2.1	3.62
2BKI.B	5.14	3.07	3.43	3.6	2.32	3.6	3.85	2.18	2.2	4.68	2.37	2.19	3.73
2L1W.A	9.86	7.21	6.43	6.42	6.35	7.12	6.34	7.1	7.7	7.36	6.57	7.09	6.2
2LGF.A	7.66	2.86	2.86	2.79	3.51	2.52	4.81	2.69	4.44	2.66	2.99	3.49	2.59
4DBP.C	4.89	2.9	3.38	3.54	2.38	3.46	3.89	2.13	2.18	4.54	2.38	2.14	3.69
4DJC.A	15.75	14.57	14.3	14.35	14.05	14.66	14.57	15.08	15.66	14.99	14.31	14.92	14.26
4JPZ.C	7.24	8.87	9.57	9.7	8.94	9.53	10.49	8.39	8.66	10.11	9.12	8.55	9.76
4JQ0.C	7.32	9.15	9.88	10	9.29	9.8	10.78	8.71	8.99	10.37	9.45	8.88	10.07
4M1L.A	7.1	2.8	3.71	3.77	2.47	0.66	4.64	2.36	3.74	3.98	1.91	2.01	3.73
4Q5U.A	6.25	1.9	1.23	1.27	2.66	3.06	3.75	2.2	3.31	2.38	2.31	3.12	1.14
4DBQ.B	5.03	3.03	3.39	3.55	2.34	3.62	3.81	2.12	2.18	4.65	2.39	2.2	3.69
3GN4.B	4.98	2.98	3.33	3.48	2.38	3.63	3.83	2.12	2.24	4.59	2.43	2.22	3.63
3L9I.C	5	2.94	3.48	3.64	2.48	3.44	4.06	2.25	2.4	4.58	2.39	2.24	3.8
4ANJ.B	5.33	3.28	3.75	3.91	2.87	3.76	4 4 5	2.56	2.72	4.87	2.84	2.44	4.09
1A29.A	7.08	2.59	3.63	3.67	2.74	0.43	4.87	2.59	4	3.71	2.12	2.39	3.68
10IV.A	7.1	2.69	3.76	3.81	2.88	0.46	4 95	2.68	4.06	3.81	2.23	2.46	3.83
1CDM.A	6.41	2.65	3.43	3.53	1.87	1.59	4.02	2.00	3	4 11	1 48	16	3 53
4ZLK.B	3.43	4 01	4 46	4 71	37	5.42	5.43	4.09	3.89	59	4.05	4 09	4 89
3IF7.A	7.3	2.81	3.86	3.88	3.17	0.55	5.08	2.88	4 26	3 74	2 52	2 72	3.91
1MXF.A	5 55	2.51	2.88	3.02	1.96	2.84	3 37	1 42	1.20	3.9	1.83	1 72	3.05
1LIN.A	7.06	2.63	3.66	3 71	27	0.41	4.83	2.57	3.97	3.78	2.08	2.36	3 71
1XA5.A	8.02	3.64	4 1 5	4 25	2.76	2.06	4.87	3.42	4 77	4 64	2.00	3.1	4 07
2BCX.A	0	5.39	6.02	6.19	6.28	7.18	7 54	5.94	5.69	6.89	635	6.28	6.51
2BF6.C	5 39	0	1.94	2.08	2.81	2 77	4.92	2.48	3.69	2 53	24	3 11	2 33
2F3Y.A	6.02	1.94	0	0.43	3.09	3.76	4 24	2.10	3.82	2.33	2.1	3.69	0.78
2F37.A	6.19	2.08	0.43	0	33	3 79	4.27	2.07	3.92	2.55	3.08	3.8	0.73
2FOT A	6.28	2.81	3.09	3.3	0	2.89	3.56	2.50	2.87	4 4 9	1.06	1.87	3 27
2HOW A	7 18	2.77	3 76	3 79	2 89	0	4.88	2.63	4	3.8	2 27	2 38	3.8
2.17LA	7.54	4.92	4.24	4.27	3.56	4.88	0	3.91	3 13	5 34	3.78	3.94	4 17
21 71 A	5.94	2.48	2.87	2.96	2.19	2.63	3 91	0	2 55	3.69	1 97	1.81	2.97
2M01.A	5.69	3.69	3.82	3.92	2.87	4	3.13	2 55	0	4.82	2.99	2.56	4
2MES A	6.89	2 53	2 33	2 14	4 4 9	3.8	5.34	3.69	4.82	0	4 04	4 59	2 2 2 2
205G A	6 35	2.35	2.88	3.08	1.06	2 27	3 78	1 97	2.99	4 04	0	1.87	3.06
2050./(2060 A	6.28	3 11	3.69	3.8	1.87	2.27	3.94	1.97	2.55	4.59	1.87	0	3.85
2VAY A	6.51	2.33	0.78	0.73	3.27	3.8	4 17	2.97	4	2.22	3.06	3.85	0
3FW/T A	7 11	2.68	3.74	3 77	2.91	0.39	4.91	2.57	4	3 74	2.00	2.43	3.8
3EW/V A	7 32	2.78	3.68	3 72	2.69	0.59	4.91	2.00	4 01	3.84	2.27	2.45	3.7
3GOF A	6.84	2.70	2.85	2.87	2.05	1 42	4.01	1.85	3 30	3 25	1.0	1 99	2 79
3GP2 A	5.85	2.57	3.15	3.25	2.08	1 79	4.73	1.05	2.82	3.79	1.5	1.59	3 37
3HR4 D	5.19	1.61	29	3.01	2.00	236	4.25	2 11	2.02	3./9	2.19	2 10	3.37
	6.38	2.61	1.09	1 1 1	3.1	3.97	3.7	2.11	2.50	2.40	2.10	3.66	0.8
	6.50	2.01	3.81	3.89	2 39	1.22	A 52	2.02	3.05	2.75 A 10	1.02	1.7	3.86
	4.57	2.07	3.01	3.09	2.59	3.22	4.55 // 12	1.07	2 2 2 2	4.19	2.50	2.24	3.00
	14.37	13 35	13.00	13 11	13.25	13.01	12.09	14.24	2.55	12 71	13 5	2.54	12.1
	61	2.4	1 98	2 11	1.83	3 15	3 20	1 99	2 79	3.49	1 01	2.4	2.02
	15.11	13.60	14.07	14.11	13.24	1247	12.20	12.45	2.70	1/11	12.14	2.4	14.05
JN0Q.A	13.11	15.05	11.07		13.27	12.17	15.01	13.45	14.00	17.11	13.14	15	14.05

Chains	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
1CTR.A	0.66	0.75	1.41	1.74	2.32	3.91	1.16	3.19	13.7	3.04	12.48
2WEL.D	1.9	1.96	1.47	0.91	1.47	3.04	1.45	1.79	14.04	1.99	13.17
2W73.B	12.57	12.45	12.5	12.62	12.72	12.17	12.48	12.96	2.37	12.26	13.52
2YGG.B	14.82	14.7	14.78	14.92	15.18	14.61	14.64	15.26	3.99	14.56	12.77
3BXK.C	2.7	2.76	2.27	1.99	1.57	2.35	2.81	2.35	13.41	2.05	13.71
3BXL.A	2.55	2.64	2.27	2.1	1.64	2.53	2.82	2.59	13.31	2.31	13.56
3BYA.A	0.52	0.72	1.52	1.63	2.27	4.06	1.08	3.19	13.98	3.16	12.47
3DVE.A	1.06	1.06	1.52	1.3	2.23	3.85	0.65	2.93	13.76	2.84	12.45
3DVJ.A	0.96	0.95	1.49	1.33	2.22	3.89	0.67	2.94	13.87	2.88	12.47
3DVK.A	2.39	2.33	2.36	2.08	2.84	4.27	1.44	2.77	13.24	2.99	12.18
3DVM.A	2.28	2.24	2.25	1.94	2.72	4.16	1.31	2.67	13.28	2.9	12.22
1QIW.A	1.44	1.66	1.35	1.25	1.64	3.2	1.36	2.23	13.87	2.43	12.99
5J7J.A	3.2	3.16	2.56	3.48	3.47	2.54	3.59	3.96	13.4	2.97	13.74
5JQA.A	2.08	1.88	1.79	1.66	2.33	3.14	1.8	2.84	13.45	2.09	12.97
5WSV.C	4.42	4.24	3.27	3.51	3.7	1.57	4.01	3.22	13.43	1.7	14.14
2BKH.B	3.41	3.52	2 99	1 79	2.02	3 29	2 74	1 51	14 12	2 4 3	13.7
2BKI.B	3.57	3.64	3 11	1.98	23	3 39	2.83	1.74	14.1	2.10	13 74
2L1W.A	7.22	6.98	6.56	7.1	7.6	6.12	6.85	7.34	9.86	6.07	12.69
2LGF.A	2.61	2.5	1.92	3.01	3 32	2.91	2.93	3.84	13.99	2.83	13.24
4DBP.C	3.42	3 54	3.03	1.8	2.02	3 36	2.55	1 4 2	14.03	2.05	13.58
4DIC.A	14 7	14 57	14.61	14.78	15.02	14 37	14.49	15.09	3.82	14 36	13.03
4 IP7 C	9.58	9.57	9.22	8.86	8.62	9.7	0	8	17.29	9	15.05
4100 C	9.85	9.87	0.51	0.00	8.88	10.01	0.26	8 2 2	17.20	0.31	15.55
4M1L A	0.83	0.63	1.24	1.65	2.30	3.84	0.86	3.1	12.91	2.21	12.52
405U A	3.06	3.01	2.11	2.51	2.55	1 10	3.06	2.62	13.01	1.51	13.92
	3.57	3.65	2.11	1.02	2.55	2.24	2.00	1.71	1/1	2.40	13.67
3GN4 B	3 50	3.68	2.10	1.50	2.25	2.04	2.07	1.71	14.1	2.49	12.60
31 91 C	3 30	3.53	2.00	1.99	2.21	2.27	2.9	1.07	14.00	2.47	12.00
	3.39	3.81	2.09	1.00	2.09	2.70	2.71	1.05	14.07	2.00	12.01
	0.44	0.62	5.59	2.30	2.40	2.79	1.15	2.50	14.55	3.07	13.73
101/ 4	0.44	0.02	1.4	1.71	2.27	5.00	1.22	2.20	12.75	2.05	12.54
	1.62	1.61	1.0	1./4	2.27	4	1.29	5.29	13.03	3.23	12.45
	F 41	F. 42	1.55	1.10	2.03	3.47	0.96	2.39	13.55	2.33	12.74
	0.42	0.99	4.88	4.08	3.8	4.64	4.08	2.95	13.22	3.82	14.19
	2.45	0.00	1.74	1.97	2.44	4.12	1.58	3.52	13.92	3.43	12.40
	2.05	0.50	2.11	1.05	1.80	2.70	2.27	1.52	14.28	1.72	13.00
	0.47	1 07	1.4	1./1	2.3	3.88	1.16	3.21	13./1	3.03	12.49
	7.12	7.20	2.41	2.85	3.62	4.22	2.22	4.32	12.87	3.5	11.94
	7.11	7.52	6.84	5.85	5.19	0.38	0.05	4.57	14.41	6.1	15.11
	2.00	2.70	2.37	2.15	1.61	2.61	2.87	2.49	13.35	2.4	13.69
2F3Y.A	5./4 2.77	5.00 2.72	2.85	3.15	2.9	1.09	3.81	3.13	13.09	1.98	14.07
2F3Z.A	2.01	2.72	2.87	3.25	3.01	1.11	3.89	3.25	13.11	2.11	14.11
	2.91	2.09	2.35	2.08	2.57	3.1	2.39	2.71	13.25	1.83	13.24
2HQW.A	4.01	0.59	1.42	1./9	2.36	3.97	1.22	3.28	13.91	3.15	12.47
2JZI.A	4.91	4.81	4.19	4.23	4.6	3./	4.53	4.13	13.98	3.38	13.81
2L/L.A	2.00	2.05	1.85	1./	2.11	2.82	2.15	1.97	14.24	1.88	13.45
2MOJ.A	4	4.01	3.39	2.82	2.98	3.63	3.44	2.33	14.82	2.78	14.08
2MES.A	3.74	3.84	3.25	3.79	3.48	2.73	4.19	4.01	13.71	3.48	14.11
205G.A	2.27	2.13	1.9	1.61	2.18	2.98	1.93	2.58	13.5	1.91	13.14
2060.A	2.43	2.31	1.99	1.54	2.19	3.66	1.7	2.34	14.21	2.4	13
2VAY.A	3.8	3./	2.79	3.37	3.28	0.8	3.86	3.4	13.1	2.02	14.05
3EWT.A	0	0./	1.57	1.72	2.24	3.98	1.32	3.28	13.91	3.21	12.52
3EWV.A	0./	0	1.33	1.9	2.51	3.87	1.33	3.41	13.81	3.01	12.58
3GOF.A	1.57	1.33	0	1.74	2.26	2.89	1.5	2.7	13.8	2.01	13.01
3GP2.A	1./2	1.9	1.74	0	1.24	3.32	1.31	1.94	13.92	2.37	13.05
3HR4.D	2.24	2.51	2.26	1.24	0	3.3	2.24	1.8	14.01	2.61	13.45
30XQ.A	3.98	3.87	2.89	3.32	3.3	0	3.87	3.16	13.29	1.75	14.19
3SUI.A	1.32	1.33	1.5	1.31	2.24	3.87	0	2.66	13.82	2.8	12.46
4AQR.A	3.28	3.41	2.7	1.94	1.8	3.16	2.66	0	14.18	2.27	13.69
4EHQ.A	13.91	13.81	13.8	13.92	14.01	13.29	13.82	14.18	0	13.45	14.54
4UPU.A	3.21	3.01	2.01	2.37	2.61	1.75	2.8	2.27	13.45	0	13.75
5K8Q.A	12.52	12.58	13.01	13.05	13.45	14.19	12.46	13.69	14.54	13.75	0

iii. <u>Γραφικές αναπαραστάσεις των clusters</u> Παρουσίαση αποτελεσμάτων των ομάδων για k=3,4,5 και 6. Επιλογή δύο διαφορετικών αναπαραστάσεων για καλύτερη οπτικοποίηση αποτελέσματος ανάλογα με τις ανάγκες:

✓ k=3











iv. Αναλυτικά αποτελέσματα docking ClusPro

Οι πίνακες των αποτελεσμάτων της βαθμολόγησης για το πεδίο ισορροπίας σε κάθε δείγμα έχουν αναλυθεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

- Ca²⁺/CaM και control πεπτίδιο
 - ο Πεδίο ισορροπίας





1

2

3





ο Ηλεκτροστατικό πεδίο







Πίνακας 26: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το control πεπτίδιο για το ηλεκτροστατικό πεδίο. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	767	Κέντρο	-1525.2
	/0/	Χαμηλότερη ενέργεια	-1639.2
1	122	Κέντρο	-1433.5
1	132	Χαμηλότερη ενέργεια	-1433.5
2	45	Κέντρο	-1311.2
Δ	43	Χαμηλότερη ενέργεια	-1564.9
2	45	Κέντρο	-1397.8
3	43	Χαμηλότερη ενέργεια	-1446.0
1	11	Κέντρο	-1311.3
4	11	Χαμηλότερη ενέργεια	-1311.3

ο Υδροφοβικό πεδίο



Πίνακας 27: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το control πεπτίδιο για το υδροφοβικό πεδίο. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	571	Κέντρο	-1768.4
0	574	Χαμηλότερη ενέργεια	-1933.9
1	202	Κέντρο	-1904.1
I	392	Χαμηλότερη ενέργεια	-1904.1
2	24	Κέντρο	-1543.8
2	54	Χαμηλότερη ενέργεια	-1739.5

ο Πεδίο VdW και ηλεκτροστατικό











<u>6</u>







Πίνακας 28: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το control πεπτίδιο για το πεδίο VdW μαζί με ηλεκτροστατικό. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	224	Κέντρο	-338.2
0	234	Χαμηλότερη ενέργεια	-343.9
1	107	Κέντρο	-318.2
1	167	Χαμηλότερη ενέργεια	-365.3
2	166	Κέντρο	-317.9
2	100	Χαμηλότερη ενέργεια	-355.6
3	126	Κέντρο	-333.0
	130	Χαμηλότερη ενέργεια	-362.7
4	94	Κέντρο	-316.2
4	04	Χαμηλότερη ενέργεια	-342.9
5	70	Κέντρο	-323.5
5	19	Χαμηλότερη ενέργεια	-357.9
E	62	Κέντρο	-316.7
0	03	Χαμηλότερη ενέργεια	-347.2
7	40	Κέντρο	-323.2
1	49	Χαμηλότερη ενέργεια	-359.2

- Ca²⁺/CaM και πεπτίδιο B
 - ο Πεδίο ισορροπίας





0



2



















Πίνακας 29: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο B για το ηλεκτροστατικό πεδίο. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	121	Κέντρο	-1320.3
0	434	Χαμηλότερη ενέργεια	-1596.2
1	250	Κέντρο	-1325.9
1	239	Χαμηλότερη ενέργεια	-1559.4
2	161	Κέντρο	-1362.7
	101	Χαμηλότερη ενέργεια	-1478.7
2	126	Κέντρο	-1543.1
5	120	Χαμηλότερη ενέργεια	-1584.2
1	11	Κέντρο	-1317.6
4	11	Χαμηλότερη ενέργεια	-1383.5
F	0	Κέντρο	-1305.2
5	9	Χαμηλότερη ενέργεια	-1358.9

ο Υδροφοβικό πεδίο

0






Πίνακας 30: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο B για το υδροφοβικό πεδίο. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	270	Κέντρο	-1817.8
0	519	Χαμηλότερη ενέργεια	-1871.2
1	305	Κέντρο	-1576.3
1		Χαμηλότερη ενέργεια	-2072.4
2	175	Κέντρο	-1526.9
Ζ.	173	Χαμηλότερη ενέργεια	-2023.7
3	141	Κέντρο	-1540.9
		Χαμηλότερη ενέργεια	-1625.1

ο Πεδίο VdW και ηλεκτροστατικό























Πίνακας 31: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο B για το πεδίο VdW μαζί με ηλεκτροστατικό. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	196	Κέντρο	-378.5
0	480	Χαμηλότερη ενέργεια	-394.2
1	286	Κέντρο	-339.2
I	280	Χαμηλότερη ενέργεια	-406.9
2	105	Κέντρο	-338.5
2		Χαμηλότερη ενέργεια	-423.7
2	42	Κέντρο	-335.4
3	42	Χαμηλότερη ενέργεια	-359.3
4	24	Κέντρο	-338.6
4	24	Χαμηλότερη ενέργεια	-348.5
E	12	Κέντρο	-332.8
3	15	Χαμηλότερη ενέργεια	-350.4
6	12	Κέντρο	-339.0
	15	Χαμηλότερη ενέργεια	-344.5
7	11	Κέντρο	-340.2
	11	Χαμηλότερη ενέργεια	-344.4
0	9	Κέντρο	-333.8
ð		Χαμηλότερη ενέργεια	-340.2

ο Πεδίο ισορροπίας













4

ο Ηλεκτροστατικό πεδίο



Πίνακας 32: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο F για το ηλεκτροστατικό πεδίο. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	401	Κέντρο	-1076.2
0	401	Χαμηλότερη ενέργεια	-1251.9
1	221	Κέντρο	-1216.5
1	521	Χαμηλότερη ενέργεια	-1244.6
2	109	Κέντρο	-1139.2
	198	Χαμηλότερη ενέργεια	-1385.8

Υδροφοβικό πεδίο



Πίνακας 33: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο F για το υδροφοβικό πεδίο. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	126	Κέντρο	-1116.0
0	420	Χαμηλότερη ενέργεια	-1426.3
1	291	Κέντρο	-1220.3
1		Χαμηλότερη ενέργεια	-1578.2
2	202	Κέντρο	-1182.5
2	202	Χαμηλότερη ενέργεια	-1264.5
3	81	Κέντρο	-1105.7
		Χαμηλότερη ενέργεια	-1241.7

ο Πεδίο VdW και ηλεκτροστατικό



















Πίνακας 34: Αποτελέσματα βαθμολόγησης της ανάλυσης docking της Ca²⁺/CaM με το πεπτίδιο F για το πεδίο VdW μαζί με ηλεκτροστατικό. Περιέχει τον αριθμό των clusters που προέβλεψε το ClusPro στη συγκεκριμένη ανάλυση με τον αντίστοιχο αριθμό μελών σε κάθε cluster καθώς και το σταθμισμένο σκορ για το κεντρομερές του κάθε cluster και της χαμηλότερης ενέργειας που εντοπίστηκε.

Cluster	Μέλη	Ενδεικτικά	Σταθμισμένο Σκορ
0	360	Κέντρο	-384.1
		Χαμηλότερη ενέργεια	-414.8
1	262	Κέντρο	-346.6
I	202	Χαμηλότερη ενέργεια	-388.3
2	97	Κέντρο	-357.0
Σ		Χαμηλότερη ενέργεια	-372.2
3	77	Κέντρο	-347.9
5		Χαμηλότερη ενέργεια	-372.4
1	70	Κέντρο	-356.1
4	70	Χαμηλότερη ενέργεια -369.2	-369.2
5	59	Κέντρο	-345.8
		Χαμηλότερη ενέργεια	-360.6
6	25	Κέντρο	-345.9
	25	Χαμηλότερη ενέργεια -366.3	-366.3
7	14	Κέντρο	-350.8
	14	Χαμηλότερη ενέργεια	-358.0
8	11	Κέντρο	-349.1
	11	Χαμηλότερη ενέργεια	-360.8
9	6	Κέντρο	-347.3
	0	Χαμηλότερη ενέργεια	-358.6