

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ



ΚΟΣΜΟΠΟΥΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΧΗΜΙΚΟΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΟΎ La-SSB ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ: ΜΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



IQANNINA 2006

221 200. Aø

.

. • •



BIBAOO

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Βιολογίας του Ερευνητικού Κέντρου 'Δημόκριτος' στην Αθήνα για το χρονικό διάστημα από 0.510.2002 έως 05.02.2003.

Η ανάθεση του θέματος έγινε από την κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, στα πλαίσια του ΠΕΝΕΔ 2001, με τίτλο 'Κυτταρική Ανοσολογική Απόκριση κατά του La/SSB αυτοαντιγόνου'. Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή αποτελείται από την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιούφα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστήμιου Ιωαννίνων κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, ως επιβλέπουσα, για την ανάθεση του θέματος, την άμεση επίβλεψη και την ουσιαστική καθοδήγηση. Η κ. Μαρία Σακαρέλλου σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής μου παρείχε πολύτιμη βοήθεια τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Η συμβολή της ήταν καθοριστική για την επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστήμιου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο για το συνεχές ενδιαφέρον του όσον αφορούσε την πρόοδο και εξέλιξη της παρούσας διατριβής καθώς επίσης για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και συναντήσεις μας καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής. Η συμμετοχή του στην δημιουργία μιας μικρής μονάδας υπολογιστικής χημείας ήταν σημαντική για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής και θα μπορούσε να σηματοδοτήσει την αρχή νέων επιστημονικών προσεγγίσεων στο εργαστήριο της Χημείας των Πεπτιδίων.

Ευχαριστίες απευθύνω επίσης στον Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Αθανάσιο Τζιούφα, ως επιστημονικό υπεύθυνο του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε αυτό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Λέκτορα του Οικονομικού Τμήματος του Πανεπιστήμιου Ιωαννίνων κ. Αθανάσιο Σταυρακούδη για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε σε θέματα Υπολογιστικής Χημείας και για τις σημαντικές γνώσεις που μου μετέδωσε καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την Δρα κ. Μεταξία Βλάσση στο Ινστιτούτο Βιολογίας στο Ερευνητικό Κέντρο 'Δημόκριτος', για την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε στα πρώτα μου βήματα στο χώρο της Υπολογιστικής Χημείας και για το συνεχές ενδιαφέρον της.



Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τη μελέτη αυτής της διατριβής και τα εύστοχα σχόλιά τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο της Χημείας των Μεπτιδίων για τη φιλική τους διάθεση καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο και για όλες τις ευχάριστες αναμνήσεις που μοιραζόμαστε.



の日本のためであったと

TEPIEXOMENA

-

-

.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι - ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (ΜΗC)	3
ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΗΟ ΜΟΡΙΩΝ	5
ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ	7
ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΗΣ ΜΟΡΙΩΝ	8
1. ΜΗΟ ΜΟΡΙΑ ΤΑΞΗΣ Ι	9
2. ΜΗΟ ΜΟΡΙΑ ΤΑΞΗΣ ΙΙ	11
3. Η ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΑ ΜΗC ΜΟΡΙΑ	13
ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	16
1. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΟΥΣ ΜΟΡΙΟΥ αβ TCR	16
2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΟΥΣ ΜΟΡΙΟΥ Υδ ΤCR	17
3. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΟΡΦΩΝ αβ ΚΑΙ γδ TCR	17
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΜΗΟ	18
CD4+/ CD8+ T AEMΦOKYTTAPA	20
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ-ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ- ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ	21
ΤΥΠΟΙ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	23
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ Ι	24

27 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ - ΤΟ LA/SSB ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ 29 30 ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ LA ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ 31 1. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ 31 2. Η ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ΤΟΥ LA225-334 32 3. Η ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ΤΟΥ LA MOTIBOY (1-103) 36 4. Η ΤΡΙΔΙΑΣΤΑΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ RRM 38 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ LA ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ 38 ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟ RNA ΤΗΣ LA ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ 39 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ LA ΠΟΥ ΣΥΝΕΙΣΦΕΡΟΥΝ ΣΤΗΝ RNA ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ 39 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ ΙΙ 41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ - ΤΟ) ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJOGREN'S (SS)
-------------------	---------------------------

TO ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJOGREN'S (SS)

45

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SJOGREN'S	47
ΑΙΤΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SJOGREN'S	48
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SJOGREN'S	48
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΝΤΙ-LA/SSB · - ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ SS ME THN ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΤΩΝ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ ΙΙΙ	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΥ - ΑΡΧΕΣ ΟΜΟΛΟΓΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ	55
ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	57
ΒΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ	58
1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΔΙΠΛΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΚΜΑΓΕΙΟΥ	59
2. ΟΜΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΙΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΣΤΟΧΟΥ-ΕΚΜΑΓΕΙΟΥ	61
3. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ	62
4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ	62
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ	63
ΛΑΘΗ ΣΤΑ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ ΙV	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V - Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΕΠΙΤΟΠΟΙ-ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ	71
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ	73
1. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ	73
1.1 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	74
2. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΣΩΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ	75
2.1 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	75
3. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΩΝ ΜΗC-ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ	75
3.1 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	76
4. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ	77
4.1 Η ΙΔΕΑ ΤΩΝ ΗLΑ-ΙΙ ΜΗΤΡΩΝ	80
ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΕΡΙΤΟΡΕ	82
1. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΚΑΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΤΕΡΙΤΟΡΕ	82
2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΤΕΡΙΤΟΡΕ	85
TO NPOLPAMMA MULTIPRED	87
1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	87
2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ MULTIPRED	89
TO ПРОГРАММА MHCPRED	90



1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	90
2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΜΗCPRED ΜΕ ΑΛΛΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ V	93

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ	99
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	101
1. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ	102
2. ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ	103
3. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗΣ	105
4. ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	107
4.1 Η ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ CHARMM	108
5. ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ	112
5.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΤΡΑ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ	114
5.2 ΣΥΝΑΡΤΗΣΙΑΚΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	116
5.3 Η ΕΞΙΣΩΣΗ POISSON-BOLTZMANN	117
5.4 ΤΟ ΣΥΝΕΧΕΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΝΔΙΑΛΥΤΩΣΗΣ GB/SA	118
6. Η ΜΕΘΟΔΟΣ LIE ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΠΟ ΜΟ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ	120
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ VI	122

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII - ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	127
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	129

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII - ΟΜΟΛΟΓΉ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ DQ2 ΚΑΙ DQ7

ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ DQ8	133
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	135
2. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΗLA-DQ2 ΚΑΙ DQ7	135
3. ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ DQ2 ΚΑΙ DQ7 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ DQ8	137
4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΩΝ DQ2 ΚΑΙ DQ7 ΜΕ ΤΟ DQ8	140
5. Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ	144



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΧ - ΠΡΟΒΛΕΨΗ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ	153
1. ΠΡΟΒΛΕΨΗ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ TAYLOR	155
2. ΠΡΟΒΛΕΨΗ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΕΡΙΤΟΡΕ	157
3. ΠΡΟΒΛΕΨΗ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ MULTIPRED	163
4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ	166

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Χ - ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ	169
ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ TAYLOR ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ Β	171

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΧΙ - ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ Τ	
ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ	175
1. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ GETAREA	177
2. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΙΝΚΕR ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ DQ-ΠΕΠΤΙΔΙΟ	178
3. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ MHCPRED	180
4. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ DQ8- ΠΕΠΤΙΔΙΟ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ Β ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ DQ7-ΠΕΠΤΙΔΙΟ	182
4.1 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΤΟ DQ8, ΣΕ ΚΙΝΗΣΗ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ	183
4.2 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ, ΣΕ ΚΙΝΗΣΗ ΤΟ DQ8	185
4.3 ΣΕ ΚΙΝΗΣΗ ΧΩΡΙΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΤΟ DQ8 ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ	187
4.4.1 ΣΕ ΚΙΝΗΣΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΤΟ DQ8 ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (Α)	189
4.4.2 ΣΕ ΚΙΝΗΣΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΤΟ DQ8 ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (Β)	192
5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ DQ-ΠΕΠΤΙΔΙΟ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LIE	223

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΧΙΙ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	225
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	227

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΧΙΙΙ - ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗ



	243
	281
	291
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV	305
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V	319
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI	329
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII	337
	341





ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

<u>ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΣΤΗΜΑ</u> ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (ΜΗC)



ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΗΟ ΜΟΡΙΩΝ

Το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας MHC (major histocompatibility complex) είναι μια περιοχή υψηλά πολυμορφικών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων εκφράζονται στις επιφάνειες μιας ποικιλίας κυττάρων. Τα γονίδια παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση σε πρωτεϊνικά αντιγόνα. Αυτό συμβαίνει διότι τα Τ λεμφοκύτταρα (ειδικά για τα αντιγόνα) δεν αναγνωρίζουν τα αντιγόνα σε ελεύθερη ή διαλυτή μορφή αλλά αντί αυτού αναγνωρίζουν περιοχές των πρωτεϊνικών αντιγόνων (π.χ. πεπτίδια), τα οποία προσδένονται μη ομοιοπολικά στα προϊόντα των γονιδίων. Με άλλα λόγια τα ΜΗC μόρια παρέχουν ένα σύστημα έκθεσης των αντιγονικών πεπτιδίων στα Τ κύτταρα. Αυτό επιτρέπει στα Τ κύτταρα να αξιολογήσουν την παρουσία πεπτιδίων που προέρχονται από ξένες πρωτεΐνες. Υπάρχουν 2 τύποι προϊόντων των γονιδίων που καλούνται τάξης Ι και τάξης ΙΙ μόρια και κάθε Τ κύτταρο που αναγνωρίζει ξένα αντιγόνα προσδένεται μόνο σε ένα εκ των δύο MHC μορίων. Επιπλέον ο αντιγονικός υποδοχέας των ώριμων Τ κυττάρων είναι ειδικός για το σύμπλοκο μεταξύ ενός ξένου πρωτεϊνικού αντιγόνου και του ΜΗC μορίου. Έτσι τα ΜΗΟ μόρια δεν εκθέτουν μόνο τα αντιγονικά πεπτίδια, αλλά αποτελούν αναπόσπαστο συστατικό των υποκαταστατών που αναγνωρίζουν τα Τ κύτταρα^[1].

Παρακάτω περιγράφονται περιληπτικά οι κύριες φυσιολογικές συνέπειες της εξειδίκευσης των Τ λεμφοκυττάρων για το σύμπλοκο MHC-αντιγόνου.

- 1. Η ανοσολογική απόκριση προς μια ξένη πρωτεΐνη καθορίζεται από την έκφραση ειδικών ΜΗC μορίων που μπορούν να προσδέσουν και να παρουσιάσουν πεπτιδικά κομμάτια της πρωτεΐνης αυτής στα Τ κύτταρα. Τα ΜΗC γονίδια είναι πολυμορφικά π.χ. πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα υπάρχουν μέσα στον πληθυσμό, τα οποία διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να προσδένουν και να παρουσιάζουν τους διαφορετικούς αντιγονικούς καθοριστές των πρωτεΐνών. Αν ένα πεπτίδιο έχει τέτοια δομή ώστε να μη μπορεί να προσδεθεί σε κανένα αλληλόμορφο των ΜΗC μορίων, τα Τ κύτταρα δε μπορούν να ανταποκριθούν σε αυτό το πεπτίδιο. Με αυτό το τρόπο τα ΜΗC γονίδια επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση έναντι των πρωτεϊνικών αντιγόνων.
- 2. Επειδή τα ΜΗC μόρια είναι μεμβρανικά και όχι εσωτερικά κρυμμένα, τα Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν ξένα αντιγόνα μόνο όταν αυτά προσδένονται στην επιφάνεια άλλων κυττάρων. Αυτό περιορίζει την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων διότι τα Τ κύτταρα αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα που φέρουν το σύμπλοκο ΜΗC-αντιγόνου και όχι με διαλυτά αντιγόνα. Στην πραγματικότητα ο αντιγονικός υποδοχέας των Τ κυττάρων προσδένεται στις

παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων του πεπτιδίου και του MHC μορίου. Το κύτταρο που φέρει το MHC μόριο 'παρουσιάζει' το αντιγόνο στο T λεμφοκύτταρο. Η αναγνώριση του αντιγόνου στην επιφάνεια ενός κυττάρου περιορίζει την ενεργοποίηση του T κυττάρου στις περιοχές όπου είναι συγκεντρωμένο το αντιγόνο, π.χ. στην επιφάνεια ενός μολυσμένου κυττάρου ή σε ένα ειδικό δευτερογενές λεμφοειδές οργανίδιο που λειτουργεί με το να συλλέγει το αντιγόνο. Τα αντισώματα αντίθετα λειτουργούν με το να προσδένονται σε διαλυτά αντιγόνα και να τα εξουδετερώνουν.

3. Ο τύπος πρόσδεσης του αντιγόνου με το MHC--I και MHC--II μόριο καθορίζει το είδος των Τ κυττάρων που διεγείρονται από διαφορετικούς τύπους αντιγόνων. Τα μονοπάτια βιοσύνθεσης και συνάθροισης των MHC--I και MHC--II πρωτεϊνών καθορίζουν την πηγή των πεπτιδίων που σχετίζονται με κάθε τάξης MHC μόρια. Τμήματα πεπτιδίων, που παράγονται στα ενδοσώματα ή στα λυσοσώματα από πρωτεϊνες που έχουν υποστεί ενδοκυττάρωση, προσδένονται στο MHC--II μόριο. Σε αντίθεση τα πεπτίδια που παράγονται στο κυτοσόλιο σχετίζονται με το MHC--I μόριο. Σαν συνέπεια οι πρωτεϊνες που συντίθενται εξωγενώς ή ενδογενώς αναγνωρίζονται από διαφορετικούς λειτουργικούς πληθυσμούς Τ κυττάρων (Εικ.1).



Εικόνα 1: Παρουσίαση των πεπτιδίων που προσδένονται στα ΜΗC μόρια τάξης Ι και ΙΙ για την αναγνώριση των συμπλόκων ΜΗC-πεπτιδίου από διαφορετικούς Τ κυτταρικούς υποδοχείς.

BIBAIOG

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

Το είδος των πειραμάτων που έγιναν για να προσδιορίσουμε τα MHC γονίδια στα ποντίκια, δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους ανθρώπους. Παρόλα αυτά οι μέθοδοι θεραπείας που χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική ιατρική παρείχαν μια ισχυρή ώθηση για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό MHC γονιδίων στους ανθρώπους. Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που είχαν χαλασμένο συκώτι ή έκαναν μετάγγιση αίματος συχνά ανέπτυσσαν κυκλοφορούντα αντισώματα ενεργά με τα αντιγόνα των λευκοκυττάρων του αίματος ή με οργανικούς δότες. Αυτοί οι οροί που δρούσαν εναντίον των κυττάρων των οργανισμών ονομάστηκαν αλοαντιγόνα. Έχει αναφερθεί ότι αυτά τα αλοαντιγόνα είναι προϊόντα πολυμορφικών γονιδίων που διακρίνουν ξένα σώματα από τα ίδια. Προσπάθειες σε διεθνές επίπεδο έδειξαν ότι υπάρχουν τουλάχιστον έξι ξεχωριστοί πολυμορφικοί γενετικοί τόποι (loci). Επειδή αυτά εκφράζονται στα ανθρώπινα λευκοκύτταρα, τα αλοαντιγόνα που αναγνωρίζονται από αυτούς τους ορούς έγιναν γνωστά ως ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens) HLAs^[2](Εικ.2).



Εικόνα 2: Απεικόνιση του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA (Human Leukocyte Antigen).

Τα τρία πρώτα γονίδια καλούνται HLA-A, HLA-B και HLA-C, ενώ τα επόμενα τρία γονίδια καλούνται HLA-D. Το πρώτο προϊόν γονιδίου που ανιχνεύτηκε από τα

αλοαντισώματα και βρέθηκε στην περιοχή HLA-D ονομάστηκε HLA-D related ή DR. Τα επόμενα ονομάστηκαν αλφαβητικά HLA-DQ και HLA-DP. Η HLA περιοχή είναι τώρα γνωστή σαν ανθρώπινο (human) MHC και είναι ισοδύναμη με την H-2κ περιοχή των ποντικιών. Οι διάφοροι HLA και H-2 τόποι καθώς και τα παράγωγα των γονιδίων τους είναι δομικά και λειτουργικά ομόλογα. Συγκεκριμένα τα ανθρώπινα HLA-A, HLA-B και HLA-C μοιάζουν με τα H-2κ, D και L του ποντικού και καλούνται MHC μόρια τάξης Ι. Πράγματι παρόμοια πολυμορφικά γονίδια και προϊόντα πρωτεϊνών έχουν βρεθεί σε κάθε είδος σπονδυλωτού που εξετάστηκε^[3, 4].

Δυο τάξεις Τ λεμφοκυττάρων αναγνωρίζουν και ανταποκρίνονται σε διαφορετικούς τύπους των προϊόντων των MHC γονιδίων. Τα CD4+ Τ κύτταρα, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι βοηθητικά κύτταρα που παράγουν κυτοκίνη, είναι ειδικά για τάξης ΙΙ μόρια π.χ. HLA-DR, -DQ και DP στους ανθρώπους και Ι-Α και Ι-Ε στα ποντίκια. Τα CD8+ Τ κύτταρα, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι κυτολιτικά Τ λεμφοκύτταρα, είναι ειδικά για τάξης Ι μόρια και στους ανθρώπους και στα ποντίκια. Αυτή η ειδική αναγνώριση από Τ κύτταρα δεν απευθύνεται μόνο στην αναγνώριση από MHC μόρια αλλά και στην αναγνώριση από άλλες πρωτεΐνες π.χ. μικροβιακά αντιγόνα, που σχετίζονται με MHC μόρια. Με άλλα λόγια τα CD4+ Τ κύτταρα αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα που προσδένονται σε MHC–II μόρια και τα CD8+ Τ κύτταρα αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα που προσδένονται σε MHC–I μόρια.

Το συνολικό σετ των αλληλόμορφων σε κάθε χρωμόσωμα καλείται MHC απλότυπος. Στους ανθρώπους σε κάθε αλληλόμορφο δίνεται μια αριθμητική ονομασία. Για παράδειγμα, ένας HLA απλότυπος ενός ανθρώπου μπορεί να είναι HLA-A₂, -B₅, DR₃ κ.λ.π. Όλοι οι ετερόζυγοι οργανισμοί φυσικά έχουν δύο HLA απλότυπους. Στα ποντίκια σε κάθε HLA αλληλόμορφο δίνεται μια γραμματική ονομασία. Ποντίκια που είναι ομόζυγα έχουν απλό απλότυπο. Έτσι ο απλότυπος ενός H-2κ ποντικιού είναι H-2κ^κ, I-A^κ, I-E^κ. Έτσι εκτεταμένοι απλότυποι, στους οποίους πολλαπλά HLA γονίδια παραμένουν συνδεδεμένα, σχετίζονται με συγκεκριμένες αυτοάνοσες παθήσεις.

ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΗΟ ΜΟΡΙΩΝ

Η αντίληψη ότι τα ΜΗC μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση όλων των πρωτεϊνικών αντιγόνων από τα Τ κύτταρα οδήγησε σε μια τεράστια προσπάθεια πολλών εργαστηρίων να επιλύσουν τη δομή αυτών των μορίων. Η βιοχημική ανάλυση των ΜΗC μορίων ήταν ιδιαίτερα επιτυχημένη, ειδικά με την επίλυση της κρυσταλλικής δομής των ΜΗC μορίων τάξης Ι και ΙΙ.



1. ΜΗC μόρια τάξης Ι

Όλα τα ΜΗC μόρια τάξης Ι έχουν δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες την α ή βαριά αλυσίδα μεγέθους 44KD στους ανθρώπους και 47KD στα ποντίκια και την β-αλυσίδα μεγέθους 12KD και για τα δυο είδη. Η α-αλυσίδα σχηματίζεται από ένα βασικό πολυπεπτίδιο μεγέθους περίπου 40KD και περιέχει ένα ή δυο Ν-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες στους ανθρώπους και στα ποντίκια αντίστοιχα. Κάθε α-αλυσίδα προσανατολίζεται έτσι ώστε τα 3/4 ενός ολοκληρωμένου πολυπεπτιδίου, συμπεριλαμβανομένου του αμινο-τελικού άκρου και των ομάδων των ολιγοσακχαριτών να εκτείνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον, ένα μικρό υδρόφοβο τμήμα να καλύπτει τη μεμβράνη και το καρβοξυ-τελικό άκρο 30 αμινοξέων περίπου να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η β-αλυσίδα αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με την εξωκυττάρια περιοχή της α-αλυσίδας και δεν έχει άμεση επαφή με το κύτταρο^[5].

Τα ΜΗC-μόρια τάξης Ι μπορούν να διαιρεθούν σε 4 ξεχωριστές περιοχές:

- μια εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων στο αμινο-τελικό άκρο
- α μια εξωκυττάρια Ig-περιοχή
- μια μεταμεμβρανική περιοχή και
- α μια κυτταροπλασματική περιοχή

Η κύρια λειτουργία των MHC μορίων τάξης Ι είναι η πρόσδεση τμημάτων ξένων πρωτεϊνών ώστε να σχηματιστούν σύμπλοκα MHC-πρωτεϊνών τα οποία αναγνωρίζονται από τα Τ λεμφοκύτταρα. Το τμήμα των MHC μορίων τάξης Ι, που αλληλεπιδρά με το αντιγονικό πεπτίδιο, σχηματίζεται από 180 περίπου αμινοξέα που βρίσκονται στο Ν-τελικό άκρο της α-αλυσίδας. Αυτή η περιοχή αποτελείται από δυο ομόλογες περιοχές περίπου 90 αμινοξέων που αναφέρονται ως α₁ και α₂. Η α₂ περιοχή περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό και σχηματίζει θηλειά 63 περίπου αμινοξέων. Οι α₁ και α₂ περιοχές αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας 8 β-πτυχωτά φύλλα και 2 παράλληλες α-έλικες.

Τα 4 φύλλα του β-πτυχωτού φύλλου και η μια από τις δυο α-έλικες σχηματίζονται από τα αμινοξέα της α₁ περιοχής. Τα υπόλοιπα 4 φύλλα και η άλλη αέλικα σχηματίζονται από τα αμινοξέα της α₂ περιοχής. Οι α-έλικες σχηματίζουν ένα άνοιγμα λόγω των πτυχωτών φύλλων. Το μέγεθος του ανοίγματος είναι τέτοιο ώστε να προσδένει 9-11 αμινοξέα μιας ξένης πρωτεΐνης σε μια εύκαμπτη εκτεταμένη διαμόρφωση και είναι η περιοχή που τα αντιγονικά πεπτίδια προσδένονται στα MHC μόρια και αναγνωρίζονται από Τ κύτταρα. Το άνοιγμα είναι αρκετά μικρό για να μπορεί να προσδεθεί μια ανέπαφη σφαιρική πρωτεΐνη και έτσι διαφέρει από το επίπεδο τμήμα πρόσδεσης των αντισωμάτων. Το μικρό μέγεθος του ανοίγματος στα MHC μόρια απαιτεί οι φυσικές σφαιρικές πρωτεΐνες να τεμαχίζονται σε μικρότερα κομμάτια ώστε να μπορούν να προσδεθούν στα MHC μόρια επιτρέποντας την αναγνώριση με τα Τ λεμφοκύτταρα.

Η α₃ περιοχή περιλαμβάνει περίπου 90 αμινοξέα που εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της α₂ περιοχής. Η αμινοξική ακολουθία είναι υψηλά διατηρημένη ανάμεσα σε όλα τα MHC μόρια τάξης ί που εξετάστηκαν και με ανάλυση της αλληλουχίας προέκυψε ότι είναι ομόλογη με περιοχές της lg και περιέχει μια παρόμοια θηλειά με κείνη της lg οφειλόμενη σε δισουλφιδικούς δεσμούς^[6-8].



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση ενός ΜΗC μορίου τάξης Ι.

Η β-αλυσίδα των ΜΗC μορίων τάξης Ι είναι ίδια για όλα τα ΜΗC μόρια που εξετάστηκαν και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο έξω από το ΜΗC. Το πολυπεπτίδιο αυτό είναι όμοιο με μια πρωτεΐνη, που προσδιορίστηκε στην ανθρώπινη ουρίνη και καλείται β₂-μικρογλοβουλίνη, όσον αφορά στην ηλεκτροφορητική ευκινησία, στο μέγεθος και στη διαλυτότητα. Η β-αλυσίδα του ΜΗC μορίου τάξης Ι καλείται συνήθως β₂-μικρογλοβουλίνη ακόμη και όταν προσδένεται στην επιφάνεια του κυττάρου (Εικ.3). Όπως η α₃, έτσι και η β₂-μικρογλοβουλίνη περιέχει μια περιοχή ομόλογη της Ιg και ένα δισουλφιδικό δεσμό παρόμοιο με αυτόν που συναντάται στην Ig. Επίλυση της κρυσταλλικής δομής του ΜΗC μορίου τάξης Ι επιβεβαίωσε ότι η α₃-αλυσίδα και η β₂-μικρογλοβουλίνη συγκροτούνται σε περιοχές σαν την Ig. Θεωρήθηκε έτσι ότι τα ΜΗC μόρια ανήκουν στην υπεροικογένεια των Ig. Αυτές οι δυο περιοχές (α₃ και β₂) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και η β₂ επιπλέον αλληλεπιδρά με τη περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου αλληλεπιδρώντας έτσι με τις α₁ και α₂ περιοχές. Η πρόσδεση του πεπτιδίου σταθεροποιείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της β₂μικρογλοβουλίνης με την α-αλυσίδα.

Άρα το φυσικό MHC μόριο τάξης Ι θεωρείται ως ένα τριμερές που αποτελείται από τα εξής:

- ο την α-αλυσίδα
- ο τη β₂-μικρογλοβουλίνη και
- ο το πεπτίδιο.

Η ισχυρή συσχέτιση της έκφρασης των CD8+ T κυττάρων με εξειδίκευση στα σύμπλοκα MHC–I/πεπτιδίου οδήγησε στην απλή πρόταση ότι τα CD8+ μπορεί να λειτουργούν με το να προσδένονται σε μια μη πολυμορφική περιοχή του μορίου⁽⁹⁾. Αυτή η υπόθεση έχει τώρα αποδειχτεί. Μελέτες έδειξαν ότι η μη πολυμορφική α₃ περιοχή περιέχει μια προεξέχουσα θηλειά, 25 περίπου υδρόφοβων αμινοξέων, η οποία είναι υπεύθυνη για τη πρόσδεση των CD8+ T κυττάρων.

2. ΜΗC μόρια τάξης ΙΙ

Όλα τα MHC μόρια τάξης ΙΙ αποτελούνται από 2 μη ομοιοπολικά σχετιζόμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Εικ.4). Οι δύο αλυσίδες μοιάζουν πολύ μεταξύ τους στη συνολική δομή τους. Η α-αλυσίδα μεγέθους 32-34KD είναι ελαφρά μεγαλύτερη από την β-αλυσίδα μεγέθους 29-32KD ως αποτέλεσμα της πιο εκτεταμένης γλυκοζυλίωσης. Στα MHC μόρια τάξης ΙΙ και οι δυο αλυσίδες περιέχουν Ν-συνδεδεμένες ομάδες ολιγοσακχαριτών, το Ν-τελικό άκρο είναι εξωκυττάριο και το C- τελικό άκρο είναι εσωκυτταρικό και πάνω από τα 2/3 της αλυσίδας εντοπίζονται εξωκυττάρια. Οι δυο αλυσίδες των MHC μορίων τάξης ΙΙ κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια με λίγες εξαιρέσεις και είναι πολυμορφικές. Η τρισδιάστατη δομή των μορίων αυτών έχει επιλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Επιπλέον η νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία πολλών MHC μορίων τάξης ΙΙ είναι γνωστή. Μελέτες δείχνουν ότι μεταξύ των μορίων τάξης Ι και ΙΙ υπάρχουν ομοιότητες κυρίως στο άνοιγμα που προσδένεται το πεπτίδιο^[6, 8-10].





Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του ΜΗC-ΙΙ μορίου.

Το ΜΗΟ μόριο τάξης ΙΙ διαιρείται στις εξής περιοχές:

- μια περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου
- μια περιοχή ανάλογη με την lg
- μια μεταμεμβρανική περιοχή και
- μια κυτοπλασματική περιοχή.

Οι εξωκυττάριες περιοχές των α και β αλυσίδων έχουν υποδιαιρεθεί σε δυο περιοχές περίπου 90 αμινοξέων που καλούνται α1, α2 και β1, β2 αντίστοιχα. Η περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου για το ΜΗC μόριο σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση και των δυο αλυσίδων (α1 και β1). Αυτό διαφέρει σε σχέση με το MHC μόριο τάξης Ι όπου μόνο η α-αλυσίδα εμπλέκεται στο σχηματισμό του ανοίγματος στο οποίο προσδένεται το πεπτίδιο. Οι αλυσίδες α1 και β1 σχηματίζουν β-πτυχωτό φύλλο (8 φύλλα) και δυο α-έλικες. Τα τέσσερα φύλλα και η μια α-έλικα σχηματίζεται από την α1-αλυσίδα ενώ τα άλλα τέσσερα φύλλα και η άλλη α-έλικα σχηματίζεται από την β1αλυσίδα. Η α1-αλυσίδα δεν περιέχει δισουλφιδική θηλειά σε αντίθεση με τη β1αλυσίδα που περιέχει. Η θηλειά της β1-αλυσίδας είναι στην ίδια θέση με τη θηλειά της α2-αλυσίδας για ΜΗC μόρια τάξης Ι. Όπως συμβαίνει για τα ΜΗC μόρια τάξης Ι, τα ΜΗΟ μόρια τάξης ΙΙ χρησιμοποιούν τις α-έλικες και τα β-πτυχωτά φύλλα για να σχηματίσουν το άνοιγμα στο οποίο θα προσδεθεί το πεπτίδιο. Οι α2 και β2 αλυσίδες περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς και με βάση την ανάλυση αμινοξέων ανήκουν στην Ig υπεροικογένεια. Αυτές οι περιοχές καθώς και η α3-αλυσίδα του MHC μορίου τάξης Ι και η β2-μικρογλοβουλίνη συγκρατούνται στις ig περιοχές μέσα στο φυσικό ΜΗC μόριο. Οι α2 και β2 αλυσίδες είναι πολυμορφικές για τα διάφορα αλληλόμορφα

ενός συγκεκριμένου γονιδίου τάξης ΙΙ αλλά παρουσιάζουν κάποιες διαφορές για διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Έτσι οι α2 περιοχές όλων των DR αλληλόμορφων είναι όμοιες ενώ η DRα2 διαφέρει από την DPa2 και DQa2.

Οι περιοχές που είναι ομόλογες με την lg για ένα MHC μόριο τάξης ll είναι πιθανόν σημαντικές για τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις δυο αλυσίδες αν και άλλες περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας συνεισφέρουν επίσης. Γενικά οι α-αλυσίδες ενός γενετικού τόπου (locus) π.χ. DR, αλληλεπιδρούν καλύτερα με τη β-αλυσίδα του ίδιου γενετικού τόπου (locus) και λιγότερο συχνά με β-αλυσίδες άλλου τόπου π.χ. DQ ή DP. Τα C-τελικά άκρα των α₂ και β₂ τμημάτων συνεχίζουν με HLA αλληλουχίες 25 υδρόφοβων αμινοξέων που καλύπτουν τη μεμβράνη. Η μεταμεμβρανική περιοχή τελειώνει με ένα σύμπλεγμα βασικών αμινοξέων και για τις δυο αλυσίδες. Αυτά ακολουθούνται από τα C-τελικά άκρα των πολυπεπτιδίων που σχηματίζουν κοντές υδρόφιλες κυπαροπλασματικές ουρές.

3. Η δομική βάση της πρόσδεσης του πεπτιδίου στα ΜΗC μόρια

Πριν αναφερθούν τα κύρια χαρακτηριστικά πρόσδεσης των πεπτιδίων στα ΜΗC μόρια τάξης Ι και ΙΙ, θα περιγραφούν περιληπτικά τα χαρακτηριστικά κλειδιά αυτής της αλληλεπίδρασης όπως έχουν προσδιοριστεί από βιοχημικές μελέτες^[1].

1. Η συσχέτιση των αντιγονικών πεπτιδίων με τα MHC μόρια είναι μια χαμηλής συγγένειας αλληλεπίδραση με ένα αργό ρυθμό σύμπλεξης και ένα πολύ αργό ρυθμό αποσύμπλεξης. Τα χαρακτηριστικά αυτά προσδιορίστηκαν αρχικά με τις τεχνικές ισορροπητικής διαπίδυσης (equilibrium dialysis) και διήθησης σε πήγμα (gel filtration), χρησιμοποιώντας καθαρά MHC μόρια τάξης ΙΙ και φθορίζοντα ραδιενεργά ιχνηθετημένα πεπτίδια. Η αλληλεπίδραση ΜΗC-πεπτιδίου είναι αρκετά ασθενέστερη από εκείνη μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος, η οποία συνήθως έχει Kd=10⁻⁷ έως 10⁻¹¹Μ. Σε ένα διάλυμα η πρόσδεση του πεπτιδίου πάνω στο ΜΗC μόριο τάξης ΙΙ παίρνει 15 έως 30 λεπτά. Αν γίνει η πρόσδεση το πεπτίδιο μπορεί να μείνει συνδεδεμένο από ώρες μέχρι εβδομάδες. Πριν να συμβεί η πρόσδεση ΜΗC-πεπτιδίου, το πεπτίδιο και το ΜΗC υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές γεγονός που αποδεικνύεται από τον αργό ρυθμό πρόσδεσης. Η πρόσδεση του πεπτιδίου στο ΜΗC τάξης Ι είναι ακόμη πιο αργή και συνήθως απαιτεί το διαχωρισμό της α-αλυσίδας από β2m μικρογλοβουλίνη^[11].

BIBAR

- Κάθε ΜΗC μόριο τάξης Ι ή ΙΙ προσδένει ένα μόνο πεπτίδιο κάθε φορά. Αυτό επιβεβαιώθηκε με την επίλυση της κρυσταλλικής δομής των ΜΗC μορίων τάξης Ι και ΙΙ, η οποία έδειξε ότι το πεπτίδιο καταλαμβάνει ένα μόνο άνοιγμα πρόσδεσης.
- 3. Πολλά διαφορετικά πεπτίδια μπορούν να προσδεθούν στο ίδιο MHC μόριο, ένα όμως κάθε φορά. Αυτό αποδείχθηκε πειραματικά αφού η αναγνώριση ενός συμπλόκου MHC--πεπτιδίου από ένα T κύτταρο μπορούσε να ανασταλεί από την προσθήκη ενός άλλου δομικά παρόμοιου πεπτιδίου. Σε αυτά τα πειράματα το MHC μόριο μπορούσε να προσδέσει διαφορετικά πεπτίδια αλλά το T λεμφοκύτταρο αναγνώριζε μόνο ένα σύμπλοκο MHC--πεπτιδίου κάθε φορά. Σαφείς πληροφορίες για την ικανότητα ενός MHC μορίου να προσδένει διαφορετικά πεπτίδια αλλά το T λεμφοκύτταρο αναγνώριζε μόνο ένα σύμπλοκο MHC-μορίου να προσδένει διαφορετικά πεπτίδια αλλά το T λεμφοκύτταρο αναγνώριζε μόνο ένα σύμπλοκο MHC-μορίου να προσδένει διαφορετικά πεπτίδια προήλθαν από μελέτες της πρόσδεσης καθαρών MHC μορίων σε διάλυμα καθώς και από την ανάλυση των πεπτιδίων που εκλούσθηκαν από τα σύμπλοκα MHC-πεπτιδίου. Αυτές οι παρατηρήσεις σε συνδυασμό με τον περιορισμένο αριθμό αλληλόμορφων που εκφράζονται σε κάθε οργανισμό στηρίζουν την υπόθεση ότι τα MHC μόρια δείχνουν ευρεία εξειδίκευση για την πρόσδεση πεπτιδίων και ότι η εξειδίκευση της αναγνώρισης του πεπτιδίου αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στους αντιγονικούς υποδοχείς.
- 4. Όλα τα πεπτίδια που προσδένονται σε ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο MHC μόριο εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά που πιθανόν δεν είναι τα ίδια με κείνα των πεπτιδίων που προσδένονται σε διαφορετικό τύπο αλληλόμορφου MHC μορίου. Παράδειγμα κοινών χαρακτηριστικών είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ στη θέση 2 ή ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ στη θέση 7. Πειράματα μεταλλαξογένεσης έχουν επιβεβαιώσει ότι τέτοιες θέσεις είναι κρίσιμες για την πρόσδεση του πεπτιδίου σε συγκεκριμένα MHC αλληλόμορφα.
- 5. Υπάρχουν έντονες διαφορές για τη φύση των πεπτιδίων που προσδένονται στα MHC μόρια τάξης Ι και ΙΙ. Τα πεπτίδια που εκλούονται από τα σύμπλοκα MHCπεπτιδίου τάξης Ι έχουν μήκος 9-11 αμινοξέα περίπου ενώ αυτά που εκλούονται από σύμπλοκα MHC-πεπτιδίου τάξης ΙΙ έχουν μήκος 9-30 αμινοξέα ή περισσότερα.
- 6. Τα αμινοξέα, που διαφέρουν ανάλογα με το MHC αλληλόμορφο τάξης I ή II, περιορίζονται κυρίως στην αμινο-τελική περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου. Πειράματα μετάλλαξης των MHC μορίων επιβεβαιώνουν ότι πολλά από αυτά τα πολυμορφικά αμινοξέα προσδιορίζουν την εξειδίκευση πρόσδεσης του πεπτιδίου από το μόριο που κωδικοποιείται από ένα συγκεκριμένο MHC αλληλόμορφο. Άλλα πολυμορφικά αμινοξέα που εντοπίζονται στην αμινο-τελική περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου. άλλοι πολυμορφικά αμινοξέα προσδιορίζουν την εξειδίκευση πρόσδεσης του πεπτιδίου από το μόριο που κωδικοποιείται από ένα συγκεκριμένο MHC αλληλόμορφο. Άλλα πολυμορφικά αμινοξέα που εντοπίζονται στην αμινο-τελική περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου.

Αυτά τα χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης MHC-πεπτιδίου μπορούν να εξηγηθούν με ακριβείς δομικές προσεγγίσεις. Για παράδειγμα οι πλευρές της α-έλικας του ανοίγματος για το MHC μόριο τάξης Ι, που συγκλίνουν στα άκρα του ανοίγματος, οριοθετούν το μέγεθος των πεπτιδίων που προσαρμόζονται στο άνοιγμα από 9 έως 10 αμινοξέα. Η πρόσδεση ενός 11-πεπτιδίου είναι πιθανή αλλά απαιτεί κάμψη του πεπτιδίου κεντρικά έτσι ώστε να προσαρμοστεί. Ένα 12-πεπτίδιο είναι αρκετά μεγάλο ώστε να χωρέσει στο συγκεκριμένο άνοιγμα. Σε αντίθεση, στο MHC μόριο τάξης ΙΙ, οι πλευρές της α-έλικας δε συγκλίνουν, επιτρέποντας στα πεπτίδια που προσδεθούν να επεκταθούν εξωτερικά από τα άκρα του ανοίγματος. Έτσι τα πεπτίδια που προσδένονται στα MHC μόρια τάξης ΙΙ δεν έχουν μέγιστο μήκος. Στα MHC μόρια τάξης Ι τα φορτισμένα αμινο-τελικά και καρβοξυ-τελικά άκρα του πεπτιδίου πρόσδεσης δεν αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με αντίθετα φορτία στο MHC μόριο τάξης ΙΙ¹¹².

Σε κάθε MHC μόριο τάξης Ι ή ΙΙ οι χαρακτηριστικές διατηρημένες δομές των πεπτιδίων που προσδένονται σε αυτόν τον αλληλόμορφο τύπο μορίου συμπληρώνονται από την παρουσία ειδικών δομικών χαρακτηριστικών του ΜΗC μορίου όπως η παρουσία θυλάκων (pockets) στο άνοιγμα πρόσδεσης (groove). Αυτοί οι θύλακες είναι στη πραγματικότητα διαστήματα ανάμεσα στο πεπτιδικό σκελετό και τα β-πτυχωτά φύλα. Η παρουσία ή απουσία ενός θύλακα καθορίζεται από την αμινοξική αλληλουχία των β-πτυχωτών φύλων και όταν ένας θύλακας σχηματιστεί, η πολυμορφική ακολουθία του ΜΗC μορίου, που σχηματίζει το θύλακα. καθορίζει τη φύση της πεπτιδικής παράπλευρης αλυσίδας που μπορεί να ταιριάξει στο θύλακα π.χ.υδρόφοβη, φορτισμένη κ.λπ. Διατηρημένες πεπτιδικές ακολουθίες, οι οποίες ταιριάζουν στους θύλακες των ΜΗC μορίων καλούνται αμινοξέα-άγκυρες (anchor residues) επειδή είναι κρίσιμες για την επαφή του πεπτιδίου με το MHC μόριο. Στις αρχικές δομές που επιλύθηκαν για τα ΜΗC μόρια τάξης Ι τα αμινοξέαάγκυρες εντοπίστηκαν κοντά στα άκρα του πεπτιδίου θέτοντας ένα μικρό περιορισμό στην πεπτιδική αλληλουχία εκτός από τα άκρα. Παρόλα αυτά τα αμινοξέα-άγκυρες μπορεί να παρατηρηθούν στη μέση του πεπτιδίου και να αλληλεπιδράσουν με θύλακες στη μέση του ανοίγματος. Τα αμινοξέα-άγκυρες συνεισφέρουν ισχυρά στη πρόσδεση του πεπτιδίου αλλά δεν αποτελούν τη μόνη βάση για την επαφή του με τα ΜΗΟ μόρια. Μερικά πολυμορφικά αμινοξέα στις α-έλικες του ΜΗΟ μορίου έρχονται σε επαφή με το πεπτίδιο και μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στη πρόσδεση. Τελικά μερικές επαφές ανάμεσα στο ΜΗC μόριο και το πεπτίδιο εμπλέκουν μη Τελικά μερικες επαψες αναμεσα στο πολυμορφικά αμινοξέα τυπικά αλληλεπιδρούν με

διατηρημένες περιοχές του πεπτιδίου, όπως ο πεπτιδικός σκελετός, δεν συνεισφέρουν στην εξειδίκευση αλλά σταθεροποιούν τη πρόσδεση.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η αναγνώριση των αντιγόνων από τα Τ λεμφοκύτταρα είναι κεντρικής σημασίας για την παραγωγή και ρύθμιση της αποτελεσματικής απόκρισης. Πολλά σημαντικά ερωτήματα στην ανοσολογία έχουν επικεντρωθεί στη φύση των υποδοχέων των Τ κυττάρων, που μεσολαβούν στην αναγνώριση των ειδικών αντιγόνων^[1,13]. Ένας υποδοχέας των Τ κυττάρων (T Cell Receptor, TCR) καθορίστηκε αρχικά και παρήχθη σε καθαρή μορφή χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα που κατευθύνονταν εναντίον ειδικών καθοριστών στα Τ κύτταρα. Ονομάστηκε αβ TCR γιατί πρόκειται για ετεροδιμερές μόριο που αποτελείται από μια α αλυσίδα και μια β αλυσίδα, οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Αργότερα απομονώθηκε ένας δεύτερος υποδοχέας των Τ κυττάρων που ονομάστηκε γδ.

1. Δομή του ετεροδιμερούς μορίου αβ TCR

Το ετεροδιμερές μόριο αβ TCR αποτελείται από τις ετεροδιμερείς υπομονάδες α (40-50kDa) και β (35-47kDa) που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό^[1,14,15]. Τα δομικά χαρακτηριστικά του ετεροδιμερούς μορίου αβ TCR παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου ετεροδιμερούς αβ TCR.



Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από δυο περιοχές, μία μεταβλητή περιοχή V (variable region domain) και μια σταθερή περιοχή C (constant region domain) που μοιάζουν με την ανοσοσφαιρίνη και περιέχουν περίπου 110 αμινοξέα, είναι δε συνδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός διαμεμβρανικού πεπτιδίου και φέρουν μια βραχεία κυτταροπλασματική ουρά. Η διαφορά του μοριακού βάρους στις αλυσίδες α και β οφείλεται στην παρουσία ενός επιπλέον υδατάνθρακα στο Ν-τελικό άκρο της αλυσίδας α. Ο δισουλφιδικός δεσμός που συνδέει τις αλυσίδες α και β εντοπίζεται κοντά στο C-τελικό άκρο. Ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό των διαμεμβρανικών περιοχών τόσο της α-αλυσίδας όσο και της βαλυσίδας είναι ότι περιλαμβάνουν θετικά φορτισμένα υπολείμματα αμινοξέων^[16,17]. Τα φορτισμένα αυτά υπολείμματα θεωρείται ότι συμμετέχουν στη συνάθροιση και ενδοκυτταρική μεταφορά του συμπλέγματος TCR. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων εντοπίζεται στις Ν-τελικές περιοχές των πολυπεπτιδίων α και β, που είναι ομόλογες με τις μεταβλητές περιοχές των ανοσοσφαιρινών. Αυτή η περιοχή κωδικοποιείται ανακατατάσσοντας τα τμήματα V, D και J των γονιδίων στην βαλυσίδα και τα τμήματα V και J των γονιδίων στην α-αλυσίδα. Η ανάλυση των αλληλουχιών των αμινοξέων των διαφόρων V περιοχών του TCR έχει δείξει περιοχές σχετικά μεγαλύτερης μεταβλητότητας, που αντιστοιχούν σε υπερμεταβλητές περιοχές ανοσοσφαιρινών (CDRs).

2. Δομή του ετεροδιμερούς μορίου γδ TCR

Η γενική δομή του γδ TCR είναι παρόμοια με τη δομή του αντίστοιχου αβ TCR, όπου κάθε αλυσίδα αποτελείται από περιοχές που μοιάζουν με την ανοσοσφαιρίνη, ένα διαμεμβρανικό τμήμα που περιλαμβάνει θετικά φορτισμένα υπολείματα αμινοξέων και μια βραχεία κυτταροπλασματική ουρά. Οι ανθρώπινες γ και δ αλυσίδες συνδέονται είτε με δισουλφιδικό δεσμό είτε με μη δισουλφιδικό. Στο ποντίκι δεν έχουν αναφερθεί μορφές του γδ TCR που να συνδέονται με μη-δισουλφιδικό δεσμό^[18-20].

3. Κατανομή των μορφών αβ και γδ του TCR

Οι δυο μορφές του TCR φαίνεται ότι εντοπίζονται σε διαφορετικά κύτταρα. Το μόριο αβ TCR βρίσκεται στο περισσότερο από το 95% των περιφερικών κυττάρων και στη μεγαλύτερη πλειονότητα των θυμοκυττάρων που εκφράζουν το TCR, αντίθετα με τα γδ T κύτταρα. Αν και τα γδ T κύτταρα βρίσκονται σε ελάχιστη αναλογία στο θύμο και τα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα, εντούτοις βρίσκονται σε αφθονία

στα διάφορα επιθήλια, όπως την επιδερμίδα (στα ποντίκια αλλά όχι τον άνθρωπο), το εντερικό επιθήλιο, τη μήτρα και τη γλώσσα.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΜΗC

Ένα από τα χαρακτηριστικά του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι ο μεγάλος βαθμός πολυμορφίας που κωδικοποιείται μέσα από αυτά. Η πολυμορφία αυτή δεν είναι κατανεμημένη σε όλο το MHC. Σε ένα συγκεκριμένο MHC μόριο τάξης Ι ή ΙΙ η πολυμορφία της δομής συγκεντρώνεται σε ορισμένες περιοχές του. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων στα αντιγόνα της τάξης Ι συγκεντρώνεται σε τρεις κύριες περιοχές των α₁ και α₂. Η περιοχή της α₃ φαίνεται ότι είναι πολύ πιο σταθερή. Στα μόρια της τάξης ΙΙ, ο βαθμός της μεταβλητότητας εξαρτάται από την υποπεριοχή και από την πολυμορφία εμφανίζεται στις αλυσίδες DR και DQβ, ενώ οι αλυσίδες DPβ εμφανίζουν ελαφρώς λιγότερη πολυμορφία. Η αλυσίδα DQα είναι ουσιαστικά αμετάβλητη, επίσης οι αλυσίδες DRα αυτιπροσωπεύονται από δυο αλληλόμορφα. Γενικά, η υψηλότερη πολυμορφία των αμινοξέων των αντιγόνων τάξης Ι και ΙΙ βρίσκεται συγκεντρωμένη στο πάνω μέρος του μορίου στη βάση της αύλακας σύνδεσης του αντιγόνου ή συγκλίνει από τα πλάγια της περιοχής της α-έλικας^[21-23].

Για τα MHC μόρια τάξης Ι, η υψηλότερη μεταβλητότητα σε αμινοξικά κατάλοιπα παρατηρείται στις α₁ και α₂ αλληλουχίες που σχηματίζουν την αύλακα που αλληλεπιδρά με τα αμινοξικά κατάλοιπα του πεπτιδίου πρόσδεσης (Εικ.6). Για κάθε MHC μόριο τάξης Ι, η πρόσδεση ενός πεπτιδίου συνήθως απαιτεί το πεπτίδιο να έχει ένα ή περισσότερα ειδικά αμινοξικά κατάλοιπα σε μια σταθερή συγκεκριμένη θέση. Τα υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα μπορεί να διαφέρουν τόσο, ώστε κάθε MHC μόριο τάξης Ι να μπορεί να προσδέσει πολλά διαφορετικά πεπτίδια. Άλλα πολυμορφικά κατάλοιπα του MHC μορίου τάξης Ι είναι αυτά που βρίσκονται σε επαφή με τον Τ κυτταρικό υποδοχέα (TCR), ο οποίος αλληλεπιδρά τόσο με το πεπτίδιο όσο και με το MHC μόριο.





Εικόνα 6: Η υψηλότερη μεταβλητότητα σε αμινοξικά κατάλοιπα σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος της α-αλυσίδας του MHC μορίου τάξης Ι συμβαίνει στις α₁ και α₂ περιοχές. Ο πολυμορφισμός απαντάται κυρίως για τα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν τη γραμμή μεταξύ του τείχους (wall) και του πατώματος (floor) της αύλακας που προσδένει τα πεπτίδια.



Εικόνα 7: Ο υψηλότερος πολυμορφισμός για τη β-αλυσίδα των ΜΗC μορίων τάξης ΙΙ εντοπίζεται στη β₁ περιοχή για εκείνα τα αμινοξικά κατάλοιπα, που σχηματίζουν τη γραμμή μεταξύ του τείχους (wall) και του πατώματος (floor) της αύλακας που προσδένει τα πεπτίδια.

Όπως και στην περίπτωση των MHC μορίων τάξης Ι, έτσι και για τα MHC μόρια τάξης ΙΙ, η υψηλότερη πολυμορφική μεταβλητότητα στα αμινοξικά κατάλοιπα εντοπίζεται στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου (Εικ.7). Ο γενετικός πολυμορφισμός καθορίζει τη χημική δομή της αύλακας πρόσδεσης και επηρεάζει την εξειδίκευση και ικανότητα πρόσδεσης του πεπτιδίου καθώς και την Τ κυτταρική αναγνώριση.

CD4+/CD8+ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF) περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου με ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Αυτή η οικογένεια των μορίων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσία, κυρίως στην μεσολάβηση της αναγνώρισης μέσω της κυτταρικής επιφάνειας. Τα μέλη της IgSF, όπως CD4, CD8, CD28, CD3 και άλλα είδη ανοσοσφαιρινών, είναι απαραίτητα για την κυτταρική προσκόλληση ή πρόσδεση που σχετίζεται με ένα λειτουργικό γεγονός^[24].

Πιο συγκεκριμένα, η CD4+ είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια των T κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν TCR εξειδίκευση για αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα MHC-τάξης II μόρια πάνω σε ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο APC (Antigen Presenting Cell). Τα T κύτταρα που εκφράζουν τα CD4+ είναι γενικά τα T κύτταρα βοηθοί (Th), τα οποία παρέχοντας κυτοκίνες ενισχύουν τη έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα CD4+ και τις μη-πολυμορφικές περιοχές του MHC-II μορίου στο APC είναι κρίσιμη για την σωστή ενεργοποίηση του T κυττάρου^[25-27].



Εικόνα 8: Τα CD4+ Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα CD8+ κυτοτοξικά Τ λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), όπως τα δενδριτικά κύτταρα (DC), τα οποία επιδεικνύουν στην επιφάνεια του κυττάρου όλα τα μοριακά σήματα που απαιτούνται για την Τ κυτταρική ενεργοποίηση.



Η CD8+ πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι συμμετέχει σε δυο κρίσιμες λειτουργίες:

1. Λειτουργεί ως συνυποδοχέας με το TCR για τα αντιγόνα που προσδένονται στα MHC μόρια τάξης Ι αυξάνοντας την ισχύ της λειτουργικής σύνδεσης του TCR για τον υποκαταστάτη του.

2. Έχει ικανότητες μεταγωγής σήματος. Τα CD8+ T κύτταρα είναι συστατικά-κλειδιά της ανοσολογικής απόκρισης έναντι μολυσματικών παθογόνων οργανισμών, αφού αποτελούν σημαντική πηγή κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της ιντερφερόνης-γ. Επίσης, λαμβάνουν μέρος σε αντιδράσεις μεταφύτευσης και αποτελούν μικρούς μοριακούς παράγοντες που ρυθμίζουν την δραστικότητά τους και βρίσκουν σημαντικές κλινικές εφαρμογές.

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ / ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Τα αντισώματα και οι υποδοχείς των αντιγόνων στα Τ κύτταρα έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Και τα δυο έχουν μεταβλητές (V) και σταθερές (C) περιοχές και οι διεργασίες ανασυνδυασμού των γονιδίων που παράγουν τις μεταβλητές περιοχές για κάθε τύπο υποδοχέα, είναι επίσης παρόμοιες. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο τα Β κύτταρα και τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα, είναι τελείως διαφορετικός. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μέσα σε διαλύματα ή πάνω στις επιφάνειες των κυττάρων, πάντα στην αρχική τους μορφή, ενώ οι υποδοχείς των Τ κυττάρων αναγνωρίζουν τα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από το αντιγόνα μόνο σε σχέση με τα MHC μόρια στην επιφάνεια των κυττάρων. Συχνά, τα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα Τ κύτταρα έχουν υποστεί κάποια αποικοδόμηση ή επεξεργασία, ώστε ο προσδιοριστής που αναγνωρίζεται από τον αντιγονικό υποδοχέα στο Τ κύτταρο να αποτελεί μόνο ένα μικρό τμήμα του αρχικού αντιγόνου.

Άλλη διαφορά μεταξύ του αντισώματος και του αντιγονικού υποδοχέα του Τ κυττάρου είναι ότι το αντίσωμα μπορεί να παραχθεί σε δυο μορφές, είτε ως αντιγονικός υποδοχέας Β κυττάρου είτε ως εκκρινόμενο αντίσωμα, ενώ ο υποδοχέας αντιγόνων των Τ κυττάρων αποτελεί πάντα μια ακέραιη μεμβρανική πρωτεΐνη. Ουσιαστικά, το εκκρινόμενο αντίσωμα είναι ένα λειτουργικό μόριο με δυο λειτουργίες, οι μεταβλητές περιοχές (V) εμπλέκονται κυρίως με τη σύνδεση των αντιγόνων και οι σταθερές περιοχές (C) αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς στους ιστούς του ξενιστή.

Η σύνδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα λαμβάνει χώρα με το σχηματισμό πολλαπλών μη ομοιοπολικών δεσμών, μεταξύ του αντιγόνου και των αμινοξέων της θέσης σύνδεσης. Μολονότι οι ελκτικές δυνάμεις που συμμετέχουν (δηλαδή δεσμοί

υδρογόνου καθώς και ηλεκτροστατικές, Van der Waals και υδρόφοβες δυνάμεις) είναι αδύναμες σε σύγκριση με τους ομοιοπολικούς δεσμούς, η πληθώρα των δεσμών οδηγεί σε σημαντική ενέργεια σύνδεσης.

Οι δυνάμεις σύνδεσης που αναπτύσσονται ανάμεσα στο αντιγόνο και στο αντίσωμα απαιτούν τη στενή προσέγγιση των ομάδων που αλληλεπιδρούν. Ο δεσμός υδρογόνου είναι το αποτέλεσμα σχηματισμού γεφυρών υδρογόνου μεταξύ των κατάλληλων ατόμων. Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις οφείλονται στην έλξη αντίθετα φορτισμένων ομάδων που βρίσκονται στις πλευρικές αλυσίδες δυο πρωτεϊνών. Οι δεσμοί Van der Waals παράγονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ νεφών ηλεκτρονίων. Οι υδρόφοβοι δεσμοί (που μπορεί να συμβάλλουν μέχρι και στη μισή συνολική δύναμη του δεσμού αντιγόνου-αντισώματος) βασίζονται στο συσχετισμό μη πολικών, υδρόφοβων ομάδων ώστε η επαφή με μόρια νερού να ελαχιστοποιείται. Η απόσταση διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων που αλληλεπιδρούν διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του δεσμού.

Η ισχύς ενός μονοσθενούς δεσμού αντιγόνου-αντισώματος προκύπτει από την άθροιση των ελκτικών και απωθητικών δυνάμεων που περιγράφηκαν. Η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός αντισώματος με ένα αντιγόνο μπορεί να διερευνηθεί με διάφορες μεθόδους. Σε κάθε μέθοδο δημιουργείται ένα σύστημα όπου το αντιγόνο και το αντίσωμα μπορούν να έρθουν σε ισορροπία σύμφωνα με την αντίδραση:

Ab + Ag ← → AbAg

Στη συνέχεια μετρούνται οι ποσότητες του ελεύθερου αντιγόνου και του αντιγόνου που έχει συμπλεχθεί, χωρίς να διαταραχθεί η ισορροπία. Τα δεδομένα από αυτά τα συστήματα μπορούν να αναλυθούν με την εφαρμογή του νόμου της δράσης των μαζών ώστε να βρεθεί η σταθερά ισορροπίας Κ, που αποτελεί μέτρο της ισχύς ενός μονοσθενούς δεσμού αντιγόνου-αντισώματος σύμφωνα με τη σχέση,

 $K = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]}$

όπου [Ab], [Ag] οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου αντισώματος και του ελεύθερου αντιγόνου αντίστοιχα και [AbAg] η συγκέντρωση του συμπλεγμένου αντιγόνου.



ΤΥΠΟΙ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η εξειδίκευση των Τ λεμφοκυττάρων για σύμπλοκα ανάμεσα στα αντιγονικά πεπτίδια και στα ΜΗC μόρια αποκαλύπτουν πολλά χαρακτηριστικά για την Τ κυπαρική αναγνώριση του αντιγόνου, η οποία διαφέρει σε πολλά σημεία κατά την αναγνώριση ενός αντιγόνου από τα αντισώματα.

- 1. Τα περισσότερα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν μόνο πεπτίδια, ενώ τα Β κύτταρα μπορούν να αναγνωρίζουν διάφορα μόρια όπως, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και μικρά χημικά μόρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι Τ κυτταρικές ανοσολογικές αποκρίσεις να προκαλούνται μόνο από πρωτεϊνικά αντιγόνα, ενώ οι χυμικές ανοσολογικές αποκρίσεις μπορεί να προκληθούν από πρωτεϊνικά ή μη πρωτεϊνικά αντιγόνα. Σπάνια παραδείγματα Τ κυττάρων που αναγνωρίζουν μη-πεπτιδικά αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων που είναι προσδεδεμένα σε μη πολυμορφικά MHC μόρια, έχουν περιγραφεί, αλλά η σπουδαιότητα αυτών των Τ κυττάρων δεν είναι γνωστή.
- 2. Τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν μόνο γραμμικούς πεπτιδικούς επιτόπους που προκύπτουν από πρωταρχικές αμινοξικές αλληλουχίες. Τα γραμμικά πεπτίδια έχουν εκτεταμένες διαμορφώσεις μέσα στην αύλακα των ΜΗC μορίων. Τα Β κύτταρα, ειδικά για πρωτεϊνικά αντιγόνα, μπορούν να αναγνωρίσουν διαμορφωτικούς επιτόπους που υπάρχουν όταν οι πρωτεΐνες είναι στη φυσική τριτοταγή δομή τους ή επιτόπους που εκτίθενται κατά τη μετουσίωση ή την πρωτεόλυση. Έτσι, όταν ένα ζώο ανοσοποιείται με μια φυσική πρωτεΐνη, τα αντιγονοειδικά Τ κύτταρα που διεγείρονται θα αποκριθούν σε μετουσιωμένα ή ακόμη σε πρωτεολυτικά προϊόντα πέψης αυτής της πρωτεΐνης. Τα αντισώματα που παράγονται από τα Β κύτταρα μετά την ανοσοποίηση με τη φυσική πρωτεΐνη αντιδρούν πλέον μόνο με αυτή. Αυτό έχει σημαντικές εφαρμογές για την ανάπτυξη εμβολίων, αφού είναι θεωρητικά πιθανό να μειώνει την Τ κυτταρική ανοσία.
- 3. Τα Τ κύτταρα αναγνωρίζονται και αποκρίνονται σε ξένα πεπτιδικά αντιγόνα όταν το αντιγόνο είναι προσδεδεμένο στην επιφάνεια άλλων κυττάρων. Αυτό διότι τα ΜΗC μόρια αποτελούν μέρος του συμπλόκου που αναγνωρίζουν τα Τ κύτταρα. Η έκθεση των συμπλόκων ΜΗC-πεπτιδίων σε μια μορφή αναγνωρίσιμη από τα Τ κύτταρα καλείται παρουσίαση αντιγόνου. Τα κύτταρα που εκθέτουν τα αντιγόνα σε αυτή τη μορφή καλούνται αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs).

- 1. Abbas, A. K., Lightman, A. H., Pober, J. S., 'Cellular and Molecular Immunology', Chapter 5, 1997.
- 2. Campel, D. R., Trowsdale J., 'Map of the human MHC', Immunol. Today, 1993, 14, 349-352.
- 3. David-Watine, B. A., Israel and P. Kourilsky, 'The regulation and expression of MHC class I genes', Immunol. Today, 1999, **11**, 286-292.
- 4. March, B. V., Steimle, E., Martinez-Soria, Reith, W., 'Regulation of MHC class Il genes: lessons from a disease', Annual Rev. Immunol., 1996, 14, 301-331.
- Bjorkman, P. J., Parham, P., 'Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules', Annual Rev. Biochem., 1990, 59, 253-288.
- 6. Batalia, M. A., Collins, E. J., 'Peptide Binding by Class I and Class II MHC Molecules', Biopolymers, 1997, 43, 281-302.
- Engelhard, V. H., 'Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules', Annual Rev. Immunol., 1994, 12, 181-207.
- 8. Madden, D., 'The three dimensional structures of peptide-MHC complexes', Annual Rev. Immunol., 1995, 13, 587-622.
- 9. Jones, Y. E., Tormos, J., Reid, S. W., Stuart, D. I., 'Recognition surfaces of MHC class I', Immunol. Rev., 1998, 163, 121-128.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., Wiley, D. C., 'Three dimensional structure of the class It histocompatibility antigen HLA-DR1', Nature, 1993, 364, 33-39.
- Pedersen, L.O., Hansen, A.S., Olsen, A.C., Gerwien, J., Nissen, M.H., Buus, S., 'The interaction between beta 2-microglobulin (beta 2m) and purified class-I major histocompatibility (MHC) antigen', Scand. J. Immunol., 1994, 39(1), 64-72.
- 12. Villadangos, J. A., 'Presentation of antigen by MHC class II molecules: getting the most out of them', Mol. Immunol., 2001, **38**, 329-346.
- Kim, H. J., Guo D., Sant' Angelo, D. B., 'Coevolution of TCR-MHC interactions: Conserved MHC tertiary structure is most efficient for interactions with TCR', PNAS, 2005, 102(20), 7263-7267.
- 14. Ashwell, J. D., Klausner, R. D., 'Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor', Annual Rev. Immunol., 1990, 8, 139-167.



- 15. Chothia, C., Boswell, D. R., Lesk, A. M., 'The outline structure of the T cell αβ receptor', EMBO J, 7, 3745-3755.
- 16. Bantley, G. A., Boulot, G., Karjalainen, K., Mariuzza, R. A., 'Crystal structure of the β chain of a T cell antigen receptor', Science, 1995, **267**, 1984-1987.
- 17. Fields, B. A., Ober, B., Malchiodi, E. L., Lebedeva, M. I., Braden, B. C., Ysern, X., Kim, J. K., Shao, X., Ward, E. S., Mariuzza, R. A., 'Crystal structure of the Vα domain of a T cell antigen receptor', Science, 1995, 270, 1821-1824.
- 18. Raulet, D. H., 'The structure, function and molecular genetics of the γ/δ T cell receptor', Annual Rev Immunol, 1989, 7, 175-208.
- 19. Chien, Y. H., Jores, R., Crowley, M. P., 'Recognition by γ/δ T cells', Annual Rev. Immunol., 1996, 8, 394-401.
- 20. Li, H., Lebedeva, M. I., Liara, A. S., Fields, B. A., Srenner, M. B., Mariuzza, R. A., 'Structure of the Vδ domain of a human γ/δ T cell antigen receptor', Nature, 1998, 391, 502-506.
- 21. Takahata, N., Nei, M., 'Allelic genealogy under overdominant and frequency dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci', Genetics, 1990, **124**, 967-978.
- 22. Wills, C., 'Maintenance of multiallelic polymorphism at the MHC region', Immunol. Rev., 1991, 124, 165-220.
- 23. Leffell, M. S., 'MHC polymorphism: Coping with the allele explosion,' Clin. Appl. Immunol. Rev., 2002, 3, 35-46.
- Huang, Z., Li, S., Korngold, R., 'Immunoglobulin Superfamily Proteins: Structure, Mechanisms and Drug Discovery', Biopolymers, 1997, 43, 367-382.
- Bierer, B. E., Sleckman, B. P., Ratnofsky S. E., Burakoff, S. J., 'The biological roles of CD2, CD4 and CD8 in T cell activation', Annual Rev. Immunol., 1989, 7, 579-600.
- 26. Micelli, M. C., Parnes, J. R., 'The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation', Adv. Immunol., 1993, 53, 59-122.
- 27. Parnes, J. R., 'Molecular biology and function of CD4 and CD8', Adv. Immunol., 1989, 44, 265.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

TO LA/SSB AYTOANTIFONO


ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια ιδιαίτερα άφθονη πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, γνωστή ως La πρωτεΐνη, είναι η πρώτη πρωτείνη που σχετίζεται με όλες τις νεοσυντιθέμενες μεταγραφές της RNA πολυμεράσης ΙΙΙ^[1]. Η La πρωτεΐνη (που καλείται επίσης SS-B) περιγράφηκε αρχικά σαν ένα αυτοαντιγόνο σε ασθενείς που έπασχαν από ρευματικές ασθένειες, όπως Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (SLE) και Sjogren's Σύνδρομο (SS). Το όνομα La προέρχεται από το όνομα ενός ασθενούς, στον οποίο ανιχνεύτηκε το αντίσωμα και το SS-B αναφέρεται στην επικράτηση των αντισωμάτων στο Sjogren's σύνδρομο^[2]. Αν και η La χαρακτηρίστηκε αρχικά σαν μια ανθρώπινη πρωτεΐνη, ομόλογες πρωτεΐνες αυτής έχουν αναγνωριστεί σε μεγάλο πλήθος ευκαρυωτικών οργανισμών. Πειράματα, στα οποία ασθενείς зų αντί-La αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκαταβύθιση La ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNPs) από ραδιοιχνηθετημένα εκχυλίσματα κυττάρων, απεκάλυψαν ότι η La πρωτείνη σχετίζεται με ένα πολύ μεγάλο αριθμό μικρών νεοσυντιθέμενων RNAs.

Τα RNAs που αναγνωρίστηκαν σε αντί-La ανοσοκαταβυθίσεις περιελάμβαναν μεταξύ άλλων pre-tRNAs, pre-5S rRNA, U6 μικρά πυρηνικά RNA (snRNA), RNase P RNA, MRP RNA, 7SL RNA και Y RNAs^[1,3]. Πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα προσβεβλημένα από ιό, απεκάλυψαν ότι η La επίσης προσδένει έναν αριθμό ιϊκά κωδικοποιημένων RNAs.

Για την πλειοψηφία των κυτταρικών RNAs, η La προσδένεται περισσότερο στα πρόδρομα παρά στα ώριμα RNAs. Για παράδειγμα, τα U6 RNAs, που προσδένονται από την La πρωτεΐνη εκτείνονται προς το 3΄ τελικό άκρο και παρουσιάζουν λιγότερες τροποποιήσεις από το ώριμο RNA. Παρόμοια, η La πρωτεΐνη προσδένει πρόδρομα μόρια στα tRNAs και στα 5S rRNA, αλλά δεν προσδένει τα ώριμα RNAs. Ο λόγος που η La πρωτεΐνη σχετίζεται αρχικά με τα μεταγραφήματα της RNA πολυμεράσης ΙΙΙ έγινε σαφής όταν φάνηκε ότι η αναγνώριση της πρωτεΐνης γίνεται μέσω του τμήματος UUU_{OH}, το οποίο βρίσκεται στο 3΄ τελικό άκρο όλων των RNAs. Αυτές οι τελικές ουριδιλικές ομάδες συνήθως μετακινούνται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του RNA, εξαλείφοντας έτσι την περιοχή πρόσδεσης για την La πρωτεΐνη^[3].

Επειδή η πλειοψηφία των RNAs που σχετίζονται με την La πρωτεΐνη προκύπτουν από μεταγραφές της RNA πολυμεράσης III, έχει θεωρηθεί ότι η πρωτεΐνη επιδρά με κάποιο τρόπο στην βιογένεση αυτών των RNAs. Μια από τις πρώτες λειτουργίες που αποδόθηκε στην La πρωτεΐνη ήταν ως ένας παράγοντας τερματισμού της μεταγραφής για την RNA πολυμεράση III. Πιο πρόσφατα, έγινε ξεκάθαρο, ότι ο κύριος ρόλος της La είναι να σταθεροποιεί νεοσυντιθέμενα μικρά

RNAs από την πέψη λόγω εξωνουκλεασών. Αυτή η σταθεροποίηση στα 3 τελικά άκρα έχει διαφορετικές συνέπειες για τα διάφορα RNAs που προσδένονται. Για συγκεκριμένα άλλα μικρά RNAs, η πρόσδεση από τη La συνεισφέρει στην πυρηνική κατακράτηση των εν τω γεννάσθαι μεταγραφημάτων και/ή στην συγκέντρωση των RNAs μέσα σε λειτουργικά RNPs. Επειδή η παροδική πρόσδεση από τη La πρωτεΐνη διευκολύνει τη σωστή διατήρηση πολλών νεοσυντιθέμενων μικρών RNAs, η La έχει προταθεί να λειτουργεί σαν ένα μοριακό τσαπερόνιο για την βιογένεση μικρών RNAs.

Υποκυτταρική κατανομή

Η La πρωτεΐνη είναι μια πολύ άφθονη πρωτεΐνη. Η ανθρώπινη La πρωτεΐνη έχει εκτιμηθεί ότι βρίσκεται σε 2 x 10⁷ αντίγραφα ανά κύτταρο, και είναι τόσο άφθονη όσο μια ριβοσωμική πρωτεΐνη. Το ποσό της La πρωτεΐνης που βρίσκεται σε ανθρώπινα εκχυλίσματα και εκχυλίσματα ζύμης έχει εκτιμηθεί στα 50nM για ένα ανθρώπινο S100 εκχύλισμα και 12nM για ένα S100 Saccharomyces cerevisiae εκχύλισμα.

Αν και η La πρωτεΐνη κυρίως βρίσκεται στον πυρήνα, έχει επίσης βρεθεί στον πυρηνίσκο και στο κυτταρόπλασμα. Η διανομή της La στο κυτταρόπλασμα μπορεί να αυξηθεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες συμπεριλαμβάνοντας ιϊκές μολύνσεις και απόπτωση^[4-6].



ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ La ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

1. Οργάνωση των περιοχών

Σύγκριση ομόλογων περιοχών των La πρωτεϊνών από διάφορα είδη απεκάλυψε ότι αυτές οι πρωτεϊνες μπορούν να διαιρεθούν τουλάχιστον σε τρεις περιοχές (Εικ.1). Τα Ν-τελικά άκρα όλων των γνωστών La πρωτεϊνών περιέχουν ένα μοτίβο 60 αμινοξέων με υψηλά διατηρημένη αλληλουχία που είναι επίσης παρούσα σε έναν αριθμό άλλων μη σχετικών πρωτεϊνών. Το La μοτίβο ακολουθεί ένα λιγότερο διατηρημένο μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif, RRM: επίσης γνωστό ως RNP περιοχή) και ένα φορτισμένο και λιγότερο διατηρημένο C-τελικό άκρο. Η C-τελική περιοχή είναι η λιγότερο διατηρημένη περιοχή της La, ποικίλλει ανάμεσα στα είδη ως προς το μήκος (από 70 αμινοξέα στους ζυμομύκητες S.*Cerevisiae* και S.*pombe* σε περισσότερα από 220 αμινοξέα στου άνθρωπο και στον Xenopus laevis) και την αλληλουχία και συνήθως περιέχει μεταξύ 40% και 50% φορτισμένα αμινοξέα. Άλλες περιοχές που έχουν προσδιοριστεί ότι βρίσκονται στο Cτελικό άκρο της ανθρώπινης La περιλαμβάνουν ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού NLS (Nuclear Localization Signal), ένα σήμα πυρηνικής κατακράτησης NRE (Nuclear Retention Element) και μια εν δυνάμει περιοχή διμερισμού ^[3,7].

Η ανθρώπινη La πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές περιοχές, που όλες φαίνεται να βρίσκονται στο C-τελικό άκρο. Μέχρι σήμερα, τέσσερα σημεία φωσφορυλίωσης έχουν προσδιοριστεί στην ανθρώπινη πρωτεΐνη. Το κύριο σημείο φωσφορυλίωσης είναι η σερίνη 366. Επιπλέον, η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται στη θρεονίνη 302, σερίνη 325 και θρεονίνη 362^[8]. Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες είναι σαφές ότι κανένα από τα σημεία αυτά δε φαίνεται να διατηρείται πέρα από τις La πρωτεΐνες των σπονδυλωτών. Το μοριακό βάρος της La πρωτεΐνης ποικίλει από 50kD στα σπονδυλωτά μέχρι 32kD στο S.Cerevisiae (Εικ.1).

Ένα εν δυνάμει άτυπο RRM έχει παρατηρηθεί στο C-τελικό άκρο των La πρωτεϊνών των σπονδυλωτών. Μοντελοποίηση αυτής της περιοχής των Drosophila και C.Elegans πρωτεϊνών δίνει περιορισμένη ένδειξη για την παρουσία του RRM στη Drosophila και δεν προβλέπει ένα RRM στην C.Elegans πρωτεΐνη. Η θέση ενός μικρού βασικού μοτίβου SBM (Short Basic Motif), στην ανθρώπινη πρωτεΐνη έχει εντοπιστεί, καθώς είναι μια περιοχή της πρωτεΐνης που προτείνεται ότι σχετίζεται με το διμερισμό. Οι La πρωτεΐνες των σπονδυλωτών περιέχουν το εν δυνάμει Walker A μοτίβο, GXXXXXGKX, μέσα στο SBM μοτίβο. Το NLS για τον ζυμομύκητα S.Cerevisiae δεν έχει τελικά χαρτογραφηθεί αλλά έχει προσδιοριστεί μέσα σε ένα τμήμα 113 αμινοξέων που περιλαμβάνει το RRM.



Εικόνα 1: Σύγκριση ομόλογων περιοχών της La πρωτεΐνης (ανθρώπινη, Drosophila, C.Elegans, S.Pombe, S.Cerevisiae, T.Brucei). Για κάθε La πρωτεΐνη, ο αριθμός των αμινοξέων φαίνεται στη δεξιά στήλη. La μοτίβο: διατηρημένη περιοχή 60 αμινοξέων, RRM (RNP): περιοχή αναγνώρισης RNA, NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού, dimer: περιοχή διμερισμού, SBM: μικρό βασικό μοτίβο.

2. Η τριτοταγής δομή του La225-334

Η τριτοταγής δομή της ανθρώπινης La(1-408) δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή. Παρόλα αυτά, πρόσφατες βιβλιογραφικές μελέτες έχουν δώσει σημαντικά στοιχεία για την δομή ορισμένων τμημάτων αυτής. Πρόσφατα⁽⁹⁾, το 2003, χαρακτηρίστηκε η δομή ολόκληρης της C-τελικής περιοχής της hLa με ένα συνδυασμό από αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν σε τρία διαφορετικά τμήματα της hLa (La225-408, La225-359 και La225-334, Εικ.2). Τα τμήματα αυτά περιέχουν το θεωρούμενο C-τελικό RRM, που προβλέφθηκε ότι αρχίζει από το κατάλοιπο 231. Το La225-408 περιέχει ολόκληρο το CTD (C Terminal Domain), το La225-359 προέκυψε από τη διάσπαση της πρωτεΐνης από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό της πολιομυελίτιδας και το La225-334 προέκυψε από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση από την έκφραση της La225-408 στο E.coli. Η ανάλυση του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού CD (Circular Dichroism) για το La225-334 έδειξε την παρουσία α έλικας και β πτυχωτού φύλλου σε διάλυμα. Αν και τα φάσματα CD είναι πολύ παρόμοια για τα La225-359 και La225-408, οι γραμμομοριακές ελλειπτικότητες είναι μικρότερες για τα μεγαλύτερα τμήματα, δείχνοντας ότι τα πρόσθετα κατάλοιπα που συνθέτουν τα μεγαλύτερα τμήματα μεταβάλλουν αισθητά τη δευτεροταγή δομή του αρχικού τμήματος La225-334(Εικ.3).

HUNNINGA .



Εικόνα 2: Τμήματα του C-τελικού άκρου της La πρωτεΐνης που εκφράστηκαν ως μεταλλάγματα διαγραφής. La μοτίβο: διατηρημένη περιοχή 60 αμινοξέων, RRM (RNP): περιοχή αναγνώρισης RNA, NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού, SBM: μικρό βασικό μοτίβο. NRE: σήμα πυρηνικής κατακράτησης, dimerization?: περιοχή διμερισμού.



Εικόνα 3: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού για τα τμήματα La225-408, La225-359 και La225-334. Η δευτεροταγής δομή όπως προέκυψε από την εκτίμηση του φάσματος έδωσε τα εξής ποσοστά: La225-334 (30% α, 40% β διάταξη, 10% στροφή, 20% τυχαία δομή), La225-359 (23% α, 33% β διάταξη, 7% στροφή, 36% τυχαία δομή) και La225-408 (18% α, 30% β διάταξη, 5% στροφή και 49% τυχαία δομή).



Η τρισδιάστατη δομή σε διάλυμα του La225-334 προσδιορίστηκε με NMR φασματοσκοπία. Η υπέρθεση 20 δομών για το La225-334 φαίνονται στην Εικ.4Α. Η τοπολογία του La225-334 διαφέρει σημαντικά από τα συνήθη RRMs. Σε ένα τυπικό RRM, η β1-α1-β2-β3-α2-β4 τοπολογία των στοιχείων δευτεροταγούς δομής σχηματίζει ένα β-πτυχωτό φύλλο με τέσσερις αντιπαράλληλες πτυχές οι οποίες μπορούν να δώσουν τη β4-β1-β3-β2 διευθέτηση. Η επιφάνεια του β-φύλλου που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη σχηματίζει την επιφάνεια πρόσδεσης RNA, ενώ η επιφάνεια που βρίσκεται απέναντι από τις δύο α έλικες δημιουργεί τον υδρόφοβο πυρήνα της περιοχής.



Εικόνα 4: Υπέρθεση 20 δομών για το La225-334 (RRM). Φαίνεται το Ν-τελικό και το C-τελικό άκρο και αριθμούνται τα β-πτυχωτά φύλλα (Α). Οι θέσεις των β-πτυχωτών φύλλων και των αελίκων πάνω στην αμινοξική αλληλουχία φαίνονται στο (Β). Τα RNP μοτίβα σημειώνονται με πλαίσιο και οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις θέσεις των καταλοίπων μέσα σε αυτά τα μοτίβα που είναι τα αρωματικά στα περισσότερα RRMs. Τα διατηρημένα βασικά και όξινα κατάλοιπα στο NRE σημειώνονται με υπογράμμιση και οι μπάρες δείχνουν τις θέσεις της τριάδας των όξινων καταλοίπων στην επιφάνεια του β-πτυχωτού φύλλου.

Εππιλέον, οι τυπικές RRM περιοχές περιέχουν δύο μικρά μοτίβα (RNP-1 και RNP-2), που βρίσκονται στο κεντρικό ζεύγος των πτυχών και συνήθως περιέχουν αρωματικά κατάλοπτα διατηρημένα σε θέσεις κλειδιά, τα οποία αλληλεπιδρούν με το RNA. Το RRM μέσα στο La225-334 κατέχει μια β1-α1-β2-β3-α2-β4'-β4-α3 τοπολογία που σχηματίζει ένα β-πτυχωτό φύλλο με πέντε πτυχές και καταλήγει σε μια α έλικα. Η πέμπτη πτυχή, που βρίσκεται ανάμεσα στα α2 και β4, και καλείται β4', εκτείνεται αντιπαράλληλα στο β4 στην άκρη του β-πτυχωτού φύλλου, και προσλαμβάνει έτσι μια β4'-β4-β1-β3-β2 διευθέτηση. Στο La225-334, είναι επίσης προφανές ότι η τυπική επιφάνεια πρόσδεσης με το RNA επικαλύπτεται από τη C-τελική α3 έλικα (κατάλοιπα 308-325). Αυτή η έλικα (α3) συνδέεται με το β4 με ένα πολύ μικρό συνδέτη, επεκτείνεται για πέντε στροφές, η δομή της σε διάλυμα είναι πολύ καλά καθορισμένη και σταθεροποιείται με το β-πτυχωτό φύλλο με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα, τα κατάλοπτα Val310, Ala314 και Ile318 σχηματίζουν μια υδρόφοβη αλληλουχία στην πλευρά της έλικας που επικοινωνεί με ένα μη πολικό κομμάτι στο βπτυχωτό φύλλο που περιλαμβάνει τα Leu233, Trp261, Ile272, Leu274 και Leu306 (EIK.5).



Εικόνα 5: Δομικά χαρακτηριστικά της La225-334 (Α), Στερεοαπεικόνιση της La225-334 όπου φαίνεται ότι η έλικα α3 επικαλύπτει το πάνω μισό του β-φύλλου (Β), Στερεοαπεικόνιση των υδρόφοβων αμινοξέων που συμμετέχουν στη σταθεροποίηση της έλικας α3 πάνω στην επιφάνεια του β-φύλλου (Γ).



3. Η τριτοταγής δομή του La μοτίβου (1-103)

Η δομή του La μοτίβου και του Ν-τελικού άκρου της La ήταν σε μεγάλο βαθμό αμφισβητούμενη την περασμένη δεκαετία (Εικ.6). Η τριτοταγής δομή που παρουσιάζεται εδώ προέρχεται από την NMR φασματοσκοπία και αποκαλύπτει ότι το La μοτίβο προσλαμβάνει μια δομή διαφορετική από αυτή του RRM^[10]. Στην πραγματικότητα, η συμπαγής δομή του αποτελείται από έξι α-έλικες και τρία βαντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα (Εικ.7).



Εικόνα 6: Τμήματα της La πρωτεΐνης (1-408) και μεταλλάγματα διαγραφής. La μοτίβο: διατηρημένη περιοχή 60 αμινοξέων, RRM (RNP): περιοχή αναγνώρισης RNA, NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού, SBM: μικρό βασικό μοτίβο, NRE: σήμα πυρηνικής κατακράτησης.

Η δομή του La μοτίβου κυριαρχείται από μια μεγάλη αμφιπαθητική α-έλικα (α1, κατάλοιπα 8-25), η οποία μετά από ένα μικρό κόμβο στην Gly26, ακολουθείται από μια μικρή έλικα που καλείται α1΄. Η πολική πλευρά της έλικας α1 είναι σε μεγάλο βαθμό εκτεθειμένη στο διαλύτη, ενώ η μη πολική πλευρά μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με άλλα τμήματα του La μοτίβου, σχηματίζει τον υδρόφοβο πυρήνα της περιοχής. Τα τρία β-πτυχωτά φύλλα συνεισφέρουν μη πολικά κατάλοιπα στον πυρήνα αλλά επίσης παρουσιάζουν και μια επιφάνεια εκτεθειμένη στο διαλύτη και στην έλικα α1. Η έλικα α1 φαίνεται να παρέχει ένα εκμαγείο γύρω από το οποίο η υπόλοιπη περιοχή μπορεί να αναδιπλωθεί (Εικ.7).





Εικόνα 7: Δομική ανάλυση του La μοτίβου και του παρακείμενου RRM. Υπέρθεση των πεπτιδικών σκελετών 20 βελτιωμένων δομών, (A) για το La μοτίβο (κατάλοιπα 6-100) και (B) για το κεντρικό RRM της hLa (κατάλοιπα 106-195). Φαίνονται το N- και C-τελικό άκρο, οι έλικες και τα β-φύλλα αριθμούνται από 1 έως 4. (Γ) Διάγραμμα του La μοτίβου που δείχνει τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης. Σημειώνονται τα βασικά αμινοξέα. (Δ) Δομή του κεντρικού RRM. (Ε) Δομή της C-τελικής περιοχής της hLa. (ΣΤ) Απεικόνιση των πολικών και υδρόφοβων αμινοξέων που εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της έλικας α3.

Εκτός από τη N- και C-τελική περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η θηλειά που συνδέει την α5 αλυσίδα και το β2 πτυχωτό φύλλο είναι το λιγότερο καλά προσδιορισμένο τμήμα του μορίου. Η C-τελική επέκταση του β3 πτυχωτού φύλλου περιέχει μια καλά-προσδιορισμένη θηλειά που ακολουθείται από έναν εκτεταμένο βραχίονα που αναδιπλώνεται πίσω και επάνω στο μόριο, επικοινωνώντας με την έλικα α1΄ και τις θηλιές που τον συνδέουν με τις α1 και α2 (Εικ.7Α, Γ).



4. Η τρισδιάστατη δομή του κεντρικού RRM

Σύμφωνα με την τρισδιάστατη δομή του La (105-202), αυτή η περιοχή προσλαμβάνει μια κλασικού RRM-τύπου αναδίπλωση^[10] (Εικ.7Δ). Η C-τελική έλικα (α3, κατάλοιπα 185-194) συνδέεται με το β4 με έναν εξαιρετικά μικρό, ενός μόνο κατάλοιπου (Phe184), συνδέτη και εντοπίζεται στην β4 πλευρά της επιφάνειας πρόσδεσης-RNA του β-φύλλου. Σταθεροποιείται από υδρόφοβες επαφές ανάμεσα στις παράπλευρες αλυσίδες των καταλοίπων Tyr188, Lys185, Asp186 και Asp187 της έλικας και Tyr114, Leu183 και Phe184 του β-φύλλου. Μπορεί επίσης να υπάρχει μια αλληλεπίδραση λόγω σχηματισμού γέφυρας άλατος ανάμεσα στα κατάλοιπα Asp186 και Lys109. Η C-τελική έλικα επίσης καταλήγει σε μια μικρή 3₁₀ στροφή στο Ν-τελικό άκρο της περιοχής (α0, κατάλοιπα 108-111) (Εικ.7).

Η έλικα α3 είναι σημαντικά υδρόφιλη και εξέχει προς το διαλύτη. Αυτή η ασυνήθιστη διευθέτηση της C-τελικής α3 έλικας δεν έχει παρατηρηθεί σε άλλες RRM περιοχές. Η β-πτυχωτή επιφάνεια του κεντρικού RRM φαίνεται να είναι διαθέσιμη για RNA αλληλεπιδράσεις. Τα διατηρημένα RNP μοτίβα που προβλέφθηκαν για το κεντρικό RRM της hLa (113-VYIKGF-118 151-KGSIFVV-158) και είναι εντοπισμένα στο κεντρικό ζεύγος των β-φύλλων, περιέχουν δυο από τα τρία κατάλοιπα (Tyr114 και Phe155), τα οποία είναι γενικά διατηρημένα στις RRM περιοχές και μπορούν να αλληλεπιδρούν με το RNA με τις παράπλευρες αλυσίδες τους, ενώ το τρίτο αρωματικό κατάλοιπο έχει υποκατασταθεί από την Ser153. Η Tyr114 συμμετέχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τη βάση της C-τελικής έλικας. Αν η Tyr114 εμπλέκεται στην RNA πρόσδεση, τότε αυτή η αλληλεπίδραση θα απαιτήσει εκτόπιση της α3 έλικας.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ La ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι ο κύριος ρόλος της La είναι να προστατεύει το 3΄ τελικό άκρο μικρών εν τω γενάσθαι RNAs από την πέψη λόγω εξωνουκλεασών. Αυτή η σταθεροποίηση, που οφείλεται στην διαμεσολάβηση της La πρωτεΐνης, έχει διαφορετικές συνέπειες για τα διάφορα RNAs που προσδένονται. Για παράδειγμα, για μερικά μικρά RNAs, η πρόσδεση με τη La μπορεί να διευκολύνει το συνολικό RNP να συνεισφέρει στη διατήρηση του νεοσυντεθέντος RNA στο πυρήνα ή να σταθεροποιήσει τη δομή του RNA. Αν και λιγότερα είναι γνωστά για το ρόλο που παίζει η La πρωτεΐνη σε διαδικασίες που εμπλέκουν μεγαλύτερα RNAs, έχει επίσης προταθεί ότι η La διευκολύνει τη μετάφραση συγκεκριμένων κυτταρικών ή ιϊκών mRNAs.

BIBAIOG

ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟ RNA ΤΗΣ La ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η πλειοψηφία των μικρών RNAs που προσδένονται στη La πρωτεΐνη καταλήγει στην αλληλουχία UUU_{OH.} Αν και τα περισσότερα από αυτά τα RNAs είναι εν τω γεννάσθαι μεταγραφήματα της RNA πολυμεράσης III, η La επίσης προσδένεται στα RNAs που προκύπτουν από άλλες πολυμεράσες που καταλήγουν σε UUU_{OH.} Ένας αριθμός μελετών υποστηρίζει ότι στις τελικές ουριδιλικές ομάδες οφείλεται η υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με τη La πρωτεΐνη. Η συστηματική μελέτη χρησιμοποιώντας καθαρή πρωτεΐνη και μοντέλα RNA ως υποστρώματα απεκάλυψε ότι η La προτιμά να προσδένει RNAs που καταλήγουν στα τρία ουρυδιλικά κατάλοιπα^[11].

Αν και οι 3΄ ουριδιλικές ομάδες είναι ένας κύριος προσδιοριστής για την πρόσδεση της La πρωτεΐνης, η πρωτεΐνη αυτή πρέπει επίσης να αναγνωρίζει και άλλα χαρακτηριστικά της δομής του RNA. Για παράδειγμα, η συνεισφορά της 5΄ τριφωσφορικής ομάδας στην συνολική αναγνώριση από τη La μπορεί να είναι συγκρίσιμη με τις τελικές ουριδιλικές ομάδες. Έχει επίσης προταθεί ότι η La πρωτεΐνη μπορεί να αναγνωρίσει εσωτερικές ολιγο-ουριδιλικές ομάδες κάτι που δεν έχει αποδειχτεί πειραματικά.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ La ΠΟΥ ΣΥΝΕΙΣΦΕΡΟΥΝ ΣΤΗΝ RNA ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ

Αν και δεν είναι ακόμη γνωστό ποιες περιοχές της La πρωτεΐνης έρχονται σε απευθείας επαφή με το RNA, πειράματα έδειξαν ότι η La πρωτεΐνη περιέχει τρεις εν δυνάμει περιοχές πρόσδεσης του RNA, που είναι το La μοτίβο (LM, La Motif) και τα μοτίβα αναγνώρισης RRM1 και RRM2, τα οποία προσδένουν διάφορα RNA υποστρώματα με μια συγγένεια συγκρίσιμη με αυτή της συνολικής πρωτεΐνης^[7] (Εικ.8).



Εικόνα 8: Υποθετικό μοντέλο για την ακολουθούμενη συσχέτιση των τριών εν δυνάμει περιοχών πρόσδεσης του RNA της hLa με το pre-tRNA.

Το υποθετικό μοντέλο προέκυψε από το συνδυασμό διαφορετικών in vivo και in vitro πειραμάτων πρόσδεσης. Κατά το πρώτο βήμα το RRM1 είναι κρίσιμο για τη συσχέτιση με το pre-tRNA. Ακολούθως, η επαφή με το La μοτίβο μπορεί να συμβάλλει στον αποφασιστικό έλεγχο της εξειδίκευσης ακολουθούμενο από τη συσχέτιση του RRM2 δίνοντας στη πρόσδεση χαρακτηριστικά υψηλής συγγένειας. Εναλλακτικά, το RRM2 μπορεί να προσδέσει αργότερα το RRM1 πριν το La μοτίβο έρθει σε επαφή με το RNA.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Wolin S.L. and Cedervall T., 'The La Protein', Annu. Rev. Biochem., 2002, 71, 375-403.
- 2. Harley J.B., 'Autoantibodies in Sjogren's syndrome', J. Autoimmun., 1989, 2, 283-394.
- 3. Maraia R.J. and Intine R.V.A., 'Recognition of Nascent RNA by the human La Antigen: Conserved and Diverged Features of Structure and Function', Mol. Cell Biol., 2001, 21(2), 367-379.
- Graus F., Cordon-Cardo C., Bonfa E. and Elkon K.B, 'Immunohistochemical localization of La nuclear antigen in brain. Selective concentration of the La protein in neuronal nucleoli', J. Neuroimmunol., 1985, 9, 307-319.
- 5. Habets W.J., J.H. denBrok, Boerbooms A.M., L.B. van de Putte and W.J. van Venrooij, 'Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and unifected HeLa cells, EMBO J, 1983, 2, 1625-1631.
- 6. Hendrick J.P., S.L. Wolin, J. Rinke, M.R. Lerner and J.A. Steitz, 'Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characteterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from unifected mammalian cells', Mol. Cell. Biol., 1981, 1, 1138-1149.
- Horke S., Reumann K., Schulze C., Grosse F. and Heise T., 'The La motif and the RNA recognition motifs of human La autoantigen contribute individually to RNA recognition and subcellular localization', J. Biol. Chem., 2004, 279(48), 50302-50309.
- Christel H. D. Broekhuis, Gitte Neubauer, Annemarie van der Heijden, Matthias Mann, Christopher G. Proud, Walther J. van Venrooij, and Ger J. M. Pruijn, 'Detailed Analysis of the Phosphorylation of the Human La (SS-B) Autoantigen', Biochemistry, 2000, 39, 3023-3033.
- Jacks A., Babon J., Kelly G., Manolaridis I., Gary P.D., Curry S. and Conte M.R., 'Structure of the C-Terminal Domain of Human La Protein Reveals a Novel RNA Recognition Motif Coupled to a Helical Nuclear Retention Element', Structure, 2003, 11, 833-843.
- Alfano C., Sanfelice D., Babon J., Kelly G., Jacks A., Curry S. and Conte M.R., 'Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein', Nature Structural & Molecular Biology, 2004, 11(4), 323-329.



11. Kenan D.J. and Keane J.D., 'La gets its wings', Nature Structural & Molecular Biology, 2004, 11(4), 303-305. an daib

1999년 - Andrewski Andrewski, 1999년 - Andrewski Andrewski, 1997년 - Andrewski Andrewski, 1997년 - Andrewski Andrew 1997년 - 1997년 - 1997년 - Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski 1997년 - 1997년 - 1997년 - Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski Andrewski

and the second

. a that we do the set ng an an an an Arthur an Arthur and the second $\mathcal{L}_{1,2}^{(n)} = \frac{1}{2^{n-1}} \sum_{j=1}^{n-1} \mathcal{L}_{1,2}^{(n)} = \frac{1}{2^{n-1}} \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{j=1}^{$ 1. 1997年,199 ng para tanàna amin'ny tanàna mandritra dia mandritra dia mandritra dia mandritra dia mandritra dia mandritra d Ben we are the set of a set of the set of the

the state of the second se and the second the production of the start in the sector 1965

- A Start & A St and the particular sector of the sector of t 18

And the second s and an a press of the second secon a start and the start of the star

and the second of the second second

CT SING

5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

<u>ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJÖGREN'S (SS)</u>



TO ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJÖGREN'S (SS)

Το ανοσοποιητικό σύστημα σε υγιή άτομα είναι ικανό να διακρίνει ένα ξένο συστατικό από τα συστατικά του ίδιου του οργανισμού. Η ικανότητα αυτή αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται λανθασμένα εναντίον του ίδιου του οργανισμού στοχεύοντας τα κύτταρα, τους ιστούς και τα όργανά του. Η συσσώρευση κυττάρων και μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος σε ένα σημείο του σώματος που δέχεται επίθεση, αναφέρεται ως φλεγμονή. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά αυτοάνοσα νοσήματα που καθένα μπορεί να προσβάλει τον οργανισμό με διαφορετικούς τρόπους.

Το σύνδρομο Sjögren's (SS) είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα, στο οποίο οι σιελογόνοι και δακρυϊκοί αδένες είναι οι κύριοι στόχοι μιας χρόνιας φλεγμονής που καταλήγει σε ατροφία των αδένων και ανεπαρκή λειτουργία με συνέπεια να προκαλείται ξηρότητα στα μάτια και στο στόμα. Στην ιατρική ορολογία, για τα ξηρά μάτια χρησιμοποιείται ο όρος keratoconjunctivitis sicca ή KCS, ενώ για το ξηρό στόμα ο όρος ξηροστομία. Το νόσημα μπορεί να επηρεάσει και άλλους αδένες, όπως αυτούς που βρίσκονται στο στομάχι, στο πάγκρεας και στα εντόσθια, και μπορεί να προκαλέσει ξηρότητα και σε άλλα μέρη που χρειάζονται υγρασία, όπως η μύτη, ο λαιμός, οι αεραγωγοί και το δέρμα.

Το SS είναι μια σχετικά πρόσφατη ασθένεια (Πίνακας Ι). Μέχρι το τέλος του 19^{ου} αιώνα υπήρχαν απομονωμένες αναφορές, ενώ το 1933 το SS περιέγραψε 19 περιπτώσεις και η ασθένεια άρχισε να εγκαθιδρύεται σαν μια οντότητα^[1].

Έτος	Αναδρομή της εμφάνισης του SS		
1888	Single case reports by Hadden and Rowlands		
1892	Case report and histology described by Miculicz		
1926	Three patients described by Gougerot		
1928	Link with arthritis reported by Houwer		
1933	Sjogren's thesis describing 19 patients with 'keratoconjuctivitis sicca'		
1946	Sjogren's thesis translated into English		
1953	The term 'Sjogren's syndrome' becomes established in literature		
1965	Primary versus secondary Sjogren's syndrome described		
1970	Autoantibodies Ro (SS-A) and La (SS-B) described. Routine		
	diagnostic tests available in 1990s		
1980- 1990	Extraglandular manifestations		
1990	Trials on disease-modifying drugs		
1993	The preliminary European criteria		
2002	The revised American-European consensus criteria		

Πίνακας Ι: Ιστορική αναδρομή της εμφάνισης του Συνδρόμου Sjögren's (SS).

Το SS εκτείνεται σε τρεις ειδικότητες: οφθαλμολογία, οδοντιατρική και ρευματολογία. Στα πρώιμα χρόνια, η βιβλιογραφία κυρίως εντοπίστηκε σε οφθαλμολογικά περιοδικά, και το SS δεν χαρακτηρίζονταν σαν ρευματική ασθένεια μέχρι την περιγραφή της διάκρισης του πρωτοπαθούς σε σχέση με το δευτεροπαθές SS το 1965. Τα χαρακτηριστικά αυτοαντισώματα κατά των αυτοαντιγόνων Ro(SS-A) και La(SS-B) περιγράφηκαν το 1970, αλλά είναι μόνο στα τελευταία δεκαπέντε χρόνια που τα πειράματα έχουν γίνει ευρέως διαθέσιμα. Σε σύγκριση με άλλες ρευματικές παθήσεις όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (RA) και ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (SLE), το SS είναι σχετικά πιο ήπιο.

Το SS μπορεί να εμφανιστεί μόνο του, και χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθές SS (pSS), ή σε συσχέτιση με άλλες ασθένειες του συνδετικού ιστού, πιο συχνά με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (RA), Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (SLE) ή Σκληρόδερμα, και τότε καλείται δευτεροπαθές SS (sSS)^[2]. Το SS έχει μια προσεγγιστική επικράτηση 0.6% του συνολικού πληθυσμού και συγκρινόμενο με άλλες αυτοάνοσες ρευματικές παθήσεις και εμφανίζεται σε υψηλότερες συχνότητες στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (9:1). Ο πίνακας ΙΙ δείχνει τις αναλογίες μεταξύ γυναικών και ανδρών στις αυτοάνοσες παθήσεις.

Αυτοάνοσες παθήσεις	Αναλογία	
Hashimoto's disease/hypothyroiditis	50:1	
Systemic lupus erythematosus	9:1	
Sjogren's syndrome	9:1	
Antiphospholipid syndrome	9:1	
Primary biliary cirrhosis	9:1	
Mixed connective tissue disease	8:1	
Chronic active hepatitis	8:1	
Graves' disease/hyperthyroiditis	7:1	
Rheumatoid arthritis	4:1	
Scleroderma	3:1	
Myasthenia gravis	2:1	
Multiple sclerosis	2:1	
Chronic idiopathic thrombo-cytopenic purpura	2:1	

Πίνακας ΙΙ: Αναλογίες εμφάνισης των αυτοάνοσων παθήσεων ανάμεσα σε Γυναίκες- Άνδρες.

Το πρωτοπαθές SS ανιχνεύεται στους δακρυϊκούς και σιελογόνους αδένες. Ασθενείς με πρωτοπαθές SS είναι περισσότερο πιθανό να έχουν αντισώματα κατά Ro/SS-A και SS-B να κυκλοφορούν στο αίμα τους σε σχέση με εκείνους με δευτεροπαθές SS^[3]. Σε ασθενείς με δευτεροπαθές SS είχε ήδη διαγνωσθεί ένα αυτοάνοσο νόσημα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή ο λύκος πριν να αναπτυχθεί το SS. Οι ασθενείς με δευτεροπαθές SS έχουν περισσότερα προβλήματα υγείας διότι εμφανίζουν δυο νοσήματα, και είναι λιγότερο πιθανό να έχουν τα αντισώματα που σχετίζονται με το πρωτοταγές SS.

Για λόγους που δεν είναι κατανοητοί, περίπου το 75% των αυτοάνοσων παθήσεων συμβαίνουν στις γυναίκες, κυρίως κατά τη διάρκεια της κύησης. Η έρευνα προσπαθεί να ρίξει φως στους γενετικούς, ορμονικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου που συνεισφέρουν στην πρόκληση των ασθενειών αυτών^[4,5]. Στην πραγματικότητα, οι ασθένειες αυτές δεν είναι πολύ συχνές, με εξαίρεση τον θυρεοειδισμό, το διαβήτη, και το λύκο. Παρόλα αυτά, συνολικά αντιπροσωπεύουν την τέταρτη μεγαλύτερη αιτία ανικανότητας στις γυναίκες στις ΗΠΑ.

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SJÖGREN'S

Στο SS, τα λεμφοκύτταρα στοχεύουν τους αδένες που παράγουν υγρασία κυρίως τους δακρυϊκούς και τους σιελογόνους αδένες. Αν και δεν είναι γνωστό πως ακριβώς συμβαίνει, οι κατεστραμμένοι αδένες δεν μπορούν πλέον να παράγουν δάκρυα και σάλιο με αποτέλεσμα την ξηρότητα των ματιών και του στόματος. Όταν το δέρμα, οι αεραγωγοί, οι ιστοί του κολεού επηρεαστούν τότε δημιουργείται ξηρότητα και σε αυτά τα μέρη επίσης.

Τα κυριότερα συμπτώματα είναι:

 Ξηρά μάτια: Τα μάτια μπορεί να είναι κόκκινα, να καίνε και να φαγουρίζουν (κνησμός). Οι ασθενείς λένε πως νιώθουν σα να έχουν άμμο στα μάτια τους. Επίσης, η όραση δεν είναι φυσιολογική και ο ανοικτός φωτισμός, ιδίως ο φθορίζων φωτισμός μπορεί να ενοχλεί.

Ξηρό στόμα: Οι ασθενείς έχουν την αίσθηση ότι το στόμα τους είναι γεμάτο από βαμβάκι. Είναι δύσκολη η κατάποση και η ομιλία και επιπλέον αλλοιώνεται η αίσθηση της γεύσης. Η αίσθηση της όσφρησης μπορεί να αλλάξει επίσης και εκδηλώνεται ξηρόβηχας. Στο ξηρό στόμα λόγω της έλλειψης του σάλιου ελαττώνεται η προστατευτική του επίδραση και αυξάνονται οι πιθανότητες να αναπτυχθούν μολύνσεις.

Τόσο το πρωτοπαθές όσο και το δευτεροπαθές SS μπορεί να επηρεάσει και άλλα μέρη του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος, των αρθρώσεων, των πνευμόνων, του ήπατος, των αγγείων του αίματος και του νευρικού συστήματος και να προκαλέσει συμπτώματα όπως, ξηρό δέρμα, δερματικά εξανθήματα, προβλήματα στο θυρεοειδή, πόνο στις αρθρώσεις και στους μύες, πνευμονία, ξηρότητα του

κολεού, νάρκωση και σουβλερούς πόνους στα άκρα. Όταν το SS επηρεάζει άλλα μέρη του σώματος, η κατάσταση καλείται υπεραδενοειδής ανάμειξη διότι τα προβλήματα εκτείνονται πέρα από τα δακρυϊκούς και σιελογόνους αδένες. Τέλος, το SS μπορεί να προκαλέσει υπερβολική κούραση, η οποία μπορεί να έχει συνέπεια στην καθημερινή ζωή.

ΑΙΤΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SJÖGREN'S

Οι ερευνητές πιστεύουν πως το SS προκαλείται από ένα συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Πολλά διαφορετικά γονίδια φαίνεται να εμπλέκονται, αλλά δεν είναι βέβαιο ποιο από αυτά σχετίζεται με την ασθένεια αφού τα διαφορετικά γονίδια φαίνεται να διαφοροποιούν το ρόλο τους ανάλογα με τον άνθρωπο. Για παράδειγμα, υπάρχει ένα γονίδιο που προδιαθέτει τους Καυκασιανούς στην ασθένεια. Άλλα γονίδια σχετίζονται με το SS σε άτομα Ιαπωνικής, Κινεζικής και Αφρικανο-Αμερικανικής καταγωγής. Παρόλα αυτά, αν ένα άτομο έχει ένα από αυτά τα γονίδια δεν είναι σίγουρο ότι θα εμφανίσει την ασθένεια. Κάποιο είδος σκανδάλης πρέπει να ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα.

Οι επιστήμονες πιστεύουν ότι η σκανδάλη μπορεί να είναι μια ιἴκή ή βακτηριακή μόλυνση που λειτουργεί ως εξής: Ένα άτομο που διαθέτει ένα γονίδιο που συσχετίζεται με το SS προσβάλλεται από ιἴκή μόλυνση. Ο ιός διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα για να δράσει, άλλα το γονίδιο μεταβάλλει το στόχο του παράγοντας κύτταρα μαχητές (λεμφοκύτταρα) στους αδένες των ματιών και του στόματος. Τα λεμφοκύτταρα επιτίθενται στα υγιή κύτταρα, προκαλώντας την φλεγμονή που καταστρέφει τους αδένες και τους αποτρέπει από το να λειτουργούν σωστά. Αυτά τα κύτταρα μαχητές θα έπρεπε να πεθάνουν μετά την επίθεση με μια φυσιολογική διαδικασία που καλείται απόπτωση, αλλά σε ανθρώπους με SS συνεχίζουν να επιτίθενται προκαλώντας περαιτέρω βλάβη. Οι επιστήμονες πιστεύουν ότι η αντίσταση στην απόπτωση μπορεί να είναι γενετική. Η πιθανότητα ότι τα ενδοκρινή και νευρικά συστήματα παίζουν ένα ρόλο είναι επίσης υπό διερεύνηση^[4].

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SJÖGREN'S

Το SS μπορεί να προσδιοριστεί σαν μια αυτοάνοση φλεγμονώδης εξωκρινοπάθεια (exocrynopathy) που επηρεάζει τους σιελογόνους και δακρυϊκούς αδένες οδηγώντας σε ξηρό στόμα και ξηρά μάτια. Για να γίνει διάγνωση, είναι αναγκαίο να αποδειχθεί ότι η εξωκρινής δυσλειτουργία είναι αυτοάνοσης φύσης. Δυσλειτουργίες που μιμούνται το SS περιλαμβάνουν ατροφία που σχετίζεται με την ηλικία, χρόνια ανησυχία και ένα φάσμα λειτουργικών διαταραχών στο χρόνιο σύνδρομο κούρασης/ινομυαλγίας που συνδέεται με συμπτώματα ξηρών ματιών και στόματος. Είναι καλά γνωστό ανάμεσα στους κλινικούς ερευνητές ότι η εφαρμογή των διαγνωστικών κριτηρίων είναι απαραίτητη για την εκτίμηση κάθε εμπλεκόμενης ομάδας ασθενών.

Σε μια ασθένεια τόσο ετερογενή όπως το SS, τα κριτήρια κατάταξης είναι χρήσιμα για την κλινική διάγνωση. Τα κοινώς χρησιμοποιούμενα κριτήρια καθορίζονται από την απόδειξη ξηροστομίας και ξηροφθαλμίας, την απόδειξη ύπαρξης κεντρικής φλεγμονής στην βιοψία σιελογόνων αδένων και την παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό.

Τα κριτήρια αυτά είναι τα εξής:

- 1. Προσοφθάλμια συμπτώματα
- 2. Στοματικά συμπτώματα
- 3. Προσοφθάλμια σημεία
- 4. Λεμφοκυτταρικά διηθήματα στην βιοψία του χείλους
- 5. Ανάμειξη του σιελογόνου αδένα
- Αυτοαντισώματα στον ορό (ρευματοειδείς παράγοντες, αντι-πυρηνικά αντισώματα και/ή Ro ή La αντισώματα)

Τα τέσσερα από τα έξι κριτήρια απαιτούνται για τη διάγνωση του SS.

Οι πιο συνήθεις εξετάσεις για τα μάτια και το στόμα είναι οι εξής:

 Το Schirmer test κατά το οποίο ο γιατρός βάζει λεπτές λουρίδες χαρτιού κάτω από τα χαμηλότερα βλέφαρα και μετρά το ποσό της υγρασίας επάνω στο χαρτί μετά από 5 λεπτά. Άνθρωποι με SS συνήθως παράγουν λιγότερο από 8mm δακρύων. Το Schirmer II τεστ είναι παρόμοιο, αλλά ο γιατρός χρησιμοποιεί ένα βαμβακερό σφουγγαράκι για να προκαλέσει ένα δάκρυ να μετακινηθεί στο εσωτερικό της μύτης.



Εικόνα 1: Στο Schirmer's test λεπτές λουρίδες χαρτιού τοποθετούνται κάτω από τα χαμηλότερα βλέφαρα και μετράται το ποσό της υγρασίας επάνω στο χαρτί μετά από 5 λεπτά.

Η Βιοψία των σιελογόνων αδένων του χείλους. Αυτό το τεστ είναι ο καλύτερος τρόπος για να ανακαλυφθεί αν η ξηροστομία προκαλείται από το SS. Ο γιατρός παραλαμβάνει ελάχιστους σιελογόνους αδένες από το εσωτερικό του χαμηλότερου χείλους και τους εξετάζει στο μικροσκόπιο. Αν οι αδένες περιέχουν συγκεκριμένο είδος λεμφοκυττάρων, το τεστ είναι θετικό για SS.

Γενικά, θεωρείται ότι ένα άτομο πάσχει από SS αν έχει ξηρά μάτια, ξηρό ατόμα και θετική βιοψία χείλους. Πρόσθετα τεστ μπορεί να γίνουν για να διαπιστωθεί αν άλλα μέρη του σώματος έχουν επηρεαστεί. Αυτά τα τεστ συμπεριλαμβάνουν ανάλυση αίματος, ανοσολογικά τεστ, ακτινογραφία στον θώρακα και ανάλυση ούρων.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΝΤΙ-La/SSB - ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ SS ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΤΩΝ

Η παρουσία των αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με SS αποτελεί κριτήριο διάγνωσης του SS, καθώς η συσχέτιση συνύπαρξής τους με τη νόσο είναι πολύ στενή^[5]. Συγκεκριμένα, με τη χρήση της τεχνικής της απλής ανοσοδιάχυσης, ανιχνεύθηκε ότι αντισώματα αντι-La/SSB βρίσκονται στο 40-50% ασθενών με πρωτοπαθές SS και στο 15-20% των ασθενών με SLE. Παράλληλα αντισώματα αντι-La/SSB εντοπίζονται σε χαμηλό ποσοστό σε ορούς ασθενών και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, καθώς επίσης εντοπίζονται και σε ασθενείς με υποξύ-δερματικό λύκο και στην πλειοψηφία των βρεφών με νεογγικό λύκο^(6,7). Πρέπει επίσης να αναφερθεί πως τα αντισώματα αντι-La/SSB και αντι-Ro/SSA συνυπάρχουν πάντα σε ορούς ασθενών. Όμως το αντίθετο δεν συμβαίνει. Δηλαδή αντι-Ro/SSA θετικοί οροί ασθενών δεν συνοδεύονται πάντα από την ύπαρξη αντισωμάτων αντι-La/SSB. Το γεγονός της συσχέτισης και της συχνής συνύπαρξης των αντισωμάτων αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB πιθανόν να οφείλεται στην μοριακή σύζευξη των παραπάνω πρωτεϊνών έμμεσα μεταξύ τους, στο σύμπλοκο των YRNAs, σε συνδυασμό με το μηχανισμό της ενδο-διαμοριακής εξάπλωσης των αντισωμάτων.

Τα αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB αντισώματα είναι μη οργανο-ειδικά αυτοαντισώματα. Είναι πιθανό αυτά τα αντισώματα να παράγονται τοπικά στους σιελογόνους αδένες^[6]. Η έκφραση, στην επιφάνεια των σιελογόνων αδένων, ενός αντιγόνου που αντιδρά με αντι- Ro/SSA θετικό ορό φάνηκε μετά από ακτινοβόληση των κερατινοκυττάρων με UV. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι ο TNF-alpha παράγοντας μεσολαβεί στην έκφραση στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων των αυτοαντιγόνων 52-kDa Ro/SSA και La/SSB σε ασθενείς με SS και SLE⁽⁸⁾. Η μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων με τον αδενοϊό 2 προάγει τη μετάθεση του La/SSB αντιγόνου από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη.

Η μοριακή μίμηση θεωρείται ότι είναι η πιο πιθανή υπόθεση για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Στην πραγματικότητα έχουν αναφερθεί ομοιότητες στην αλληλουχία των αντιγονικών καθοριστών (επιτόπων) των Ro/SSA και La/SSB με άλλα μόρια. Για παράδειγμα, ένας από τους κύριους αντιγονικούς καθοριστές του La/SSB εμφανίζει μια ομολογία στην αλληλουχία του με μια ρετροιϊκή gag πρωτεΐνη, που δείχνει ένα πιθανό ρόλο για μια ρετροιϊκή μόλυνση στην επαγωγή της αντι-La/SSB απόκρισης^[9]. Η έναρξη των ανοσοαποκρίσεων με τη μοριακή μίμηση μπορεί να ακολουθηθεί από ενδομοριακή διάχυση των ανοσοαποκρίσεων.

Όπως προαναφέρθηκε, ασθενείς που πάσχουν από SLE αρκετά συχνά φέρουν αντισώματα αντι-La/SSB. Το ποσοστό κυμαίνεται από 10 μέχρι 20% και γενικότερα οι παραπάνω ασθενείς συχνά παρουσιάζουν κλινικά χαρακτηριστικά δευτεροπαθούς SS. Συγκεκριμένα στο 50% των ασθενών με SLE που φέρουν κλινικά χαρακτηριστικά SS, είναι παρόντα αντισώματα αντι-La/SSB^[10].

Ένα ακόμα ενδιαφέρον γεγονός είναι η υψηλή συσχέτιση που φαίνεται να υπάρχει μεταξύ της εμφάνισης συγγενούς εμφράγματος του μυοκαρδίου σε βρέφη που πάσχουν από νεογνικό λύκο και της παρουσίας αντισωμάτων αντι-La/SSB στον ορό μητέρας και νεογνού. Τα μητρικά αντισώματα διαπερνούν τον πλακούντα, εισέρχονται στο κυκλοφοριακό σύστημα του εμβρύου και προκαλούν σειρά ιστικών βλαβών στο έμβρυο, στις οποίες οφείλεται το σύνδρομο του νεογνικού λύκου από το οποίο πάσχει το βρέφος⁽⁷⁾.

Τα τελευταία χρόνια επιχειρείται να βρεθεί η συσχέτιση της εξέλιξης των νοσημάτων SS και SLE σε σχέση με τον τίτλο των αυτοαντισωμάτων αντι-La/SSB και αντι-Ro/SSA στον ορό των ασθενών^[11]. Η συνολική διαδικασία είναι αρκετά επίπονη διότι απαιτείται η στενή παρακολούθηση πολλών ασθενών, διαφόρων κατηγοριών για μακρύ χρονικό διάστημα και η αναγκαία συχνή αιμοληψία αυτών. Οι περισσότεροι ασθενείς δεν παρουσίασαν διακύμανση των επιπέδων του τίτλου των αυτοαντισωμάτων τους κατά την πάροδο του χρόνου, παρ' όλα αυτά υπήρχαν και κάποιοι στους οποίους η αυξομείωση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων συμβάδιζε με την εξέλιξη της έντασης της νόσου (έξαρση της νόσου // άνοδος του τίτλου των αυτοαντισωμάτων, ύφεση της νόσου // μείωση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων). Παράλληλα παρατηρήθηκε μια διακύμανση των επιπέδων του αντισωμάτων αντι-La/SSB, που στρέφονται εναντίον διαφορετικών τμημάτων του αυτοαντιγόνου La/SSB κατά την εξέλιξη της νόσου. Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει

πως υπάρχουν διαφορετικοί υποπληθυσμοί αντισωμάτων αντι-La/SSB που στρέφονται σε διαφορετικές περιοχές του αυτοαντιγόνου La/SSB^[12].

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν τους επιστήμονες στο να μελετήσουν την πιθανότητα συσχέτισης αναγνώρισης συγκεκριμένου επιτόπου του ίδιου αυτοαντιγόνου σε διαφορετικές αυτοάνοσες ασθένειες. Συγκεκριμένα, μελέτες σε ασθενείς με SS και SLE δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν επιτόπους απόλυτα συσχετισμένους με τα παραπάνω αυτοάνοσα νοσήματα. Παρ' όλα αυτά βρέθηκε πως διαφορετικές περιοχές του La/SSB αυτοαντιγόνου αναγνωρίζονται από τις παραπάνω ασθένειες. Συγκεκριμένα αντι-La/SSB θετικοί οροί ασθενών με SLE αναγνωρίζουν κυρίως την αμινοτελική και την κεντρική περιοχή του La/SSB αυτοαντιγόνου, ενώ αντίθετα στην περίπτωση ασθενών με SS αναγνωρίζουν κυρίως την καρβοξυτελική περιοχή^[13].

Οι τεχνικές με τις οποίες μπορούν να ανιχνευθούν τα αντισώματα στους ορούς των ασθενών είναι οι εξής:

- Ανοσοφθορισμός
- Ανοσοαποτύπωση
- Ανοσοδιάχυση
- Αντίθετη Ανοσοηλεκτροφόρηση
- Ανοσοκαθίζηση
- ELISA



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Patrick J.W. Venables, 'Sjogren's Syndrome', Best Practice and Research Clinical Rheumatology, 2004, 18(3), 313-329.
- Delaleo N., Jonsson M.V. and Jonsson R., 'Disease mechanisms of Sjogren's syndrome', Drugs Discovery Today, 2004, 1(3), 329-336.
- Harley, J.B., 'Autoantibodies in Sjogren' s sydrome', J. Autoimmun., 1989, 2, 283-394.
- 4. Kazuhiko Yamamoto, 'Pathogenesis of Sjogren's syndrome', Autoimmunity Reviews, 2003, 2, 13-18.
- Arnett, F.C., Hamilton, R.G., Reveille, J.D., Bias, W.B., Harley, J.B., Reichlin M., 'Genetic studies of Ro(SS-A) and La(SS-B) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome', Arthritis Rheum., 1989, 32, 413-419.
- Tenger P., Halse A.K., Haga H.J., Jonsson R. and Wahren-Herlenius M., 'Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome', Arthritis Rheum., 1998, 41, 2238-2248.
- Buyon, J.P., 'Neonatal lupus syndromes', Am. J. Repord. Immunol., 1992, 28, 259-263.
- Dorner, T., Hucko, M., Mayer, W.J., Trefzer, U., Burmester, G.R., Hiepe, F., 'Enhanced membrane expression on the 52kDa Ro(SS-A) and La(SS-B) antigens by human keratinocytes induced by TNF alpha', Ann. Rheum. Dis., 1995, 54, 904-909.
- Kohsaka, H., Yamamoto, K., Fujii, H., Miura, H., Miyasaka, N., Nishioka, K., et al., 'Fine epitope mapping of the human SS-B/La protein: identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein', Clin. Invest., 1990, 85, 1566-1574.
- Andonopoulos, A.P., Skopouli, F.N., Dimou, G.S., Drosos, A.A. and Moutsopoulos, H.M. 'Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus', J. Rheumatol., 1990, 17, 201-204.
- Ben-Cherit, E., Fischel, R. and Rubinow, A., 'Anti-SSA/Ro and anti-La/SSB antibodies in serum and saliva of patients with Sjogren's syndrome', Arthritis Rheum. 1991 (suppl 34), 828-834.
- St Clair, E.N., Burch, J.A., Ward, M.M., Keene, J.D. and Riesetsky, D.S.
 'Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of human La autoantigen', J. Clin. Invest., 1990, 85, 515-521.

13. Tzioufas, A.G., Yannaki, E.E. and Sakarellos-Daitsiotis, M., 'Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping and characterization', Clin. Exp. Immunol., 1997, 108, 191-198.



าร เป็นได้เห็นไ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ιν

ΑΡΧΕΣ ΟΜΟΛΟΓΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ



ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός μιας πρωτεϊνικής αλληλουχίας είναι ένα από τα πιο συχνά προβλήματα στη βιολογία. Το θέμα αυτό, συνήθως, διευκολύνει η τρισδιάστατη δομή της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Απουσία μιας πειραματικά καθορισμένης δομής μιας πρωτείνης, η συγκριτική (comparative) ή ομόλογη (homology) μοντελοποίηση μπορεί μερικές φορές να παρέχει ένα χρήσιμο τρισδιάστατο μοντέλο για την πρωτεΐνη, το οποίο να σχετίζεται με τη γνωστή τρισδιάστατη-δομή (3D) μιας πρωτεΐνης. Η ομόλογη μοντελοποίηση προβλέπει την 3D-δομή για μια δεδομένη πρωτεΐνική αλληλουχία-στόχο (target), η οποία βασίζεται κυρίως στην ομολογία της με μια ή περισσότερες πρωτεϊνικών αλληλουχιές-εκμαγεία (templates) με γνωστές 3D-δομές. Ο αριθμός των πρωτεϊνικών αλληλουχιών που μπορούν να μοντελοποιηθούν και η ακρίβεια των προβλέψεων αυξάνεται σταθερά λόγω της ανάπτυξης του αριθμού των δομών των πρωτεϊνών και της βελτίωσης των προγραμμάτων μοντελοποίησης.

Η ομόλογη μοντελοποίηση παραμένει η μόνη μέθοδος, η οποία μπορεί αξιόπιστα να προβλέψει την τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης με μια ακρίβεια συγκρίσιμη με μια χαμηλής διακριτικής ικανότητας πειραματικά προσδιορισμένη δομή. Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι στη φύση η δομική διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης είναι περισσότερο διατηρημένη από την αμινοξική της αλληλουχία και ότι μικρές ή μεσαίες αλλαγές στην αλληλουχία τυπικά έχουν ως αποτέλεσμα μόνο μικρές αλλαγές στην 3D-δομή.

Εξαιτίας της έλλειψης δομικής πληροφορίας για πολλές πρωτεΐνες, μέχρι σήμερα, παρατηρείται ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την μελέτη αυτών με τη θεωρητικήυπολογιστική μέθοδο της ομόλογης μοντελοποίησης. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν πολλά υπολογιστικά προγράμματα που αυτοματοποιούν την διαδικασία της ομόλογης μοντελοποίησης (Πίνακας Ι). Η μοντελοποίηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ομόλογης μοντελοποίησης απαιτεί ακριβά λειτουργικά συστήματα (hardware and software), ειδικές υπολογιστικές γνώσεις και είναι προσιτή μόνο για ένα μικρό ποσοστό ερευνητικών εργαστηρίων. Παρόλα αυτά τα υπολογιστικά προγράμματα είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση προβλημάτων όπως σε μία δύσκολη ή ασυνήθιστη περίπτωση ομόλογης μοντελοποίησης είτε λόγω της προβληματικής ομολογίας εκμαγείου-στόχου (alignments) είτε λόγω της μοντελοποίησης δύσκολων περιοχών λόγω της παρουσίας πολλαπλών διαμορφωτικών καταστάσεων^[1].

BIBAIC

Πίνακας Ι: Υπολογιστικά προγράμματα που χρησιμοποιούνται στην ομόλογη μοντελοποίηση πρωτεινών.

Πρόγραμμα	Διαθεσιμότητα	Ηλεκτρονική Διεύθυνση
COMPOSER	Δημόσιο	http://www.felix.bioc.cam.ac.uk/soft-base/html
CONGEN	Δημόσιο	email:bruc@dino.squibb.com
DRAGON	Δημόσιο	http://www.nimr.mrc.ac.uk
MODELLER	Δημόσιο	http://www.guitar.rockefeller.edu/modeller/modellr.html
NAOMI	Δημόσιο	http://www.ocms.ox.ac.uk
WHAT IF	Δημόσιο	http://www.sander./embl.heidelberg.de/vriend
INSIGHT II	Εμπορικό	http://www.msi.com
LOOK	Εμπορικό	http://www.mag.com
QUANTA	Εμπορικό	http://www.msi.com
SYBYL	Εμπορικό	http://www.tripos.com
SWISS-MOD	Δημόσιο	http://www-isrec.unil.ch/SWISS-MODEL.html

Το SYBYL συμπεριλαμβάνει το COMPOSER. Το QUANTA και το INSIGHT II συμπεριλαμβάνουν το MODELLER. Το INSIGHT II επίσης συμπεριλαμβάνει το CONSENSUS. Το πρόγραμμα SWISS-MOD διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο. Πολλά προγράμματα ενδείκνυται για την μοντελοποίηση μόνο των παράπλευρων αλυσίδων (sidechains) και των θηλέων (loops).

ΒΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Η ομόλογη μοντελοποίηση χρησιμοποιεί μια ή περισσότερες πειραματικά προσδιορισμένες πρωτεϊνικές δομές για να προβλέψει τη διαμόρφωση μιας άλλης πρωτεϊνης, η οποία έχει παρόμοια αμινοξική αλληλουχία. Η διαδικασία της ομόλογης μοντελοποίησης περιλαμβάνει 4 κύρια βήματα: την ταυτοποίηση των περιοχών δίπλωσης (fold assignment), την εύρεση της ομολογίας ανάμεσα στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες (sequence alignment), την κατασκευή του ομόλογου μοντέλου (model building) και την βελτιστοποίηση του μοντέλου (model refinement) (Εικ.1).





Εικόνα 1: Τα βήματα που εμπλέκονται στην πρόβλεψη της δομής μιας πρωτεΐνης με την τεχνική της ομόλογης μοντελοποίησης.

1. Ταυτοποίηση των περιοχών δίπλωσης και επιλογή του εκμαγείου

Το σημείο έναρξης στην ομόλογη μοντελοποίηση είναι ο προσδιορισμός όλων των πρωτεϊνικών δομών που σχετίζονται με την αλληλουχία του μορίου-στόχου, και η επιλογή εκείνων των δομών που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία. Αυτό το βήμα διευκολύνεται από έναν αριθμό πρωτεϊνικών αλληλουχιών και βάσεων δεδομένων με πειραματικά προσδιορισμένες δομές καθώς και από υπολογιστικά προγράμματα. Τα εκμαγεία μπορούν να βρεθούν χρησιμοποιώντας σαν βάση την αμινοξική αλληλουχία του μορίου-στόχου και με την αναζήτηση σε δομικές βάσεις δεδομένων όπως η PDB^[2] (Protein Data Bank), η SCOP^[3], το DALI^[4] και το CATH^[5]. Η πιθανότητα να βρεθεί μια σχετική πρωτεΐνη γνωστής δομής στις βάσεις δεδομένων, που εμφανίζει υψηλή ομολογία στην πρωτοταγή δομή με το μορίο-στόχο, κυμαίνεται από 20% έως 70%.

Υπάρχουν τρεις κύριες τάξεις μεθόδων σύγκρισης πρωτεϊνών που είναι χρήσιμες στην αναγνώριση των περιοχών δίπλωσης. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει τις μεθόδους που συγκρίνουν την αλληλουχία του στόχου με κάθε μία από τις 1844 αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας την σύγκριση αλληλουχίας-αλληλουχίας^[6]. Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών στην αναζήτηση παραπλήσιων πρωτεϊνικών αλληλουχιών και δομών έχει μελετηθεί και εκτιμηθεί εκτενώς. Τα συνήθη χρησιμοποιούμενα προγράμματα σε αυτή τη τάξη είναι το FASTA^[7] και το BLAST^[8].

Η δεύτερη τάξη περιλαμβάνει μεθόδους, οι οποίες χαρακτηρίζονται από πολλαπλές συγκρίσεις αλληλουχίας ώστε να βελτιωθεί η ευαισθησία της έρευνας. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα που ανήκει σε αυτή τη τάξη είναι το PSI-BLAST^[9], το οποίο επαναληπτικά βρίσκει και παρουσιάζει όλες εκείνες τις αλληλουχίες που είναι ομόλογες με την αλληλουχία του στόχου. Για μια δεδομένη αλληλουχία, συλλέγονται αρχικά οι ομόλογες αλληλουχίες, με την υψηλότερη ομολογία ως προς την πρωτοταγή δομή, από μια βάση δεδομένων με αλληλουχία και τα ομολογά της, κατασκευάζεται από την ομολογία μια ειδική μήτρα (matrix) και η μήτρα αυτή χρησιμοποιείται για την αναζήτηση στη βάση δεδομένων επιπλέον ομόλογων αλληλουχιών. Αυτά τα βήματα επαναλαμβάνονται μέχρι να μην ανιχνεύονται άλλα ομόλογα.

Η τρίτη τάξη μεθόδων περιλαμβάνει τις μεθόδους ταιριάσματος των 3D δομών των εκμαγείων ή 'threading', οι οποίες βασίζονται στην σύγκριση κατά ζεύγη μιας πρωτεϊνικής αλληλουχίας και μιας πρωτεΐνης με γνωστή δομή. Αυτές οι μέθοδοι είναι κυρίως χρήσιμες όταν δεν υπάρχουν αλληλουχίες που να σχετίζονται ευκρινώς με τον μοντελοποιημένο στόχο, και έτσι η αναζήτηση δεν μπορεί να ωφεληθεί από την αυξημένη ευαισθησία των μεθόδων που βασίζονται στο προφίλ της αλληλουχίας. Αφού δημιουργηθεί ένας κατάλογος με όλες τις σχετιζόμενες πρωτεϊνικές δομές, είναι αναγκαίο να επιλέξουμε εκείνα τα εκμαγεία που είναι πιο κατάλληλα για ένα συγκεκριμένο πρόβλημα μοντελοποίησης. Συνήθως όσο μεγαλύτερη είναι η ομολογία ανάμεσα στο εκμαγείο και τον στόχο τόσο καλύτερο είναι το προκύπτον μοντέλο.

Διάφοροι άλλοι παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψιν κατά την επιλογή του εκμαγείου. Το περιβάλλον του εκμαγείου θα πρέπει να συγκριθεί με το απαιτούμενο περιβάλλον για το μοντέλο. Το περιβάλλον, το οποίο περιλαμβάνει όλους τους παράγοντες που καθορίζουν την πρωτεϊνική δομή εκτός από την αλληλουχία του (διαλύτης, υποκαταστάτες, τετραδικές αλληλεπιδράσεις, pH), παίζει σημαντικό ρόλο όταν κατασκευάζονται μοντέλα πρωτεινών με τη τεχνική της ομόλογης μοντελοποίησης. Η ποιότητα της πειραματικής δομής του εκμαγείου είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας. Η διακριτική ικανότητα, ο R-παράγοντας μιας κρυσταλλογραφικής δομής και ο αριθμός των περιορισμών ανά κατάλοιπο για μια NMR-δομή είναι ενδεικτικά της ακρίβειάς του εκμαγείου⁽¹⁾.

HUNNING A

Οι προτεραιότητες των κριτηρίων για την επιλογή του εκμαγείου εξαρτώνται από το σκοπό του συγκριτικού μοντέλου. Για παράδειγμα αν ένα μοντέλο πρωτεΐνηςυποκαταστάτη πρόκειται να κατασκευαστεί, η επιλογή του εκμαγείου που περιέχει ένα παρόμοιο υποκαταστάτη είναι πιθανόν πιο σημαντική από τη διακριτική ικανότητα του εκμαγείου. Από την άλλη πλευρά, αν το μοντέλο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για να αναλύσει τη γεωμετρία π.χ. του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί ένα εκμαγείο υψηλής διακριτικής ικανότητας. Δεν είναι απαραίτητο να επιλεγεί ένα μόνο εκμαγείο. Στην πραγματικότητα η χρήση πολλών εκμαγείων αυξάνει την ακρίβεια του ομόλογου μοντέλου.

2. Ομολογία ανάμεσα στις αλληλουχίες στόχου-εκμαγείου

Οι περισσότερες μέθοδοι προσδιορισμού της δευτεροταγούς δομής δημιουργούν μια ομολογία ανάμεσα στις αλληλουχίες του στόχου και του εκμαγείου. Παρόλα αυτά, αυτή η ομολογία συχνά δεν είναι η ιδανική ομολογία στόχου-εκμαγείου για την ομόλογη μοντελοποίηση. Όταν το εκμαγείο έχει επιλεγεί, μια ειδική μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ώστε να γίνει η ομολογία μεταξύ της αλληλουχίας του στόχου και της αλληλουχίας του εκμαγείου. Για πρωτεϊνικές αλληλουχίες με ομοιότητα υψηλότερη από 40% η ομολογία είναι σχεδόν πάντα σωστή. Όταν η συνολική ομοιότητα ανάμεσα στην αλληλουχία του στόχου και την αλληλουχία του εκμαγείου είναι κάτω από 40% εμφανίζονται περιοχές με χαμηλή τοπική ομοιότητα στην αλληλουχία. Η ομολογία γίνεται πιο δύσκολη όταν η ομοιότητα είναι μικρότερη από 30%. Καθώς η ομοιότητα στην αλληλουχία μειώνεται, οι ομολογίες περιέχουν έναν αυξανόμενο αριθμό από λάθη, τα οποία ορισμένες φορές μπορούν να διορθωθούν αυτόματα ή δια χειρός. Για παράδειγμα, μόνο το 80% των καταλοίπων είναι πιθανόν να έχει σωστή ομολογία ανάμεσα σε δυο πρωτεΐνες που μοιράζονται 30% ομοιότητα στην αλληλουχία. Απαιτείται μέγιστη προσπάθεια για την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής ομολογίας διότι καμία σύγχρονη μέθοδος ομόλογης μοντελοποίησης δεν μπορεί να διορθώσει τα αποτελέσματα μιας λανθασμένης ομολογίας^[10-13]

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων ομολογίας πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα για ομολογία πολλαπλών αλληλουχιών είναι το CLUSTAL^[14], το οποίο διατίθεται στο διαδίκτυο. Στις περιπτώσεις δύσκολης ομολογίας, γίνεται επεξεργασία και χρήση των πληροφοριών που προέρχονται από ένα σύνολο πολλών δομών και αλληλουχιών. Αρχικά, προετοιμάζεται η ομολογία των εν δυνάμει εκμαγείων με την υπέρθεση των δομών τους και οι αλληλουχίες που

σχετίζονται με τα εκμαγεία και έχουν ομολογοποιηθεί εύκολα με αυτές, προστίθενται στην ομολογία. Το ίδιο γίνεται και με την αλληλουχία του στόχου. Τελικά, τα δυο προφίλ ομολογοποιούνται το ένα με το άλλο λαμβάνοντας υπόψιν όσο το δυνατό περισσότερο τη δομική πληροφορία.

3. Κατασκευή του μοντέλου

Αφού βρεθεί η ομολογία στόχου-εκμαγείου, μια ποικιλία μεθόδων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή ενός τρισδιάστατου μοντέλου για την πρωτεΐνηστόχο^[15-19]. Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα είναι η μοντελοποίηση με άκαμπτα σώματα. Μια άλλη οικογένεια μεθόδων, η μοντελοποίηση με τμηματικό ταίριασμα, βασίζεται στις θέσεις προσέγγισης των διατηρημένων ατόμων στα εκμαγεία. Η τρίτη ομάδα μεθόδων, η μοντελοποίηση που ικανοποιεί χωρικούς περιορισμούς, χρησιμοποιεί είτε τη γεωμετρία απόστασης ή βελτιωμένες τεχνικές ώστε να ικανοποιήσει τους χωρικούς περιορισμούς που προκύπτουν από ομολογία. Άλλοι παράγοντες όπως η επιλογή του εκμαγείου και η ακρίβεια της ομολογίας, συνήθως έχουν μεγαλύτερη βαρύτητα στην ακρίβεια του μοντέλου, κυρίως για μόρια που βασίζονται σε ομοιότητα στην αλληλουχία μικρότερη από 40% με το εκμαγείο.

4. Εκτίμηση του μοντέλου

Η ορθότητα του μοντέλου προσδιορίζει τη χρησιμότητα του. Το μοντέλο μπορεί να εκτιμηθεί ως ολόκληρο μόριο καθώς και ως ξεχωριστές περιοχές^[1,11,18]. Υπάρχουν στο διαδίκτυο πολλά προγράμματα για την εκτίμηση των μοντέλων. Το πρώτο βήμα στην εκτίμηση του μοντέλου είναι να προσδιορίσουμε αν το μόριο έχει τη σωστή αναδίπλωση. Ένα μοντέλο θα έχει τη σωστή αναδίπλωση αν το σωστό εκμαγείο έχει επιλεγεί και αν αυτό το εκμαγείο έχει ομολογοποιηθεί τουλάχιστον σωστά με την αλληλουχία του στόχου. Ο προσδιορισμός της σωστής αναδίπλωσης του μοντέλου γενικά αυξάνεται από την υψηλή ομοιότητα στην αλληλουχία με το πλησιέστερο εκμαγείο και τη διατήρηση των λειτουργικών ή δομικών καταλοίπωνκλειδιά στην αλληλουχία του στόχου. Όταν γίνει δεκτή μια αναδίπλωση για το μοντέλο, μια πιο λεπτομερής εκτίμηση της συνολικής ακρίβειας του μοντέλου μπορεί να παραχθεί βασιζόμενη στην ομοιότητα ανάμεσα στις αλληλουχίες του στόχου και του εκμαγείου.

Ομοιότητα στην αλληλουχία πάνω από 30% είναι ικανή να προβλέψει την αναμενόμενη ορθότητα ενός μοντέλου. Οι λόγοι είναι η γνωστή σχέση ανάμεσα στις δομικές ομοιότητες και στις ομοιότητες στην αλληλουχία των δυο πρωτεϊνών, η γεωμετρική φύση της μοντελοποίησης, που αναγκάζει το μοντέλο να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στο εκμαγείο και η ανικανότητα κάθε μεθόδου μοντελοποίησης να διορθώσει τα αποτελέσματα μιας λανθασμένης ομολογίας. Αν η ομοιότητα στην αλληλουχία ανάμεσα στο στόχο και το εκμαγείο πέσει κάτω από το 30%, η ομοιότητα γίνεται ανακριβής σαν μέτρο της αναμενόμενης ορθότητας ενός μοντέλου. Μοντέλα που παρεκκλίνουν σημαντικά από τη μέση ορθότητα είναι συχνά. Σε τέτοιες περιπτώσεις οι μέθοδοι της εκτίμησης μοντέλων είναι χρήσιμες.

Εκτός από την ομοιότητα στην αλληλουχία ανάμεσα στο στόχο και το εκμαγείο και το περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει ισχυρά την ορθότητα ενός μοντέλου. Για παράδειγμα, μερικές πρωτεΐνες, που δεσμεύουν ασβέστιο, επάγουν μεγάλες διαμορφωτικές αλλαγές όταν προσλαμβάνουν το ασβέστιο. Αν χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο η ελεύθερη ασβεστίου πρωτεΐνη για να μοντελοποιηθεί ο στόχος, ο οποίος δεσμεύει ασβέστιο, είναι πιθανό ότι το μοντέλο θα είναι λανθασμένο άσχετα με την ομοιότητα στην αλληλουχία ή την ορθότητα της δομής του εκμαγείου. Αυτό εφαρμόζεται στον πειραματικό προσδιορισμό μιας πρωτεΐνικής δομής, όπου μια δομή πρέπει να προσδιορίζεται μέσα σε ένα λειτουργικό περιβάλλον.

Μια βασική απαίτηση για ένα μοντέλο είναι να έχει καλή στερεοχημεία. Μερικά καλά προγράμματα για την εκτίμηση της στερεοχημείας είναι το PROCHECK^[20], το PROCHECK-NMR^[21], το AQUA^[21] και το WHATCHECK. Τα χαρακτηριστικά του μοντέλου που ελέγχονται με αυτά τα προγράμματα περιλαμβάνουν μήκη δεσμών, γωνίες δεσμών, επιπεδότητες του πεπτιδικού σκελετού και δακτυλίων των παράπλευρων αλυσίδων, χειρικότητα, γωνίες στρέψης των κύριων και παράπλευρων αλυσίδων και κρούσεις ανάμεσα στα αδέσμευτα ζεύγη ατόμων.

Υπάρχουν επίσης μέθοδοι για την εξέταση της τρισδιάστατης δομής των μοντέλων που λαμβάνουν υπόψιν τους χαρακτηριστικά, που έχουν συλλεχθεί από πρωτεινικές δομές υψηλής διακριτικής ικανότητας. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται σε προφίλ τρισδιάστατης δομής και στατιστικά δυναμικά μέσης δύναμης και λαμβάνουν υπόψιν το περιβάλλον κάθε καταλοίπου στο μοντέλο. Υπάρχει μια υπόθεση για τη θεωρητική ισχύ των ενεργειακών προφίλ για την ανίχνευση περιφερειακών λαθών στα μοντέλα.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η ομόλογη μοντελοποίηση είναι μια ικανοποιητική μέθοδος για να παραχθεί χρήσιμη πληροφορία για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Για παράδειγμα, τα συγκριτικά μοντέλα μπορεί να είναι χρήσιμα στο σχεδιασμό μεταλλαγμάτων για να

63

ł

;

ανιχνευθεί η βιολογική λειτουργία μιας πρωτεΐνης^[22-24], στην ταυτοποίηση των ενεργών κέντρων και περιοχών πρόσδεσης, στην ταυτοποίηση, στο σχεδιασμό και στη βελτίωση υποκαταστατών για μια συγκεκριμένη περιοχή πρόσδεσης^[25-28], στη μοντελοποίηση της εξειδίκευσης του υποστρώματος^[29], στην πρόβλεψη αντιγονικών επιτόπων^[30-36], στον έλεγχο και στη βελτίωση μιας ομολογίας αλληλουχίας-δομής, στην επιβεβαίωση μιας μακρινής δομικής σχέσης και στην λογικοποίηση γνωστών πειραματικών παρατηρήσεων^[29,37]. Ευτυχώς ένα τρισδιάστατο μοντέλο δεν χρειάζεται να είναι απόλυτα τέλειο για να είναι χρήσιμο στη βιολογία, σύμφωνα με τις εφαρμογές που προαναφέρθηκαν. Παρόλα αυτά η χρήση των μοντέλων εξαρτάται από την ορθότητα τους^[1]. Οι κατηγορίες των μοντέλων ανάλογα με το επίπεδο της ορθότητας αναφέρονται πιο κάτω:

 Μοντέλα που βασίζονται σε λιγότερο από 30% ομοιότητα στην αλληλουχία και έχουν λιγότερο από το 50% των ατόμων τους να βρίσκεται σε ακτίνα μέχρι 3.5 Å από τις σωστές θέσεις. Τέτοια μοντέλα εμφανίζουν δομικές διαφορές και τα κενά στην ομολογία είναι πιο συχνά και μεγαλύτερα. Παρόλα αυτά, ένας τέτοιος τύπος μοντέλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί η βιοχημική λειτουργία μιας πρωτεΐνης με μη προσδιορισμένη πειραματικά δομή.

 Μοντέλα που βασίζονται σε ομοιότητα στην αλληλουχία μεταξύ 30%-50% και το 85% των ατόμων τους, που έχει μοντελοποιηθεί, να βρίσκονται σε απόσταση μέχρι 3.5 Å από τις σωστές θέσεις. Οι ενεργές περιοχές και οι περιοχές πρόσδεσης είναι συχνά πιο διατηρημένες και μοντελοποιούνται με μεγαλύτερη ακρίβεια. Συχνά είναι πιθανό να προβλέψουμε ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης-στόχου τα οποία δεν απαντώνται στην δομή του εκμαγείου. Για παράδειγμα, η εύρεση της περιοχής πρόσδεσης μπορεί να προβλεφθεί από ένα σύμπλεγμα φορτισμένων καταλοίπων και το μέγεθος του υποκαταστάτη μπορεί να προβλεφθεί από τον όγκο της αύλακας στην περιοχή πρόσδεσης. Τα μοντέλα μεσαίας διακριτικής ικανότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή περιοχών μεταλλαγμάτων με αλλαγμένη ή κατεστραμμένη ικανότητα πρόσδεσης, η οποία θα μπορούσε να ελέγξει την υπόθεση για τη σχέση αλληλουχίας-δομής-λειτουργίας. Γενικά, μοντέλα μεσαίας διακριτικής ικανότητας συχνά επιτρέπουν βελτιστοποίηση (refinement) της λειτουργικής πρόβλεψης, που βασίζεται μόνο στην αλληλουχία διότι η πρόσδεση του υποκαταστάτη προσδιορίζεται κυρίως από τη δομή της περιοχής πρόσδεσης παρά από την αλληλουχία του.

 Μοντέλα που βασίζονται σε ομοιότητα στην ομολογία μεγαλύτερη από 50%. Η μέση ορθότητα των μοντέλων αυτών πλησιάζει εκείνη των X-ray δομών χαμηλής διακριτικής ικανότητας ή των NMR δομών μεσαίας διακριτικής ικανότητας. Οι

H BIBALOO

ομολογίες στις οποίες βασίζονται αυτά τα μοντέλα γενικά δεν περιέχουν καθόλου λάθη. Επιπλέον με τις προαναφερθείσες εφαρμογές, τα μοντέλα υψηλής ποιότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το 'docking' μικρών υποκαταστατών ή ολόκληρων πρωτεΐνών σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

ΛΑΘΗ ΣΤΑ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Καθώς η ομοιότητα ανάμεσα στο στόχο και στο εκμαγείο μειώνεται, τα λάθη στο μοντέλο αυξάνονται^[38,39]. Τα λάθη στα συγκριτικά μοντέλα μπορούν να διαιρεθούν σε πέντε κατηγορίες.

• Λάθη στο πακετάρισμα των παράπλευρων αλυσίδων (side-chain packing errors). Καθώς οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες είναι διαφορετικές, το πακετάρισμα των παράπλευρων αλυσίδων των καταλοίπων του πρωτεϊνικού σκελετού αλλάζει. Ακόμη και αν υπάρχουν πανομοιότυπες παράπλευρες αλυσίδες η διαμόρφωση δεν είναι η ίδια, γεγονός που αποτελεί μειονέκτημα για πολλές μεθόδους ομόλογης μοντελοποίησης. Τα λάθη στις παράπλευρες αλυσίδες είναι κρίσιμα αν συμβαίνουν σε περιοχές που εμπλέκονται στη λειτουργία των πρωτεϊνών, όπως ενεργά κέντρα και περιοχές πρόσδεσης υποκαταστατών.

Λάθη λόγω παραμορφώσεων και αλλαγών στον άκαμπτο-σκελετό σε σωστά ομολογοποιημένες περιοχές. Σαν συνέπεια των αλλαγών στην αλληλουχία, η διαμόρφωση του κύριου σκελετού αλλάζει, ακόμη και αν η συνολική αναδίπλωση παραμένει η ίδια. Επιπλέον, είναι πιθανό ότι σε μερικά σωστά ομολογοποιημένα τμήματα ενός μοντέλου, το εκμαγείο να διαφέρει τοπικά από το στόχο, οδηγώντας σε λάθη στην περιοχή αυτή. Οι δομικές διαφορές μερικές φορές δεν οφείλονται σε διαφορές στην αλληλουχία, αλλά είναι συνέπεια της τεχνικής που χρησιμοποιείται εκάστοτε για τον προσδιορισμό της δομής ή οφείλονται στον προσδιορισμό της δομής σε διαφορετικά περιβάλλοντα (πακετάρισμα κρυστάλλου (crystal packing), διαλύτης, υποκαταστάτες). Η ταυτόχρονη χρήση πολλών εκμαγείων μπορεί να ελαχιστοποιήσει ένα τέτοιο λάθος.

Λάθη λόγω παραμορφώσεων και αλλαγών στον άκαμπτο-σκελετό από την παρεμβολή αμινοξέων. Αν πρόκειται για λιγότερα από 9 αμινοξέα τότε μερικές μέθοδοι μπορούν σωστά να προβλέψουν τη διαμόρφωση του πεπτιδικού σκελετού.
 Οι συνθήκες για επιτυχή πρόβλεψη είναι η σωστή ομολογία και ένα ακριβές περιβάλλον μοντελοποίησης.

 Λάθη κατά την ομολογία. Το μεγαλύτερο ποσοστό των λαθών που εμφανίζονται κατά την διαδικασία της συγκριτικής μοντελοποίησης οφείλεται σε ελλιπείς ομολογίες (misalignments), κυρίως όταν η αλληλουχία αναγνώρισης του

στόχου-εκμαγείου είναι μικρότερη από 30%. Τα λάθη αυτά μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με τη χρήση ενός μεγάλου αριθμού αλληλουχιών ώστε να επιτευχθεί μια πολλαπλή ομολογία, ακόμη και αν οι περισσότερες από αυτές τις αλληλουχίες δεν έχουν δομές.

Λάθη που προκύπτουν όταν σαν εκμαγεία χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες που εμφανίζουν λιγότερο από 25% ομοιότητα στην αλληλουχία σε σχέση με την πρωτεΐνη-στόχο. Η διάκριση ανάμεσα σε ένα μοντέλο που βασίζεται σε ένα λανθασμένο εκμαγείο και σε ένα μοντέλο που βασίζεται σε μια λανθασμένη ομολογία με το σωστό εκμαγείο είναι δύσκολη. Και στις δυο περιπτώσεις, οι μέθοδοι εκτίμησης προβλέπουν ένα μη αξιόπιστο μοντέλο.

Παρόλο που η τεχνική της ομόλογης μοντελοποίησης χρειάζεται βελτιώσεις, ωστόσο αποτελεί μια ώριμη τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιλύσει πολλά πρακτικά προβλήματα. Ο αυξανόμενος ρυθμός επίλυσης των πρωτεϊνικών δομών με κρυσταλλογραφικές τεχνικές και φασματοσκοπικές τεχνικές NMR έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή βελτίωση και χρήση της ομόλογης μοντελοποίησης για την κατανόηση και τον έλεγχο διαδικασιών που εμπλέκονται σε βιολογικές λειτουργίες.


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Sanchez R., Sali A., 'Advances in comparative protein-structure modelling', Curr. Opin. Struct. Biol., 1997, 7, 206-214.
- Berman H.M., WestBrook J., Feng Z., Gilliland G., Bham T.N., Weissig H., Shindyalon I.N., Bourne P.E., 'The Protein Data Bank', Nucleic Acids Research, 2000, 28(1), 235-242.
- 3. Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C., 'SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures', JMB, 1995, 247, 536-540.
- 4. Holm L., Sander C., 'Mapping the protein universe', Science, 1996, 273(5275), 595-603.
- Orengo C.A., Michie A.D., Jones S., Jones D.T., Swindells M.B., Thornton J.M., 'CATH: A hierarchic classification of protein domain structures', Structure, 1997, 5, 1093-1108.
- Godzik A.,' Fold recognition methods', In Structural Bioinformatics, 2003, 44, 525-546.
- 7. Pearson W.R., Lipman D.J., 'Improved Tools for Biological Sequence Comparison', PNAS, 1988, 85, 2444-2448.
- 8. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 'Basic Local Alignment Search Tool', JMB, 1990, 215, 403-410.
- Altschul S.F., Madden T.L., Scaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', Nucleic Acids Research, 1997, 25(17), 3389-3402.
- 10. Hillisch A., Pineda L. F., Hilgenfeld R., 'Utility of homology models in the drug discovery process', DDT, 2004, 9(15), 659-669.
- 11. Forster M.J., 'Molecular modelling in structural biology', Micron, 2002, 33, 365-384.
- Marti-Renom M.A., Yerkovich B., Sali A., 'Modeling Protein Structure from its Sequence', Lab of Molecular Biophysics, The Rockefeller University, USA, 2002, 1-43.Goldsmith-Fischman S., Honig B., 'Structural genomics: Computational methods for structure analysis', Protein Sci, 2003, 12, 1813-1821.
- 13. Blundell T.L., et al., 'Knowledge based protein modeling and design', Eur. J. Biochem., 1988, 172, 513-520.



- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.,' Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice', Nucleic Acids Research, 1994, 22, 4673-4680.
- 15. Havel T.F., Snow M.E., 'A new method for building protein conformations from sequence alignments with homologues of Known proteins', J. Mol. Biol., 1991, **217**, 1-7.
- 16. Guex N., Peitch M.C., 'SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling', Electrophoresis, 1997, 18, 2714-2723.
- 17. Guex N., Diemand A., Peitch M.C., 'Protein modelling for all', Trends in Biochemical Sciences, 1999, 24, 364-367.
- 18. Fiser A., Do R. K., Sali A., 'Modelling of loops in protein structures', Protein Sci, 2000, 9, 1753-1773.
- 19. Morikis D., Lambris J.D., 'Physical methods for structure, dynamics and binding in immunological research', Trends in Immunology, 2005, **12(25)**, 700-707.
- 20. Laskowski R.A., Mac Arthrur M.W., Moss D.S., Thorton J.M., 'Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures', J. Appl. Cryst., 1993, **26**, 283-291.
- 21. Laskowski R.A., Rullman J.A.C., MacArthrur M.W., Kaptein R., Thornton J.M., 'AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR', J. Biomol. NMR, 1996, 8(4), 477-486.
- 22. Ott K-H, Kwagh J-G, Stockton G.W., Sidorov V., Kakefuda G., 'Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase', J. Mol. Biol., 1996, 263, 359-368.
- Eyers P.A., van der IJssel P., Quinlan R.A., 'Use of a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38to validate the in vivo specificity of SB 203580', FEBS Lett., 1999, 451, 191-196.
- 24. Srinivasan N., et al., 'Structural interpretation of site-directed mutagenesis and specificity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 using comparative modelling', Protein Eng, 1999, **12(2)**, 119-127.
- 25. Hillisch A., Peters O., Kosemund D., Muller G., Walter A., Schneider B., Reddersen G., Elger W., Fritzemeier K.H., 'Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structurebased design', Mol. Endocrinol., 2004, **18**, 1599-1609.



- 26. Ghosh S. Liu X.P., Zheng Y., Uckun F.M., 'Rational design of potent and selective EGFR tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents', Curr. Cancer Drug Targets, 2001, 1, 129-140.
- 27. Vankayapalati H., Bearss D.J., Saldanha J.W., Munoz R.M., Rojanala S., Von Hoff D.D., Mahadevan D., 'Targeting aurora2 kinase in oncogenesis: A structural bioinformatics approach to target validation and rational drug design', Mol. Cancer Ther., 2003, 2, 283-294.
- 28. Becker O.M. et al. 'Modeling the 3D structure of GPRs: advances and application to drug discovery', Curr. Opin. Drug Disc. Devel., 2003, 6, 353-361.
- Modi S., Paine M.J., Sutcliffe M.J., Lian L-Y, Primrose W.U., Wolf C.R., Roberts GCK, 'A model for human cytochrome P₄₅₀ 2d6 based on homology modeling and NMR studies of substrate binding', Biochemistry, 1996, 35, 4540-4550.
- 30. Lim J-S et al., 'Selection of peptides that bind to the HLA-A2.1 molecule by molecular modelling', Mol. Immunol., 1996, 33(2), 221-230.
- 31. Weber P., et al., 'Molecular modeling of hen egg lysozyme HEL [52-61] peptide binding to I-A^k MHC class II molecule', Int Immunol, 1998, **10(12)**, 1753-1764.
- 32. Kolaskar A.S., Kulkarni-Kale U., 'Prediction of three dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus', Virology, 1999, 261(1), 31-42.
- Reeves D. C., Sayed M. F. R., Chau P-L, Price K. L., Lummis S. C. R., 'Prediction of the 5-HT3 Receptor Agonist-Binding Residues Using Homology Modeling', Biophys. J., 2003, 84, 2338-2344.
- 34. Chen S.W., Pellequer J-L, 'Identification of functionally important residues in proteins using comparative models', Curr. Med. Chem., 2004, 11, 595-605.
- 35. Chaitra M.G., Hariharaputran S., Chandra N.R., Shaila M.S., Nayak R., 'Defining putative T-cell epitopes from PE and PPE families of proteins of Mycobacterium tuberculosis with vaccine potential', Vaccine, 2005, 23(10), 1265-1272.
- 36. Vijayasri S., Agrawal S., 'Domain-based homology modeling and mapping of the conformational epitopes of envelope glycoprotein of west nile virus' J Mol Model, 2005, 11(3), 248-255.
- 37. Bajorath J., Sheriff S., 'Comparison of an antibody model with X-ray structure; the variable fragment of BR96', Proteins, 1996, 24, 152-157.



- 38. Zu-Kang F., Slppl M.J., 'Optimum superposition of protein structures: ambiguities and implications', Fold. Des., 1996, 1, 123-132.
- 39. Godzik A., 'The structural alignment between two proteins: is there a unique answer;' Protein Sci., 1996, 5, 1325-1338.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

<u>Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΕΠΙΤΟΠΟΙ-</u> <u>ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ</u>

-



ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι μέθοδοι πρόβλεψης της αντιγονικότητας μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- 1. πρόβλεψη του προφίλ αντιγονικότητας
- 2. πρόβλεψη των πρωτεοσωμικών περιοχών διάσπασης
- πρόβλεψη των MHC περιοχών πρόσδεσης
- 4. πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων

1. Πρόβλεψη του προφίλ αντιγονικότητας

Η ικανότητα πρόβλεψης των αντιγονικών περιοχών (ή αντιγογικών καθοριστών ή επιτόπων) σε μια πρωτεΐνη αποτελεί ένα σημαντικό θέμα για την ανάπτυξη και παραγωγή εμβολίων, τα οποία βασίζονται σε συνθετικά πεπτίδια, με σκοπό την αντιμετώπιση και θεραπεία πολλών παθήσεων. Οι αντιγονικές περιοχές μπορούν να ταξινομηθούν στις διαδοχικές (sequential) (δηλαδή εξαρτώνται από την αμινοξική αλληλουχία και όχι από την διαμόρφωση) και στις διαμορφωτικές (conformational). Χαρακτηρίζονται επιπλέον σαν συνεχείς (continuous) και μη συνεχείς (discontinuous), στις οποίες τα αμινοξικά κατάλοιπα του επιτόπου δεν είναι συνεχόμενα, αλλά έρχονται κοντά όταν αναδιπλώνεται το πρωτεϊνικό μόριο. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι περισσότερες περιοχές, αν όχι ολόκληρη η επιφάνεια μιας πρωτεϊνης, είναι εν δυνάμει αντιγονικές^[1-5].

Οι αντιγονικές περιοχές σε μια πρωτεΐνη μπορούν να προβλεφθούν είτε από την τρισδιάστατη είτε από πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η πρώτη προσέγγιση για την πρόβλεψη της αντιγονικότητας βασίστηκε στην επιλογή των αμινοξικών καταλοίπων, που βρίσκονταν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, με βάση την υδροφιλικότητά τους. Η στατιστική πιθανότητα ενός καταλοίπου να βρίσκεται εκτεθειμένο στην επιφάνεια της πρωτεΐνης εισήχθη ως παράμετρος. Αργότερα βρέθηκε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην αντιγονικότητα και την μερική ευκινησία της αντιγονικής περιοχής της πρωτεΐνης. Η συσχέτιση ανάμεσα στην ευκινησία και την έκθεση στην επιφάνεια δικαιολογείται αφού οι περιοχές της πρωτεΐνης που δεν είναι εκτεθειμένες τείνουν να είναι λιγότερο εύκαμπτες από εκείνες που εκτίθενται στην επιφάνεια⁽⁶⁻⁸⁾. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της προσβασιμότητας στην επιφάνεια απευθείας από την πρωτοταγή δομή, η πιθανότητα πρόβλεψης της ευκινησίας και ευκαμψίας, ο υπολογισμός των κρυσταλλογραφικών παραγόντων θερμοκρασίας και η πρόβλεψη της AIBAIC

73

υδροπαθητικότητας αποτελούν τη βάση για τον προσδιορισμό ενός εν δυνάμει αντιγονικού προφίλ μέσα σε μια πρωτείνική αλληλουχία^(9,10)

-

1.1 Περιορισμοί

Τα αντιγονικά προφίλ δεν παρέχουν σαφείς πληροφορίες για τον τύπο του επιτόπου, παρ' όλα αυτά μπορούν να μεκώσουν σε κάποιο βαθμό το πειραματικό κόστος.

Πίνακας Ι: Κατάλογος των διαθέσιμων προγραμμάτων για την πρόβλεψη της αντιγονικότητας.

Πρόγραμμα	Ηλεκτρονική διεύθυνση
EMBOSS	ftp://ftp.uk.embnet.org/pub/EMBOSS/
AntheProt ^[11-13]	http://antheprot-pbil.ibcp.fr/Documentation_antheprot.html
SciProtein	EMПOPIKO Available at: http://www.scivision.com/sciProtein.html
ProAnal ^[14]	ftp://ftp.nig.ac.jp/pub/dos/proanal/
EpiPlot 1.0 ^[15]	http://genamics.com/software/files/epiplot1.exe
GCG	EMITOPIKO Available from: http://www.accelrys.com/about/gcg.html
Protean ^(16,17)	EMITOPIKO Available from: http://www.dnastar.com/products/Protean.html
ProtScale ⁽¹⁸⁾ (Expasy)	http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl
JaMBW ⁽¹⁹⁾	http://www.EMBL-Heidelberg.DE/Ja
PrediTop ⁽²⁰⁾	



2. Πρόβλεψη των πρωτεοσωμικών περιοχών διάσπασης

Τα πρωτεϊνικά αντιγόνα μέσα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αποικοδομούνται σε μικρά πεπτίδια από εσωκυττάριες πρωτεάσες. Μερικά από τα πεπτίδια αυτά ικανοποιούν τις προυποθέσεις για να είναι Τ κυτταρικοί επίτοποι. Έτσι, μοτίβα που αναγνωρίζονται από πρωτεάσες μπορεί να αποτελέσουν πιθανούς υποψήφιους. Μέθοδοι για την πρόβλεψη πρωτεοσωμικών περιοχών διάσπασης (proteosomal cleavage regions) έχουν αναπτυχθεί και πρόσφατα έχουν δημοσιευτεί δυο νέοι αλγόριθμοι ^[21-24].

Πίνακας ΙΙ: Κατάλογος των διαθέσιμων προγραμμάτων για την πρόβλεψη των πρωτεοσωμικών περιοχών διάσπασης (proteosomal cleavage regions).

Πρόγραμμα	Ηλεκτρονική διεύθυνση
NetChop ^[21,22]	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/
PaProc ^[23,24]	http://paproc.de/

2.1 Περιορισμοί

- Λόγω του μεγάλου αριθμού των πρωτεολυτικών ενζύμων, μερικά εκ των οποίων δεν είναι γνωστά, είναι πιθανό κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των αντιγονικών πεπτιδίων να παραλειφθούν ορισμένα πεπτίδια.
- Οι αλγόριθμοι, που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη των περιοχών αναγνώρισης των πρωτεϊνών από πρωτεάσες, δεν λαμβάνουν υπόψη τη συσχέτιση ανάμεσα στη πρόσβαση στην επιφάνεια και την πιθανότητα τερματισμού.

3. Πρόβλεψη των ΜΗC-περιοχών πρόσδεσης

Μετά από μερική πρωτεόλυση μερικά από τα πεπτίδια προσδένονται στα MHC μόρια και μεταφέρονται στη κυτταρική επιφάνεια για αναγνώριση από τα αντιγονοειδικά Τ κύτταρα. Έτσι η πρόσδεση στο MHC είναι μια αρχική απαίτηση για ένα πεπτίδιο να είναι Τ κυτταρικός επίτοπος. Πολλοί αλγόριθμοι έχουν προταθεί για την πρόβλεψη των ΜΗC-πεπτιδίων πρόσδεσης. Αυτοί μπορεί να βασίζονται α) στη δομή, β) σε μοτίβα πρόσδεσης, γ) σε μήτρες (matrices), και δ) στα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (Artificial Neural Network, ANNs). Οι αλγόριθμοι που βασίζονται στη δομή χρησιμοποιούν διαμορφωτικές παραμέτρους για να προβλέψουν τις ΜΗC περιοχές πρόσδεσης ενός αντιγόνου. Αυτοί οι αλγόριθμοι απαιτούν ανώτερους μαθηματικούς υπολογισμούς με συνέπεια να μην έχουν ευρεία χρήση. Πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι αλγόριθμοι που βασίζονται στα μοτίβα πρόσδεσης, στις μήτρες και στα ANNs. Ένα μοτίβο προσδιορίζεται από την τοποθέτηση των συμβαλλόντων αμινοξικών καταλοίπων σε συγκεκριμένες θέσεις σε μια πεπτιδική αλληλουχία. Αυτοί οι αλγόριθμοι έχουν χαμηλή ακρίβεια πρόβλεψης καθώς το 60%-70% των προσδετών (binders) περιέχουν μοτίβα πρόσδεσης. Η μήτρα είναι ένα βελτιωμένο μοτίβο που καλύπτει όλα τα αμινοξέα του πεπτιδίου πρόσδεσης. Η ακρίβεια τους είναι καλύτερη από εκείνη των μοτίβων, αλλά μπορεί να χάσουν τους μη σχετιζόμενους προσδέτες. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας μήτρας αν προκύψουν νέα δεδομένα. Για να αντιμετωπισθούν οι περιορισμοί αυτοί εισήχθησαν τα ANNs, τα οποία χρησιμοποιούν πλέγματα (networks) για να διακρίνουν τους προσδέτες από τους μη-προσδέτες.

3.1 Περιορισμοί

- Αν και η πρόσδεση στο MHC είναι το πρώτο στάδιο για ένα Τ κυτταρικό επίτοπο, δεν είναι όλοι οι MHC-προσδέτες Τ επίτοποι.
- Στην περίπτωση του MHC-II μορίου, ο πεπτιδικός πυρήνας πρόσδεσης είναι κυρίως μη προσδιοριζόμενος εξαιτίας των ανοικτών άκρων της αύλακας του MHC που προσδένεται το αντιγονικό πεπτίδιο.
- Οι περισσότερες μέθοδοι πρόβλεψης είναι περιορισμένες για μία ομάδα αλλυλίων, έτσι τα προβλεπόμενα πεπτίδια μπορεί να μη προσδένονται σε όλο τον πληθυσμό οπότε να μην είναι ολικά αποτελεσματικά.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ: Κατάλογος των διαθέσιμων βάσεων δεδομένων και προγραμμάτων για την πρόβλεψη των πεπτιδίων που προσδένονται στα ΜΗC μόρια τάξης Ι και ΙΙ.

Πρόγραμμα	Ηλεκτρονική διεύθυνση
MHCPEP ^[25]	http://wehih.wehi.edu.au/mhcpep/
SYFPEITHI ^[26]	http://134.2.96.221/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm
BIMAS ^[27]	http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/
MAPPP ^[28]	http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/expertquery.html
MHCPred ^[29-31]	http://www.jenner.ac.uk/MHCPred
EpIPredict ^[32-35]	http://www.epipredict.de/index.html
TEPITOPE^[36-40]	http://mypage.ihost.com/usinet.hamme76/Vaccinome _TEPITOPET_cellepitopepredictionMHC _HLA_class_IIbioinformatics_tools414.html
ProPred ^[41]	http://www.imtech.res.in/raghava/propred
MultiPred ⁽⁴²⁻⁴⁵⁾	http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/
RANKPEP ^[46,47]	http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html

4. Πρόβλεψη Τ κυτταρικών επιτόπων

Τα Τ κύτταρα είναι οι μεσολαβητές κλειδιά των ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων εναντίον ασθενειών όπως αλλεργίες, μολυσματικές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα και καρκίνο. Ένα σημαντικό γεγονός στην Τ κυτταρική ενεργοποίηση είναι η παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων, που σχετίζονται με μια ασθένεια, μέσω του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στην επιφάνεια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (APC), για την αναγνώριση από τους Τ κυτταρικούς υποδοχείς (TCR). Το κρίσιμο βήμα στο σχεδιασμό εμβολίων είναι η ταυτοποίηση των Τ κυτταρικών επιτόπων σε ομάδες προϊόντων ασθενο-ειδικών γονιδίων. Οι πειραματικές προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση των Τ κυτταρικών επιτόπων μέσα σε αυτά τα αντιγόνα, όπως η σύνθεση και ο προσδιορισμός αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων από την πρωτεΐνη-αντιγόνο, δεν είναι εφαρμόσιμες για μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Παρόλα αυτά, υπολογιστικά μοντέλα ικανά να προσομοιώσουν και να προβλέψουν τη βιολογική διαδικασία της παρουσίασης του αντιγόνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελαχιστοποιήσουν τον αριθμό των πειραμάτων, επιτρέποντας τη συστηματική ανίχνευση για υποψήφιους Τ κυτταρικούς επιτόπους.

Πολλές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί για την πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων κυρίως λόγω της αυξημένης δομικής και λειτουργικής πληροφορίας που είναι διαθέσιμη την τελευταία δεκαετία, αντανακλώντας τα χαρακτηριστικά τόσο για τα MHC μόρια τάξης Ι όσο και για τα MHC μόρια τάξης ΙΙ^[48]. Οι μέθοδοι πρόβλεψης Τ κυτταρικών επιτόπων περιλαμβάνουν τα μοτίβα πρόσδεσης, τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (ANNs), τις ποσοτικές μήτρες (quantitative matrices). τις φαινομενικές μήτρες (virtual matrices), τα μοντέλα HMM (Hidden Markov Models) και την μοριακή μοντελοποίηση.

Πιο συγκεκριμένα, τα μοτίβα πρόσδεσης περιγράφουν γενικά μοτίβα-θέσης επαναλαμβανόμενων αμινοξέων, που συνήθως βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα σε πεπτίδια τα οποία προσδένονται στα MHC μόρια^[49-52]. Τα μοτίβα αυτά επιδεικνύουν ποιες θέσεις και ποια αμινοξέα είναι σημαντικά για την πρόσδεση και περιλαμβάνουν ή όχι αλγορίθμους με πολύ υψηλά αρνητικά σφάλματα (high false negative rates).

Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (ANNs) είναι αυτο-ασκούμενα συστήματα (selftraining) ικανά να εξάγουν και να διατηρήσουν μοτίβα με βάση τα υποβληθέντα δεδομένα^[53]. Τα ANNs παρέχουν αυτόματη βελτιστοποίηση καθώς νέες ομάδες δεδομένων είναι συνεχώς διαθέσιμες. Τα μοντέλα που βασίζονται στα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικά για την πρόβλεψη HLA-I και HLA-II υποκαταστατών, αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των δεδομένων (και δεν είναι διαθέσιμα για τα περισσότερα HLA αλλύλια) που πρέπει να εισαχθούν. Επιπλέον, τα δεδομένα για ένα αλλύλιο δεν μπορούν να γενικευθούν και για άλλα αλλύλια.

Οι ποσοτικές μήτρες παρέχουν πολύ λεπτομερή μοντέλα, στα οποία η συνεισφορά στην πρόσδεση καθενός αμινοξέος σε κάθε θέση μέσα στον πυρήνα πρόσδεσης ενός πεπτιδίου ποσοτικοποιείται^[54]. Οι τιμές που αντιστοιχούν στα αμινοξέα ανάλογα με τη θέση τους μέσα στον πεπτιδικό πυρήνα αντανακλούν τις

δομικές ιδιότητες των HLA αλλυλίων και αποτελούν ένα είδος 'αποτυπώματος' των HLA περιοχών πρόσδεσης. Τα συστήματα πρόβλεψης που βασίζονται στις ποσοτικές μήτρες είναι γραμμικά μοντέλα, εφαρμόζονται εύκολα και καταλήγουν σε ένα σκορ-πρόσδεσης για κάθε εξεταζόμενο πεπτίδιο. Η ακρίβεια της πρόβλεψης είναι σημαντική, αλλά εμφανίζουν μικρότερη ικανότητα να αποκωδικοποιήσουν μη γραμμικές περιοχές.

Οι φαινομενικές μήτρες, όπως οι ποσοτικές μήτρες, παρέχουν ένα λεπτομερές μοντέλο στο οποίο η συνεισφορά στη πρόσδεση καθενός αμινοξέος (υποκαταστάτη) με κάθε τσέπη/θέση (άνοιγμα πρόσδεσης) μέσα στο HLA ποσοτικοποιείται^[55]. Παρόλα αυτά, ενώ οι ποσοτικές μήτρες προσδιορίζονται ξεχωριστά για κάθε HLA αλλύλιο, οι φαινομενικές μήτρες σχηματίζονται καθορίζοντας και συνδυάζοντας τις ποσοτικές τιμές πρόσδεσης των αμινοξέων ανάλογα με τη θέση τους μέσα στον πεπτιδικό πυρήνα, που προέρχονται από ένα HLA αλλύλιο σε άλλα ΗLΑ αλλύλια μέσω της σύγκρισης των ΗLΑ αλληλουχιών. Το πλεονέκτημα των φαινομενικών μητρών έναντι των ποσοτικών είναι ότι οι φαινομενικές μήτρες αντιμετωπίζουν το πρόβλημα του HLA πολυμορφισμού και επιτρέπουν τη συστηματική πρόβλεψη πεπτιδικών υποκαταστατών για ένα ευρύ φάσμα της HLA εξειδίκευσης πρόσδεσης. Η πρόβλεψη υποκαταστατών θεωρείται ότι είναι προαπαιτούμενη για τις περισσότερες στρατηγικές πρόβλεψης ανάπτυξης εμβολίων. Τα μοντέλα πρόβλεψης που βασίζονται στις φαινομενικές μήτρες έχουν καταστεί έγκυρα για τη μελέτη των ΗΔΑ-ΙΙ μορίων και έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για την πρόβλεψη Τ κυτταρικών επιτόπων στο πεδίο της ογκολογίας, των αλλεργιών και των αυτοάνοσων παθήσεων. Το μοναδικό πρόγραμμα που χρησιμοποιεί τις φαινομενικές μήτρες μέχρι τώρα είναι το ΤΕΡΙΤΟΡΕ.

Τα Hidden Markov μοντέλα (HMMs) είναι στατιστικά μοντέλα που μπορούν να 'συλλάβουν' τις σχέσεις συμπλόκου HLA-επιτόπου σε ομάδες δεδομένων^[56,57]. Ένα HMM είναι μια μηχανή πεπερασμένης κατάστασης που κατευθύνει τη μετάβαση μιας διαδικασίας του συστήματος ανάμεσα στις καταστάσεις χρησιμοποιώντας κατανομές πιθανότητας. Μπορούν να μοντελοποιήσουν ομάδες αλληλουχιών ποικίλου μήκους και να καταστούν έτσι ικανά για την μοντελοποίηση βιολογικών αλληλουχιών. Τα HMMs έχουν αναφερθεί ως η μέθοδος υψηλής ακρίβειας προσδιορισμού πεπτιδίων που προσδένονται στα MHC μόρια. Επιπλέον, τα HMMs εμφανίζουν παρόμοια αξιοπιστία με τα ANNs, απαιτούν μεγαλύτερο πληθυσμό δεδομένων και το κύριο πλεονέκτημά τους είναι ότι δεν απαιτείται να ελεγχθεί η ομολογία των πεπτιδίων πριν την πρόβλεψη.

Η μοριακή μοντελοποίηση χρησιμοποιεί τη λεπτομερή γνώση που παρέχει η κρυσταλλική δομή των MHC μορίων και των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-

79

πεπτιδίου^[58,59]. Η ομόλογη (homology) ή συγκριτική (comparative) μοντελοποίηση χρησιμοποιείται, αν είναι γνωστή η κρυσταλλική δομή και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-πεπτιδίου, για την κατασκευή μιας 3D-δομής μια πρωτεΐνης, της οποίας η δομή δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά. Η ομόλογη μοντελοποίηση ουσιαστικά αποτελεί συμπληρωματική μέθοδο άλλων προσεγγίσεων και παρέχει μια εικόνα της θεωρητικής 3D-δομής της πρωτεΐνης και των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνηςπεπτιδίου. Παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι μια υπολογιστικά απαιτητική μέθοδος εφαρμόζεται εκτενώς για τον προσδιορισμό των Τ κυτταρικών επιτόπων.

4.1 Η ιδέα των ΗLA-ΙΙ μητρών

Τα HLA-II μόρια είναι πολυμορφικά. Αυτό δημιουργεί σε υψηλό βαθμό δομική ποικιλομορφία που επηρεάζει την HLA-II εξειδίκευση πρόσδεσης. Πρόσφατα εκτεταμένες δομικές και λειτουργικές μελέτες βελτίωσαν την κατανόηση της αλληλεπίδρασης HLA-πεπτιδίου και οδήγησαν στον καθορισμό ορισμένων κανόνων.

- Το πεπτίδιο που αλληλεπιδρά με την ΗLΑ-αύλακα έχει μήκος 9 αμινοξέων και μπορεί να φέρει διαφορετικά είδη αμινοξέων στις διάφορες θέσεις του 9μερούς κεντρικού τμήματος.
- 2. Οι θέσεις του πεπτιδίου που αλληλεπιδρούν με το HLA-II καλούνται θέσεις 'άγκυρες' (anchor positions).
- 3. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εντοπίζονται στην αύλακα πρόσδεσης και συνεισφέρουν στο σχηματισμό των τσεπών πρόσδεσης (binding pockets) είναι συχνά διαφορετικά για τα διάφορα HLA αλλύλια. Αυτό έχει ως συνέπεια οι τσέπες πρόσδεσης να έχουν διαφορετικό μέγεθος και χημικά χαρακτηριστικά για διαφορετικά αλλύλια. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του πεπτιδικού υποκαταστάτη που αυξάνουν την ικανότητα και την εξειδίκευση πρόσδεσης καλούνται 'άγκυρες' (anchor residues), ενώ τα κατάλοιπα που μπορούν να επεμβαίνουν στην αρχιτεκτονική της τσέπης και να μειώνουν την πρόσδεση και καλούνται 'αναστολείς' (inhibitory residues).
- 4. Η επίδραση των 'anchor residues' είναι ΗLΑ-ειδική και εξαρτάται περισσότερο από τη σχετική τους θέση μέσα στο πεπτιδικό πλαίσιο πρόσδεσης, παρά από τα γειτονικά κατάλοιπα, οδηγώντας έτσι στην υπόθεση ότι κάθε αμινοξύ λειτουργεί ανεξάρτητα και επηρεάζει την συνολική ικανότητα πρόσδεσης του πεπτιδίου.
- 5. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν μια αξιοσημείωτη ποικιλομορφία όσον αφορά τις πεπτιδικές αλληλουχίες των υποκαταστατών.

Το συμπέρασμα αυτών των παρατηρήσεων είναι ότι αφού καθοριστεί το προφίλ τσέπης in vitro, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα HLA-DR αλλύλια αρκεί τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν σε κάθε τσέπη να είναι ίδια. Τα προφίλ για όμοιες τσέπες επιλέγονται από μια ομάδα (pool) και δεν προσδιορίζονται για κάθε αλλύλιο χωριστά. Έτσι, ένας σχετικά μικρός αριθμός προφίλ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός μεγάλου αριθμού HLA-DR μητρών, που καλούνται 'φαινομενικές μήτρες'. Εκτεταμένη πειραματική εργασία επέτρεψε τον προσδιορισμό των προφίλ τσέπης για δεκάδες διαφορετικές πολυμορφικές τσέπες που συνδυάστηκαν περαιτέρω ώστε να κατασκευαστούν >50 HLA-DR μήτρες. Από αυτές τις μήτρες 25 αποτελούν τη βάση του προγράμματος πρόβλεψης επιτόπων TEPITOPE^[60].

Μερικά από τα προγράμματα που διατίθεται στο δίκτυο για την απευθείας πρόβλεψη Τ κυτταρικών επιτόπων φαίνονται στον Πίνακα IV.

ΠΙΝΑΚΑΣ	IV:	Κατάλογος	των	διαθέσιμων	προγραμμάτων	για	την	πρόβλεψη	των	T
κυτταρικών	επιτ	όπων.								

Πρόγραμμα	Ηλεκτρονική διεύθυνση
EpiPlot 1.0 ⁽¹⁵⁾	http://genamics.com/software/files/epiplot1.exe
EpiMer/Optimer ^{i61]}	http://www.brown.edu/Research/TB-
	HIV_Lab/epimatrix/TIGR/epimer1.htm
АМРНI ⁽⁶²⁾	Margalit et al., 1987
SOHHA ^[63,64]	Reyes et al., 1991
TEPITOPE ^[36-40,60]	http://mypage.ihost.com/usinet.hamme76/Vaccin omeTEPITOPET_cellepitope _predictionMHCHLA_class_II _bioinformatics_tools414.html
MultiPred ^[42-45]	http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/
MHCPred ^[29-31]	http://www.jenner.ac.uk/MHCPred



ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΕΡΙΤΟΡΕ

1. Αλγόριθμοι και παράμετροι του προγράμματος ΤΕΡΙΤΟΡΕ

Το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ χρησιμοποιεί δεδομένα από φαινομενικές μήτρες σε ένα νραμμικό μοντέλο πρόβλεψης, το οποίο δε λαμβάνει καθόλου υπόψη τη διαμόρφωση του πεπτιδίου. Οι παράμετροι που περιγράφουν την πρόσδεση του πεπτιδίου είναι το πεπτιδικό πλαίσιο (peptide frame: PF), η επίδραση των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων κατά την πρόσδεση (peptide side chain effect: PS) και το μήκος του πεπτιδίου (peptide length: PL). Η βασική ανάλυση που γίνεται στο ΤΕΡΙΤΟΡΕ περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα. Αρχικά, όλα τα πιθανά PFs εξάγονται από την πρωτεϊνική αλληλουχία εισαγωγής. Στη συνέχεια, οι PS τιμές, που προέρχονται από τις φαινομενικές μήτρες και εξαρτώνται από τη θέση και την παράπλευρη αλυσίδα του αμινοξέος, κατανέμονται σε κάθε αμινοξύ μέσα στο πεπτιδικό πλαίσιο. Τέλος, οι γραμμικοί συνδυασμοί για όλες τις PS τιμές για κάθε PF καταλήγουν σε μια αριθμητική τιμή, το συνολικό πεπτιδικό σκορ (peptide score: PSC). Το υπολογιζόμενο PSC έχει φανεί ότι σχετίζεται με την ικανότητα των HLA-DR υποκαταστατών, αποτελώντας ένα μέτρο για την πιθανότητα ενός πεπτιδίου με συγκεκριμένο PF να προσδεθεί σε ένα HLA-II μόριο. Καμία από τις παραμέτρους αυτές δεν εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή όταν εκτελείται το πρόγραμμα. Παρόλα αυτά, η βασική κατανόηση αυτών των παραμέτρων βελτιώνει τη μετάφραση των αποτελεσμάτων πρόβλεψης.

• Το PF είναι μια μεταβλητή που χαρακτηρίζει το κεντρικό 9-μερες τμήμα μιας πεπτιδικής αλληλουχίας. Κάθε PF μέσα σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία αρχίζει κατά κανόνα από τα αμινοξέα που έχουν μια υδρόφοβη παράπλευρη αλυσίδα (π.χ. αλειφατικά ή αρωματικά), διότι αυτό είναι η αναγκαία απαίτηση για τη σχετική θέση 1 (P1) ενός HLA-DR πεπτιδίου πρόσδεσης. Μια πρωτεϊνική αλληλουχία μήκους > 9 αμινοξέων μπορεί να περιέχει πολλαπλά αλληλοεπικαλυπτόμενα PFs. Για απλοποίηση, το TEPITOPE αρχικά θεωρεί μόνο ένα PF τη φορά και ολοκληρώνει τα αποτελέσματα των πολλαπλών PF μέσω μιας ορατής στο χρήστη διεπιφάνειας (interface). Έτσι, προβλέπεται η ικανότητα ενός πεπτιδικό πλαισίου να προσδεθεί σε HLA-II μόρια περισσότερο από ότι όλη η πεπτιδική αλληλουχία.

 Το PL επηρεάζει την πρόσδεση ενός HLA-II υποκαταστάτη, όπως έχει φανεί από μελέτες περικοπής πεπτιδίων (peptide truncation studies) in vitro. Αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν ότι το PL θα μπορούσε να παραλειφθεί από ένα μοντέλο πρόβλεψης, όταν το κεντρικό 9-μερες πεπτιδικό τμήμα της πεπτιδικής αλληλουχίας πλαισιώνεται από τουλάχιστον δυο αμινοξέα σε κάθε πλευρά.



Οι PS τιμές προέρχονται από τις αντίστοιχες φαινομενικές μήτρες και ορίζονται με βάση το γράμμα και τη θέση μέσα στο PF. Αυτά είναι σχετικά δεδομένα πρόσδεσης, τα οποία για παράδειγμα υπολογίστηκαν κανονικοποιώντας (normalizing) τα πειραματικά IC₅₀ δεδομένα με τιμές IC₅₀ που προέκυψαν για την αλανίνη στην ίδια πεπτιδική θέση. Τα δεδομένα αυτά εκφράζονται ως ο λογάριθμος των δεδομένων της αλανίνης που κανονικοποιήθηκε (normalized). Συνεπώς, ο γραμμικός συνδυασμός των PS τιμών για τον υπολογισμό του PSC είναι η πρόσθεση των PS τιμών.

Μια παράμετρος που χρειάζεται να επιλεχθεί από το χρήστη είναι το % 'κατώφλιο' (threshold). Για παράδειγμα, μία τιμή κατωφλίου 1% προβλέπει πεπτίδια σε οποιαδήποτε πρωτεϊνική αλληλουχία που ανήκουν στο 1% των καλύτερων βαθμολογικά φυσικών πεπτιδίων. Έτσι, η τιμή του κατωφλίου είναι ένας επιπλέον δείκτης για την πιθανότητα τα προβλεπόμενα πεπτίδια να είναι ικανά να προσδεθούν σε ένα HLA μόριο. Το % κατώφλιο (threshold) επιτρέπει στο χρήστη να επιλέξει διαφορετικά επίπεδα 'αυστηρότητας', ώστε να ρυθμίσει τα αποτελέσματα πρόβλεψης, για παράδειγμα ένα μικρότερο κατώφλι αποκρίνεται σε πρόβλεψη υψηλής αυστηρότητας. Εν συντομία, για την ίδια πρωτεϊνική αλληλουχία τιμή κατωφλίου 1% θα προβλέψει χαμηλότερο αριθμό πεπτιδικών αλληλουχιών και για μικρότερο αριθμό HLA-II αλλυλίων, συγκρινόμενο με τιμή κατωφλίου 2%. Φυσιολογικά, τουλάχιστον για την πρώτη πρόβλεψη, τιμές κατωφλίου υψηλότερες από 3% δεν είναι επιθυμητές αφού η αναλογία των ψευδώς θετικών μπορεί να αυξήσει το μέγεθος του προβλεπόμενου πλήθους σε ένα ποσό μη αποδεκτό για πειραματικό έλεγχο.

Το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ^[60] διαθέτει 25 HLA-DR μήτρες, οι οποίες αποτελούν τη βάση του προγράμματος για την πρόβλεψη επιτόπων (Εικ.1).

TEPITOPE - MHC Clas	s II Allele Selection		X
X DR51+0101	[DRB1+0701	(DRB1+1305	, i
A DRB1+0102	[DRB1+0801	[DRB1+1307	
M DRB1+0301	C DRB1+0802	🗖 DRB1+1311	
R DRB1+0401	[" DRH1+0004	[" DRB1+1321	
D DRB1+0402	[DRB1+0806	C DRB1+1501	
F DRB1+0404	T DRB141101	C DRB1+1502	
C DR01+0405	T DRB1+1104	(" DR85+0101	2 - 4
Г рин1+0410	[" DRB1+1106		Hintit
DRB1+0421	[DR81+1107		a a a a a a a a a a a a a a a a a a a
BELECT NONE	ECT ALL	SAVE / CLOSE	

Εικόνα 1: Διαθέσιμες HLA-ΙΙ μήτρες στο πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ.



TEPITOPE 2000 - bota	
File Import Mode Run Report View Help	5. M.
MAENGDNEKM AALEAKICHQ IEYYFGDFNL PRDKFLKEQI KLDEGWVPLE	50
IMIKFNRINR LTTDFNVIVE ALSKSKAELM EISEDKTKIR RSPSKPLPEV	100
TDEYKNDVKN RSVYIKGFPT DATLDDIKEW LEDKGQVLNI QMRRTLHKAF	150
KGSIFUVFDS IESAKKFVET PGQKYKETDL LILFKDDYFA KKNEERKQNK	200
VEAKLRAKQE QEAKQKLEED AEMKSLEEKI GCLLKFSGDL DDQTCREDLH	250
ILF3NHGEIK WIDFVRGAKE GIILFKEKAK EALGKAKDAN NGNLQLRNKE	300
VTWEVLEGEV EKEALKKIIE DQQESLNKWK SKGRRFKGKG KGNKAAQPGS	350
GKGKVQFQGK KTKFASDDEH DEHDENGATG PVKRAREETD KEEPASKQQK	400
TENGAGDQ	

Porte well- www.woreform.seconde worders ?!

З.

🚧 TEPITOPE 2000 - beta	
File Import Mode Run Report View Help	
	100 -
16 · 10x · I residue · 13 选图 画图 经经济	
1	60
TRILITUINI MAENGONERMAADRAKICHOIRYTEGDENDERFERDIKEOIKINEGOVEDE IMTKE	NRLNELTISN
DRB1*0102 MAEIADDERMALEAKICHQIEYYPSDFALFRDRFLKEQIKLDEGWYFLEIMIKF	NELULTIDEN
DRB1+0301 MAELGOMERMAREAKIC FOLEVYFOLEMIERDNFLEFOLNINDEGMVPLEIMTRF	NPLINEL TTPEN IS
DRB140401 MAEMGDAEIMAALEARICHOIEW WFGDFNLPR DRFLKEQIKLDEGWVPLEIMIKF	NELNRETILENT
OPE110402 MAENGONERMAADEARICHQIEYYFGDENDERDARLKEQIKLDEGWYFDE HHKF	NRLNPLTIDE
DRE 170404 MAENGONEFMAADEAETCEDLEYYEGDEW.PROKELKEDIKLDEGWYELFIMIKE	NRINFLITTEN
	· ()。会理的
Dease vist www.vacchone.com.log.poeres.com.log.poeres.com.log.com.l	

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου παρουσίασης των αποτελεσμάτων του προγράμματος. (Α) Τοποθετείται στο ειδικό πλαίσιο του TEPITOPE η προς σάρωση αλληλουχία και επιλέγονται η % τιμή του κατωφλίου (1%) και τα HLA-DR αλλύλια, με βάση τα οποία θα γίνει η πρόβλεψη. (Β) Μετά τη σάρωση της αλληλουχίας, διακρίνονται τα προβλεπόμενα πεπτιδικά πλαίσια για κάθε HLA-DR αλλύλιο (με μπλε γράμματα) και το αμινοξικό κατάλοιπο που βρίσκεται στη θέση P1 του 9-μερους πεπτιδίου (με κόκκινο γράμμα).



A

Qualitative Analysis of 'MIKFNRLNR'

Quant i tat ive	Analysis	ad	' DAINFERLERLTTD'
America concrea	Second of the		The second secon

Threshold (4):		DRB1*0101 DRB1*0102	A			т		Ŧ	
550140101		DRB1+0101 DRB1+0102	A	•		т		т	
BEB 140101		DRB1+0102				_		-	
DIST-OTOT			A			I	•	1.	•
DFB1+0102	······································	DRB1+0301	A		T	A			
DFB1+0301	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	D081+0401	Ä		_	Ť		Ť	
959 1+0401		DUR140402	-		•	÷	÷	÷	
9FE 1º 0 402		DIG1-0102		•		÷	~	÷	
DFB 1+0404	100000X	DIGT-0404	÷	•	<u>.</u>	:는.			·
DRB1+0405		DHB1*0403	A	•		· <u> </u>	•	1	
DE01+0410		DRB1*0410	A	•	A	I	•	I	
DR81+0421		DR81+0421	A	. •	•	I	•	٠	
DBR 1+0701	Transa and the second sec	DFB1+0701	X -		· •	Ι	A		• • •
DDR1+0A01		DRB1+0801	A		•	A	•	Ι	•
DER140.802		DRB1+0802	A			A		Ι	
BBB1+0804		DRB1+0804	A	1		A		I	
DEB1+0606		DRB1*0806	• A	-		A		Ī	
DEB141101		BUR1+1101					Å	Ŧ	
		DDR1+1104		•	•	-	.	Ŧ	
		DRD1-1102	~	•	•.	- T	-	÷	· · · .
PHE 1=1106		DK01*1106	· ·	•	<u>.</u>			÷.	
DHB1*1107		DK81*1107	.	•	Τ.		:		
DFE 1=1305		DFB1*1305	A	•	•	A	A	٠	
DFD1+1307	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	DRB1+1307	A	•	•	A	•	I	
DPB1+1311	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	DRB1*1311	A	· •	•	A	A	I	
DFB1+1321		DRB1+1321	A			A	A	· I	
DDB1+1501		DRB1+1501	Ā		A	A	A	I	
DDB1*1502		DRB1*1502	Ā		Ā	Ā	Ā	Ī	
DR8 5+0101	XXXXXXXXXXXXXXXX	D28540101				т		Ā	
		PLOG. OTOT	-	•	•	-	•	-	

Εικόνα 3: Φόρμες του προγράμματος ΤΕΡΙΤΟΡΕ που αντιστοιχούν στην ποσοτική και ποιοτική ανάλυση ενός προβλεπόμενου πεπτιδίου. (Α) Η φόρμα για την ποσοτική ανάλυση (quantitative analysis) δείχνει τα επίπεδα του κατωφλίου, με τιμές από 1% έως 10%, στα οποία το πεπτίδιο θα προβλεπόταν για καθένα από τα HLA-DR αλλύλια της μήτρας. Οι Χ μπάρες επιδεικνύουν τα επίπεδα του κατωφλίου. (Β) Η φόρμα για την ποιοτική ανάλυση (qualitative analysis) του 9-μερούς πεπτιδίου, το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο 14-μερες πεπτίδιο της ποσοτικής ανάλυσης (το αμινοξικό κατάλοιπο που βρίσκεται στη θέση P1 είναι η Met), δείχνει όλα τα 'anchor' (Α) και τα 'inhibitory' (Ι) αμινοξικά κατάλοιπα σε κάθε θέση μέσα στο πεπτιδικό πλαίσιο για κάθε HLA-DR αλλύλιο.

2. Εφαρμογές του ΤΕΡΙΤΟΡΕ

Ο προσδιορισμός των Τ κυτταρικών επιτόπων είναι σημαντικός για την αντιμετώπιση ασθενειών, όπως οι αλλεργίες, οι μολυσματικές ασθένειες, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ο καρκίνος, καθώς και για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων. Πειραματικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό των Τ κυτταρικών επιτόπων, που μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν την σύνθεση ενός μεγάλου αριθμού πεπτιδικών αλληλουχιών, δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν λόγω του μεγάλου αριθμού των πρωτείνικών αλληλουχιών και της πολυμορφίας των HLA μορίων. Τα υπολογιστικά μοντέλα μπορούν να προβλέψουν τη βιολογική διαδικασία της παρουσίασης του αντιγόνου και να χρησιμοποιηθούν για τη συστηματική ανίχνευση των Τ κυτταρικών επιτόπων, ελαχιστοποιώντας τον αριθμό των πειραμάτων. Το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ αποτελεί ένα τέτοιο υπολογιστικό μοντέλο πρόβλεψης Τ κυτταρικών επιτόπων και βρίσκει σήμερα πολλές εφαρμογές.

Ο Schroers και συν. χρησιμοποίησαν το TEPITOPE για τον προσδιορισμό των HLA-DR7 επιτόπων από την αντίστροφη τρανσκιπτάση της ανθρώπινης τελομεράσης (human telomerase reverse transcriptase, hTRT)^[65]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα CD4+ T κύτταρα ειδικά για τους HLA-DR7 επιτόπους αναγνώρισαν τους επιτόπους της hTRT που προβλέφθηκαν με το πρόγραμμα TEPITOPE.

Με αφορμή τη σημασία της ενεργοποίησης των Τ κυττάρων βοηθών στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, το TEPITOPE χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πεπτιδίων του RAGE-1, τα οποία προσδένονται πιθανά στα HLA-DR μόρια με σκοπό την επαγωγή μιας ανοσολογικής απόκρισης. Τα υπολογιστικά προβλεπόμενα πεπτίδια του RAGE-1 μπορούν να μελετηθούν in vitro οδηγώντας πιθανά σε μία RAGE-1 βασισμένη μέθοδο ανοσοθεραπείας^[66].

Η Ag γλυκοπρωτεΐνη 100 που σχετίζεται με το μελάνωμα αναλύθηκε με το πρόγραμμα TEPITOPE και προέκυψαν επτά υποψήφιοι Τ κυτταρικοί επίτοποι. Ο εμβολιασμός με πεπτίδια που προσδένονται σε MHC μόρια τάξης ΙΙ γίνεται ένα σημαντικό εργαλείο για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου^[67].

Το πρόγραμμα TEPITOPE χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό αλληλουχιών από το MAGE-3, οι οποίες εμφάνιζαν χαρακτηριστικά πρόσδεσης στα HLA-DR μόρια^[68]. Το MAGE-3 είναι ένα ογκο-ειδικό αντιγόνο που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εκφράζεται σε υψηλή αναλογία σε μελανώματα και άλλους ιστότυπους όγκων (καρκίνωμα της κύστης και του πνεύμονα) και όχι σε φυσιολογικούς ιστούς. Τα CD8⁺ CTLs από ασθενείς με μελάνωμα αναγνωρίζουν MAGE-3 επιτόπους που προσδένονται σε HLA τάξης Ι, επιπλέον το αντιγόνο MAGE-3 είναι μια εξαιρετική υποψήφια πρωτεΐνη για τη μελέτη της αντικαρκινικής CD4⁺ T κυτταρικής απόκρισης. Ο χαρακτηρισμός των CD4⁺ T κυτταρικών επιτόπων θα μπορούσε να βελτιώσει τη δύναμη των πρωτοκόλλων ανοσοποίησης που βασίζονται σε πεπτίδια, σε ασθενείς με νεοπλασίες.

Αν και η ατοπική αλλεργία επηρεάζει λιγότερο από το 20% του συνολικού πληθυσμού, το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των υποψήφιων επιτόπων του αλλεργιογόνου Lol p5a από το φυτό της σίκαλης, με σκοπό να δοκιμαστούν in vitro για την ικανότητα πρόσδεσής τους από HLA-DR αλλύλια και να επιβεβαιωθεί ότι οι προβλεπόμενοι αυτοί υποψήφιοι επίτοποι μπορούν να διεγείρουν τα Τ κύτταρα ασθενών με ατοπική αλλεργία. Η υπολογιστική πρόβλεψη επιτρέπει το σχεδιασμό Τ κυτταρικών επιτόπων με εφαρμογή σε νέες ανοσοθεραπευτικές στρατηγικές^[69].

TO **ПРОГРАММА MULTIPRED**

Το MULTIPRED είναι ένα δικτυακό υπολογιστικό σύστημα για την πρόβλεψη των πεπτιδίων που προσδένονται σε πολλαπλά μόρια (πρωτεΐνες) που ανήκουν στα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (HLA) τάξης Ι, Α2, Α3 και τα τάξης ΙΙ DR αλλύλια. Χρησιμοποιεί τα μοντέλα Hidden Markov (HMMs) και τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANNs) σαν μηχανές πρόβλεψης. Το MULTIPRED είναι ικανό να προβλέψει αντιγονικά πεπτίδια, που μπορούν να προσδεθούν σε πολλαπλά HLA αλλύλια επιλέγοντας ένα μόνο HLA αλλύλιο. Εκτεταμένες εργασίες, που έγιναν για την εκτίμηση των μοντέλων πρόβλεψης (HMM και ANNs) έδειξαν ότι το MULTIPRED αποτελεί μία ευαίσθητη και εξειδικευμένη μέθοδο για την πρόβλεψη αντιγονικών πεπτιδίων^[42-45].

1. Περιγραφή του Συστήματος

Το επικρατέστερο μήκος των πεπτιδίων που προσδένονται στις HLA-A2/–A3 τάξης Ι πρωτεΐνες είναι εννέα αμινοξέα. ΟΙ HLA-DR τάξης ΙΙ πρωτεΐνες προσδένουν πεπτίδια μεγαλύτερα σε μήκος διατηρώντας στο κεντρικό τμήμα πρόσδεσης εννέα αμινοξέα. Τα δεδομένα του συστήματος αποτελούνται από 3050 9-μερεις πεπτιδικές αλληλουχίες (664 προσδέτες και 2386 μη-προσδέτες), που σχετίζονται με 15 παραλλάγματα του HLA-A2 υπερ-τύπου, 2216 9-μερείς πεπτιδικές αλληλουχίες (680 προσδέτες), που σχετίζονται με οκτώ παραλλάγματα του HLA-A2 υπερ-τύπου, 2216 9-μερείς πεπτιδικές αλληλουχίες (680 προσδέτες και 2396 9-μερή πεπτίδια (448 προσδέτες και 1948 μη-προσδέτες) που σχετίζονται με έξι HLA-DR παραλλάγματα. Αυτά τα δεδομένα προέρχονται κυρίως από τρεις πηγές: την βάση δεδομένων MHCPEP, δημοσιευμένα άρθρα και ένα σύνολο από πεπτίδια που δεν προσδένονται στα HLA μόρια. Το πρόγραμμα λαμβάνει υπόψη μόνο τα κατάλοιπα επαφής, που διαφέρουν από τύπο σε τύπο HLA παραλλαγμάτων και απορρίπτει τα διατηρημένα κατάλοιπα.

Στο MULTIPRED ερευνήθηκαν διάφορες τεχνικές, όπως η βελτιστοποίηση της αρχιτεκτονικής των τεχνητών νευρωνικών δικτύων, ώστε να βελτιωθεί η ακρίβεια πρόβλεψης των ANN μοντέλων. Η εναλλακτική μηχανή πρόβλεψης που διαθέτει το MULTIPRED είναι τα μοντέλα HMMs (Hidden Markov Models). Ο χρήστης μπορεί να επιλέξει οποιαδήποτε από τις δυο μεθόδους, αφού και οι δύο μέθοδοι έχουν βελτιστοποιηθεί και εμφανίζουν παρόμοια απόδοση. Επιπλέον το MULTIPRED προβλέπει τις περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε 9-μερή πεπτίδια προσδέτες, που καλούνται 'κρίσιμες περιοχές' (hotspots). Το MULTIPRED εκτελεί τρεις βασικές λειτουργίες: (α) εκτελεί προβλέψεις, (β) 'χτίζει' μοντέλα και (γ) υπολογίζει την ακρίβεια πρόβλεψης. Για την πρόβλεψη των πεπτιδίων, που προσδένονται σε έναν HLA υπερ-τύπο, ο χρήστης πρέπει να εισάγει τον υπερ-τύπο που επιθυμεί και να επιλέξει την καταλληλότερη μέθοδο πρόβλεψης (ANNs ή HMMs) από το μενού του προγράμματος. Μετά την εισαγωγή της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, το μήκος της οποίας κυμαίνεται από 9 έως 2000 αμινοξέα, το πρόγραμμα εκτελεί την πρόβλεψη και προκύπτουν διάφορες φόρμες παρουσίασης των αποτελεσμάτων (Εικ.4).

THE PREDICTED PEPTIDE BINDING AFFINITY TO HLA classifiDR using Artificial Neural Network Method

Thu Jan 5 18:34:21 2006

Note: In the table, the binding scores range form 1 to 9, with scores 4-9 referring to predicted MHC binders (High binders: 8-9, Moderate binders: 6-7; Low binders: 4-5). Scores of 1-3 refer to predicted non-binders.

Sequence Name: Ia Result ID : 1400

A scoring scheme to identify immunological hotspots within antigens was developed. The scheme for HLA class II supertype is based on average scores of individual 8-mers within a window of 15 amino acids. For a 9-mer peptide, "Sum" is the sum total of the individual binding scores of the peptide to the MHC molecules and "Average" is the average of seven consecutive "Sum" values (There are seven 9mers in a 15-mer window).

Other Display formats of prediction result: Alignment View | Sort the Result | Plot Sum Value | Plot Average Value

Using Average value at threshold: 20 (Suggested threshold using Average value is 20): Get hotspots

		Molecules										
No	Peptides	DRB1- 0101	DRB1- 0301	DRB1- 0401	DRB1- 0701	DRB1- 0801	DR81- 1101	DRB 1- 1301	DR81- 1501	Sumf	Average"	
[1]	ADFRGTHHH	1.09	1.09	1.47	1.18	1.07	1.08	1.24	1.13	9.35	14.80	
2	DFRGTHHHY	1.19	1.20	1.88	1.36	1.15	1.17	1.46	1.25	10.67	14.69	
.3	FRGTHHHYP	591	5.60	5,49	2/4/7	5.47	5.70	新聞	669	49.29	14.49	
4	RGTHHHYPL	1.01	1.01	1.15	1.06	1.00	1.01	1.08	1.04	8.36	12.98	
5	GTHHHYPLK	0.99	0.99	1.03	1.01	0.99	0.99	1.03	1.00	8.03	13.05	
6	THHHYPLKM	1.12	1.13	1.38	1.26	1.09	1.11	1.33	1.18	9.60	17.52	
7	HHHYPLKMN	1.01	1.01	1.09	1.07	1.00	1.00	1.06	1.06	8.30	17.34	
8	HHYPLKMNH	1.03	1.03	1.17	1.11	1.02	1.03	1.11	1.10	8.60	18.53	
9	HYPLKMNHG	1.09	1.09	1.38	1.19	1.07	1.08	1.25	1.13	9.28	18.41	
10	YPLKMNHGV	4.46	4.4D	4.63	5.70	4.17	4.25	访问	5.09	38.70	18.22	
11	PLKMNHGVF	1.05	1.05	1.22	1.15	1.03	1.05	1.15	1.14	8.85	13.97	

Εικόνα 4: Φόρμα πρόβλεψης αποτελεσμάτων του προγράμματος που MULTIPRED για μια τυχαία πρωτεϊνική αλληλουχία, στην οποία απεικονίζονται τα προβλεπόμενα 9-μερή πεπτίδια για τα διάφορα HLA-DR αλλύλια. Στον πίνακα το 'ποσό' πρόσδεσης κυμαίνεται από 1 έως 9, ενώ χρησιμοποιήθηκαν τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα ως μέθοδος πρόβλεψης.

BIBAIOG

2. Εφαρμογές του MULTIPRED

Το MULTIPRED μπορεί να προβλέψει πεπτίδια ικανά να προσδεθούν σε πολλαπλές HLA πρωτεΐνες. Αφού οι HLA πρωτεΐνες είναι υψηλά πολυμορφικές, τα πεπτίδια που μπορούν να προσδεθούν σε περισσότερες από μια HLA πρωτεΐνες είναι οι κύριοι στόχοι για την ανάπτυξη της ανοσοθεραπείας και εμβολίων διότι σχετίζονται με το υψηλότερο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού. Οι περιοχές που χαρακτηρίζονται κατά την πρόβλεψη ως 'κρίσιμες περιοχές' (hotspots) αποτελούν περιοχές ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ως στόχοι των Τ κυτταρικών αποκρίσεων και θα μπορούσαν να ελεγχθούν πειραματικά σαν εν δυνάμει εμβόλια^[44,45].

Το MULTIPRED παρέχει πολλές λειτουργίες, οι οποίες δεν διατίθεται σε άλλα συστήματα πρόβλεψης, όπως το 'χτίσιμο' ενός μοντέλου από το χρήστη και την εκτίμηση της ακρίβειας. Το μονοπάτι από την πρόβλεψη ενός επιτόπου μέχρι την παρασκευή ενός εμβολίου είναι αρκετά δύσβατο και απαιτεί μεγάλο οικονομικό κόστος και εκτεταμένες εργαστηριακές προσπάθειες. Ο βασικός στόχος του MULTIPRED αφορά στην επιλογή των αντιγονικών περιοχών-κλειδιών ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται για την χαρτογράφηση των Τ κυτταρικών επιτόπων.



ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΗCPRED

Τα υπολογιστικά προγράμματα που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της ικανότητας πρόσδεσης πεπτιδίων σε HLA μόρια τάξης Ι και ΙΙ συνεχώς πληθαίνουν. Η προέλευση και η χρησιμότητα μερικών προγραμμάτων παραμένουν αβέβαιες, καθώς οι μέθοδοι πρόβλεψης στις οποίες βασίζονται δεν έχουν δημοσιευτεί σε έγκυρα επιστημονικά περιοδικά.

Το MHCPred είναι ένα υπολογιστικό πρόγραμμα, το οποίο εφαρμόζει μια 2D-QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) προσέγγιση για την πρόβλεψη της ικανότητας πρόσδεσης πεπτιδίων σε HLA μόρια τάξης Ι και ΙΙ. Η μέθοδος αυτή καλείται διαφορετικά 'additive' μέθοδος και χρησιμοποιεί όρους για να υπολογίσει την επίδραση της παράπλευρης αλυσίδας^[70].

1. Περιγραφή του Συστήματος

Το MHCPred περιέχει μια ομάδα μοντέλων από διαφορετικά ανθρώπινα MHC αλλύλια. Αυτά συμπεριλαμβάνουν αλλύλια τάξης Ι (HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0206, HLA-A*0301, HLA-A*1101, HLA-A*3301, HLA-A*6801, HLA-A*6802 και HLA-A*3501) και αλλύλια τάξης ΙΙ (HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401 και HLA-DRB1*0701).

Τα μοντέλα αυτά που δημιουργήθηκαν από τις ΙC₅₀ τιμές, οι οποίες χαρακτηρίζουν την ικανότητα πρόσδεσης των πεπτιδίων στα ΜΗC μόρια, συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία και συγκεντρώθηκαν στη βάση δεδομένων JenPep^[71]. OI προέκυψαν IC50 τιμές από συναγωνιστικά πειράματα ραδιοπροσδέματος (radioligand competition assays). Η IC₅₀ τιμή είναι η συγκέντρωση που απαιτείται για να επιτευχθεί 50% αναστολή ενός πρότυπου ιχνηθετημένου πεπτιδίου από το πεπτίδιο που εξετάζεται. Επιπλέον, η ικανότητα πρόσδεσης ενός πεπτιδίου στα MHC μόρια είναι αντιστρόφως ανάλογη της IC50 τιμής. Όταν ένα πεπτίδιο έχει προσδεθεί σε ένα ΜΗC μόριο, ώστε να αναγνωριστεί από το ανοσοποιητικό σύστημα, πρέπει αρχικά το σύμπλοκο ΜΗC-πεπτιδίου να αναγνωριστεί από το TCR. Γενικά είναι αποδεκτό ότι το σύμπλοκο MHC-πεπτιδίου μπορεί να αναγνωριστεί από το TCR, αν η τιμή $p|C_{50} > 6.3$ M.

Προκειμένου να γίνει μια πρόβλεψη ο χρήστης καθορίζει τις παραμέτρους του προγράμματος, όπως το MHC αλλύλιο, τα αμινοξικά κατάλοιπα που θα αντιστοιχούν στις θέσεις P1-P9 και άλλες παραμέτρους (Εικ. 5Α).

BIBAR





Providing the binding all net to the C 1 on

B

			999975			www.			ana anga	
ſ								Arms		racions
						36				
-						<u> </u>			u.	
					· * · · · ·		er:-1-3	_		
5	1.0	-	(1-7)		-	<u>(1-9)</u>		****	(1-5)	- 23
		1	-		1 	T XC		TA.	. Г.М	
	F1M F1M	EC	Г.И. Г.У.		rê.	TN.	· · ·	CC.	CN N	
D	CT .	CD	E.S		CP.	FP		E D	ro -	
2	FQ.					r ž	Ĩ∜÷ `	ΓT	FR -	
2 6	TS .	Γa	rs .		CG.	rs.	÷	F 0	r's	
Ē.	F7.	LE.	FT	,		י ביי		1.8	1.1 FV	
1	<u>ry</u>	F1						CE	F.W.	
Χ.,	100 C	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			C1	E'T		CL.	- FT	



Ta sine far pagtar effite desper, mit in ite gespe en in presse we er alper en en eren en er er er er er er er Vanne son heldet

MONRAGEISLNAIKASTI	SETNEGESSEZANLGELSETTSTDWEFFGELDARDARD
PATANTESES TADEEMAN	VOLARFADIGSEDHLIEDESKDAFGKEDNIFLDRPASAF
LEIDANG THAT THAT IS	4.578
ASDELTIN STATE	1519
COMUSE THE PARTY	
CONTRACT.	
CONTRACTOR - 200 CAR STORE	LEATE CHEVE AND
Martin The Solar Aris	
CHER Y THE	
BRD2 - AST	122-5 (SV 122-5 AVE 300 (S. 8 5 - 6 - 6 - 6 - 6 - 6 - 6 - 6 - 6 - 6 -
	ACCESSION OF A CONTRACT OF A C
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

Εικόνα 5: Μια τυπική απεικόνιση της επιφάνειας του προγράμματος MHCPred για την πρόβλεψη και την παρουσίαση του αποτελέσματος. (Α) Η πρόβλεψη περιλαμβάνει την εισαγωγή της πρωτεινικής αλληλουχίας, για την οποία εξετάζονται ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους υποψήφια 9-μερή πεπτίδια, την επιλογή του κατάλληλου MHC αλλυλίου, την έξοδο των αποτελεσμάτων με βάση την plC₅₀ τιμή και την επιλογή στα αντίστοιχα πλαίσια των αμινοξικών καταλοίπων που αντιστοιχούν στις θέσεις P1-P9 του κεντρικού τμήματος του προς εξέταση 9-μερούς πεπτιδίου ανάλογα με τις προτιμήσεις του χρήστη για τις συγκεκριμένες θέσεις. (B) Φόρμα παρουσίασης των αποτελεσμάτων για μια συγκεκριμένη πρωτεινική αλληλουχία. Ο πίνακας των αποτελεσμάτων περιλαμβάνει 3 στήλες (Εικ. 5Β). Η πρώτη παρουσιάζει όλους τους συνδυασμούς με τα προβλεπόμενα 9-μερή πεπτίδια που έχουν στις θέσεις P1-P9 ένα ή περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα από εκείνα που επιλέχθηκαν αρχικά για τη πρόβλεψη. Η δεύτερη και η τρίτη στήλη περιλαμβάνουν τις θεωρητικά υπολογιζόμενες τιμές -log[IC₅₀] (ή plC₅₀) και IC₅₀ αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την additive μέθοδο, οι IC₅₀ τιμές που προκύπτουν μετατρέπονται σε log[1/IC₅₀] (ή -log[IC₅₀] ή pIC₅₀). Η pIC₅₀ μπορεί να συσχετιστεί με την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ΔG_{bind}, αφού ΔG_{bind}~-RT InIC₅₀. Οι τιμές pIC₅₀ προβλέφθηκαν από ένα συνδυασμό που περιλαμβάνει τις συνεισφορές (P) για καθένα αμινοξύ σε κάθε θέση του πεπτιδίου και τις συνεισφορές από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του πεπτιδίου που απέχουν μεταξύ τους μία (γειτονικά κατάλοιπα) ή δύο θέσεις.

2. Σύγκριση του MHCPred με άλλα προγράμματα

Ένας μεγάλος αριθμός προγραμμάτων είναι σήμερα διαθέσιμος για τον προσδιορισμό της ικανότητας πρόσδεσης πεπτιδίων στα MHC μόρια τάξης I και II. Το MHCPred διαφέρει από τα υπόλοιπα προγράμματα διότι βασίζεται σε μια ποσοτική προσέγγιση της πρόβλεψης της πρόσδεσης πεπτιδίων από τα MHC μόρια, η οποία είναι σημαντική για τρεις κυρίως λόγους.

- 1. Επιτρέπει μια αντικειμενική σύγκριση των θεωρητικών σε σχέση με τις πειραματικά υπολογιζόμενες ικανότητες πρόσδεσης.
- Η ικανότητα πρόσδεσης είναι το προϊόν των αλληλεπιδράσεων ολόκληρου του πεπτιδίου με το μόριο-υποδοχέα.
- 3. Βρίσκει σημαντική εφαρμογή στη πεδίο της δημιουργίας ετερόκλητων πεπτιδίων.

Τα ετερόκλητα (heteroclitic) πεπτίδια είναι τροποποιημένα φυσικά, ήπια ανοσογονικά πεπτίδια με αυξημένη τάση για πρόσδεση στα MHC μόρια^[72]. Η χρήση της μεθόδου αυτής επιτρέπει την αναγνώριση των αμινοξικών καταλοίπων που πρέπει να υποκατασταθούν ώστε να αυξηθεί πιθανά η πρόσδεση ενός πεπτιδίου στο MHC μόριο και άρα η Τ κυτταρική ενεργοποίηση, με πλεονέκτημα την ανάπτυξη εμβολίων, τα οποία θα βασίζονται σε επιτόπους. Μόνο το πρόγραμμα BIMAS εφαρμόζει μια επίσης ποσοτική μέθοδο πρόβλεψης. Παρόλα αυτά, το πρόγραμμα αυτό διαφέρει από το MHCPred διότι προβλέπει τις κινητικές, και όχι τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της διάσπασης του MHCβ2 συμπλόκου της μικρογλοβουλίνης και δεν μελετά ενεργειακά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου.

BIBAR

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Hopp TP., Woods KR., 'Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences', PNAS, 1981, 78, 3824-3828.
- Parker JMR., Guo D., Hodges RS., 'New hydrophilicity scale derived from high performance liquid chromatography retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray derived accessible sites', Biochemistry, 1986, 25, 5425.
- Thornton JM., Edwards MS., Tayler WR., Barlow DJ., 'Location of 'continuous antigenic determinants in the protruding regions of proteins', EMBO J, 1986, 5, 409-413.
- 4. Welling GW., Weijer WJ., van der Zee R., Welling-Wester S., 'Prediction of sequential antigenic regions in proteins', FEBS Lett., 1985, **188**, **215**-218.
- Stem PS., 'Predicting antigenic sites on proteins', Trends Biotechnol., 1991, 9, 163-169.
- Sette A., et al., 'Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis', PNAS, 1989, 88, 3296-3300.
- Margalit H., Spouge JL., Cornette JL., Cease KB., Delisi C., Berzofsky JA., 'Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from primary sequence', J. Immunol., 1987, 138(7), 2213-2229.
- 8. Jameson B.A., Wolf H., 'The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants', Comp. Appl. Biosci., 1988, 4, 181-186.
- Reyers VE., Chin LT, Humphreys RE., 'Selection of class I MHC-restricted peptides with the strip-of-helix hydrophobicity algorithm', Mol. Immunol., 1988, 25(9), 867-871.
- 10. Kichnam V., Mach O., Maly A., 'Computer prediction of potential immunogenic determinants from protein amino acid sequence', Anal. Biochem., 1987, 165(1), 200-207.
- Deléage, G., Clerc, F.F, Roux B. & Gautheron, D.C., 'ANTHEPROT: A package for protein sequence analysis using a microcomputer', Cabios, 1988, 4,351-356.
- Geourjon, C. & Deléage, G., 'ANTHEPROT 2.0: A three-dimensional module fully coupled with protein sequence analysis methods', J. Mol. Graph., 1995
 13, 209-212.
- 13. Deléage, G. & Geourjon, C., 'ANTHEPROT : A software to display and analyze 3D NMR structures', J. Trace and Microprobe Techniques, 1995, 13,

337-338.

- 14. Eroskin, AM., Fomin, VI., Zhilkin PA., Ivanisenko VV., Kondrakhin YV.,' PROANAL version 2: multifunctional program for analysis of multiple protein sequence alignments and for studying the structure--activity relationships in protein families', Comput. Appl. Biosci., 1995, 11(1), 39-44.
- Menendez-Arias, L., Rodriguez, R.,' A BASIC microcomputer program for prediction of B and T cell epitopes in proteins', Comput. Appl. Biosci., 1990, 6(2), 101-5.
- Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O.,' A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX', Nucleic Acids Res., 1984, 12(1), 387-395.
- 17. Plasterer, TN., 'PROTEAN. Protein sequence analysis and prediction', Mol. Biotechnol., 2000, 16(2),117-25.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.,' Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server', In John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005), 571-607.
- 19. Toldo, LI., 'JaMBW 1.1: Java-based Molecular Biologists' Workbench', Comput Appl Biosci., 1997, **13(4)**, 475-476.
- Pellequer JL., Westhof E., 'PREDITOP: a program for antigenicity prediction', J. Mol. Graph., 1993, 11(3), 204-210 and 191-192.
- 21. Kesmir, C., Nussbaum, A., Hansjorg Schild, Detours, V. and Brunak, S., 'Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks', Prot. Eng., 2002, 15(4), 287-296.
- Nielsen M., Lundegaard C., Brunak S., Lund O., and Kesmir C.,' he role of the proteasome in generating cytotoxic T cell epitopes: Insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage', Immunogenetics, 2005, 57(1-2), 33-41.
- C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Hadeler, An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages', J. Mol. Biol., 2000, 298, 417-429.
- 24. Nussbaum AK, Kuttler C, Hadeler KP, Rammensee HG, Schild H.,' PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW', Immunogenetics, 2001, 53(2), 87-94.
- Brusic V., Rudy G., Kyne A.P. and Harrison L.C., 'MHCPEP, a database of MHC-binding peptides: update 1997', Nucleic Acids Research, 1998, 26(1), 368-371.

- 26. Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N.P. N., Bachor, O.A., and Stevanovic, S.,' SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs', Immunogenetics, 1999, **50**, 213-219.
- 27. Parker, K.C., BedNarek, M.A., Coligan, J.E., 'Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side chain', J. Immunol., 1994, 152, 5586-5592.
- Hakenberg, J., Nussbaum, A., Schild, H., Rammensee, H.-G., Kuttler, C., Holzhütter, H.-G., Kloetze, I P.-M., Kaufmann, S.H.E., Mollenkopf, H.-J.,' MAPPP-MHC-I Antigenic Peptide Processing Prediction', Appl. Bioinformatics, 2003, 2(3), 155-158.
- 29. Guan P, Doytchinova IA, Zygouri C, Flower DR. 'MHCPred: bringing a quantitative dimension to the online prediction of MHC binding', Appl. Bioinformatics, 2003, **2**, 63-66.
- 30. Guan P, Doytchinova IA, Zygouri C, Flower DR., 'MHCPred: A server for quantitative prediction of peptide-MHC binding', Nucleic Acids Res., 2003, 31, 3621-3624.
- 31. Hattotuwagama CK, Guan P, Doytchinova IA, Zygouri C, Flower DR.,' Quantitative online prediction of peptide binding to the major histocompatibilitycomplex', J. Mol. Graph. Model., 2004, 22, 195-207.
- 32. http://www.epipredict.de/Links/links.html
- 33. http://www.epipredict.de/Prediction/prediction.html
- Fleckenstein, B., Jung, G. and Wiesmüller, K-H.,' Peptide libraries in T-cellmediated immune response', In: G Jung, Editor, Combinatorial Chemistry— Synthesis, Analysis, Screening, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, 355–380.
- 35. Jung G, Fleckenstein B, von der Mulbe F, Wessels J, Niethammer D, Wiesmuller KH.,' From combinatorial libraries to MHC ligand motifs, T-cell superagonists and antagonists', Biologicals, 2001, 29(3-4), 179-181.
- 36. Hammer, J., 'New methods to predict MHC binding sequences within protein antigens', Current Opinion in Immunology, 1995, 7, 263-269.
- 37. Sturniolo, T.,' Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA chips and virtual HLA class II matrices', Nature Biotechnology, 1999, 17, 555-562.
- 38. Raddrizzani, L.,' Epitope scanning using virtual quantitative matrix-based algorithms', Briefings in Bioinformatics, 2000, 1, 179-189.
- 39. Bian, H., Hammer, J.,' Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE', Methods, 2004, 34(4), 468-475.
- 40. Hammer, J. et al.,' HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity'

Advances in Immunology, 1997, 66, 67-100.

- 41. Singh H, Raghava GP.,' ProPred: prediction of HLA-DR binding sites', Bioinformatics, 2001, **17(12)**, 1236-1237.
- 42. Zhang GL, Khan AM, Srinivasan KN, August JT, Brusic V., 'Neural models for predicting viral vaccine targets', J. Bioinform. Comput. Biol., 2005, **3(5)**, 1207-25.
- 43. Zhang GL, Khan AM, Srinivasan KN, August JT, Brusic V.,'MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides', Nucleic Acids Res., 2005, 1(33), 172-179.
- 44. Srinivasan KN, Zhang GL, Khan AM, August JT, Brusic V., 'Prediction of class
 I T-cell epitopes: evidence of presence of immunological hot spots inside antigens', Bioinformatics, 2004, Suppl.1, 1297-1302.
- 45. Brusic V, Petrovsky N, Zhang G, Bajic VB. Prediction of promiscuous peptides that bind HLA class I molecules', Immunol. Cell Biol., 2002, 80(3), 280-5.
- 46. Reche PA, Glutting JP, Reinherz EL., 'Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs', Hum. Immunol., 2002, 63(9), 701-9.
- 47. Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles', Immunogenetics, 2004, 56(6), 405-19.
- 48. Brusic V., Bajik V.B., Petrovsky N., 'Computational methods for prediction of T cell epitopes-a framework for modelling, testing and applications', Methods, 2004, 34(4), 436-443.
- 49. Rothbard JB., Taylor WR., 'A sequence pattern common to T cell epitopes', EMBO J, 1988, 7(1), 93-100.
- 50. Davenport MP., Ho Shon IA., Hill AV., 'An empirical method for the prediction of T cell epitopes', Immunogenetics, 1995, **45(2)**, 392-397.
- 51. Hammer J., Valsasnini P., Tolba K., Bolin D., Higelin J., Takacsand B., Sinigaglia F., 'Promiscuous and allele specific anchors in HLA-DR-binding peptides', Cell, 1993, **74**, 197-203.
- 52. Taylor WR.,' Pattern matching methods in protein sequence comparison and structure prediction', Protein Engin., 1988, **2(2)**, 233-258.
- 53. Brusic V., Rudy G., Honeyman G., Hammer J., Harrison L., 'Prediction of MHC class II --binding peprides using evolutionary algorithm and artificial neaural network', Bioinformatics, 1998, **14(2)**, 121-130.
- 54. Hammer J., Bono E., Gallazzi F., Belunis C., Nagy Z., Sinigaglia F.,' Precise prediction of major histocompatibility complex calss II-peptide interaction

based on peptide side-chain scanning', J. Exp. Med., 1994, 180(6), 2353-2358.

- 55. Raddrizzani L., Hammer J., 'Epitope scanning using virtual matrix-based algorithms', Briefing of Bioinformatics, 2000, **1(2)**, 179-189.
- 56. Maritsuka H., 'Predicting peptides that bind to MHC molecules using supervised learning of Hidden Markov Models', Proteins, 1998, 33(4), 460-474.
- 57. Baldi P., Brunak P.S., 'Bioinformatics. The machine learning approach', MIT Press, Cambridge, 1998.
- 58. Sanchez R., Sali A., 'Advances in comparative protein structure-modelling', Curr. Opin. Struct. Biol., 1997, 7, 206-214.
- 59. Forster MJ., 'Molecular modelling in structural biology', Micron, 2002, 33, 365-384.
- 60. Bian H., Reidhaar-Olson JF., Hammer J., 'The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T cell epitopes', Methods, 2003, **29(3)**, 299-309.
- 61. Meister GE, Roberts CG, Berzofsky JA, De Groot AS., 'Two novel T cell epitope prediction algorithms based on MHC-binding motifs; comparison of predicted and published epitopes from Mycobacterium tuberculosis and HIV protein sequences', Vaccine, 1995, **13(6)**, 581-591.
- 62. Margalit H., Spouge JL., Cornette JL., Cease KB., Delisi C., and Berzofsky JA., 'Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence', J Immunol, 1987, 138, 2213-2229.
- 63. Christopher J. Stille, Lawrence J. Thomas, Victor E. Reyes and Robert E. Humphreys, 'Hydrophobic strip-of-helix algorithm for selection of T cell-presented peptides', Mol. Immun., 1987,1021-1027.
- 64. Reyes VE, Fowlie EJ, Lu S, Phillips L, Chin LT, Humphreys RE, Lew RA. Comparison of three related methods to select T cell-presented sequences of protein antigens, Mol. Immun., 1990, 27(10), 1021-1027.
- 65. Schroes R., Huang XF., Hammer J., Zhang J., Chen S-Y., 'Identification of HLA-DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse trancriptase recognized by CD4+ T helper cells', Cancer Res., 2002, 62(9), 2600-2605.
- 66.. Stassar MJ., Raddrizzani L., Hammer J.,. Zoller M.,' T-helper cell response to MHC class II-binding peptides of the renal cell carcinoma-associated antigen REGE-1', Immunolbiol., 2001, **203**, 743-755.
- 67. Cochlovius B., Stassar M., Chris O., Raddrizzani L., Hammer J., Mytilineos I., Zoeller M., 'In vitro and in vivo iduction of a Th cell response toward peptides of the melanoma-associated glycoprotein 100 protein selected by the

TEPITOPE program', J. Immunol., 2000, 165, 4731-4741.

- 68. Manici S., Sturniolo T., Imro M.A., Hammer J., Sinigaglia F., Noppen C., Spagnoli G., Mazzi B., Bellone M., Dellabona P., Protti M.P., ' Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11', J. Exp. Med., 1999, **189**, 871-876.
- 69. de Lalla C., Sturniolo T., Abbruzzese L., Hammer J., Sidoli A., Sinigaglia F., Panina-Bordignon P., 'Cutting edge: identification of novel T cell epitopes in Iol p5a by computational prediction', J. Immunol., 1999, **163**, 1725-1729.
- 70. Doytchinova IA., Blythe MJ., Flower DR., 'An additive method for the prediction of protein-peptide binding affinity. Apllication to the MHC class I molecule HLA-A*0201', J. Proteome. Res., 2002, 1, 263-272.
- 71. Blythe M.J., Doytchinova I.A. and Flower D.R., 'JenPep, a database of quantitative functional peptide data for immunology', Bioinformatics, 2002, 18, 434–439.
- 72. Tangri S., Ishioka G.Y., Huang X., Sidney J., Southwood S., Fikes J. and Sette A., 'Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide', Exp. Med., 2001, **194**, 833–846.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD simulations) αποτελεί ένα από κύρια εργαλεία για τη θεωρητική μελέτη βιολογικών μορίων, αφού εξετάζει την συμπεριφορά ενός μοριακού συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο.

Η μέθοδος των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής εφαρμόστηκε αρχικά από τους Alder Wainwright στα τέλη του 1950 με σκοπό να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των σκληρών σφαιρών^[1,2]. Το επόμενο κύριο βήμα έγινε το 1964, όταν ο Rahman πραγματοποίησε την πρώτη προσομοίωση χρησιμοποιώντας ένα 'ρεαλιστικό δυναμικό' για το υγρό αργό^[3]. Η πρώτη προσομοίωση μοριακής δυναμικής ενός 'ρεαλιστικού συστήματος' έγινε από τους Rahman και Stillinger το 1974, όπου το μελετούμενο σύστημα ήταν το νερό^[4], ενώ οι πρώτες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε πρωτεΐνες εμφανίστηκαν το 1977 για τον αναστολέα της τρυψίνης του BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor) παγκρέατος βοδινού ^[5].

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής βρίσκουν σήμερα εφαρμογή σε τρία κύρια πεδία^[6]. Πρώτον, οι MD προσομοιώσεις χρησιμοποιούνται για να παράγουν δομές βιομορίων, παρέχοντας βαθιά γνώση της φυσικής δυναμικής των βιομορίων αυτών σε διάλυμα, σε διαφορετικές χρονικές κλίμακες. Δεύτερον, οι MD προσομοιώσεις παρέχουν τους θερμικούς μέσους όρους των ιδιοτήτων των βιομορίων. Η προσομοίωση ενός μορίου με το περιβάλλον του για μια χρονική περίοδο μπορεί να παρέχει τους χρονικά εξαρτώμενους μέσους όρους των ιδιοτήτων του μορίου, οι οποίοι προσεγγίζουν τους πειραματικά μετρήσιμους αντίστοιχους μέσους όρους. Αυτό χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ιδιοτήτων των υγρών και των διαφορών στην ελεύθερη ενέργεια για μια χημική διαδικασία, όπως η πρόσδεση ενός υποκαταστάτη σε έναν υποδοχέα. Τρίτον, οι MD προσομοιώσεις μπορούν να διερευνήσουν ποιες από τις διαμορφώσεις ενός μορίου ή συμπλόκου είναι θερμικά προσβάσιμες. Είναι γενικά γνωστό ότι σχεδόν όλες οι δομές των βιομορίων, που έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ ή με NMR φασματοσκοπία, μπορούν να βελτιωθούν με τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Ο αριθμός των τεχνικών προσομοίωσης έχει αναπτυχθεί πολύ και υπάρχουν πια πολλές εξειδικευμένες τεχνικές για συγκεκριμένα προβλήματα. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής μπορεί να είναι χρονοβόρες και υπολογιστικά ακριβές. Για επιδιαλυτωμένες πρωτεΐνες, οι MD προσομοιώσεις πραγματοποιούνται σε χρονική κλίμακα νανο-δευτερολέπτων (ns), όμως έχουν αναφερθεί και προσομοιώσεις σε χρονική κλίμακα μιλι-δευτερολέπτων (ms)^[7].



1. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής παρέχουν πληροφορία σε μικροσκοπικό επίπεδο περιλαμβάνοντας τις ατομικές θέσεις και ταχύτητες των μικροσκοπικών συστημάτων (ατόμων, μορίων, ιόντων κ.λ.π.). Η μετατροπή της μικροσκοπικής πληροφορίας σε μακροσκοπικά παρατηρούμενα μεγέθη όπως η πίεση, η ενέργεια, η θερμοκρασία κ.λ.π. επιτυγχάνεται με την βοήθεια της στατιστικής μηχανικής.

Συγκεκριμένα, η στατιστική μηχανική είναι ο κλάδος των φυσικών επιστημών που μελετά μακρομοριακά συστήματα από μοριακής άποψης. Σε μία προσομοίωση μοριακής δυναμικής, ο στόχος είναι η διερεύνηση των μακροσκοπικών ιδιοτήτων του συστήματος διαμέσου των μικροσκοπικών προσομοιώσεων, για παράδειγμα ο υπολογισμός της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας κατά την πρόσδεση ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη-υποψήφιου φαρμάκου και η μελέτη του μηχανισμού μιας διαμορφωτικής αλλαγής. Ο υπολογισμός αυτός στηρίζεται στην αναγνώριση ότι οι μακροσκοπικές ιδιότητες παριστάνουν τη μέση συμπεριφορά μυριάδων ατόμων, μορίων κ.λ.π.

Η στατιστική μηχανική παρέχει τις αυστηρές μαθηματικές εκφράσεις που συσχετίζουν τις μακροσκοπικές ιδιότητες προς την κατανομή και κίνηση των ατόμων και μορίων ενός συστήματος Ν-ατόμων. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής παρέχουν το μέσο για την επίλυση των εξισώσεων κίνησης, την εκτίμηση αυτών των μαθηματικών τύπων και τη μελέτη των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων και/ή του κινητικού φαινομένου.







102

Προκειμένου να γίνει η σύνδεση μεταξύ του μακροσκοπικού συστήματος με το μικροσκοπικό, συχνά εισάγονται χρονο-εξαρτώμενοι στατιστικά μέσοι όροι. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα μέσων όρων είναι η μέση δυναμική ενέργεια V και η μέση κινητική ενέργεια Κ^[8,9] (Σχέσεις 1.1 και 1.2)

$$\mathbf{V} = \left\langle \mathbf{V} \right\rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^{M} \mathbf{V}_{i}$$
 1.1

όπου Μ είναι ο αριθμός των διαμορφώσεων σε μια τροχιά μοριακής δυναμικής και V_i είναι η δυναμική ενέργεια για τη διαμόρφωση i.

$$\mathbf{K} = \left\langle \mathbf{K} \right\rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^{M} \left\{ \sum_{i=1}^{N} \frac{\mathbf{m}_{i}}{2} \mathbf{v}_{i} \times \mathbf{v}_{i} \right\} \quad \mathbf{1.2}$$

όπου Μ είναι ο αριθμός των διαμορφώσεων στην προσομοίωση, Ν ο αριθμός των ατόμων του συστήματος, m_i η μάζα του στοιχείου i και v_i η ταχύτητα του στοιχείου i.

Μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής πρέπει να είναι ικανοποιητικά μακρά ώστε να έχουν προκύψει αρκετές αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις.

2. ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Η μέθοδος προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής βασίζεται στον δεύτερο νόμο του Νεύτωνα ή αλλιώς την εξίσωση κίνησης F=ma, όπου F είναι η δύναμη που δέχεται το άτομο μάζας m και επιτάχυνσης α. Αν είναι γνωστή η δύναμη F που δέχεται κάθε άτομο είναι δυνατό να προσδιοριστεί η επιτάχυνση κάθε ατόμου στο σύστημα. Η ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης αποδίδει μια τροχιά που περιγράφει τη μεταβολή στις θέσεις, στις ταχύτητες και στις επιταχύνσεις των ατόμων σε συνάρτηση με το χρόνο. Από αυτή τη τροχιά, μπορούν να προσδιοριστούν οι μέσες τιμές των ιδιοτήτων. Η μέθοδος αυτή είναι καθοριστική, δηλαδή μόλις οι θέσεις και οι ταχύτητες κάθε ατόμου προσδιοριστούν, τότε η κατάσταση του συστήματος μπορεί να προβλεφθεί για κάθε στιγμή στο μέλλον ή το παρελθόν.



Ο δεύτερος νόμος κίνησης του Νεύτωνα δίνεται από τη σχέση 2.1:

$$F = m \times \alpha = m \times \frac{dv}{dt} = m \times \frac{d^2x}{dt^2}$$
2.1

Αν η επιτάχυνση είναι σταθερή δίνεται από τη σχέση:

$$a = \frac{dv}{dt}$$
 2.2

Με ολοκλήρωση της σχέσης (2.2) προκύπτει για την ταχύτητα:

$$\mathbf{v} = \alpha \mathbf{t} + \mathbf{v}_0 \tag{2.3}$$

Η ταχύτητα δίνεται από τη σχέση:

$$v = \frac{dx}{dt}$$
 2.4

Με ολοκλήρωση της σχέσης (2.4) προκύπτει για την θέση:

$$x = v \times t + x_0 \tag{2.5}$$

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις 2.3 και 2.5 προκύπτει η σχέση 2.6, η οποία δίνει την θέση χ σε χρόνο t σαν συνάρτηση της επιτάχυνσης α, της αρχικής θέσης χ₀ και της αρχικής ταχύτητας ν₀.

$$x = \alpha \times t^2 + v_0 \times t + x_0$$
 2.6

Η επιτάχυνση είναι συνάρτηση της δυναμικής ενέργειας του συστήματος,

$$\alpha = -\frac{1}{m} \frac{dE}{dr}$$
 2.7

Οι εξισώσεις κίνησης είναι καθοριστικές για παράδειγμα οι θέσεις και οι ταχύτητες σε χρόνο μηδέν καθορίζουν τις θέσεις και τις ταχύτητες σε χρόνο t. Οι αρχικές θέσεις λαμβάνονται από πειραματικά προσδιορισμένες δομές, όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ των πρωτεϊνών ή οι δομές σε διάλυμα που προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία NMR.


Η αρχική κατανομή των ταχυτήτων συνήθως προσδιορίζεται από μια τυχαία κατανομή όπου τα μεγέθη προσαρμόζονται στην απαιτούμενη θερμοκρασία και διορθώνονται έτσι ώστε να μην υπάρχει συνολική ροπή Ρ, δηλαδή

$$P = \sum_{i=1}^{N} m_i v_i = 0$$
 2.8

Οι ταχύτητες, ν_i, συχνά επιλέγονται τυχαία είτε από μια κατανομή Maxwell-Boltzmann είτε από μια Γκαουσιανή κατανομή σε δεδομένη θερμοκρασία και δίνουν την πιθανότητα το άτομο i να έχει μια ταχύτητα ν_x στην x διεύθυνση σε θερμοκρασία Τ.

$$p(\mathbf{v}_{i\mathbf{x}}) = \left(\frac{\mathbf{m}_{i}}{2\pi \mathbf{k}_{B}T}\right)^{1/2} \exp\left[-\frac{1}{2}\frac{\mathbf{m}_{i}\mathbf{v}_{i\mathbf{x}}^{2}}{\mathbf{k}_{B}T}\right]$$
 2.9

Η θερμοκρασία Τ μπορεί να υπολογιστεί από τις ταχύτητες χρησιμοποιώντας τη σχέση 2.10,

$$T = \frac{1}{3N} \sum_{i=1}^{N} \frac{|p_i|}{2m_i}$$
 2.10

όπου Ν είναι ο αριθμός των ατόμων του συστήματος.

Η θερμοκρασία του συστήματος στη μοριακή δυναμική είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος. Κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής το υπο μελέτη σύστημα πρέπει να έχει σταθερή θερμοκρασία με κάποια φυσική έννοια.

Όταν ξεκινά η μοριακή δυναμική δίνονται στα άτομα του συστήματος ταχύτητες που αναλογούν στην κινητική ενέργεια και η κατανομή τους υπακούει το νόμο Maxwell-Boltzmann. Η επιλογή αυτή είναι αυθαίρετη αλλά στα επόμενα βήματα της μοριακής δυναμικής γίνονται οι απαραίτητες διορθώσεις ώσπου το σύστημα να εξισορροπήσει. Οι ταχύτητες των ατόμων μεταβάλλονται κάτω από την επίδραση του πεδίου δύναμης οπότε μεταβάλλεται και η θερμοκρασία. Συνεπώς, για να διατηρηθεί η θερμοκρασία σταθερή απαιτείται συνεχής αναπροσαρμογή των ταχυτήτων.

3. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗΣ

Η δυναμική ενέργεια είναι μια συνάρτηση των ατομικών θέσεων (3N) όλων των ατόμων στο σύστημα. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της συνάρτησης αυτής, δεν



υπάρχει αναλυτική επίλυση των εξισώσεων κίνησης και πρέπει αυτές να επιλυθούν αριθμητικά. Πολλοί αριθμητικοί αλγόριθμοι έχουν αναπτυχθεί για την ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης^[10,11]. Κατά την επιλογή του αλγορίθμου πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής κριτήρια:

- 1. Ο αλγόριθμος πρέπει να διατηρεί την ενέργεια και την ορμή
- 2. Πρέπει να είναι υπολογιστικά αποτελεσματικός
- 3. Πρέπει να επιτρέπει μια μακρά χρονική περίοδο για την ολοκλήρωση.

Μια καθοριστική παράμετρος για τη μοριακή δυναμική είναι η χρονική περίοδος Δt στη διαδικασία της ολοκλήρωσης. Επειδή πρέπει να ληφθούν υπόψη όλες οι δονήσεις του μορίου (ακόμη και η ταχύτερη ~10⁻¹⁴sec για το δεσμό C-H) και επειδή η ολοκλήρωση είναι αριθμητική (~10 τμήματα απαιτούνται για καλή αναπαράσταση της καμπύλης), το Δt είναι συνήθως 1fs (10⁻¹⁵ sec). Η τιμή αυτή έχει άμεση επίπτωση στη ποιότητα της προσομοίωσης. Για πεπτίδια και πρωτεΐνες η τιμή αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2fs, ενώ για πιο ακριβείς υπολογισμούς πρέπει να είναι μικρότερη από 1fs.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι αλγόριθμοι είναι:

- 1. Ο Verlet αλγόριθμος
- 2. Ο Leap-frog αλγόριθμος
- 3. Ο velocity Verlet αλγόριθμος
- 4. Ο αλγόριθμος του Beeman

Σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος είναι ο αλγόριθμος Verlet^[12,13]. Οι βασικές εξισώσεις που συνιστούν τον αλγόριθμο Verlet είναι οι εξής:

$$\mathbf{r}(t+\delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\alpha(t)\delta t^{2}$$
3.1

$$\mathbf{r}(\mathbf{t} - \delta \mathbf{t}) = \mathbf{r}(\mathbf{t}) - \mathbf{v}(\mathbf{t})\delta \mathbf{t} + \frac{1}{2}\alpha(\mathbf{t})\delta \mathbf{t}^{2}$$
3.2

Αθροίζοντας τις εξισώσεις 3.1 και 3.2 προκύπτει η εξίσωση 3.3:

$$\mathbf{r}(\mathbf{t} + \delta \mathbf{t}) = 2\mathbf{r}(\mathbf{t}) - \mathbf{r}(\mathbf{t} - \delta \mathbf{t}) + \alpha(\mathbf{t})\delta \mathbf{t}^2$$
 3.3



Ο Verlet αλγόριθμος χρησιμοποιεί τις θέσεις και τις επιταχύνσεις για τη χρονική στιγμή t και τις θέσεις από τη χρονική στιγμή t-dt ώστε να υπολογίσει τις νέες θέσεις στη χρονική στιγμή t+dt. Ο Verlet αλγόριθμος είναι πολύ συμβατός, μπορεί εύκολα να προγραμματιστεί και γενικά είναι ένας απλός αλγόριθμος ενώ ως μειονέκτημά του αναφέρεται η μέτρια ακρίβεια του.

4. ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Οι θεωρητικές μελέτες των βιολογικών μορίων επιτρέπουν τη μελέτη ανάμεσα στη σχέση μεταξύ δομής, λειτουργίας και δυναμικής σε ατομικό επίπεδο. Αφού τα βιολογικά συστήματα περιλαμβάνουν πολλά άτομα, δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η κβαντική μηχανική για την αντιμετώπιση τυχόν προβλημάτων. Παρόλα αυτά, τα προβλήματα γίνονται ευκολότερα όταν γίνεται χρήση των συναρτήσεων δυναμικής ενέργειας, οι οποίες είναι λιγότερο απαιτητικές υπολογιστικά από την κβαντική μηχανική αλλά η χρήση τους κοστίζει περισσότερο σε υπολογιστικό εξοπλισμό.

Η δημιουργία των συναρτήσεων δυναμικής ενέργειας (potential energy functions ή force fields) έχει σαν συνέπεια να παρέχεται ένας ισόρροπος συμβιβασμός ανάμεσα στην ακρίβεια και την υπολογιστική αποδοτικότητα. Η ικανότητα τους να αναπαράγουν τις φυσικές ιδιότητες που μετρούνται από το πείραμα εξετάζεται. Αυτές οι ιδιότητες περιλαμβάνουν δομικά δεδομένα που προέρχονται από την κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και την NMR φασματοσκοπία, δυναμικά δεδομένα που προέρχονται από την ανελαστική σκέδαση νετρονίου και θερμοδυναμικά δεδομένα. Η ανάπτυξη ενός συνόλου παραμέτρων είναι μία πολύ επίπονη διαδικασία, που απαιτεί εκτεταμένη βελτιστοποίηση. Αυτό αποτελεί πεδίο συνεχούς έρευνας με εφαρμογές τόσο στην βασική έρευνα όσο και στην εφαρμοσμένη με έμφαση στην φαρμακευτική βιομηχανία.

Πολλές ομάδες εργάζονται τις τελευταίες δεκαετίες ώστε να δημιουργήσουν λειτουργικές φόρμες και παραμέτρους για τις συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας γενικής εφαρμογής σε βιολογικά μόρια. Ανάμεσα στα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πεδία δυνάμεων είναι το AMBER^[14,15], το CHARMM^[16,17], το GROMOS^[18,19] και το OPLS/AMBER^[20-23]. Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί για τις συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας. Ένας από τους πιο σημαντικούς είναι ότι δεν επιτρέπονται δραστικές αλλαγές στην ηλεκτρονική δομή, για παράδειγμα δεν επιτρέπεται η δημιουργία ή η διάσπαση ενός δεσμού στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.







Ολοκληρωμένες συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας είναι διαθέσιμες για μακρομοριακές προσομοιώσεις. Ένα ιδιαίτερο παράδειγμα είναι το CHARMM27^[24-25] που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προσομοιώσεις πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων, λιπιδίων και υδρογονανθράκων.

4.1 Η ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ CHARMM

Σύμφωνα με το μοντέλο δυναμικής ενέργειας CHARMM, η δυναμική ενέργεια Ε είναι συνάρτηση των ατομικών θέσεων όλων των ατόμων στο σύστημα, οι οποίες συνήθως εκφράζονται ως καρτεσιανές συντεταγμένες^[16,17,24,25]. Η τιμή της δυναμικής ενέργειας υπολογίζεται ως το άθροισμα των εσωτερικών ή δεσμευμένων όρων, Ε_{bonded}, οι οποίοι περιγράφουν τους δεσμούς, τις γωνίες και τις περιστροφές δεσμών σε ένα μόριο και των εξωτερικών ή μη δεσμικών ατόμων, Enon-bonded. Αυτοί οι όροι εξηγούν τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μη δεσμικά άτομα (nonbonded atoms) ή τα άτομα που χωρίζονται με 3 ή περισσότερους ομοιοπολικούς δεσμούς.

$$V(R) = E_{bonded} + E_{non-bonded}$$
 4.1.1

Ο όρος E_{bonded} είναι το άθροισμα τριών επιμέρους όρων, οι οποίοι ανταποκρίνονται στους τρεις τύπους κίνησης των ατόμων:

 $E_{bonded} = E_{bonded-strech} + E_{angle-bend} + E_{rotate-along-bond}$ 4.1.2



Ο πρώτος όρος στην εξίσωση 4.1.2 είναι μια αρμονική δυναμική που αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ζεύγη ατόμων όπου τα άτομα χωρίζονται με έναν ομοιοπολικό δεσμό για παράδειγμα 1,2-ζεύγη. Αυτή είναι η προσέγγιση στην ενέργεια ενός δεσμού σαν συνάρτηση της αντικατάστασης από το ιδανικό μήκος δεσμού, b₀. Η σταθερά δύναμης, K_b, εκφράζει την ισχύ του δεσμού. Το ιδανικό μήκος δεσμού b₀ και η σταθερά δύναμης Kb είναι συγκεκριμένα για κάθε ζεύγος ατόμων και εξαρτώνται από το χημικό τύπο αυτών.





$$E_{bond-stretch} = \sum_{1,2\,pairs} K_b (b-b_0)^2$$

Ο δεύτερος όρος στην εξίσωση 4.1.2 είναι επίσης μια αρμονική δυναμική που σχετίζεται με την αλλαγή της γωνίας θ από την ιδανική τιμή θ₀. Οι τιμές για τη θ₀ και τη σταθερά K_θ εξαρτώνται από το χημικό τύπο των ατόμων που αποτελούν τη γωνία. Αυτοί οι δύο όροι περιγράφουν την απόκλιση από μια ιδανική γεωμετρία και σε μια τέλεια βελτιστοποιημένη δομή, το άθροισμά τους θα έπρεπε να είναι κοντά στο μηδέν.



$$E_{bond-bend} = \sum_{angles} K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$$

4.1.4

4.1.3

Ο τρίτος όρος στην εξίσωση 4.1.2 αντιπροσωπεύει την περιστροφή μιας δίεδρης γωνίας γύρω από το μέσο δεσμό. Η δυναμική υποτίθεται ότι είναι περιοδική και συνήθως είναι συνάρτηση του συνημίτονου.





$$E_{\text{rotate-along-bond}} = \sum_{1,4 \text{ pairs}} K_{\phi} (1 - \cos(n\phi))$$

Ο ενεργειακός όρος Ε_{non-bonded} που αντιπροσωπεύει τις μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις στη δυναμική συνάρτηση CHARMM έχει δύο συστατικά, την ενέργεια αλληλεπίδρασης Van der Waals και την ηλεκτροστατική ενέργεια αλληλεπίδρασης.

$$E_{non-bonded} = E_{van-der-Waals} + E_{electrostatic}$$
 4.1.6

Η van der Waals αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ατόμων προκύπτει από μια ισορροπία ανάμεσα στις απωθητικές και τις ελκτικές δυνάμεις. Η απωθητική δύναμη οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ ηλεκτρονίων λόγω της μικρής απόστασης μεταξύ τους. Η ελκτική δύναμη προκύπτει από διακυμάνσεις στην κατανομή φορτίου στο ηλεκτρονιακό νέφος. Η διακύμανση στην ηλεκτρονιακή κατανομή ενός ατόμου ή μορίων καταλήγει σε ένα ακαριαίο δίπολο, το οποίο επάγει ένα δίπολο σε ένα δεύτερο άτομο ή μόριο καταλήγοντας σε μια ελκτική αλληλεπίδραση.

Οι επιδράσεις αυτές είναι μηδέν σε άπειρη ατομική απόσταση r και γίνονται σημαντικές όταν η απόσταση μειώνεται. Η ελκτική αλληλεπίδραση είναι μεγαλύτερη από την απωστική αλλά καθώς η απόσταση μικραίνει, επικρατεί η απωστική αλληλεπίδραση. Αυτό έχει σαν συνέπεια ένα ενεργειακό ελάχιστο. Η τοποθέτηση των ατόμων στις βέλτιστες θέσεις σταθεροποιεί το σύστημα.



4.1.5

5. ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

Σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής, η χρονικά εξαρτώμενη συμπεριφορά του συστήματος προκύπτει ολοκληρώνοντας τις εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα, χρησιμοποιώντας έναν από τους αριθμητικούς ολοκληρωτές που περιγράφηκαν προηγουμένως (κλασσική μηχανική) και τη συνάρτηση δυναμικής ενέργειας. Το αποτέλεσμα της προσομοίωσης είναι ένα σύνολο από διαμορφώσεις, οι οποίες καλούνται τροχιές (trajectories). Οι περισσότερες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πραγματοποιούνται κάτω από συνθήκες σταθερής πίεσης (P) και θερμοκρασίας (T) και με τον ίδιο αριθμό ατόμων (N), ώστε να μιμηθούν καλύτερα τις πειραματικές συνθήκες. Τα βήματα τα οποία αποτελούν μια ολοκληρωμένη πορεία προσομοίωσης μοριακής δυναμικής περιγράφονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα.





Για να αρχίσει μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής, πρέπει να επιλεγεί μια αρχική διαμόρφωση για το σύστημα, το σημείο έναρξης, που αντιστοιχεί σε χρόνο t=0. Συνήθως σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής οι αρχικές, πειραματικά προσδιορισμένες, δομές παρέχονται από την PDB βάση δεδομένων (<u>http://www.rcsb.org/pdb/</u>). Επίσης είναι πιθανό να χρησιμοποιηθεί μια θεωρητική δομή που έχει προκύψει από ομόλογη μοντελοποίηση. Η επιλογή της αρχικής διαμόρφωσης πρέπει να γίνει πολύ προσεκτικά διότι αυτή μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα της προσομοίωσης.

Πριν την έναρξη μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, είναι επίσης απαραίτητο να γίνει ενεργειακή ελαχιστοποίηση της αρχικής δομής. Αυτό οδηγεί σε μετακίνηση όλων των πιθανών ισχυρών van der Waals αλληλεπιδράσεων, που υπάρχουν και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε τοπικές δομικές παραμορφώσεις καταλήγοντας σε μια ασταθή προσομοίωση. Η ενεργειακή ελαχιστοποίηση (energy minimization) ή αλλιώς γεωμετρική βελτιστοποίηση (geometry optimization) είναι η κύρια ασχολία της μοριακής μηχανικής και αφορά την εύρεση σταθερών σημείων πάνω στην επιφάνεια δυναμικής ενέργειας. Αυτό επιτυγχάνεται με την εύρεση διαμορφώσεων που είναι πιο σταθερές από την αρχική, αφαιρώντας δηλαδή δυναμική ενέργεια από το σύστημα χωρίς να προστίθεται κινητική ενέργεια. Κατά τη διάρκεια της ενεργειακής ελαχιστοποίησης μπορούν να εφαρμοστούν διάφοροι περιορισμοί και να ληφθούν τα κατάλληλα συμπεράσματα. Πάντα πρέπει να έχουμε κατά νου ότι οι συναρτήσεις δυναμικού είναι πολυδιάστατες και η γραφική τους παράσταση είναι μια υπερεπιφάνεια. Πάνω σε αυτή την υπερεπιφάνεια υπάρχουν πολλά σταθερά σημεία, γνωστά σαν τοπικά ελάχιστα (local minimum) και ένα σημείο με τη χαμηλότερη ενέργεια, γνωστό σαν ολικό ελάχιστο (global minimum).

Στο σημείο αυτό προστίθενται διακριτά (explicit) ή μη διακριτά (implicit) μόρια νερού ώστε να επιδιαλυτωθεί η πρωτεΐνη. Αν η αρχική δομή έχει προέλθει από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, τότε είναι πολύ πιθανό μερικά νερού να είναι ήδη παρόντα, αλλά δεν είναι αρκετά για την επιδιαλύτωση της πρωτεΐνης. Τα διακριτά μόρια νερού συνήθως παρέχονται από ένα κατάλληλο μεγάλο κουτί που έχει προηγουμένως έλθει σε ισορροπία. Ολόκληρο το κουτί νερού επικαλύπτει όλη την πρωτεΐνη και εκείνα τα μόρια νερού που σκεπάζουν την πρωτεΐνη μετακινούνται. Στο σημείο αυτό, γίνεται πάλι ελαχιστοποίηση της ενέργειας, η οποία επιτρέπει στα μόρια του νερού να επαναδιευθετηθούν στο πρωτεΐνικό μόριο.

Οι αρχικές ταχύτητες σε χαμηλή θερμοκρασία καθορίζονται για κάθε άτομο του συστήματος και η προσομοίωση αρχίζει. Περιοδικά, νέες ταχύτητες προσδιορίζονται σε μια ελαφρά υψηλότερη θερμοκρασία και η προσομοίωση συνεχίζεται. Αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία. Αφού επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία, η προσομοίωση του συστήματος πρωτεΐνης-νερού συνεχίζεται προκειμένου να ελεγχθούν κάποιες ιδιότητες όπως η δομή, η πίεση, η θερμοκρασία και η ενέργεια. Αυτό το χρονικό διάστημα καλείται φάση εξισορρόπησης και διαρκεί τόσο, ώστε οι παραπάνω ιδιότητες να μην μεταβάλλονται σε σχέση με το χρόνο.

Το τελευταίο βήμα της προσομοίωσης είναι η φάση παραγωγής, που μπορεί να έχει χρονική διάρκεια από μερικές εκατοντάδες ps σε ns ή περισσότερο. Κατά τη διάρκεια της φάσης παραγωγής μπορούν επίσης να υπολογιστούν οι θερμοδυναμικές παράμετροι του συστήματος.

5.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΤΡΑ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ

Οι φυσικές ιδιότητες, που υπολογίζονται σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής, είναι συνήθως συνάρτηση των ατομικών συντεταγμένων και ταχυτήτων. Ένα πείραμα συνήθως εκτελείται σε ένα μακροσκοπικό δείγμα που περιέχει ένα πολύ μεγάλο αριθμό ατόμων ή μορίων με ένα τεράστιο αριθμό διαμορφώσεων.



Μακροσκοπικό Επίπεδο



Για παράδειγμα, για μια γενική φυσική ιδιότητα Α, η οποία μεταβάλλεται με το

χρόνο t,

$$A(t) = f(r_1(t), ..., r_N(t), ..., v_N(t))$$



5.1.1

ο μέσος όρος <A> δίνεται από τη σχέση 5.1.2 :

$$\langle A \rangle = \frac{1}{N_T} \sum_{t=1}^{N_T} A(t)$$
 5.1.2

όπου Ν_τ είναι ο συνολικός αριθμός των βημάτων της μοριακής δυναμικής. Οι πιο συνήθης μετρούμενες φυσικές ιδιότητες είναι οι εξής:

- Ολική Δυναμική Ενέργεια
- α Κινητική Ενέργεια
- Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης
- Θερμοκρασία
- Η τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής του τετραγώνου της απόκλισης, RMSD (Root Mean Square Deviation)
- Ακτίνα Περιστροφής (radius of gyration)

Το RMSD (Root Mean Square Distance or Deviation) είναι ο πιο γνωστός εκτιμητής δομικής ποιότητας ανάμεσα σε ισοδύναμα άτομα και υπολογίζεται μετά από υπέρθεση των δομών που πρόκειται να συγκριθούν.Το RMSD υπολογίζεται από τη σχέση 5.1.3:

$$\mathbf{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \left(\left| \mathbf{r}_{i}^{\text{mod el}} - \mathbf{r}_{i}^{\text{real}} \right| \right)^{2}}$$
 5.1.3

όπου r^{reel} είναι η θέση του C^a του ατόμου i της πρωτεΐνης-εκμαγείου και r^{model} είναι η θέση του C^a του αντίστοιχου ατόμου I της πρωτεΐνης-μοντέλου. Ν είναι ο αριθμός των C^a ατόμων της πρωτεΐνης.

Η ακτίνα περιστροφής αποτελεί επίσης έναν δείκτη για την εκτίμηση των δομικών διαφορών σε μια πρωτεΐνη. Ορίζεται σαν το μέσο σταθμικό βαθμωτό μήκος (mass weighted scalar length) για κάθε άτομο της πρωτεΐνης από το κέντρο μάζας του (centre of mass, COM). Η ακτίνα περιστροφής υπολογίζεται από τη σχέση 5.1.4:

$$\mathbf{r}_{gyration} = \sqrt{\frac{\sum r^2 \cdot \mathbf{m}}{\sum \mathbf{m}}}$$

5.1.4



5.2 ΣΥΝΑΡΤΗΣΙΑΚΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΔΙΑΛΥΤΗ

Η αξιόπιστη μοντελοποίηση των βιολογικών μακρομορίων σε διάλυμα χρησιμοποιώντας τη μοριακή μηχανική απαιτεί ρεαλιστικά μοντέλα για την αλληλεπίδραση του διαλύτη με το εκάστοτε μόριο^[26-29]. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί τα διακριτά μοντέλα διαλύτη (explicit solvent models) και τα μη διακριτά μοντέλα διαλύτη (implicit solvent models).

Διακριτά μοντέλα διαλύτη

Τα διακριτά μοντέλα διαλύτη (explicit solvent models) βασίζονται στην χρήση εκατοντάδων ή χιλιάδων διακριτών μορίων διαλύτη^[30]. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν τα διακριτά μοντέλα διαλύτη είναι ευρέως διαδεδομένες για την πραγματοποίηση προσομοιώσεων σε διαλύτη^[31-33]. Τέτοιοι υπολογισμοί γίνονται σχετικά αργά λόγω του μεγάλου αριθμού των ατόμων που συμμετέχουν. Επειδή τα διακριτά μοντέλα διαλύτη είναι πολύ απαιτητικά υπολογιστικά, υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για τα λιγότερο απαιτητικά μη διακριτά μοντέλα διαλύτη^[34,35].

Μη διακριτά μοντέλα διαλύτη

Τα μη διακριτά μοντέλα διαλύτη (implicit solvent models) μεταχειρίζονται το διαλύτη σαν ένα συνεχές μέσο, το οποίο έχει τις μέσες ιδιότητες του πραγματικού διαλύτη και περιβάλλει το διαλυτοποιημένο μόριο αρχίζοντας από την επιφάνεια van der Waals^[36-39]. Διάφορα συνεχή μοντέλα έχουν περιγραφεί τα τελευταία χρόνια μεταξύ των οποίων το γενικευμένο μοντέλο του Born (GB, Generalized Born)^[40-44], το SA (surface area) μοντέλο^[45,46] και ο συνδυασμός τους GB/SA^[40,47].



Εικόνα 3: Προσομοίωση μοριακής δυναμικής για μια μικρή πρωτεΐνη. (A) Απεικόνιση στο εσωτερικό του κουτιού προσομοίωσης, το οποίο περιλαμβάνει διακριτά (explicit) μόρια νερού. (B) Απεικόνιση στο εσωτερικό του κουτιού προσομοίωσης, στο οποίο η επίδραση των μορίων του νερού γίνεται αισθητή στην πρωτεΐνη μέσω δυνάμεων (implicitly).



Στην πρώτη περίπτωση το συνολικό σύστημα αποτελείται από 1229 άτομα για την πρωτεΐνη και 6009 άτομα για το νερό, ενώ στη δεύτερη το συνολικό σύστημα αποτελείται μόνο από τα 1229 άτομα της πρωτεΐνης.

5.3 H EEIZOZH POISSON-BOLTZMANN

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις παίζουν ουσιαστικό ρόλο σε όλες τις βιοχημικές διαδικασίες. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να διερευνηθούν στη βάση θεωρητικών μοντέλων χρησιμοποιώντας την εξίσωση Poisson-Boltzmann (PB). Η εξίσωση Poisson-Boltzmann (PB) χρησιμοποιείται κατά παράδοση για την εύρεση του ηλεκτροστατικού δυναμικού γύρω από ένα μακρομόριο^[48-51]. Ένα κλασικό PB μοντέλο αγνοεί τον όγκο των ιόντων στο μέσο. Επιπλέον, η εξίσωση PB είναι έγκυρη για ασθενή ιοντικά διαλύματα π.χ. συγκέντρωσης <0.15 Μ. Αυτό το μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των ιδιοτήτων των μορίων σε διάλυμα.

Το PB μοντέλο ερμηνεύει την μη διακριτότητα των μορίων του διαλύτη (solvent molecules implicitly) μέσω της διηλεκτρικής σταθεράς που είναι χαμηλή μέσα στο μόριο και θεωρείται ότι αυξάνεται σταδιακά μακριά από το μόριο ενδιαφέροντος. Διαλύματα σε απλά προβλήματα με σφαιρική, κυλινδρική ή επίπεδη συμμετρία είναι διαθέσιμα για την γραμμική PB εξίσωση^[52].

Αν ένα μόριο μπορεί να αναπαρασταθεί σαν μια κοιλότητα διαλυμένης ουσίας με φορτισμένα άτομα μέσα σε αυτήν, τα οποία περιβάλλονται από το διαλύτη, η εύρεση του ηλεκτροστατικού δυναμικού γύρω από το μόριο επιτυγχάνεται με την εξίσωση 5.3.1:

$$\overline{V}(\varepsilon(\vec{r})\overline{V}\phi(\vec{r})) - \varepsilon(\vec{r})\kappa^2(\vec{r})\sinh\phi(\vec{r}) = -(4\pi/kT)\rho(\vec{r})$$
 5.3.1

όπου $\varepsilon(\vec{r})$ είναι η διηλεκτρική σταθερά, $\phi(\vec{r})$ είναι το αδιάστατο ηλεκτροστατικό δυναμικό (σε μονάδες kT/e, όπου k είναι η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, e το μέγεθος του φορτίου του ηλεκτρονίου, ρ(r) η πυκνότητα του ελεύθερου φορτίου (σε μονάδες e) και $\kappa^2(\vec{r}) = 8\pi l/\varepsilon(\vec{r}) kT$ (όπου l=e²c η ιονική ισχύς του καθαρού διαλύματος και c η συγκέντρωση του διαλύματος).

Κατά την προσπάθεια επίλυσης της PB εξίσωσης με τη χρήση αριθμητικών μεθόδων για συστήματα με πολύπλοκες μοριακές γεωμετρίες και κατανομές φορτίου, παρουσιάστηκαν πολλές προκλήσεις^[53-57]. Λόγω του υψηλού υπολογιστικού κόστους επίλυσης των εξισώσεων PB, η χρήση τους περιορίστηκε για πολλές εφαρμογές συμπεριλαμβανομένης και της μοριακής δυναμικής. Αναλυτικές προσεγγίσεις της εξίσωσης PB, όπως το συνεχές μοντέλο GB/SA έχουν ευρεία χρήση.

5.4 ΤΟ ΣΥΝΕΧΕΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΔΙΑΛΥΤΩΣΗΣ GB/SA

Η ακριβής μοντελοποίηση μορίων σε διάλυμα χρησιμοποιώντας τη μοριακή μηχανική αποτελεί ένα προκλητικό πρόβλημα διότι ο διαλύτης είναι ένα εκτεταμένο μέσο που περιλαμβάνει ένα αστρονομικό ποσό καταστάσεων χαμηλής ενέργειας. Για το χειρισμό ενός τέτοιου μέσου έχουν αναπτυχθεί μοριακά και συνεχή μοντέλα του διαλύτη. Τα μοριακά μοντέλα διαλύτη αποτελούνται από εκατοντάδες ή χιλιάδες διακριτά μόρια διαλύτη και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εκτέλεση προσομοιώσεων σε υγρά περιβάλλοντα. Ωστόσο πολλές από τις ιδιότητες των μετάλλων έχουν αναπαραχθεί λόγω του μεγάλου αριθμού των στοιχείων που μετέχουν και των καταστάσεων που εμπλέκονται. Στην πραγματικότητα οι μοριακό υπολογισμοί απαιτούν περισσότερο CPU χρόνο. Λόγω του ότι τα μοριακά μοντέλα σιαλύτη είναι τόσο απαιτητικά υπολογιστικά, αναπτύχθηκαν τα περισσότερο γρήγορα συνεχή μοντέλα επιδιαλύτωσης.

Τα συνεχή μοντέλα επιδιαλύτωσης χειρίζονται το διαλύτη σαν ένα συνεχές μέσο που έχει τις μέσες ιδιότητες του πραγματικού διαλύτη και περιβάλλει την διαλυμένη ουσία αρχίζοντας στην van der Waals επιφάνειά της ή κοντά σε αυτήν. Τέτοια μοντέλα παρέχουν τις επιδράσεις της διαλυτοποίησης με σχετικά μικρή υπολογιστική προσπάθεια, αφενός διότι οι ιδιότητες ενός αναλυτικού συνεχούς διαλύτη συγκλίνουν με τη φύση αφετέρου διότι το μοντέλο δεν περιλαμβάνει άλλα άτομα εκτός από εκείνα της διαλυμένης ουσίας. Πολλά συνεχή μοντέλα επιδράσεις της διαλυμένης μέθοδοι ώστε να υπολογισθούν η συνολική ελεύθερη ενέργεια επιδιαλύτωσης (Gsolv), η ελεύθερη ενέργεια των ηλεκτροστατικών επιδράσεων μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη (G_{cav}) και ο όρος αλληλεπίδρασης van der Waals (Gvdw) μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη. Εξαιτίας των αδυναμών που εμφάνισαν τα συνεχή μοντέλα επιδιαλύτωσης δημιουργήθηκε το συνεχές μοντέλο επιδιαλύτωσης GB/SA (Generalized Born/Surface Area)^[40,47].

Στο συνεχές μοντέλο επιδιαλύτωσης GB/SA, η συνολική ελεύθερη ενέργεια επιδιαλύτωσης εκφράζεται από το άθροισμα τριών ενεργειακών όρων ως εξής:

 $G_{solv} = G_{cav} + G_{vdW} + G_{pol}$

5.4.1



Επειδή οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες και τα μη πολικά μόρια έχουν Gpol≈ 0 και η Gsolv στο νερό είναι γραμμική εξάρτηση της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (Solvent-Accessible Surface Area), το μοντέλο GB/SA υπολογίζει το άθροισμα Gcav + Gvdw, εκτιμώντας έτσι την επιφάνεια που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη, ως εξής:

$$G_{cov} + G_{wdW} = \sum_{k=1}^{N} ASP(k)ASA(k)$$
 5.4.2

όπου ASA(k) είναι η συνολική επιφάνεια που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη για όλα τα άτομα του τύπου k και ASP(k) (σ_κ) είναι μια εμπειρικά προσδιοριζόμενη παράμετρος επιδιαλύτωσης. Για υδρόφοβα άτομα και με επιφάνεια περίπου 1.4 Å έξω από την van der Waals επιφάνεια , το σ_κ (ASP(k)) έχει τιμή ~0.01Kcal/mol Å². Ο όρος Gpol προκύπτει από την πόλωση του συνεχούς του διαλύτη λόγω της κατανομής του φορτίου της διαλυμένης ουσίας.

Για τον υπολογισμό του Gpol (Kcal/mol) η γενικευμένη εξίσωση του Born τροποποιήθηκε ώστε να μπορούν να μελετηθούν και διαλυμένες ουσίες ακανόνιστου σχήματος ως εξής:

$$G_{pol} = -166.0 \left(1 - \frac{1}{\varepsilon} \right) \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{N} \frac{q_i q_j}{\sqrt{r_{ij}^2 + \alpha^2_{ij}} \exp\left(-\frac{r_{ij}^2}{4\alpha^2_{ij}}\right)}$$
 5.4.3

όπου $a_{ij} = (a_i a_j)^{0.5}$, $D_{ij} = r^2_{ij} / (2a_{ij})^2$, r_{ij} η απόσταση μεταξύ των ατόμων i και j με φορτία q_i και q_j αντίστοιχα, ε η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη και α_i η ακτίνα του Born για το άτομο i. Αν και η εξίσωση αυτή φαίνεται απλή, ωστόσο απαιτεί μια ακτίνα του Born (a) για κάθε άτομο διαλυμένης ουσίας έχοντας ένα ατομικό φορτίο ή μερικό φορτίο.

Για μια απλή σφαιρική διαλυμένη ουσία με ένα φορτίο τοποθετημένο στο κέντρο του (π.χ. το μοντέλο ενός μεταλλικού ιόντος), η ακτίνα α μπορεί απλά να θεωρηθεί σαν την van der Waals ακτίνα της διαλυμένης ουσίας. Για πιο πολύπλοκες σχηματικά ουσίες, η ακτίνα του Born για το άτομο i (α_i) εξαρτάται από τις θέσεις και τους όγκους των άλλων ατόμων της ουσίας επειδή επιδεικνύουν την διηλεκτρική σταθερά του μέσου. Η ακτίνα του Born ενός φορτισμένου στοιχείου στην πραγματικότητα δεν είναι τόσο μια ακτίνα καθώς είναι ένα είδος μέσης απόστασης από το ατομικό φορτίο στην περιοδικότητα του διηλεκτρικού μέσου. Για συγκεκριμένα απλά συστήματα η τιμή του α είναι προφανής. Για παράδειγμα, η α για ένα άτομο στο κέντρο ενός σφαιρικού μακρομορίου θα ήταν η ακτίνα του μακρομορίου, ενώ είναι πολύ πολύπλοκο να εκτιμηθεί για συστήματα που περιλαμβάνουν ακανόνιστα σχήματα.

6. Η ΜΕΘΟΔΟΣ LIE ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΠΟ ΜΟ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ

Μια από τις κύριες προκλήσεις στον υπολογιστικό σχεδιασμό υποκαταστατών είναι ο υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης του συμπλόκου υποδοχέαυποκαταστάτη. Πολλές υπολογιστικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί, όπως η μοριακή μηχανική (MM), οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD), και οι Monte Carlo (MC) υπολογισμοί. Το 1998 οι Merelius και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν την μέθοδο LIE (Linear Interaction Energy) για την πρόβλεψη της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ενός συμπλόκου υποδοχέα-υποκαταστάτη, η οποία βασίζεται κυρίως σε MD προσομοιώσεις^[58,59].

Η ιδέα ήταν να θεωρηθεί η απόλυτη ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ενός υποκαταστάτη (ligand, l) σαν την αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια όταν ο υποκαταστάτης μεταφέρεται από την ελεύθερη κατάσταση, στην οποία βρίσκεται, στην συμπλεγμένη κατάσταση, δηλαδή,

$$\Delta G_{bind} = \Delta G^{P}_{sol}(l) - \Delta G^{w}_{sol}(l)$$
6.1

όπου οι εκθέτες p και w υποδηλώνουν την πρωτεΐνη (υποδοχέα) και το νερό (διαλύτη) αντίστοιχα. Η ενέργεια επιδιαλύτωσης ενός υποκαταστάτη σε ένα περιβάλλον, ΔG^I sol</sub>(I), αντικατοπτρίζει τη διαδικασία μεταφοράς του μορίου από την αέρια φάση στο περιβάλλον αυτό. Αυτή η διαδικασία μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο ξεχωριστά βήματα: (α) τη δημιουργία της μοριακής van der Waals κοιλότητας στο συγκεκριμένο περιβάλλον και (β) τη διέγερση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο μόριο και τα περιβάλλοντα μόρια (πρωτεΐνη-υποδοχέας, διαλύτης, ιόντα κ.λ.π.).

Η μέθοδος LIE συνυπολογίζοντας το ηλεκτροστατικό μέρος της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης καθώς και τις μη πολικές συνεισφορές κατά την πρόσδεση, όπως για παράδειγμα τις υδρόφοβες και τις van der Waals αλληλεπιδράσεις, εκτιμά ότι η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ακολουθεί τη γενική σχέση 6.2:



$$\Delta G_{bind} = \alpha \Delta \langle V^{vdv}_{l-s} \rangle + \beta \Delta \langle V^{el}_{l-s} \rangle + \gamma \qquad 6.2$$

όπου < > δηλώνει τους μέσους όρους των van der Waals (vdw) και των ηλεκτροστατικών (el) αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στον υποκαταστάτη και τον υποδοχέα (l-s), όπως προέκυψαν από MD προσομοιώσεις ή Monte Carlo υπολογισμούς. Το Δ στην εξίσωση 6.2 δηλώνει τη διαφορα των μέσων όρων του δυναμικού van der Waals και του ηλεκτροστατικού δυναμικού του υποκαταστάτη όταν αυτός βρίσκεται στην ελεύθερη και στη δεσμευμένη κατάσταση δηλαδή,

$$\Delta G_{band} = \alpha(\langle V^{vdw}_{l-s}bound > - \langle V^{vdw}_{l-s}free \rangle) + \beta(\langle V^{el}_{l-s}bound > - \langle V^{el}_{l-s}free \rangle) + \gamma$$

Τα α και β στην παραπάνω εξίσωση είναι συντελεστές για την συνεισφορά των μη πολικών και πολικών αλληλεπιδράσεων στην ενέργεια πρόσδεσης και το γ είναι μια επιπλέον σταθερά. Πειραματικές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι τιμές για τις παραμέτρους α, β και γ είναι περίπου σταθερές και ίσες με 0.16, 0.5 και 0 για ένα μεγάλο αριθμό συμπλόκων^[60].



- 1. Alder B.J., Waiwright T.E., 'Phase transition for a hard sphere system', J Chem Phys, 1957, 27, 1208-1209.
- 2. Alder B.J., Waiwright T.E., 'Studies in molecular dynamics. I. General method', J Chem Phys, 1959, 31, 459-466.
- 3. Rahman A., 'Correlations in the motion of atomsin liquid argon', Phys Rev, 1964, A136, 405-411.
- 4. Stillinger F.H., Rahman A., 'Improved simulation of liquid water by molecular dynamics', J Chem Phys, 1974, 60, 1545-1557.
- 5. McCammon J.A., Geling B.R., Karplus M., 'Dynamic of folded proteins', Nature, 1977, 267, 585, 590.
- Hansson T., Oostenbrink DC., van Gunsteren W.F., 'Molecular dynamics simulations', Curr Opin Struct Biol, 2002, 12, 190-196.
- 7. Karplus M., 'Molecular dynamics of Biological Macromolecules: A brief History and Perspective', Biopolymers, 2003, **68**, 350-358.
- 8. Wilde R.E., Singh S., Statistical Mechanics, Fundamentals and Modern Applications (John Wiley & Sons, Inc, NY, 1998)
- 9. Φυσικοχημεία, Κατσάνος.
- 10. Beeman D., 'Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations', J Comput Phys, 1976, **20**, 130-139.
- 11. Levitt M., Meirovitch H., 'Integrating the equations of motion', J Mol Biol, 1983, 168, 617-620.
- 12. Verlet L., 'Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lenard-Jones molecules', Phys Rev, 1967, **159(1)**, 98-103.
- 13. Verlet L., 'Computer experiments on classical fluids. II. Equilibrium correlation functions', Phys Rev, 1968, 165(1), 201-214.
- Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R, Merz K.M, Ferguson Jr.D.M., Spellmeyer D.C, Fox T., Caldwell J.W., Koliman P.A., 'A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules', J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 5179-5197.
- 15. Cheatham III T.E., Cieplak P., Kollman P.A., 'A Modified Version of the Cornell et al. Force Field with Improved Sugar Pucker Phases and Helical Repeat', J. Biomol. Struct. Dyn., 1999, **16**, 845-862.
- 16. Nilsson L., Karplus M., 'Empirical Energy Functions for Energy Minimizations and Dynamics of Nucleic Acids', J. Comput. Chem., 1986, **7**, 591-616.



- MacKerell, Jr A.D., Wiorkeiwicz-Kuczera J., Karplus M., 'An All-Atom Empirical Energy Function for the Simulation of Nucleic Acids', J. Am. Chem. Soc, 1995, 117, 11946-11975.
- MacKerrell, Jr, A.D., et al., 'All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins', J. Phys. Chem. B, 1998, 102, 3586-3616.
- Hermans, J., Berendsen, H. J. C., van Gunsteren, W. F., Postma, J. P. M., 'A Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions', Biopolymers, 1984, 23, 1.
- 20. van Gunsteren, W.F., Daura X., Mark A.E., 'The GROMOS force field', Encyclopaedia of Computational Chemistry, 1997.
- Jorgensen, W. L., & Tirado-Rives, J., 'The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimization for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin', J. Am. Chem. Soc., 1988, 110, 1657-1666.
- 22. Jorgensen, W.L.; Maxwell, D.S. and Tirado-Rives, J., 'Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids', J. Am. Chem. Soc., 1996, **118**, 11225-11236.
- 23. Damm, W., Frontera A., Tirado-Rives J., Jorgensen W. L., 'OPLS All-Atom Force Field for Carbohydrates', J. Comp. Chem., 1997, **18**, 1955-1970.
- Ha S.N, Giammona A., Field M., Brady J.W., 'A revised potential-energy surface for molecular mechanics studies of carbohydrates', Carbohydr. Res., 1988, 180(2), 207-221.
- 25. Schlenkrich M., Brickmann J., MacKerell Jr. A.D., Karplus M., 'An Empirical Potential Energy Function for Phospholipids: Criteria for Parameter Optimization and Applications, in Biological Membranes: A Molecular Perspective from Computation and Experiment', K. M. Merz, Jr. and B. Roux, editors (Birkhauser), 1996, 31-81.
- 26. Still, WC, Tempczyk, A, Hawley, RC, Hendrickson, T., 'Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics', J. Am. Chem. Soc, 1991, 112, 6127-6129.
- 27. Orzco, M and Luque, FJ., 'Theoretical methods for the description of the solvent effect in biomolecular systems', *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 4187-4225.
- 28. Cheatham, TE and Kollman, PA., ' Molecular dynamics simulation of nucleic acids, Ann. Rev. Phys. Chem., 2000, **51**, 435-471.
- 29. Makarov, V, Pettit, BM and Feig, M., 'Solvation and hydration of proteins and nucleic acids: A theoretical view of simulation and experiment', Accounts of Chem. Res., 2002, 35, 376-384.



- 30. Bizzarri, AR and Cannistraro, S.,' Molecular dynamics of water at the proteinsolvent interface', J. Phys. Chem. B, 2002, **106**, 6617-6633.
- 31. Garcia A.E., Sanbonmatsu K.Y., 'Exploring the energy landscape of a βhairpin in explicit solvent', Proteins, 2001, 42, 354-354.
- 32. Gibas C.J., Subramaniam S., 'Explicit solvent models in protein pKa calculations', Biophys. J., 1996, **71(1)**, 138-147.
- 33. Nymeyer H., Garcia A.E., 'Simulation of the folding equilibrium of α-helical peptides: A comparison of the generalized Born approximation with explicit solvent', PNAS, 2003, **100(24)**, 13934-13939.
- 34. Wagoner J., Baker N.A., 'Solvation forces on Biomolecular Structures: A comparison of explicit solvent and Poisson-Boltzmann models', J. Comp. Chem., 2004, 25, 1623-1629.
- 35. Zhang L.Y., Gallichio ., Friesner R.A., Levy R.M., 'Solvent models for proteinligand binding: Comparison of Implicit Solvent, Poisson and Surface Generalized Born Models with Explicit Solvent Simulations', J Comp Chem, 2001, 22(6), 591-607.
- Roux B., Simonson T., 'Implicit Solvent Models', Biophys. Chem., 1999, 78, 1-20.
- 37. Feig M., Brooks III C.L., 'Recent advances in the development and application of implicit solvent models in biomolecule simulations', Curr. Opin Struct. Biol., 2004, 14, 217-224.
- 38. Jaramillo A., Wodak S.J., 'Computational protein design is a challenge for implicit solvation models', Biophys. J.Biofast, 2004, 1-61.
- 39. Ferrara P., Apostolakis J., Caffisch A., 'Evaluation of a fast implicit solvent model for molecular dynamics simulations', Proteins, 2002, 46, 24-33.
- 40. Qiu, D, Shenkin, PS, Hollinger, FP and Still, W.C., 'The GB/SA continuum model for solvation. A fast analytical method for the calculation of approximate Born radii', J. Phys. Chem. A, 1997, **101**, 3005-3014.
- 41. Dominy, B.N., Brooks III C.L., 'Development of a generalized Born model parameterization for proteins and nucleic acids', J. Phys. Chem. *B*, 1999, **103**, 3765-3773.
- 42. Tsui, V., Case, D.A., 'Molecular dynamics simulations of nucleic acids with a generalized born solvation model,' J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 2489-2498.
- Tsui, V. and Case D.A., 'Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations', Biopolymers, 2000, 56, 275-291.



- 44. Lee M.S., Salsbury F.R, Brooks III C.L. 'Novel generalized Born methods', J. Chem. Phys., 2002, 116, 10606-10614.
- 45. Ooi T., Oobatake M., Nemethy G., Scheraga H.A., 'Accessible Surface Areas as a Measure of the Thermodynamic parameters of Hydration of Peptides', PNAS, 1987, 84, 3086-3090.
- Wesson L., Eisenberg D., 'Atomic Solvation Parameters applied to Molecular Dynamics of Proteins in solution', Prot. Sci., 1992, 1, 227-235.
- 47. Zhu J., Shi Y., Liu H., 'Parametrization of a generalized Born/solvent accessible surface area model and applications to the simulation of protein dynamics', J. Phys. Chem. B, 2002, 106, 4844-4853.
- 48. Wang W.Z., Li G.Z., Guan D.R., Yi X.Z., Lu A.J., 'The surface potential of a spherical colloid particle: Functional Theoretical Approach', J. Colloid Interface Sci., 2002, 246(2), 302-308.
- Fogolari F., Brigo A., Molinari H., 'The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: A tool for structural biology', J. Mol. Recognit., 2002, 15(6), 377-392.
- 50. Fogolari F., Esposito G., Viglino P., Molinari H., 'Molecular mechanics and dynamics of biomolecules using a solvent continuum model', J. Comput. Chem., 2001, 22(15), 1830-1842.
- 51. Dennis S., Camacho C.J., Vajda S., 'Continuum electrostatic analysis of preferred solvation sites around proteins solution', Proteins, 2000, 38(2), 176-188.
- Fogolari F., Zuccato P., Esposito G., Viglino P., 'Biomolecular electrostatics with the linearized Poisson-Boltzmann equation', Biophys. J., 1999, 76(1), 1-16.
- 53. MacGillirra A.D., 'Assymptotic solution of the Poisson-Boltzmann equation for a charged sphere, and implications', J. Theor. Biol., 1969, 23(2), 205-217.
- 54. Marshall E.A., 'On the exact analytical solution of the Poisson-Boltzmann equation', Biophys. J., 1980, 30(2), 317-325.
- 55. Yoon B.J., 'Integral equation approach for solving the non-linear Poisson-Boltzmann equation', J. Colloid Interface Sci., 1997, 192(2), 503-504.
- Lopez-Garcia J.J., Horno J., Grosse C., 'Numerical solution of the Poisson-Boltzmann equation for a spherical cavity', J. Colloid Interface Sci., 2002, 251(1), 85-93.
- 57. Hofinger S., 'Solving the Poisson-Boltzmann equation with a specialized computer chip MD-Grape-2', J. Comput. Chem., 2005, 26(11), 1148-1154.



- Marelius, J., Hansson, T., Aqvist, J., 'Calculation of ligand binding free energies from molecular dynamics simulations', Int. J. Quant. Chem., 1998, 69, 77-88.
- 59. Hansson, T., Marelius, J., Aqvist, J., 'Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods', J. Comp-Aided Mol. Des., 1998, 12, 27-35.
- 60. Aqvist, J., Luzhkov, V.B., Brandsal, B.O., 'Ligand binding affinities from MD simulations', Acc. Chem. Res., 2002, 35, 358-365.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η κυτταρική ανοσολογική απόκριση που γίνεται από τα Τ κύτταρα ξεκινάει με τη δέσμευση αντιγονικών θραυσμάτων από τους αντιγονικούς υποδοχείς των Τ κυττάρων (TCR). Τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο μόνο όταν αυτό παρουσιαστεί στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) σε σύμπλεξη με τις πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα Τ κύτταρα διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο σε ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις κατά ασθενειών, όπως οι μολυσματικές ασθένειες, ο καρκίνος, οι αλλεργίες και τα αυτοάνοσα νοσήματα. Ο προσδιορισμός των Τ κυτταρικών επιτόπων για πρωτεΐνες του MHC τάξης ΙΙ αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για τον σχεδιασμό εμβολίων και την ανάπτυξη Τ κυτταρικών αναστολέων ως ανοσοθεραπευτικών σε αυτοάνοσες παθήσεις.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν ο ακριβής προσδιορισμός των Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου, που είναι ο κύριος στόχος της ανοσολογικής απόκρισης σε ασθενείς με Σύνδρομο Sjögren's (SS) και με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (SLE), σε σχέση με τα μόρια τάξης ΙΙ DQ2 (HLA-DQA1*0501/DQB1*0201) και DQ7 (HLA-DQA1*0501/DQB1*0201), με υπολογιστικές μεθόδους.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός υπολογιστικών μεθόδων, ο οποίος περιλάμβανει:

Χρήση της τεχνικής της ομόλογης μοντελοποίησης προκειμένου να μοντελοποιηθούν τα μόρια DQ2 και DQ7 δεδομένου ότι δεν έχει επιλυθεί πειραματικά η δομή τους μέχρι τώρα. Για την μοντελοποίηση των DQ2 και DQ7 μορίων χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο η κρυσταλλικά προσδιορισμένη δομή του μορίου DQ8.

Εφαρμογή τριών διαφορετικών υπολογιστικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου. Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται σε ένα γενικό μοτίβο αλληλουχίας, κοινό για Τ επιτόπους (Taylor προσέγγιση), στις πολλαπλές ποσοτικές μήτρες (TEPITOPE πρόγραμμα) και στα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (MULTIPERD πρόγραμμα).

Δομικός έλεγχος των συμπλοκών DQ2-επίτοπος και DQ7-επίτοπος με το υπολογιστικά προγράμματα TEPITOPE και MHCPred.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A WAY AND THE ALL SURVING

語。ときないの語を認定するという



ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII

OMOΛΟΓΗ MONTEΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ DQ2 KAI DQ7 ME BAΣΗ ΤΟ DQ8



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα MHC μόρια είναι πεπτιδικοί υποδοχείς. Η λειτουργία τους είναι να συλλέγουν αντιγονικά πεπτίδια μέσα από το κύτταρο και να τα μεταφέρουν στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου το σύμπλοκο MHC--πεπτιδίου αναγνωρίζεται από υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων και αρχίζει η ανοσολογική απόκριση. Η πιο δημιουργική προσέγγιση για να κερδίσουμε πληροφορίες για την δομή και τη λειτουργία των MHC μορίων, τα οποία έχουν δεσμεύσει ή όχι κάποιο πεπτίδιο, είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Βιβλιογραφικές μελέτες δείχνουν ότι σε αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (SLE) και το σύνδρομο Sjogren's (SS), η ανοσολογική απόκριση σχετίζεται με MHC μόρια τάξης ΙΙ και στρέφεται κυρίως εναντίον του αυτοαντιγόνου La-SS/B. Πιο συγκεκριμένα στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν τα μόρια DQ2 (HLA-DQA1*501/DQB1*201) και DQ7 (HLA-DQA1*501/DQB1*301).

Η δομή του μορίου DQ7 είχε προβλεφθεί στο παρελθόν από τον Ρούτσια και τους συνεργάτες του χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μοντέλο το κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένο HLA-DR μόριο. Πρόσφατα ο Lee και οι συνεργάτες του κατάφεραν με τη χρησιμοποίηση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ να προσδιορίσουν την τρισδιάστατη δομή του μορίου HLA-DQ8 (PDB code: 1JK8), που ήταν συμπλοκοποϊημένο με ένα ανοσοεπικρατές πεπτίδιο της ινσουλίνης Β. Το μόριο αυτό παρουσιάζει 96% και 91% ομολογία για την β-αλυσίδα των μορίων DQ7 (DQB1*301) και DQ2 (DQB1*201) αντίστοιχα και 90% για την α-αλυσίδα (DQA1*501) που είναι ίδια και στα δυο μόρια και αποτελεί το ιδανικότερο μόριο-μήτρα για την πρόβλεψη της δομής των μορίων DQ2 και DQ7 με τη χρήση της τεχνικής της ομόλογης (ή συγκριτικής) μοντελοποίησης.

2. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΗLA-DQ2 ΚΑΙ DQ7

Η διαδικασία εύρεσης της ομολογίας των μορίων DQ2 και DQ7 με άλλα, κατά προτίμηση HLA-DQ, μόρια των οποίων η δομή έχει επιλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (ή με NMR φασματοσκοπία), περιέλαβε αρχικά την εισαγωγή στη βάση δεδομένων NCBI (National Centre for Biotechnology Information) (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>) και στη συνέχεια την επιλογή του εργαλείου ανάλυσης δεδομένων BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Επιλέχθηκε το Protein-Protein BLAST (BLASTp), από τους διάφορους τύπους του BLAST ως το πιο κατάλληλο, προκειμένου να βρεθεί ποιες δομές μορίων εμφανίζουν την μεγαλύτερη ομολογία στην πρωτοταγή τους δομή με τα DQ2 και DQ7 μόρια και έχουν καταγραφεί στην PDB βάση δεδομένων για πρωτεΐνες. Κατά την πρόβλεψη το πρόγραμμα λαμβάνει υπόψη αλληλουχίες που προέρχονται από όλα τα είδη οργανισμών και περιέχονται στην PDB βάση δεδομένων και χρησιμοποιεί την μήτρα BLOSUM62 για την εκτίμηση της ποιότητας της ομολογίας μεταξύ ενός ζεύγους πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Εν συνεχεία, εισάγονται διαδοχικά οι αλληλουχίες των αλυσίδων α και β για τα μόρια DQ2 και DQ7 και γίνεται αυτόματα η πρόβλεψη.

Ο αριθμός των αλληλουχιών που παρουσίασαν ομολογία ως προς την πρωτοταγή δομή της α-αλυσίδας του DQ2, ή/και του DQ7, ήταν αρκετά μεγάλος και δεν είναι σκόπιμο να παρουσιαστεί εδώ. Η αλληλουχία που εμφάνισε την υψηλότερη ομολογία προήλθε από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου μεταξύ του ανθρώπινου HLA-DQ8 με ένα πεπτίδιο της ινσουλίνης B.

a-chain DQ7 VADHVASYGVNLYQSYGPSGQYTHEFDGDEQFYVDLGRKETVWCLPELROFRGFDPOFAL 63 a-chain DO2 VADHVASYGVNLYQSYGPSGQYTHEFDGDEQFYVDLGRKETVWCLPELRQFRGFDPQFAL 63 a-chain DQ8 VADHVASYGVNLYQSYGPSGQYSHEFDGDEEFYVDLERKETVWQLPLFRRFRRFDPOFAL 60 a-chain DQ7 TNIAVLKHNLNSLIKRSNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNTLICLVDNIFPPVVNIT 123 a-chain DQ2 TNIAVLKHNLNSLIKRSNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNTLICLVDNIFPPVVNIT 123 a-chain DQ8 TNIAVLKHNLNIVIKRSNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNTLICLVDNIFPPVVNIT 120 a-chain DQ7 WLINCHSVIEGVSETIFLSKSDHSFFKISYLILLPSAEESYDCKVEHWGLDKPLLKHWEP 183 a-chain DQ2 WLTNGHSVTEGVSETTFLSKSDHSFFKISYLTLLPSABESYDCKVEHWGLDKPLLKHWEP 183 a-chain DQ8 WLSNGHSVTECVSETSFLSKSDHSFFKISYLTFLPSDDEIYDCKVEHWGLDEPLLKHWEP 180 a-chain D07 E 184 α-chain DQ2 E 184

Εικόνα 1: Σύγκριση της α-αλυσίδας των μορίων DQ2 και DQ7 (ίδιες αμινοξικές αλληλουχίες) με την α-αλυσίδα του DQ8. Οι αμινοξικές αλληλουχίες έχουν μήκος 181 κατάλοιπα και η ακριβής ομοιότητα μεταξύ τους είναι 90% (164/181 όμοια κατάλοιπα), ενώ η κατά σύμβαση ομοιότητα είναι 95% (172/181 κατάλοιπα με παρόμοιες ιδιότητες για παράδειγμα Glu/Asp, Leu/Val κ.λ.π.).

a-chain DQS E 181

Εικόνα 2: Σύγκριση της β-αλυσίδας του μορίου DQ2 με τη β-αλυσίδα του DQ8. Οι αμινοξικές αλληλουχίες έχουν μήκος 190 κατάλοιπα και η ακριβής ομοιότητα μεταξύ τους είναι 91% (173/190 όμοια κατάλοιπα), ενώ η κατά σύμβαση ομοιότητα είναι επίσης 94% (179/190 κατάλοιπα με παρόμοιες ιδιότητες για παράδειγμα Glu/Asp, Leu/Val κ.λ.π.).

β-chain	DQ7	SPEDFVYQFKA	MCYFTNGT ERVRYVT RYLYNRE EYARFD SDVEVYRAVT PLGPPDA EYWN	62
β-chain	DQ8	SPEDFVYQFKG	MCYFTNGT ERVRLVT RYLYNRE EYARFD SDVGVYRAVT PLGPPAA EYWN	60
β-chain	DQ7	SQKEVLERTRA	ELD TVCPHNYQLELRTTLQRRVEPTVTISPSRTEALNHHNLLVCSVTDF	122
β-chain	DQ8	SQKEVLERTRA	ELD TVCPHNYQLELRTTLQRRVEPTVTISPSRTEALNHHNLLVCSVTDF	120
β-chain	DQ7	YPAQIKVR UF R	NDQEETTCVVSTPLIRNCDWTFQILVMLEHTPQHCDVYTCHVEHPSLQN	182
β-chain	DQ8	YPAQIKVR UF R	NDQEETTCVVSTPLIRNCDWTFQILVMLEHTPQRCDVYTCHVEHPSLQN	180
β -chain β -chain	D07	PITVEWRAQS PIIVEWRAQS	192 190	

Εικόνα 3: Σύγκριση της β-αλυσίδας του μορίου DQ7 με τη β-αλυσίδα του DQ8. Οι αμινοξικές αλληλουχίες έχουν μήκος 190 κατάλοιπα και η ακριβής ομοιότητα μεταξύ τους είναι 96% (184/190 όμοια κατάλοιπα), ενώ η κατά σύμβαση ομοιότητα είναι επίσης 96% (184/190 κατάλοιπα με παρόμοιες ιδιότητες για παράδειγμα Glu/Asp, Leu/Val κ.λ.π.).

3. ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ DQ2 ΚΑΙ DQ7 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ DQ8

Η ομόλογη μοντελοποίηση των μορίων DQ2 και DQ7, χρησιμοποιώντας ως δομή-εκμαγείο την δομή του DQ8, έγινε με τη χρήση του προγράμματος Swiss-Pdb Viewer. Για τα μόρια DQ2 και DQ7, οι αλυσίδες α και β μοντελοποιήθηκαν με βάση τις αντίστοιχες αλυσίδες α και β του DQ8 ξεχωριστά και ενώθηκαν οι δυο επιμέρους δομές ώστε να σχηματιστούν ολόκληρα τα μόρια. Στη συνέχεια τα μόρια αυτά ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά και προέκυψαν τα τελικά μοντέλα DQ2 και DQ7.

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας έγινε με σκοπό την ομαλή μετάβαση του μορίου από μια δυναμική κατάσταση στην επόμενη, ενώ οι αρχικές συντεταγμένες των μορίων DQ2 και DQ7 προέκυψαν από την κρυσταλλική δομή του μορίουεκμαγείου DQ8. Χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας CHARMM27, το συνεχές μοντέλο επιδιαλύτωσης GB/SA και η διηλεκτρική σταθερά καθορίστηκε ίση με 1.0. Η διηλεκτρική σταθερά χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση του υδατικού περιβάλλοντος, εξαρτάται από την συνάρτηση δυναμικής ενέργειας, και συνήθως τίθεται ίση με τη μονάδα. Τα κατώτερα όρια (cut-offs) για τις ηλεκτροστατικές (charged-charged) και τις van der Waals αλληλεπιδράσεις ορίστηκαν στα 15.0 και 12.0 Å.

Η διαδικασία της ελαχιστοποίησης έγινε με τον αλγόριθμο ελαχιστοποίησης L-BFGS. Η RMS βαθμίδωση ήταν μικρότερη από 0.01 Kcal.mol⁻¹.Å⁻¹ για όλες τις ελαχιστοποιημένες δομές και ολοκληρώθηκε μετά από 10.000 βήματα.



Η διαδικασία ομόλογης μοντελοποίησης έγινε σε Silicon Graphics (INDIGO2) και οι ελαχιστοποιήσεις ενέργειας των μοντέλων με το πρόγραμμα TINKER σε υπολογιστή με Linux λειτουργικό (Mandrake 10.0) με διπλό επεξεργαστή.



Εικόνα 4: Υπέρθεση των δομών DQ7/DQ8 (Α) και DQ2/DQ8 (Β), όπως προέκυψαν μετά την ομόλογη μοντελοποίηση. Οι αλυσίδες α και β του μορίου DQ8 φαίνονται με κόκκινο και μωβ χρώμα αντίστοιχα, ενώ οι αλυσίδες α και β των μορίων DQ2 και DQ7 φαίνονται με μπλε και πράσινο. Οι δομικές διαφορές εντοπίζονται στα σημεία διαφορετικού χρώματος. Οι εικόνες σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Swiss-Pdb Viewer.





Εικόνα 5: (Α) Σχηματική απεικόνιση του μοντελοποιημένου μορίου HLA-DQ7. Διακρίνονται οι α1, α2, β1 και β2 αλυσίδες του μορίου. Οι αμινο-τελικές α1 και β1 περιοχές κάθε αλυσίδας σχηματίζουν το άνοιγμα πρόσδεσης αντιγονικών πεπτιδίων. (Β) Άλλη άποψη του μορίου HLA-DQ7, στην οποία διακρίνεται εμφανώς η αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου. Οι εικόνες σχεδιάστηκαν με το PyMol.



В

4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ DQ2 ΚΑΙ DQ7 ΜΕ ΤΟ DQ8

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου DQ8 με το πεπτίδιο της ινσουλίνης B απεκάλυψε ότι το πεπτίδιο της ινσουλίνης B προσδένεται στο DQ8 μόριο κυρίως στις θέσεις P1, P4 και P9 με τα αμινοξέα E, Y και E αντίστοιχα, ενώ τα αμινοξέα στα άκρα του πεπτιδίου εκτείνονται έξω από την αύλακα πρόσδεσης του DQ8 (Eικ.6A). Οι ίδιοι δεσμοί παρατηρήθηκαν ανάμεσα στην κύρια αλυσίδα του πεπτιδίου και στα διατηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα σε διάφορα είδη HLA II μορίων και ομόλογων μοντέλων (DR και DQ) (Εικ.6B).





В



Εικόνα 6: (Α) Απεικόνιση της αύλακας πρόσδεσης του DQ8 με προσδεδεμένο το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β. Οι παράπλευρες αλυσίδες των καταλοίπων στις θέσεις πρόσδεσης P1 (Ε), P4 (Υ) και P9 (Ε) βρίσκονται βαθιά τοποθετημένες στις αντίστοιχες τσέπες. (Β) Δεσμοί υδρογόνου στην P9 τσέπη για τα μόρια DQ8, DR1 και Ι-Α⁹⁷. Οι δεσμοί δημιουργούνται ανάμεσα στη παράπλευρη αλυσίδα του αμινοξικού καταλοίπου του πεπτιδίου στη θέση αυτή και στα διατηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των μορίων HLA II που σχηματίζουν την τσέπη πρόσδεσης.

Η P1 τσέπη στο DQ8 μόριο σχηματίζεται από δύο θετικά φορτισμένα αμινοξέα, His^{24a} και Arg^{52a}, και από δύο αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, Glu^{31a} και Glu⁸⁶⁶. Το καρβοξύλιο της παράπλευρης αλυσίδας του γλουταμινικού οξέος (Ε) του πεπτιδίου της ινσουλίνης B σχηματίζει δεσμούς-Η με την γουανιδινομάδα της Arg^{52a}, μέσω ενός μορίου νερού, και με το ιμιδαζόλιο της His^{24a}. Στο μόριο DQ7 η P1 τσέπη σχηματίζεται με αντικατάσταση της Arg^{52a} από την Gly^{55a} και αντικατάσταση του Glu^{31a} από την Gln^{33a} ενώ τα υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα είναι ίδια (Εικ.7).



Εικόνα 7: Απεικόνιση των αμινοξικών καταλοίπων που σχηματίζουν την τσέπη P1 στο μόριο DQ7. Η P1 τσέπη γεμίζει με την παράπλευρη αλυσίδα του γλουταμικού οξέος του πεπτιδίου της ινσουλίνης B (πράσινο χρώμα).

Η πιο βαθιά τσέπη στο DQ8 μόριο, η P4 (100 Å³), γεμίζεται πλήρως με την παράπλευρη αλυσίδα της τυροσίνης (Y) του πεπτιδίου της ινσουλίνης B. Η P4 τυροσίνη αλληλεπιδρά με το διατηρημένο δισουλφιδικό δεσμό Cys⁷⁹⁸-Cys¹⁵⁸. Στο μόριο DQ7 η P4 τσέπη είναι μικρότερη από εκείνη στο μόριο DQ8 λόγω της

υποκατάστασης της Leu^{26β} στο DQ8 με Tyr^{26β} στο DQ7, υποδηλώνοντας ότι αμινοξέα με μικρή σχετικά παράπλευρη αλυσίδα μπορεί να χωρέσουν στη τσέπη αυτή (Εικ.8).



Εικόνα 8: Απεικόνιση των αμινοξικών καταλοίπων που σχηματίζουν την τσέπη P4 στο μόριο DQ7 (κόκκινα χρώμα). Η P4 τσέπη γεμίζει με την παράπλευρη αλυσίδα της τυροσίνης του πεπτιδίου της ινσουλίνης B (πράσινο χρώμα).

Στο σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου παρατηρήθηκε ότι στην P9 τσέπη το καρβοξύλιο της παράπλευρης αλυσίδας του γλουταμινικού οξέος (Ε) του πεπτιδίου της ινσουλίνης B σχηματίζει δεσμούς-Η με την Arg^{76α} του DQ8 ενώ στο σχηματισμό της τσέπης συμβάλουν τα αμινοξέα Ala^{57β}, Pro^{56β} και Pro^{55β}. Στο μόριο DQ7 η P9 τσέπη σχηματίζεται με αντικατάσταση της Ala^{57β} από την Asp^{57β}, ενώ τα υπόλοιπα αμινο**ξι**κά κατάλοιπα είναι ίδια (Εικ.9).





Εικόνα 9: Απεικόνιση των αμινοξικών καταλοίπων που σχηματίζουν την τσέπη P9 στο μόριο DQ7 (κόκκινα χρώμα). Η P4 τσέπη γεμίζει με την παράπλευρη αλυσίδα του γλουταμικού οξέος του πεπτιδίου της ινσουλίνης B (πράσινο χρώμα).

Στο μόριο DQ2 η τσέπη P1 σχηματίζεται με αντικατάσταση του Glu^{31α} από Gln^{31α} και αντικατάσταση του Glu^{86β} από Thr^{86β}. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στο σχηματισμό της τσέπης P4 είναι ακριβώς τα ίδια με εκείνα στο μόριο DQ8, ενώ η τσέπη P9 σχηματίζεται με αντικατάσταση της Pro^{55β} από Leu^{55β} (Πίνακας I). Χαρακτηριστικός είναι ο διατηρημένος δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεϊνών (2.03 Å).

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι: Τα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν τις τσέπες πρόσδεσης P1, P4 και P9 για τα μόρια DQ8, DQ2 και DQ7.

DQ	P1	P4	P9
DQ8	His ²⁴⁰ Glu ³¹⁰ Arg ⁵²⁰ Glu ⁸⁶⁹	Cys ⁷⁹⁶ Cys ¹⁵⁸ Leu ²⁶⁸	Arg ⁷⁶⁰ Ala ⁵⁷⁸ Pro ⁵⁶⁸ Pro ⁵⁵⁸
DQ7	His ²⁵⁸ GIn ³³⁸ Gly ⁵⁵⁸ Glu ⁸⁵⁸	Cys ^{/98} Cys ¹⁵⁸ Tyr ²⁶⁸	Arg ^{78a} Asp ⁵⁷⁸ Pro ⁵⁶⁸ Pro ⁵⁵⁸
DQ2	His240 GIn310 Arg520 Thr	Cys ⁷⁹⁸ Cys ¹⁵⁸ Leu ²⁶⁸	Arg ⁷⁸⁴ Leu ⁵⁵⁸ Pro ⁵⁶⁸ Ala ⁵⁷⁸





Ξικόνα 10: Απεικόνιση της επιφάνειας των μοντελοποιημένων μορίων HLA-DQ2 (A) και HLA-DQ7 (B) στην περιοχή της αύλακας πρόσδεσης με βάση το σχετικό δυναμικό επιφάνειας της πρωτεΐνης (relative protein surface potential). Διακρίνονται οι P1, P4 και P9 τσέπες των μορίων. Οι εικόνες σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PyMol.

5. Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

Τα μοντελοποιημένα μόρια DQ2 και DQ7 ελέχθησαν για την στερεοχημική τους ποιότητα με το πρόγραμμα PROCHECK. Ο σκοπός του PROCHECK είναι να εκτιμήσει πόσο φυσιολογική ή μη είναι η γεωμετρία των αμινοξικών καταλοίπων, σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη συγκρινόμενη με τις στερεοχημικές παραμέτρους, που προέρχονται από καλά προσδιοριζόμενες δομές υψηλής διακριτικής ικανότητας. Οι μη φυσιολογικές περιοχές που παρουσιάζονται στο PROCHECK δεν είναι απαραίτητα λανθασμένες αλλά μπορεί να έχουν ασυνήθιστα χαρακτηριστικά για τα

H BIBA
οποία υπάρχει λογική εξήγηση (π.χ. αποκλίσεις λόγω της πρόσδεσης ενός υποκαταστάτη στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης) [Morris,1992]. Τα διαγράμματα που περιλαμβάνει το PROCHECK είναι τα εξής:

- 1. Ramachandran διαγράμματα
- 2. Ramachandran διαγράμματα με βάση τον τύπο του καταλοίπου
- 3. Δ_{12} Δ_{12}
- 4. Διαγράμματα με παραμέτρους για την κύρια αλυσίδα (Main-chain parameters)
- 5. Διαγράμματα με παραμέτρους για την παράπλευρη αλυσίδα (Side-chain parameters)
- 6. Διαγράμματα για τις ιδιότητες των καταλοίπων (Residue properties)
- Διαγράμματα κατανομής για το μηκός δεσμού καταλοίπων στην κύρια αλυσίδα (Main-chain bond length distributions)
- διαγράμματα κατανομής για το μέτρο γωνιών καταλοίπων στην κύρια αλυσίδα
 (Main-chain bond angle distributions)
- 9. RMSD διαγράμματα από την επιπεδότητα
- 10. Διαγράμματα γεωμετρίας (Distorted geometry)

Τα διαγράμματα Ramachandran δείχνουν τις φ και ψ γωνίες περιστροφής για όλα τα κατάλοιπα στη δομή (εκτός από εκείνες στα άκρα). Τα κατάλοιπα γλυκίνης και προλίνης περιγράφονται από διαφορετικά διαγράμματα. Οι περιοχές Ramachandran όπως περιγράφονται από τον Morris είναι οι εξής:

- A-core alpha
- a-allowed alpha
- ~a-generous alpha
- B-core beta
- b- allowed beta
- ~b-generous beta
- L-core left-handed alpha
- I- allowed left-handed alpha
- ~I-generous left-handed alpha
- p-allowed epsilon
- ~p-generous epsilon

Οι περιοχές αυτές προκύπτουν από τις παρατηρούμενες φ και ψ γωνίες για 121.870 κατάλοιπα από 463 γνωστές πρωτεϊνικές δομές. Οι δυο πιο προτιμούμενες περιοχές είναι οι 'core' και οι 'allowed'. Ιδανικά αναμένεται πάνω από το 90% των καταλοίπων να βρίσκεται στις 'core' περιοχές. Το ποσοστό των καταλοίπων που



βρίσκεται στις 'core' περιοχές είναι ο καλύτερος οδηγός για τη στερεοχημική ποιότητα μιας πρωτεϊνικής δομής.

Κατά τον έλεγχο της ποιότητας των μοντέλων η διακριτική ικανότητα ρυθμίστηκε στα 2Å. Τα Ramachandran διαγράμματα των μοντελοποιημένων μορίων DQ2 και DQ7 καθώς και του μορίου-εκμαγείου, DQ8, έδειξαν ότι τα περισσότερα κατάλοιπα βρίσκονται σε επιτρεπτές (preferred regions) περιοχές (DQ8: 98.1%, DQ2: 98.2% και DQ7: 97.6%) και μόνο ένα μικρό ποσοστό σε μη επιτρεπτή (disallowed region) περιοχή (Εικ.11,12).



Ramachandran Διάγραμμα DQ2

Εικόνα 11: Ramachandran διάγραμμα για το μοντελοποιημένο μόριο DQ2, στο οποίο παρουσιάζεται η στατιστική της πρόβλεψης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα Asn^{33β}, Asn^{134β} και Arg^{105β} βρίσκονται σε μη επιτρεπτές περιοχές του διαγράμματος.





Εικόνα 12: Ramachandran διάγραμμα για το μοντελοποιημένο μόριο DQ7, στο οποίο παρουσιάζεται η στατιστική της πρόβλεψης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα Asn³³⁸, Asn^{134β} και Arg¹⁰⁵⁸ βρίσκονται σε μη επιτρεπτές περιοχές του διαγράμματος.

Τα 'main-chain parameters' διαγράμματα (6 γραφήματα συνολικά) δείχνουν πως η δομή συγκρίνεται με καλά καθορισμένες δομές παρόμοιας διακριτικής ικανότητας. Οι έξι ιδιότητες που περιγράφονται είναι οι εξής:

 Η ποιότητα του διαγράμματος Ramachandran. Αυτή η ιδιότητα μετράται από το
 % ποσοστό των πρωτεϊνικών καταλοίπων που βρίσκονται στις πιο επιθυμητές ή
 'core' περιοχές του διαγράμματος Ramachandran. Για μια καλή δομή μοντέλου αναμένεται αυτό το ποσοστό να είναι πάνω από 90%.



Η επιπεδότητα του πεπτιδικού δεσμού. Αυτή η ιδιότητα μετράται υπολογίζοντας την τυπική απόκλιση (standard deviation) για την ω γωνία στρέψης πρωτεϊνικών δομών. Όσο μικρότερη είναι η τιμή τόσο πιο επίπεδος εμφανίζεται ο πεπτιδικός δεσμός, με ιδανική τιμή για την γωνία ω 180°.

 Μη δεσμικές (non-bonded) αλληλεπιδράσεις. Αυτή η ιδιότητα μετράει τον αριθμό των κακών επαφών (bad contacts) ανά 100 αμινοξέα. Οι κακές επαφές δημιουργούνται όταν δύο στοιχεία διαφορετικών καταλοίπων βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη ή ίση από 2.6 Å.

 C^α τετραεδρική διαστροφή (distortion). Αυτή η ιδιότητα μετράται υπολογίζοντας την τυπική απόκλιση για την z γωνία στρέψης πρωτεϊνικών δομών. Αυτή είναι μια φανταστική γωνία στρέψης, η οποία δεν ορίζεται για κανένα πραγματικό (actual)
 δεσμό στη δομή. Προσδιορίζεται από 4 άτομα C^α, N, C, C^b.

 Ενέργεια του δεσμού-Η της κύριας αλυσίδας. Αυτή η ιδιότητα μετράται από την τυπική απόκλιση για τις ενέργειες του δεσμού-Η, στην κύρια αλυσίδα.

Ο συνολικός G-παράγοντας. Ο συνολικός G-παράγοντας αποτελεί μέτρο της συνολικής κανονικότητας της δομής. Με τον όρο κανονικότητα εννοείται πόσο 'φυσιολογική' ή 'ασυνήθιστη' είναι μια στερεοχημική ιδιότητα. Η συνολική τιμή προκύπτει από το μέσο όρο όλων των διαφορετικών G-παραγόντων για κάθε κατάλοιπο στη δομή.

Σε ένα διάγραμμα Ramachandran τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε μη επιτρεπτές περιοχές θα έχουν χαμηλό ή αρνητικό G-παράγοντα. Το ίδιο συμβαίνει για μη επιτρεπτές τιμές για τις γωνίες x₁ και x₂. Συνεπώς, αν μια πρωτεϊνική δομή εμφανίσει πολλά κατάλοιπα με χαμηλούς G-παράγοντες σημαίνει ότι υπάρχει πρόβλημα στην συνολική του γεωμετρία. Ο G-παράγοντας στο Procheck υπολογίζεται για τις ακόλουθες ιδιότητες:

- γωνίες στρέψης (φ,ψ συνδυασμοί, x₁,x₂ συνδυασμοί, x₃,x₄ συνδυασμοί και ω συνδυασμοί)
- ομοιοπολική γεωμετρία (μήκη δεσμού της κύριας αλυσίδας και γωνίες δεσμού της κύριας αλυσίδας).

Τα 'residues properties' διαγράμματα δείχνουν πως οι γεωμετρικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης ποικίλουν κατά μήκος της αλληλουχίας της. Αποτελούν μια εικόνα για το ποιες περιοχές εμφανίζουν φτωχή ή ασυνήθιστη γεωμετρία και ποιες εμφανίζουν φυσιολογική γεωμετρία. Όλα τα χαρακτηριστικά διαγράμματα για τα μοντέλα DQ2 και DQ7 βρίσκονται στο Παράρτημα Ι.

BIBAIO

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ: Αποκλίσεις (κόκκινο χρώμα) ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων του μοντελοποιημένου μορίου DQ2 από την ιδανική (μπλε χρώμα) γεωμετρία (μήκος δεσμού και γωνία δεσμού). Η διαφορά των παραπάνω τιμών σημειώνεται με μαύρο χρώμα.

MOPIO	ATOMA	AMINOEEA	ΜΗΚΟΣ	ΓΩΝΙΑ
DQ2	CA-CB	A-Thr ¹³²	1.540 1.596 0.056	<u> </u>
		B-Val ⁵⁰	1.540 1.627 0.087	
	N-CA-C	A-Ala ⁵		111.2 101.2 10.0
		A-Val ¹³		111.2 100.7 10.5
		A-His ²⁷		111.2 100.5 10.7
		A-Phe ⁵⁴		111.2 123.1 11.9
		A-Val ¹¹⁹		111.2 99.2 12.0
		A-Leu ¹⁵⁷		111.2 100.8 10.4
		A-Leu ¹⁷³		111.2 99.6 11.6
	·	A-Giu ¹⁸² - Pro ¹⁸³		111.2 127.8 16.6
		B-Phe ⁷		111.2 100.5 10.7
		B-Glu ³⁶		111.2 101.1 10.1
		B-Phe ⁴⁰		111.2 98.2 13.0
		B-Ala ⁴⁹		111.2 100.6 10.6
		B-Asp ¹²¹		111.2 121.7 10.5

HUNNING HILL HOANNING

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ: Αποκλίσεις (κόκκινο χρώμα) ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων του μοντελοποιημένου μορίου DQ7 από το ιδανική (μπλε χρώμα) γεωμετρία (μήκος δεσμού και γωνία δεσμού). Η διαφορά των παραπάνω τιμών σημειώνεται με μαύρο χρώμα.

MOPIO	ATOMA	AMINOEEA	ΜΗΚΟΣ	ΓΩΝΙΑ
DQ7	C-0	A-Tyr ³⁶	1.231 1.177 0.054	
	C-N	A-Pro ¹⁶³ -Glu ¹⁶⁴	1.329 1.119 0.210	
		B-Ser ¹⁰⁴ -Arg ¹⁰⁵	1.329 1.262 0.067	
		B-His ¹¹² -Asn ¹¹³	1.329 1.271 0.058	
	N-CA-C	A-Val ¹³		111.2 99.7 11.5
		B-Ala ⁴⁹		111.2 103.3 10.9
		B-Gly ⁵⁴		111.2 123.1 10.6
		B-Thr ⁹⁸		111.2 100.5 10.7
	CA- C- N	B-Ser ¹⁰⁴ -Arg ¹⁰⁵		116.2 130.1 13,9
	C- N- CA	B-Ser ¹⁰⁴ -Arg ¹⁰⁵		121.7 138.1 16.4
	0-C-N	B-Ser ¹⁰⁴ -Arg ¹⁰⁵		123.0 104.2 18.8

Τα μοντελοποιημένα μόρια DQ2 και DQ7 ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά (energy minimization) με τη χρήση του προγράμματος TINKER και υπολογίστηκε ο δομικός δείκτης απόκλισης RMSD (Root Mean Square Deviation) για τα ζεύγη DQ8/ DQ2 και DQ8/ DQ7, με υπέρθεση της δεύτερης δομής του κάθε ζεύγους πάνω στην δομή του μορίου-εκμαγείου DQ8, σε 0.034 και 0.033 αντίστοιχα λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα C^α άτομα.



Για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας CHARMM27 και το συνεχές μοντέλο επιδιαλύτωσης GB/SA και η διηλεκτρική σταθερά καθορίστηκε ίση με 1.0. Τα κατώτερα όρια (cut-offs) για τις ηλεκτροστατικές (charged-charged) και τις van der Waals αλληλεπιδράσεις ορίστηκαν στα 15.0 και 12.0 Å. Η διαδικασία της ελαχιστοποίησης έγινε με τον αλγόριθμο ελαχιστοποίησης L-BFGS. Η RMS βαθμίδωση ήταν μικρότερη από 0.01 Kcal.mol⁻¹Å⁻¹



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΧ

ΠΡΟΒΛΕΨΗ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ



1. ΠΡΟΒΛΕΨΗ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΑΥLOR

Η ανάλυση των γνωστών κυτταροτοξικών και Τ βοηθητικών κυτταρικών επιτόπων απεκάλυψε μια ομοιότητα στις πρωτοταγείς δομές τους. Η παρουσία παρόμοιων μοτίβων δηλώνει ότι η πρόσδεση των πεπτιδίων-αντιγόνων στα ΜΗC μόρια τάξης Ι και ΙΙ είναι παρόμοια στη φύση. Επιπλέον αυτά τα μοτίβα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη πρόβλεψη περιοχών μέσα σε πρωτεΐνες ικανές να αναγνωρίζονται από ΜΗC μόρια τάξης Ι και ΙΙ. Ένα δομικό μοντέλο για την αναγνώριση των πεπτιδίων έχει προκύψει από πειράματα πρόσδεσης που αποδεικνύουν ότι ανθρώπινες ιστοσυμβατές πρωτείνες τάξης ΙΙ δεσμεύουν ειδικά αντιγόνα. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το αντιγονικό πεπτίδιο δεσμεύτηκε από τα MHC μόρια τάξης ΙΙ όπου έγινε η αναγνώριση από τα Τ κύτταρα. Πειράματα έδειξαν ότι η αναγνώριση Τ κυττάρων περιλαμβάνει τον αντιγονικό υποδοχέα να δεσμεύει το σύμπλοκο ΜΗC-πεπτιδίου. Οι γνωστοί βοηθητικοί και κυτταροτοξικοί Τ κυτταρικοί επίτοποι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό διατηρημένων μοτίβων στη πρωτοταγή δομή τους οδήγησαν σε 13 μοτίβα: Φ-Υ-Υ-Φ, G-Υ-Υ-Φ, G-Υ-Υ-Π, Π-Υ-Υ-Π, Φ-Υ-Υ-Π, Φ-Υ-Υ-Υ-Φ, Π-Υ-Υ-Φ, Φ-Υ-Π-Φ, G-Π-Υ-Υ-Π, G-Π-Υ-Π, Φ-Υ-Π-Π, Φ-Υ-Π-Υ-Π και Φ-Π-Υ-Φ (Φ= φορτισμένα αμινοξέα, Υ= υδρόφοβα αμινοξέα, Π= πολικά αμινοξέα και G= γλυκίνη).

Αρχικά ελέγχθηκε αν αυτά τα διατηρημένα μοτίβα εμφανίζονται στην πρωτοταγή αλληλουχία της πρωτεΐνης La/SSB με τη βοήθεια του προγράμματος PATTINPROT, με σκοπό να προβλεφθούν οι πιθανοί Τ κυτταρικοί επίτοποι. Το πρόγραμμα αυτό είναι ένα εργαλείο το οποίο σαρώνει μια πρωτεϊνική αλληλουχία και προσδιορίζει ένα ή περισσότερα μοτίβα μέσα σε αυτή. Το επίπεδο ομοιότητας του προς εξέταση μοτίβου μέσα στην πρωτεϊνική αλληλουχία ήταν 100%. Στον αλγόριθμο του προγράμματος η βιολογική πληροφορία διανέμεται ανάμεσα στα στοιχεία του μοτίβου. Η πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης La/SSB προήλθε από τη βάση δεδομένων SwissProt (<u>www.expasy.ch</u>), σε FASTA format.

Ειδικότερα, η πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης καθώς και τα προς εξέταση μοτίβα τοποθετούνται στις κατάλληλες φόρμες του προγράμματος με ειδική σύνταξη. Κάθε ένα από τα παρατηρούμενα διατηρημένα μοτίβα σαρώνει την αμινοξική αλληλουχία του αυτοαντιγόνου La/SSB. Η σημασία των προτεινόμενων μοτίβων μέσα στους Τ κυτταρικούς επιτόπους γίνεται πιο έντονη όταν αυτοί ελέγχονται ως προς το μέγεθος και την ειδικότητα τους. Επειδή το ελάχιστο μέγεθος ενός Τ κυτταρικού επιτόπου είναι 8-12 αμινοξέα, προφανώς ένα μοτίβο 4 ή 5 αμινοξέων δε θα ήταν ικανοποιητικό για την αναγνώριση. Αυτό αντιμετωπίστηκε με την προσθήκη 6 αμινοξέων δεξιά και αριστερά για το μοτίβο των 4 αμινοξέων και με

BIBAIC

την προσθήκη 5 αμινοξέων δεξιά και αριστερά για το μοτίβο των 5 αμινοξέων. Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζεται ένας επίτοπος της τάξης των 16 αμινοξέων ενώ στη δεύτερη περίπτωση 15 αμινοξέων. Ανιχνεύτηκαν συνολικά 37 υποψήφιοι επίτοποι με βάση τα διατηρημένα μοτίβα Taylor. (Πίνακας Ι).

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι: Πρόβλεψη Τ κυτταρικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB με τη χρήση των 13 διατηρημένων μοτίβων του Taylor. Τα διατηρημένα μοτίβα απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα.

MOTIBO	ΠΙΘΑΝΟΣ Τ-ΕΠΙΤΟΠΟΣ	La/SSB NEPIOXH
	FNLPRDKFLKEQIKLD	(28-43)
	MRRTI HKAEKGSIEV	(142-157)
	SIESAKKE\/ETPGOKY	(160-175)
	GEIKWIDEVRGAKEGI	(257-272)
Φ-Υ-Υ-Φ	NKEV/TWEI VEGEV/EKE	(298-313)
	EGEVEKEALKKIIEDO	(307-322)
	EKEALKKIIEDQQESL	(311-326)
G-Ү -Ү- Ф	DENGAT <u>GPVK</u> RAREET	(377-389)
G- Y-Y-П	RSVYIK <u>GFPT</u> DATLDD	(111-126)
П-Ү-Ү-П	WLEDKG <u>QVLN</u> IQMRRT	(130-145)
	DFNVIVEALSKSKAEL	(64-79)
	GKGKGNKAAQPGSGKG	(338-353)
Φ-Υ-Υ-ΙΙ	FQGKKTKFASDDEHDE	(357-372)
	EETDKEEPASKQQKTE	(387-402)
Φ-Υ-Υ-Υ-Φ	GWVPLEIMIKFNRLN	(45-59)
	RRSPSKPLPEVTDEY	(89-104)
П-Ү-Ү-Ф	YYFGDF <u>NLPR</u> DKFLKE	(23-38)
	ILFKDD <u>YFAKKNEERK</u>	(182-197)
	LEEKIG <u>CLLK</u> FSGDLD	(226-241)
	PLEIMI <u>KFNR</u> LNRLTT	(48-63)
<u>ው አግቦ</u>	IMIKFN <u>RLNR</u> LTTDFN	(51-66)
Ψ-1-11-Ψ	SKAELM <u>EISE</u> DKTKIR	(75-90)
	PSKPLP <u>EVTD</u> EYKNDV	(93-108)
G-П-Ү-Ү-П	WLEDK <u>GQVLN</u> IQMRR	(130-144)
G-П-Ү-П	AKDANN <u>GNLQ</u> LRNKEV	(286-301)
	MAALEAKICHQIEYYF	(10-25)
	KFNRLN <u>RLTT</u> DFNVIV	(54-69)
Ψ-1-[]-[]	ALGKAKDANNGLNQLR	(282-297)
	LQLRNK <u>EVTW</u> ELVEGE	(294-309)
Φ-Υ-Π-Υ-Π	GSGKG <u>KVQFQ</u> GKKTK	(349-363)
	RDKFLK <u>EQIK</u> LDEGWV	(32-47)
	TLDDIK <u>EWLE</u> DKGQVL	(123-138)
	SIFVVF <u>DSIE</u> SAKKFV	(153-168)
Φ-Π-Υ-Φ	VVFDSI <u>ESAK</u> KFVETP	(156-171)
	EEDAEM <u>KSLE</u> EKIGCL	(218-233)
	SNHGEI <u>KWID</u> FVRGAK	(254-269)



2. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΕΡΙΤΟΡΕ

Η ανάγκη για την κατανόηση της παρουσίασης του αντιγόνου σε μοριακό επίπεδο αύξησε την ανάπτυξη των υπολογιστικών αλγορίθμων, που χρησιμοποιούνται στην πρόβλεψη Τ κυτταρικών επιτόπων. Οι περισσότεροι διαθέσιμοι αλγόριθμοι βασίζονται σε δεδομένα για την πρόσδεση μεταξύ των μορίων HLA με τα αντιγονικά πεπτίδια. Το πρόγραμμα TEPITOPE χρησιμοποιείται για να προβλέψει εν δυνάμει Τ κυτταρικούς επιτόπους λαμβάνοντας υπόψη δεδομένα για την πρόσδεση μεταξύ των μορίων HLA με τα αντιγονικά πεπτίδια και δομικά δεδομένα που προκύπτουν από σύμπλοκα HLA-πεπτιδίου.

Προτού γίνει η σάρωση της La/SSB αλληλουχίας (408 κατάλοιπα) με το πρόγραμμα TEPITOPE ρυθμίζονται οι παράμετροι πρόβλεψης, όπως τα HLA-DR αλλύλια και η % τιμή κατωφλίου. Επιλέχθηκαν 14 (από τα 25 που διαθέτει το TEPITOPE) HLA-DR αλλύλια (DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0402, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*0802, DRB1*1101, DRB1*1104, DRB1*1305, DRB1*1501, DRB1*1502, DRB5*0101) και τέθηκε η τιμή κατωφλίου ίση με 4%. Τα αλλύλια αυτά επιλέχθηκαν με βάση την υψηλότερη ομολογία στην πρωτοταγή δομή τους με την αντίστοιχη β-αλυσίδα για τα HLA-DQ2 και DQ7 μόρια, ενώ το επίπεδο αυστηρότητας της πρόβλεψης, που καθορίζεται από την % τιμή κατωφλίου, επιλέχθηκε να είναι 4% ως το καταλληλότερο για τη συγκεκριμένη πρόβλεψη σύμφωνα με βιβλιογραφικές μελέτες.

Η παράμετρος που σχετίζεται με την ικανότητα πρόσδεσης ενός προβλεπόμενου πεπτιδικού πλαισίου (PF) είναι το πεπτιδικό σκορ (Peptide Score, PSC). Οι υπολογισμένες πμές PSC έχει βρεθεί να συνδέονται με την μετρούμενη ικανότητα πρόσδεσης των HLA-DR υποκαταστατών και αποτελούν μια εκτίμηση της πιθανότητας ενός πεπτιδίου, το οποίο περιέχει το PF, να προσδεθεί σε HLA-II πρωτεΐνες. Η καμπύλη κατανομής των PSC για τα 14 HLA-DR, που χρησιμοποιήθηκαν στην πρόβλεψη, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα ΙΙ. Τα PFs ταξινομούνται με βάση τις τιμές PSC, οι οποίες ανταποκρίνονται στις % τιμές κατωφλίου 1%, 2%, 3% κ.λ.π., επιβεβαιώνοντας ότι η % τιμή κατωφλίου σχετίζεται με τις τιμές PSC.

Για τον προσδιορισμό των υποψήφιων Τ κυτταρικών επιτόπων είναι συνετό να επιλέγονται αλλύλια του τύπου HLA-DRxx01, αφού αυτά φαίνεται να εμφανίζουν διαφορές σε υψηλότερο ποσοστό μεταξύ τους και επομένως διαφορετικά πεπτίδια αναμένεται να προβλεφθούν. Ο σχετικά μικρός αριθμός των HLA-DRxx01 αλλυλίων απλοποιεί επίσης την σάρωση της προς εξέταση πρωτεΐνης διευκολύνοντας

BIBAIC

σημαντικά το χρήστη κατά την πρόβλεψη των πεπτιδίων και κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Πίνακας ΙΙ: Πρόβλεψη των επιτόπων που προέκυψαν για τα 14 επιλεχθέντα HLA-DR αλλύλια και για επίπεδο αυστηρότητας της πρόβλεψης 4%. Διακρίνεται το προβλεφθέν πεπτιδικό πλαίσιο (PF:peptide frame) στη θέση P1 του πεπτιδικού πλαισίου (μαύρο έντονο χρώμα). Ανάμικτοι υποψήφιοι επίτοποι με ένα 9-μερές πεπτιδικό πλαίσιο και πολλαπλά αλληλοεπικαλυπτόμενα πλαίσια προβλέφθηκαν. Οι αλληλουχίες με την γραμμή αποκαλύπτουν την παρουσία ενός καταλοίπου σε ένα πεπτιδικό πλαίσιο με περισσότερη από 10χ ανασταλτική επίδραση.

HLA-DR	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟΙ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΕΠΙΤΟΠΟΙ ΤΟΥ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ La/SSB
DRB1*0101	FNRLNRTT, IRRSPSKPL , Y IKGFPTDA , LNIQMRRTL FVVFDSIES, LHILFSNHG, FVRGAKEGI
DRB1*0102	MAALEAKIC, IKFNRLNRTT , IRRSPSKPL LNIQMRRTL, FVVFDSIES , LHILFSNHG
DRB1*0301	IKLDEGWVPLEIMIKFNR, YKNDVKNRS LHKAFKGSI FVVFDSIESA, LLILFKDDY IGCLLKFSG, ILFSNHGEI, FVRGAKEGI
DRB1*0401	YFGDFNLPR, WVPLEIMIK, LNRLITDFNVIVEALSKS IRRSPSKPL, YKNDVKNRS, FPTDATLDD, IQMRRTLHK FVVFDSIESA, LHILFSNHG , FQGKKTKFA
DRB1*0402	IMIKFNRLN, IVEALSKSK, IRRSPSKPL, V KNRSVYIK IQMRRTLHK, FVVFDSIES, ILFKDDYFA, LHILFSNHG LRNKEVTWE, LNKWKSKGR, F QGKKTKFA
DRB1*0701	IKFNRLNRL, IRRSPSKPL,-MRRTLHKAFKGSIFVVFDSIES FVETPGQKYKETDLLIL, ILFSNHGEI, FVRGAKEGI
DRB1*0801	WVPLEIMIK FNRLNRLTT, VKNRS VYKGFPTD IQMRRTLIK, FVVFDSIES , VEAKLRAKQ+ILFKEKAKE LQLRNKEVTWE, WKSKGRRFKGKGKGNK, FQGKKTKFA
DRB1*0802	WYPLEIMIKFNRLNRLTT, FNVTVEALS YKNDVKNRSVYIK, IQMRRTLHK, FVVFDSIES VEAKLRAKQEQEA, ILFKEKAKE, LQLRNKEVTWE WKSKGRRFKGKGKGNK, FOGKKTKFA
DRB1*1101	WVPLEIMIKFNRLNRLTT, FNVIVEALS IQMRRTLHK, FVVFDSIES, FQGKKTKFA
DRB1*1104	WVP LEIMIKFNRLNRLTT, IQMRRTLHK FVVFDSIES, VQFQGKKTK
DRB1*1305	WVPLEIMIKFNRLNRLTT, FNVIVEALS IQMRRTLHKAF, F VVFDSIES
DRB1*1501	MIKFNRLNRLTT, IRRSPSKPL, I QMRRTLHK FVVFDSIES, LILFKDDYF, LHILFSNHG
DRB1*1502	MIKFNRLNR LTT, IRRSPSKPL, IQMRRTLHK FVVFDSIES, LILFKDDYF, LHILFSNHG
DRB5*0101	WVPLEIMIKFNR, IVEALSKSK, IRRSPSKPL IQMRRTLHKAF, FVVFDSIESAKKFVETPGQK¥ LHILFSNHG, HLFKEKAK, WKSKGRRFK, VQFQGKKTK

Πίνακας ΙΙΙ: Σύγκριση των προβλεπόμενων επίτοπων που είναι κοινοί ανάμεσα στα 14 επιλεχθέντα HLA-DR αλλύλια και για επίπεδο αυστηρότητας της πρόβλεψης 4%.

HLA-DR αλλύλια	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟΙ ΕΠΙΤΟΠΟΙ
DRB1*0101_DRB1*0102	DLHILFSNHGE
DRB1*0301 DRB1*0401	(248-258)
DRB1*0402 DRB1*0701	(210 200)
DRB1*1501, DRB1*1502	
DRB5*0101	
DRB140101 DRB140102	
DRB1+0301 DRB1+0401	MIKENRINRITTO
DEB1*0402 DEB1*0701	(52-64)
DRB1*0801, DRB1*0802	
DRB1*1101 DRB1*1104	
DRB1*1305, DRB1*1501	
DRB1*1502, DRB5*0101	
•	
DRB1*0101, DRB1*0102	-
DRB1*0301, DRB1*0401	KFNRLNRLTTD
DRB1*0402, DRB1*0701	(54-64)
DRB1*0801 DRB1*0802	
DRB1*1101, DRB1*1104	
DRB1*1305, DRB1*1501	
DRB1*1502, DRB5*0101	
DRB1*0301, DRB1*0401	PLEIMIKFNRLNRLTTD
DRB1*0801, DRB1*0802	(48-64)
DRB1*1101, DRB1*1104	
DRB1*1305, DRB5*0101	
DRB1*0401, DRB1*0402	RLNRLTTDFNVIVEALSKSK
DRB1*0802, DRB1*1101	(\$7-76)
DRB1+1305, DRB5+0101	
DD140701 DDD140901	
DRB1-0301, DRB1-0801	EIMIKENKLINK (60.60)
DED10104 DED101205	(30-00)
DRB1*1104, DRB1*1303	
DRB1*0101 DRB1*0102	
DRB1+0301 DRB1+0401	IFVVFDSIFSA
DRB1+0402, DRB1+0701	(154-164)
DRB1*0801, DRB1*0802	(
DRB1+1101. DRB1+1104	
DRB1+1305, DRB1+1501	
DRB1+1502, DRB5+0101	
DRB1*0101, DRB1*0102	
DRB1*0401, DRB1*0402	NIQMRRTLHKA
DRB1*0701, DRB1*0801	(139-149)
DRB1*0802, DRB1*1101	
DRB1*1104, DRB1*1305	
DRB1+1501, DRB1+1502	
DRB5+0101	
DRB1*0301, DRB1*0401	QIKLDEGWVPLEIMIKFNRL
DED141101 DED141104	(39-58)
DEB1+1306 DEE40101	-
UKD3*VIVI	
	TLHKAFKGSIFVVFDSIESA
DKB1*0301, DKB1*0701	(142-104)



Η ποσοτική ανάλυση της επιλεγμένης αλληλουχίας (μήκους >=9 καταλοίπων) επιδεικνύει ένα προφίλ κατωφλίου με τη μορφή ιστογράμματος, το οποίο δείχνει σε ποια επίπεδα κατωφλίου η αλληλουχία θα προβλέπονταν για κάθε ένα από τα αλλύλια που συμπεριλαμβάνονται στον αλγόριθμο. Οι φόρμες για την ποσοτική ανάλυση των πεπτιδίων 'IFVVFDSIESA' (154-164) και 'PLEIMIKFNRLNRLTTD' (48-64) του Πίνακα ΙΙΙ, απεικονίζονται στην Εικ.1. Η ποιοτική ανάλυση επιτυγχάνεται μόνο για 9-μερή πεπτιδικά πλαίσια και επιδεικνύει τα 'anchor' (A) και τα 'inhibitory' (!) κατάλοιπα που βρίσκονται σε κάθε θέση του πεπτιδικού πλαισίου για κάθε HLA-DR αλλύλιο (Εικ.2,3). Τα προβλεπόμενα πεπτίδια μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την παρουσία των 'inhibitory' (!) καταλοίπων, τα οποία μειώνουν την συγγένεια πρόσδεσης των πεπτιδίων στα HLA-II αλλύλια.

Εικόνα 1: Φόρμες του προγράμματος ΤΕΡΙΤΟΡΕ για την ποσοτική ανάλυση των προβλεπόμενων πεπτιδίων. Οι X μπάρες είναι χαρακτηριστικές για την τιμή του κατωφλίου στην οποία προβλέπονται τα πεπτίδια για κάθε HLA-DR αλλύλιο.

Quantita	ative Analysis of 'IFVVFDSIESA'	Quantitative Analysis of 'PLEIMIKFNRLNRLTTD'
Threshold (%):	: 10 09 08 07 06 05 04 03 02 01	Threshold (%): 10 09 08 07 06 05 04 03 02 01
DRB1*0101 DRB1*0102 DRB1*0401 DRB1*0401 DRB1*0402 DRB1*0404 DRB1*0405 DRB1*0405 DRB1*0410 DRB1*0401 DRB1*0601 DRB1*0601 DRB1*0604 DRB1*0606 DRB1*1101 DRB1*1104		DRB1*0101 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
DRB1 +1106 DRB1 +1107 DRB1 +1305 DRB1 +1307 DRB1 +1311 DRB1 +1321 DRB1 +1501 DRB1 +1502 DRB5 +0101	X000000000000000000000000000000 X00000000	DRB1*1106 DOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOC

Το πεπτίδιο 'IFVVFDSIESA' (154-164) μπορεί να προβλεφθεί σε επίπεδο κατωφλίου έως 2% για όλα τα HLA-DR αλλύλια, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για έναν πολύ καλό υποψήφιο επίτοπο. Το πεπτίδιο 'PLEIMIKFNRLNRLTTD' (48-64) παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά, αφού είναι δυνατόν να προβλεφθεί για επίπεδα κατωφλίου έως 2% (για τα αλλύλια DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0402, DRB1*0801, DRB1*0802, DRB1*0804, DRB1*0806, DRB1*1101, DRB1*1104, DRB1*1106, DRB1*1305, DRB1*1307, DRB1*1311, DRB1*1321, DRB1*1501, DRB1*1502, DRB50101) και για επίπεδο κατωφλίου > 4% (για τα αλλύλια

BIBAIO

DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0410, DRB1*0421, DRB1*0701). To πεπτίδιο αυτό μπορεί να θεωρηθεί λιγότερο καλός υποψήφιος Τ κυτταρικός επίτοπος για εκείνα τα αλλύλια για τα οποία ανιχνεύεται σε επίπεδα κατωφλίου > 4%.

Α

В

Qualitative Analysis of			'LEDIEKTER'		Qualitative Analysis of					'MIRPHRIMR'				
positions:	2	3	4	6	7	9	positions:	2	3		6	7	9.	
D781=0101				I		I	DFB1+0101		•	•	٠ī		I	• • •
D781+0102				1		I	DF81+0102		•	τ.	· I		Ĩ	•
DR81+0301							DF01+0301			I		· • ·	4.1	
DF81+0401				I	Ï	Î	DF81+0401		÷.	•	I		I	
DE01+0402				I		Î	DT01+0402		•	•	I		T	1.1.1.1.1.1.1
DE01+0404		Ä	Â	Ī		· I .	DRB1+0404	1 👗	· .	۰ 👗 -	I		1	
DE01+0405				I		Ĩ	DRB1+0405		•		I		I.	
DB81+0410		Ä		I		Ī	DFB1+0410				I	•••••	I	
DBB1+0421		Ā		ī	İ	-	DRB1+0421		•	÷	I	•	· .	· :
DBR1+0701		Ā	2	ī	Ā	-	DFB1+0701				I		• -	• .
D181+0801		Ā	À	Ā		Ť	DRB1+0801			۰.			. 1	
DB81+0802		Ā	Ä	Ā	÷	ī	DRB1+0802		•	۰.			. I .	. '
DBB1+0804		- 7				÷	DEB1+0804		•		A		Ξ.	
DB81+0806		- 7			:	÷.	DRB1+0806		•				Í	•
DB81#1101	Ţ	Ā			÷	Ŧ	DFB1+1101					A	• I	
DBR1#1104	•	- 7	- 7	-7	•	÷	DFB1+1104	Ā	•	. •			Ĩ	• .
DBR1#1104			1	- 7		Ŧ	DR01+1106	Ā			À	• 👗	T.	
NBB141107	•	- 7	-	- 7	•	÷ .	DP81+1107	Ä		I			Ī	-
DDB141305	•	- 7		. 7	•	-	DR8141305					÷ 👗		· · · ·
DDD1-1343	•	- 7	- 7	- 7	•	÷	DR81+1307			۰.	Â		Ï	
5501-1347 550141511	•		- 7		•	÷ .	DF81+1311	Ä				Ă	Ī	•
	•		-		•	÷ .	DRB1+1321						I.	: .
	•	- 7	•	-		1	DEB1+1501			- Á	Ā	- 8	Ē	· · ·
D100141301	•		•	• 1	- 7	1 7	DF81+1502	Ā		Ā	Ā	1	Ī	
NND 1- 1 342	•		· •	÷		1	DR85+0181	Ā			I		Ā	

Г

D385+0101

Bualitative Analysis of "FHELERLTT"

positions:	2	3	. 4	6	7	₽.	:	
DR8140101				I		•		
3 181 +0102	•	٠		1	1 •	• .		
DR8140301			٠		٠	•		
D56140401			•	I		I		
3981+0402	•		•	z	A	I		
D PB1+04 04			A	I		I		
DBB1+0405		•		I				
310140410			A	1		+		
DFB1 #0421				I				
D FB1+0701				Ĩ	*			
DR8140601				A				
DE8140502						I		
DIB140804				Ä		Ī		
DEB140806								
DEB141101			Å	Ä	Å	Ť		
DIN141104				Ä	Ä	Ŧ		
388141106		:		Ā	Ā	Ŧ		
DMR101107					_	Ŧ		
BIR 1 1 1 1 1 1								
398141307	•		- 7	- 7	-	÷		
5001-1307	•	•	- 7	~	- 1	-		
	•	•	- 7	- 2	- 7	. •		
300141204	•	•		- 7	- 2	•		
	•	•	•		- 🐔	•		
PHP1-1502	•	•	•	÷		٠		
						-		

Εικόνα 2: Φόρμες του προγράμματος ΤΕΡΙΤΟΡΕ για την ποιοτική ανάλυση του πεπτιδίου 'PLEIMIKFNRLNRLTTD' (48-64). Οι φόρμες (Α), (Β) και (Γ) αντιστοιχούν στα 9-μερη πεπτίδια 'LEIMIKFNR', 'MIKFNRLNR' και 'FNRLNRLTT' αντίστοιχα. Η εμφάνιση τριών διαγραμμάτων ποιοτικής ανάλυσης δικαιολογείται από το γεγονός ότι στο πεπτίδιο 48-64 προσδιορίστηκαν τρία διαφορετικά πεπτιδικά πλαίσια με τα κατάλοιπα λευκίνη (L), μεθειονίνη (M) και φαινυλαλανίνη (F) στην θέση P1 του πλαισίου αντίστοιχα.

Qualitative Analysta ----

•		ADTITUTAL AUTIMIA OF AAKPATPAN.
positions:	23 2679	
DEB1#0101	A	positions: 2 3 4 6 / 9
DRB1+0102	Α	DEB1*6101 A . I I
DRB1*0301	A	DR81+0102 A . I I
DRB1+0401	A state in the state of the sta	DR81+0301 A . A
DRB1+0402	A	DR51+0401 A . A
DEB1+0404		DEB1+0402 A . I . I .
DR81+0405		DEB1+0404 A I
DEB1+0410		DEB1*0403 A . I
DEB1*0421		DRB1*0410 A I
DPR1+0701		DFB1+0421 A A
D281+0801		DR8140701 A . I
DDR1+0802		DFB1+0801 A . I . I .
DDD1+0804		DRB140602 A I I
DDR1+0806	3	DRB1*0804 A . I . I .
DDB1+1101		DRB1+0806 A . I . I .
DDD1+1101		DR01+1101 A. I.I.
DEDIATION		DR81*1104 A I I I
DEDIA1100	· • • • • • •	DRB1*1106 A . I . I .
DK01*1107		DRB1+1107 A A
DRD1+1303	A A	DFB1+1305 A . I . I .
DR81*1307	A	DR81*1307 A I I
DR81*1311	A state of the second second	DR01*1311 A I I
DK81*1321	A	DFB1*1321 A . I . I .
DKB1*1501	- A - A - A	DR81+1501 A
DK81*1502	A A A A A A	DRB1+1502 A
DRB5*0101	A	DRB 5+0101 A . I I .

Εικόνα 3: Φόρμες του προγράμματος ΤΕΡΙΤΟΡΕ για την ποιοτική ανάλυση του πεπτιδίου 'IFVVFDSIESA' (154-164). Οι φόρμες (Α) και (Β) αντιστοιχούν στα 9-μερη πεπτίδια 'FVVFDSIES' και 'VVFDSIESA' αντίστοιχα. Η εμφάνιση δύο διαγραμμάτων ποιοτικής ανάλυσης δικαιολογείται από το γεγονός ότι στο πεπτίδιο 154-164 προσδιορίστηκαν δύο διαφορετικά πεπτιδικά πλαίσια με τα κατάλοιπα φαινυλαλανίνη (F) και βαλίνη (V) στην θέση P1 του πλαισίου αντίστοιχα.



3. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ MULTIPRED

Το MULTIPRED είναι ένα υπολογιστικό πρόγραμμα για την πρόβλεψη πεπτιδίων που προσδένονται στα HLA αλλύλια και χρησιμοποιεί τα μοντέλα Hidden Markov (HMMs) και τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (ANNs) σαν μηχανές πρόβλεψης. Για την πρόβλεψη των υποψήφιων T κυτταρικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB επιλέχθηκαν τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα ως η καταλληλότερη μέθοδος πρόβλεψης. Προέκυψαν 400 9-μερη πεπτίδια, τα οποία ταξινομήθηκαν με βάση μια 'πμή' (score) χαρακτηριστική για την πρόσδεση στα HLA-II αλλύλια (Παράρτημα III). Η 'πμή' αυτή κυμαίνεται από 1 έως 9 με τα πεπτίδια που έχουν τιμές από 4 έως 9 να χαρακτηρίζονται σαν HLA προσδέτες (8-9 υψηλής συγγένειας προσδέτες). Τα είκοσι πρώτα 9-μερη πεπτίδια, που εμφάνισαν την υψηλότερη 'τιμή', απεικονίζονται στον Πίνακα IV. Τα προβλεπόμενα 9-μερη πεπτίδια, που είναι συνολικά 400, μπορούν να παρουσιαστούν και με τη μορφή διαγράμματος (Παράρτημα III).

Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν οι 'κρίσιμες περιοχές' (hotspots regions) για την πρόσδεση, οι οποίες προέκυψαν με επέκταση των 9-μερών πεπτιδίων και από τα δυο άκρα του Πίνακα ΙV. Η πρόβλεψη των κρίσιμων περιοχών έγινε σε τιμή κατωφλίου 20 με την μέθοδο ANNs (Πίνακας V). Τα πεπτίδια που αποτελούν τις 'κρίσιμες περιοχές' μπορούν να παρουσιαστούν και με τη μορφή διαγράμματος (Παράρτημα III). Οι κρίσιμες περιοχές συνδυάστηκαν κατάλληλα ώστε να προκύψουν οι τελικές αλληλουχίες, που αποτελούν τους υποψήφιους εν δυνάμει Τ κυτταρικούς επιτόπους του αυτοαντιγόνου La/SSB (Πίνακας V).



0301			60.41	53.93	53.14	51.99	49.87	49.21	48.98	47.45	44.57	43.85	43.45	42.95	42.89	42.54	42.07	42.06	40.78	39.13	38.85	38.43
	DRB1-	1501	7.96	7.30	7.14	6.99	6.65	6.51	6.62	6.38	5.94	5.86	5.82	5.70	5.74	5.68	5.56	5.57	5.42	5.14	5.09	5.18
	DRB1-	1301	8.23	7.55	7.53	7.42	7.18	7.21	7.18	6.91	6.68	6.45	6.49	6.48	6.39	6.43	6.40	6.32	6.17	5.98	5.93	5.83
	DRB1-	1101	7.38	6.37	6.22	6.06	5.79	5.67	5.59	5.43	4.99	4.93	4.86	4.76	4.77	4.69	4.62	4.67	4.50	4.27	4.26	4.17
VYVIA	DRB1-	0801	7.26	6.09	6.12	5.89	5.54	5.48	5.45	5.26	4.83	4.76	4.71	4.62	4.59	4.54	4.47	4.53	4.30	4.16	4.09	3.94
HLA-A/	DRB1-	0701	8.25	7.65	7.59	7.50	7.15	7.06	7.13	6.94	6.54	6.39	6.39	6.33	6.32	6.30	6.21	6.17	6.02	5.75	5.67	5.74
	DRB1-	0401	6.31	5.91	5.79	5.67	5.66	5.56	5.43	5.32	5.24	5.26	5.08	5.13	5.21	5.13	5.18	5.08	5.02	4.89	4.98	4.83
	DRB1-	0301	7.44	6.46	6.29	6.14	5.88	5.79	5.70	5.53	5.10	5.06	4.97	4.88	4.89	4.80	4.73	4.78	4.61	4.39	4.34	4.31
	DRB1-	0101	7.58	6.60	6.46	6.32	6.02	5.93	5.88	5.68	5.25	5.14	5.13	5.05	4.98	4.97	4.90	4.94	4.74	4.55	4.49	4.43
9-μερή	ΠΕΠΤΙΔΙΑ		YKNDVKNRS	IOMRRTLHK	YFGDFNLPR	IRRSPSKPL	LQLRNKEVT	IKFNRLNRL	LHILFSNHG	IMIKFNRLN	FVRGAKEGI	ICHQIEYYF	LNIQMRRTL	FOCKKTKFA	MRRTLHKAF	LEIMIKFNR	FKGSIFVVF	WFDSIESA	FNRLNRLTT	VKNRSVYIK	FKEKAKEAL	LLILFKDDY
OEZH			104	140	24	89	294	53	249	51	264	17	138	357	142	49	150	156	55	108	275	180
EEIPA			-	2	r,	4	5	9	7	80	6	10		12	13	14	15	16	17	18	19	20

Πίνακας ΙV: Τα 20 πρώτα προβλεπόμενα 9-μερή πεπτίδια, που είναι εν δυνάμει ΗLΑ-προσδέτες. Η στήλη 2 δείχνει τη θέση μέσα στην αλληλουχία του αυτοαντιγόνου La/SSB από την οποία αρχίζει το 9-μερές πεπτίδιο, η στήλη 3 δείχνει την αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου, οι στήλες 4 έως 11 δείχνουν την προβλεπόμενη 'τιμή' για τα αλλύλια εκείνα, στα οποία η 'τιμή' αυτή παρουσιάζει ενδιαφέρον και η στήλη 12 απεικονίζει το άθροισμα των επιμέρους 'τιμών'. Το για τα αλλύ άθροισμα αυτό καλείται 'ποσό'.

UANEIIISTHAN

164

IGANNIN

Πίνακας V: Προβλεπόμενες κρίσιμες περιοχές (hotspots regions) του αυτοαντιγόνου La/SSB. Η πρώτη στήλη δείχνει την θέση του πεπτιδίου στην πρωτεΐνη, η δεύτερη στήλη δείχνει την αλληλουχία των πεπτιδίων και η τρίτη απεικονίζει τη 'μέση τιμή' της πρόβλεψης. Η 'μέση τιμή' ορίζεται ως το 'ποσό' (Πίνακας IV) διαιρεμένο με τον αριθμό των αλλυλίων (N_{HLA}) που έχουν δώσει σημαντικές 'τιμές'.

ΘΕΣΗ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ= ΠΟΣΟ/Ν _{ΗLA}
18-32	CHQIEYYFGDFNLPR	21.22
19-33'	HQIEYYFGDFNLPRD	22.20
20-34	QIEYYFGDFNLPRDK	22.07
21-35	IEYYFGDFNLPRDKF	22.17
22-36	EYYFGDFNLPRDKFL	20.32
23-37	YYFGDFNLPRDKFLK	20.36
45-59'	GWVPLEIMIKFNRLN	22.25
46-60'	WVPLEIMIKFNRLNR	25.67
47-61'	VPLEIMIKFNRLNRL	29.56
48-62'	PLEIMIKFNRLNRLT	28.07
49-63'	LEIMIKFNRLNRLTT	32.76
50-64'	EIMIKFNRLNRLTTD	27.91
51-65'	IMIKFNRLNRLTTDF	27.94
52-66'	MIKENRLNRLTTDEN	24.97
53-67	IKFNRLNRLTTDFNV	21.61
102-116'	DEYKNDVKNRSVYIK	20.52
103-117'	EYKNDVKNRSVYIKG	20.57
104-118'	YKNDVKNRSVYIKGF	20.67
112-126'	SVYIKGFPTDATLDD	20.25
113-127	VYIKGFPTDATLDDI	20.14
134-148'	KGQVLNIQMRRTLHK	23.06
135-149'	GQVLNIQMRRTLHKA	23.34
136-150'	QVLNIQMRRTLHKAF	27.99
137-151'	VLNIQMRRTLHKAFK	27.86
138-152'	LNIQMRRTLHKAFKG	25.36
139-153'	NIQMRRTLHKAFKGS	20.30
140-154'	IQMRRTLHKAFKGSI	23.86
150-164'	FKGSIFVVFDSIESA	22.30
155-169'	FVVFDSI ESAKKFVE	20.63
178-192'	TDLLILFKDDYFAKK	20.71
179-193'	DLLILFKDDYFAKKN	20.72
180-194'	LLILFKDDYFAKKNE	20.75

ΠΙΝΑΚΑΣ VI: Προβλεπόμενοι υποψήφιοι Τ κυτταρικοί επίτοποι. Η κατάταξη των επιτόπων έχει γίνει με βάση τον μέσο όρο αυτών.

ΘΕΣΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΜΗΚΟΣ
45-67	GWVPLEIMIKFNRLNRLTTDFNV	26.75	23
134-169	KGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIFVVFDSIESAKKFVE	23.8 6	36
18-37	CHQIEYYFGDFNLPRDKFLK	21.39	20
178-194	TOLLILFKDDYFAKKNE	20.73	17
102-1 27	DEYKNDVKNRSVYIKGFPTDATLDDI	20.43	26

4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

Οι Τ κυτταρικοί επίτοποι που προσδιορίστηκαν με τη χρήση των μοτίβων του Taylor (Πίνακας !) ελέχθησαν ως προς την ομοιότητά τους με τους επιτόπους που προέκυψαν με τη χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων ΤΕΡΙΤΟΡΕ (Πίνακας ΙΙΙ) και MULTIPRED (Πίνακας VI). Από σύνολο των επιτόπων Taylor (37) μόνο οι έντεκα (11) φάνηκε να έχουν τα ίδια και/ή παρόμοια μοτίβα στην αλληλουχία τους με είκοσι (20) επιτόπους που προέκυψαν με το ΤΕΡΙΤΟΡΕ και δύο (2) επιτόπους προέκυψαν με το MULTIPRED (Πίνακας VI).

Ο επίτοπος TEPITOPE(57-76) αποτελεί τμήμα του επιτόπου Taylor(64-79), ο επίτοπος Taylor(89-104) εμπεριέχει τον επίτοπο TEPITOPE(87-97) και ο επίτοπος Taylor(254-269) εμφανίζει το ίδιο τμήμα, 254-265, με τον επίτοπο TEPITOPE(248-265). Και στις τρεις αυτές εν δυνάμει αντιγονικές περιοχές δεν προσδιορίστηκε επίτοπος με το πρόγραμμα MULTIPRED, που να παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα (αξιοσημείωτη τιμή μέσου όρου (Πίνακας V)).

Ο επίτοπος MULTIPRED(45-67), μήκους 23 καταλοίπων, περιλαμβάνει στο κεντρικό του τμήμα 4 διαδοχικά μοτίβα Taylor, τα οποία αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους. Τα μοτίβα αυτά, EIMIK (Φ-Υ-Υ-Φ), KFNR (Φ-Υ-Π-Υ), RLNR (Φ-Υ-Π-Φ) και RLTT (Φ-Υ-Π-Π), απαντώνται σε ένα μεγάλο μέρος των επιτόπων που ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο Taylor και το πρόγραμμα TEPITOPE. Ο επίτοπος MULTIPRED(134-169), μήκους 36 καταλοίπων, περιλαμβάνει 6 διαδοχικά μοτίβα Taylor, εκ των οποίων εκείνα που βρίσκονται στο τελικό τμήμα 159-169 να αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους. Τα μοτίβα QVLN (Π-Υ-Υ-Π), GQVLN (Γλυκίνη-Π-Υ-Υ-Π), KAFK (Φ-Υ-Υ-Φ), DSIE (Φ-Π-Υ-Φ), ESAK (Φ-Π-Υ-Φ), KFVE (Φ-Υ-Υ-Φ) είναι χαρακτηριστικά των επιτόπων Taylor και TEPITOPE.

Ο συνδυασμός τριών διαφορετικών μεθόδων πρόβλεψης για τον προσδιορισμό των Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου μπορεί να αποδειχτεί μια ακριβής και αξιόπιστη μεθοδολογία, αφού είναι εμφανής η ομοιότητα ανάμεσα στα προβλεπόμενα πεπτίδια (Πίνακας VII).



ΠΙΝΑΚΑΣ VII: Σύγκριση των υποψήφιων Τ κυτταρικών επιτόπων που προέκυψαν με τη μέθοδο του Taylor, το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ και το πρόγραμμα MULTIPRED και εμφανίζουν κοινά ή/και παρόμοια μοτίβα στην αλληλουχία τους. Τα κοινά μοτίβα φαίνονται με μαύρο έντονο χρώμα.

TAYLOR	TEPITOPE	MULTIPRED
MRRTLHKAFKGSIFVV	TLHKAFKGSIFVVFDSIESA	KGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIFVVFDSIESAKKFVE
(142-157)	(145-164)	(134-169)
DFNVIVEALSKSKAEL	RLNRLTTDFNVTVEALSKSK	-
(64-79)	(57 -76)	
GWVPLEIMIKFNRLN	PLEIMIKFNRLNRLTTD	GWVPLEIMIKFNRLNRLTTDFNV
(45-59)	(48-64)	(45-67)
PLEIMIKFNRLNRLTT	QIKLDEGWVPLEIMIKFNRL	GWVPLEIMIKFNRLNRLTTDFNV
(48-63)	(39-58)	(45-67)
RRSPSKPLPEVTDEY	KIRRSPSKPLPE	
(89-104)	(87-97)	-
	KFNRLNRLTTD	
	(54-64)	
	MIKFNRLNRLTTD	GWVPLEIMIKFNRLNRLTTDFNV
PLEIMIKFNRLNRLTT	(52-64)	(45-67)
- (48-63)	PLEIMIKFNRLNRLTTD	
	(48-64)	
	QIKLDEGWVPLEIMIKFNRL	
	(39-58)	
	KFNRLNRLTTD	
	(54-64)	
	MIKFNRLNRLTID	
	(52-64)	GWVPLEIMIKFNRLNRLTTDFNV
IMIKFNRLNRLTTDFN	PLEIMIKFNRLNRLTTD	(45-67)
(51-66)	(48-64)	
	QIKLDEGWVPLEIMIKFNRL	
	(39-58)	
	KFNRLNRLTTD	
	(54-64)	
	MIKFNRLNRLTTD	
KFNRLNRLTTDFNVIV	(52-64)	GWVPLEIMIKFNRLNRLTTDFNV
(54-69)	PLEIMIKFNRLNRLTTD	(45-67)
	(48-64)	
SIFVVFDSIESAKKFV	IFVVFDSIESA	KGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIFVVF DSIE SAKKFVE
(153-168)	(154-164)	(134-169)
VVFDSIESAKKFVETP	TLHKAFKGSIFVVFDSIESAK	KGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIFVVFDSIESAKKFVE
(156-171)	(145-165)	(134-169)
SNHGEIKWIDFVRGAK	DLHILFSNHGEIKWIDF	
(254-269)	(248-265)	-



ΚΕΦΑΛΑΙΟ Χ

ΕΠΙΛΟΓΗ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ



ΟΜΟΛΟΓΉ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΑΥLOR ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ Β

Το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β, το οποίο είναι δεσμευμένο στο DQ8 μόριο, παρουσιάζει τρία κύρια σημεία επαφής με το DQ8 στις θέσεις P1, P4 και P9 στον κύριο πεπτιδικό σκελετό. Στην πρόσδεση αυτή συμμετέχουν τα αμινοξικά κατάλοιπα του πεπτιδίου Ε, Υ και Ε στις θέσεις P1, P4 και P9 αντίστοιχα σχηματίζοντας δεσμούς-Η με εκείνα τα κατάλοιπα του μορίου DQ8, τα οποία συνθέτουν τις τσέπες πρόσδεσης.

Τα πεπτίδια που προέκυψαν χρησιμοποιώντας ως μέθοδο πρόβλεψης τα διατηρημένα μοτίβα του Taylor, για τα μοντελοποιημένα DQ2 και DQ7 μόρια, υπερτέθηκαν με το πεπτίδιο της ινσουλίνης B με αλληλουχία LVEALYLVCGERGG. Η διαδικασία αυτή, που ονομάστηκε 'Bήμα προς Bήμα Ομολογία', απαιτούσε να γίνουν διάφοροι συνδυασμοί ώστε να προκύψουν τα καλύτερα υπερτεθημένα (superimposed) πεπτίδια στο πεπτίδιο της ινσουλίνης B και ήταν ιδιαίτερα χρονοβόρα.

Ενα χαρακτηριστικό παράδειγμα της μεθοδολογίας αυτής, αποτελεί το προς εξέταση πεπτίδιο SIFVVFDSIESAKKFV (153-168) του La/SSB αυτοαντιγόνου, το σποία προσδιορίστηκε και με τρεις μεθόδους πρόβλεψης που προαναφέρθηκαν (Πίνακας VII, Κεφ. ΙΧ). Για την εξέταση της ομολογίας του πεπτιδίου 153-168 με το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Swiss-Pdb Viewer. Το πεπτίδιο 153-168 υπερτέθηκε στο πεπτίδιο της ινσουλίνης Β και μετακινήθηκε, δεξιά και αριστερά, κατά ένα αμινοξύ τη φορά. Η διαδικασία σταμάτησε όταν το μήκος των επιμέρους πεπτιδίων ήταν μικρότερο από εννέα αμινοξικά κατάλοιπα. Έτσι, προέκυψαν οκτώ επιμέρους πεπτίδια με διαφορετικά κατάλοιπα στις θέσεις P1, P4 και P9 (Eiκ.1).

Τα επιμέρους πεπτίδια τοποθετήθηκαν στη συνέχεια μέσα στην αύλακα πρόσδεσης των μοντελοποιημένων DQ2 και DQ7 μορίων και τα σύμπλοκα που δημιουργήθηκαν ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά (συνολικά προέκυψαν 16 σύμπλοκα). Η ενεργειακή ελαχιστοποίηση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Swiss-Pdb Viewer και φάνηκε όπ διαφορετικά πεπτίδια 'χωράνε' στην αύλακα πρόσδεσης των DQ2 και DQ7 αναδεικνύοντας επιπλέον μια ποικιλία στα αμινοξικά κατάλοπα που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 του κεντρικού πεπτιδικού πυρήνα (Εικ.1,2). Η στερεοχημική ποιότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων ελέγχθηκε με το Procheck και τα πεπτίδια που εξασφάλισαν την καλύτερη στερεοχημική ποιότητα στα σύμπλοκα DQ2/πεπτίδιο και DQ7/πεπτιδίο θεωρήθηκαν ως οι καλύτεροι τελικοί υποψήφιοι Τ κυτταρικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου (Πίνακας Ι). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις θέσεις Ρ1, Ρ4 και Ρ9 φαίνονται στον Πίνακα ΙΙ.

(A) **S I FVVFDS I E SAKKFV** LVEALYLVCGERGG (B) SIF VV F DS I E S AKKFV LV EA LY LVCG ERGG (Γ) SIFVV FDSIESA KKFV **b**= **a a b a** LVE ALYLVC G E RGG (Δ) SIFV V FDS IE SAKKF V L VEALYLVCGER GG **(E)** SIFVVFD S I E SAKKFV LVE A LY LVCGERGG (Z) SIFVVFDS I E SAKKFV LVEALY LVCGERGG (H)S I FVVF DS I E SA KKFV LVEALYLVCGE RGG (ΣΤ) SIFVVFDSIE SAKKFV LVEA LY L VC GER G G

Εικόνα 1: 'Βήμα προς Βήμα Ομολογία' του πεπτιδίου SIFVVFDSIESAKKFV (153-168) του La/SSB αυτοαντιγόνου με το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β με αλληλουχία LVEALYLVCGERGG. (Α) Αρχικά το πεπτίδιο 153-168 τοποθετείται πάνω στο πεπτίδιο της ινσουλίνης Β έχοντας ως πρώτο αμινοξύ την σερίνη (S). Σε αντιστοιχία με το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις P1, P4 και P9 είναι η φαινυλαλανίνη (F), η φαινυλαλανίνη (F) και η σερίνη (S) (με κόκκινο γράμμα). (B) Στη συνέχεια κρατώντας σταθερό το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β μετακινείται μια θέση προς τα αριστερά το πεπτίδιο 153-168 οπότε αλλάζουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις P1, P4 και P9 σε βαλίνη (V), ασπαρτικό (D) και αλανίνη (A) (με κόκκινο γράμμα). Επαναλαβάνεται η ίδια διαδικασία (Α-ΣΤ). Τα όμοια αμινοξέα ανάμεσα στα δύο πεπτίδια συμβολίζονται με * και τα αμινοξέα που έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με ... ή ... ΠΙΝΑΚΑΣ Ι: Προβλεπόμενοι Τ κυτταρικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου για τα μοντελοποιημένα DQ2 και DQ7 μόρια. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 φαίνονται με κόκκινο γράμμα. Το μήκος των προβλεπόμενων Τ κυτταρικών επίτοπων κυμαίνεται από 9 έως 14 αμινοξέα.

DQ7 MOPIO	ПЕРІОХН ТОУ La/SSB
ΠΕΠΤΙΔΙΟ	
IVEALSKSKAEL	(68-79)
ELMEISEDKTKIR	(78-90)
AFKGSIFVVF DS I	(149-161)
GSIFVVFDSIESAK	(152-165)
IFVVFDSIESAKKF	(154-167)
AKDANNGNLQLRNK	(286-299)
DQ2 MOPIO	NEPIOXH TOY La/SSB
ΠΕΠΤΙΔΙΟ	
LKEQIKLDEGWV	(36-47)
IVEALSKSKAEL	(68-79)
SKAELMEISEDKT	(75-87)
	(131-144)
AFKGSIFVVFDSIE	(149-162)
IESAKKFVETPGQK	(161-174)
AKDANNGNLQLR	(286-297)
AKDANNGNLQLRNK	(286-299)
EKEALKKIIEDQES	(311-324)

Γίτναικας ΙΙ: Αμινοξικά κατάλοπτα των πεπτιδίων που βρίσκονται στις θέσεις P1, P4 και P9 του κεντρικού πεπτιδικού σκελετού, όπως προκύπτουν μετά από την διαδικασίας της ΄Βήμα προς Βήμα Ομολογίας' του πεπτιδίου 153-168 πάνω στο πεπτίδιο της ινσουλίνης B και τον στερεοχημικό έλεγχο των σχηματιζόμενων συμπλόκων DQ2/πεπτιδίου και DQ7/πεπτιδίου.

DQ	P1	P4	P9
DQ2	EADK	KSMQIN	WEDQTL
DQ7	EMKIVD	SIVDN	EKDAL
DQ8	E	Y	E





Εικόνα 2: (Α) Απεικόνιση του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β, όπου τα αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις Ρ1, Ρ4 και Ρ9 (Ε, Υ και Ε αντίστοιχα) φαίνονται με πράσινο χρώμα. (Β) Υπέρθεση του πεπτιδίου 68-79 του La/SSB αυτοαντιγόνου στο πεπτίδιο της ινσουλίνης Β για το μόριο DQ2. (Γ) Υπέρθεση του πεπτιδίου 149-161 του La/SSB αυτοαντιγόνου στο πεπτίδιο της ινσουλίνης Β για το μόριο DQ7. Ο κεντρικός πεπτιδικός πυρήνας μήκους 9 αμινοξέων του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β ταυτίζεται με τους κεντρικούς πυρήνες για τα πεπτίδια 68-79 και 149-161 του La/SSB αυτοαντιγόνου. Τα αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις Ρ1, Ρ4 και Ρ9 των πεπτιδίων 68-79 και 149-161 φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Οι παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων μπορεί να έχουν την ίδια ή και διαφορετική διευθέτηση από εκείνες του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΧΙ

- ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ



1. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ GETAREA

Το GETAREA είναι ένα πρόγραμμα που διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο για τον υπολογισμό της επιφάνειας πρωτεϊνικών μορίων που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (solvent accessible surface area, SASA). Προσδιορίστηκε η επιφάνειά των πεπτιδίων του Πίνακα Ι (Κεφ.Χ) μέσα στα σύμπλοκα DQ2-πεπτιδίου και DQ7πεπτιδίου. Η ακτίνα του νερού, που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, τέθηκε ίση με 1.4 Å. Η SASA των πεπτιδίων (σε Å²) υπολογίστηκε ανά αμινοξικό κατάλοιπο.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα των προβλεπόμενων πεπτιδίων που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 της αύλακας πρόσδεσης των μοντελοποιημένων DQ2 και DQ7 αναμένεται να έχουν πολύ χαμηλή έκθεση στο διαλύτη (μικρή τιμή SASA) συγκρινόμενα με γειτονικά κατάλοιπα, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στα άκρα των πεπτιδίων αναμένεται να έχουν υψηλή έκθεση στο διαλύτη (μεγάλη τιμή SASA). Πράγματι τα διαγράμματα που προέκυψαν για όλα τα προβλεπόμενα πεπτίδια μέσα σύμπλοκα DQ2-πεπτιδίου και DQ7-πεπτιδίου επιβεβαιώνουν την παρατήρηση αυτή (Εικ.1, 2).



Εικόνα 1: Ενδεικτικό διαγράμμα προσδιορισμού της εκτεθειμένης στο διαλύτη επιφάνειας του πεπτιδίου 39-47 του La/SSB αυτοαντιγόνου, όπως προέκυψε από το πρόγραμμα GETAREA. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 εμφανίζουν πολύ χαμηλή τιμή επιφάνειας, που είναι χαρακτηριστικό ότι βρίσκονται βαθιά μέσα στις τσέπες P1, P4 και P9 στην αύλακα πρόσδεσης του DQ2, σε αντίθεση με εκείνα στα άκρα των πεπτιδίων που εμφανίζουν υψηλές τιμές επιφάνειας.





Εικόνα 2: Ενδεικτικό διαγράμμα προσδιορισμού της εκτεθειμένης στο διαλύτη επιφάνειας του πεπτιδίου 149-161 του La/SSB αυτοαντιγόνου, όπως προέκυψε από το πρόγραμμα GETAREA. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 εμφανίζουν πολύ χαμηλή τιμή επιφάνειας, που είναι χαρακτηριστικό ότι βρίσκονται βαθιά μέσα στις τσέπες P1, P4 και P9 στην αύλακα πρόσδεσης του DQ7, σε αντίθεση με εκείνα στα άκρα των πεπτιδίων που εμφανίζουν υψηλές τιμές επιφάνειας.

Η προσεκτική μελέτη των διαγραμμάτων οδήγει στην υπόθεση ότι και η τσέπη P6 ενδέχεται να είναι σημαντική στην πρόσδεση για τα μόρια DQ2 και DQ7, αφού οι τιμές SASA των αμινοξικών καταλοίπων των προβλεπόμενων πεπτίδιων, που αντιστοιχούν στη θέσεις P6, είναι πολύ χαμηλές για όλα τα πεπτίδια. Επιπλέον, τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις θέσεις P5 φαίνεται να είναι εκτεθειμένα (υψηλές τιμές SASA) και πιθανά να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τον T κυτταρικό υποδοχέα (TCR).

2. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ TINKER ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ DQ-ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ

Το πρόγραμμα TINKER χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δυναμικής ενέργειας αλληλεπίδρασης των συμπλόκων DQ-πεπτίδιου της ινσουλίνης B, DQ2-πεπτίδιου και DQ7-πεπτίδιου. Η δυναμική ενέργεια αλληλεπίδρασης των συμπλόκων υπολογίσθηκε με βάση την εξίσωση 2.1,

 $\Delta E_{int} = E_{pMHC} - E_{MHC} - E_p$

2.1

όπου Ε_{ρΜΗC} είναι η συνολική δυναμική ενέργεια του συμπλόκου MHC-πεπτιδίου σε συμπλεγμένη κατάσταση, Ε_{ΜΗC} και Ε_ρ είναι οι δυναμικές ενέργειες του MHC μορίου και του πεπτιδίου (p) σε μη συμπλεγμένη κατάσταση. Στον Πίνακα Ι παρουσιάζονται οι πμές ΔΕ_{rx} για όλα τα σύμπλοκα. Τα πεπτίδια που εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση πρόσδεσης στα DQ2 και DQ7 μόρια οδηγούν σε χαμηλότερες τιμές δυναμικής ενέργειας στα σχηματιζόμενα σύμπλοκα.

Κατά τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας αλληλεπίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας CHARMM27, το συνεχές μοντέλο επιδιαλύτωσης GB/SA και η διηλεκτρική σταθερά καθορίστηκε ίση με 1.0. Τα κατώτερα όρια (cut-offs) για τις ηλεκτροστατικές (charged-charged) και τις van der Waals αλληλεπιδράσεις ορίστηκαν στα 15.0 και 12.0 Å.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι: Η δυναμική ενέργεια αλληλεπίδρασης (ΔΕ_{int}) των συμπλόκων DQ8-πεπτίδιου, DQ2-πεπτίδιου και DQ7-πεπτίδιου, σε Kcal/mol.

ΣΥΜΠΛΟΚΟ	ΔE _{int}	
DQ8		
DQ8-p	-74.778	
DQ7		
DQ7-p(149-161)	-122.63	
DQ7-p ₍₇₈₋₉₀₎	-72.785	
DQ7-p ₍₂₈₆₋₂₉₉₎	-69.358	
DQ7-p(154-167)	-65.879	
DQ7-p ₍₆₈₋₇₉₎	-51.545	
DQ7-p ₍₁₅₂₋₁₆₅₎	-28.388	
DQ2		
DQ2-p(286-297)	-88.272	
DQ2-P(149-162)	-86.230	
DQ2-p ₍₁₃₁₋₁₄₄₎	-76.134	
DQ2-p ₍₂₈₆₋₂₉₉₎	-74.111	
DQ2-p(161-174)	-71.061	
DQ2-p ₍₃₁₁₋₃₂₄₎	-65.917	
DQ2-p ₍₆₈₋₇₉₎	-49.201	
DQ2-p(38-47)	-47.912	
DQ2-p(76-47)	-47.781	



3. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ MHCPred

Η συγγένεια πρόσδεσης των υποψήφιων Τ κυτταρικών επιτόπων (Πίνακας Ι, Κεφ. Χ) μέσα στα σύμπλοκα τους προσδιορίστηκε με τη χρήση του προγράμματος MHCPred. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, όσο αυξάνεται η συγγένεια πρόσδεσης ενός πεπτιδίου σε ένα MHC μόριο, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να αναγνωριστεί από έναν Τ κυτταρικό υποδοχέα (TCR) και να αρχίσει η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ένας τρόπος μέτρησης της συγγένειας πρόσδεσης είναι ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} , η οποία δείχνει την συγκέντρωση του πεπτιδίου που απαιτείται για 50% αναστολή σε ένα ανταγωνιστικό πείραμα πρόσδεσης (competitive binding assay). Ένα πεπτίδιο προσδένεται σε ένα MHC μόριο όταν $pIC_{50} > 6.3$ ή όταν οι τιμές IC_{50} κυμαίνονται από 0.01 έως 5000nM.

Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκε το αλλύλιο τάξης ΙΙ, DRB1*0101, λόγω της υψηλής ομολογίας στην πρωτοταγή δομή του με τα DQ2 και DQ7 μόρια. Το μοντέλο πρόβλεψης της συγγένειας πρόσδεσης που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη βασίζεται στη συνεισφορά των αμινοξικών κατάλοιπων στην πρόσδεση για τις θέσεις από P1 έως P9 του κεντρικού πεπτιδικού πυρήνα και στις αλληλεπιδράσεις αυτών με γειτονικά κατάλοιπα.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 τοποθετήθηκαν στην ειδική φόρμα του προγράμματος MHCPred και υπολογίστηκαν οι τιμές IC₅₀ για καθένα από τα προβλεπόμενα πεπτίδια (Πίνακας II). Επιπλέον, προβλέφθηκαν οι τιμές pIC₅₀ (-logIC₅₀) από ένα συνδυασμό που περιλαμβάνει τις συνεισφορές (P) για καθένα αμινοξικό κατάλοιπο σε κάθε θέση του πεπτιδίου και τις συνεισφορές από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων του πεπτιδίου που απέχουν μεταξύ τους μία (γειτονικά κατάλοιπα) ή δύο θέσεις. Οι τιμές pIC₅₀ μπορούν να συσχετιστούν με την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ΔG_{bind}, αφού ΔG_{bind}~~RT InIC₅₀.



Πίνακας ΙΙ: Πρόβλεψη της συγγένειας πρόσδεσης των προβλεπόμενων αντιγονικών πεπτιδίων των μορίων DQ8, DQ2 και DQ7. Η πρώτη στήλη δείχνει το 9-μερες κεντρικό τμήμα των πεπτιδίων, η δεύτερη στήλη περιέχει τις τιμές -logiC₅₀ (ή plC₅₀) και η τρίτη στήλη περιέχει τις τιμές IC₅₀ (nM). Τα αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις P1, P4 και P9 φαίνονται με κόκκινο.

Αλληλουχία	Προβλεπόμενη -logiC ₆₀ (M)	Προβλεπόμενη ΙC ₅₀ (nM)
DQ8		
E ₃₇ ALYLVCGE ₄₅	6.988	102.80
DQ7		
I 154 FVVFDSIE 162	7.714	19.32
E 70 A L S K S K A E 78	7.348	44.87
D 288 A N N G N L Q L 296	6.816	152.76
K 151 G S I F V V F D 159	6.685	206.54
V 156 V F D S I E S A 164	6.455	350.75
M ₈₀ EISEDKTK ₈₈	6.004	990.83
DQ2		
E 70 ALSKSKAE 78	7.348	44.87
E 313 A L K K I I E D 321	7.17	67. 61
A ₇₇ ELMEISED ₈₅	7.151	70.63
D 288 A N N G N L Q L 296	6.816	152.76
D 288 A N N G N L Q L 296	6.816	152.76
K 151 G S I F V V F D 159	6.685	206.54
E ₃₈ QIKLDEGW ₄₆	6.348	448.75
D 133 K G Q V L N I Q 141	6.196	636.80
E 162 SAKKFVET 170	6.137	729.46

Τα πεπτίδια που έχουν υψηλές τιμές plC_{50} (ή χαμηλότερες τιμές lC_{50}) θεωρούνται να είναι καλύτεροι προσδέτες στα DQ2 και DQ7 μόρια. Όλα τα πεπτίδια που προβλέφθηκαν φαίνεται να είναι εν δυνάμει Τ κυτταρικοί επίτοποι εκτός από τα πεπτίδιο 78-90, που το κεντρικό του 9-μερες τμήμα είναι το 80-88 για το DQ7 μόριο και τα πεπτίδια 131-144 και 161-174, που το κεντρικό τους 9-μερες τμήμα είναι το 133-141 και 162-170 για το DQ2 μόριο ($plC_{50} < 6.3$).



4. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ DQ8-ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ Β ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΑ DQ7-ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής στο σύμπλοκο ανάμεσα στο DQ8 μόριο με το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β και στα σύμπλοκα ανάμεσα στο DQ7 μόριο με καθέναν από τους προβλεπόμενους Τ κυτταρικούς επιτόπους του La/SSB αυτοαντιγόνου (Πίνακας Ι, Κεφ.Χ) έγιναν με σκοπό να διερευνηθούν περαιτέρω τα δομικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων σε διαφορετικές χρονικές κλίμακες, να υπολογιστούν οι μέσες τιμές κάποιων από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των μορίων και να προσδιοριστούν οι δομές που είναι πιο σταθερές θερμοδυναμικά. Τα άτομα θεωρούνται σφαιρικές μάζες που διαθέτουν κάποιο φορτίο (σχεδόν πάντα κλάσμα του φορτίου το ηλεκτρονίου) και δέχονται τις αλληλεπιδράσεις που περιγράφει το πεδίο δυνάμεων από τα υπόλοιπα άτομα, δηλαδή 'αισθάνονται' κάποιο δυναμικό και κινούνται πάνω σε αυτό. Την κίνηση αυτή καθορίζει μια δύναμη που είναι παράγωγος της δυναμικής ενέργειας. Οι αρχικές θέσεις των ατόμων (έναρξη της μοριακής δυναμικής) προέρχονται από την ενεργειακή ελαχιστοποίηση, οι αρχικές ταχύτητες ανατίθενται στα άτομα σύμφωνα με την κατανομή Boltzmann και αντιστοιχούν σε κάποια θερμοκρασία και η επιτάχυνση υπολογίζεται από την παράγωγο της δύναμης.

Προκειμένου να βρεθεί η πιο κατάλληλη μεθοδολογία, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής έγιναν αρχικά μόνο για το σύμπλοκο ανάμεσα στο DQ8 μόριο με το πεπτίδιο της ινσουλίνης B, που χρησιμοποιήθηκε μέχρι τώρα ως εκμαγείο, σε διάφορα χρονικά διαστήματα και μελετήθηκε η συμπεριφορά του συστήματος λαμβάνοντας υπόψη ένα σύνολο από παραμέτρους. Στις παραμέτρους αυτές συγκαταλέγονται η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας CHARMM27, το συνεχές μοντέλο επιδιαλύτωσης GB/SA και ο αλγόριθμος ολοκλήρωσης Verlet. Η διηλεκτρική σταθερά καθορίστηκε ίση με 1.0. Τα κατώτερα όρια (cut-offs) για τις ηλεκτροστατικές (charged-charged) και τις van der Waals αλληλεπιδράσεις ορίστηκαν στα 15.0 και 12.0 Å αντίστοιχα και οι παράγοντες chg-taper και ναw-taper ορίστηκαν στα 0.9 Å. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής έγιναν με τη χρήση του προγράμματος TINKER σε μια Linux υπολογιστική μονάδα με διπλό επεξεργαστή και λειτουργικό Mandrake 10.0. Οι μεθοδολογίες που εξετάστηκαν για την παρούσα μελέτη αναπτύσσονται παρακάτω.



4.1 Ακινητοποιημένο το DQ8, σε κίνηση το πεπτίδιο

Πολλές φορές είναι ενδιαφέρον να περιοριστεί η κίνηση κάποιων ατόμων του συστήματος για να μελετηθεί καλλίτερα κάποιο υποσύστημα ή να περιοριστεί η κίνηση κάποιων ατόμων σε κάποιες ιδιαίτερες περιοχές. Τέτοιοι περιορισμοί μπορεί να είναι η ολική ακινησία ατόμων, ο περιορισμός σε μήκη και γωνίες δεσμών (ή δίεδρες) σε κάποιες τιμές μόνο. Στην περίπτωση που ο περιορισμός θέτει σε πλήρη ακινησία ορισμένα άτομα τότε αυτά δεν επιτρέπεται να κινηθούν. Έτσι εστιάζεται η προσοχή σε κάποιο άλλο τμήμα του συστήματος και επιταχύνονται οι υπολογισμοί διότι μειώνονται οι βαθμοί ελευθερίας του συστήματος.

Σύμφωνα με την μεθοδολογία αυτή όλα τα άτομα του DQ8 μορίου παρέμειναν ακίνητα σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, ενώ τα άτομα του πεπτιδίου της ινσουλίνης B κινήθηκαν ελευθέρα, χωρίς περιορισμούς. Η εντολή 'active' του προγράμματος TINKER ενεργοποίησε την κίνηση των ατόμων του πεπτιδίου της ινσουλίνης B και κατέστησε ακίνητα όλα τα άτομα του DQ8 μορίου. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με τη μεθοδολογία αυτή έγιναν σε θερμοκρασία 300K και διήρκεσαν μόνο 20 ps. Υπολογίστηκε η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης (RMSD) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B, για το DQ8 και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B ξεχωριστά.

Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ8 μόριο (RMSD=0 Å) ενώ για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B και για το σύμπλοκο DQ8πεπτίδιου η τιμή του RMSD κυμάνθηκε από 0.189 έως 1.620 Å και από 0.0465 έως 0.382 Å, αντίστοιχα (Εικ.3). Δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μετατόπιση στο κεντρικό 9μερες τμήμα του πεπτιδίου της ινσουλίνης B, όπως φάνηκε από την υπέρθεση των δομών του συμπλόκου και των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων στις θέσεις P1, P4 και P9 (Εικ.4,5).





Εικόνα 3: Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B (-), για το DQ8 μόριο (-) και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B(¤).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της μετατόπισης του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β μέσα στην αύλακα πρόσδεσης του DQ8 μορίου με την πάροδο του χρόνου και ενώ το DQ8 μόριο παραμένει ακίνητο για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 5, 10, 15 και 20 ps.





Εικόνα 5: Υπέρθεση των αμινοξικών καταλοίπων Ε, Υ και Ε του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β στις θέσεις Ρ1, Ρ4 και Ρ9 αντίστοιχα για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 5, 10, 15 και 20 ps.

4.2 Ακινητοπιημένο το πεπτίδιο, σε κίνηση το DQ8

Σύμφωνα με την μεθοδολογία αυτή όλα τα άτομα του DQ8 μορίου κινήθηκαν ελευθέρα χωρίς περιορισμούς, ενώ όλα τα άτομα του πεπτιδίου της ινσουλίνης B παρέμειναν ακίνητα σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Η εντολή 'active' του προγράμματος TINKER ενεργοποίησε την κίνηση των ατόμων του DQ8 μορίου και κατέστησε ακίνητα όλα τα άτομα του πεπτιδίου της ινσουλίνης B. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με τη μεθοδολογία αυτή διήρκεσαν μόνο 20 ps και υπολογίστηκε η μεταβολή του δομικού δείκτη RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B, για το DQ8 και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B ξεχωριστά (Εικ.6).

Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B (RMSD=0 Å), ενώ για το DQ8 μόριο και για το σύμπλοκο DQ8πεπτίδιου η τιμή του RMSD αυξήθηκε απότομα κατά τη διάρκεια των 3 ps και στη συνέχεια παρέμεινε περίπου σταθερή (η μέση τιμή RMSD υπολογίστηκε σε 2.467 και 2.531 Å για το DQ8 μόριο και για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου αντίστοιχα, για το χρονικό διάστημα από 3 έως 20 ps). Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης παρατηρήθηκε αποδιάταξη της ελικοειδούς δομής των αλυσίδων α1 και β1 του μορίου DQ8, οι οποίες σχηματίζουν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου (Εικ.7).




Εικόνα 6: Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B (-), για το DQ8 μόριο (-) και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B (¤).



Εικόνα 7: Απεικονίσεις των διαμορφώσεων του DQ8 μορίου που προκύπτουν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 5, 10, 15 και 20 ps και ενώ το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β παραμένει ακίνητο μέσα στην αύλακα πρόσδεσης.

4.3 Σε κίνηση χωρίς περιορισμούς το DQ8 και το πεπτίδιο

Σύμφωνα με την μεθοδολογία αυτή όλα τα άτομα του DQ8 μορίου και του πεπτιδίου της ινσουλίνης B κινήθηκαν ελευθέρα χωρίς περιορισμούς σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Η εντολή 'active' του προγράμματος TINKER ενεργοποίησε την κίνηση των ατόμων του DQ8 μορίου και του πεπτιδίου της ινσουλίνης B. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με τη μεθοδολογία αυτή διήρκεσαν μόνο 20 ps και υπολογίστηκε η μεταβολή του δομικού δείκτης RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B, για το DQ8 και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B ξεχωριστά (Eiκ.8).



Εικόνα 8: Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B (-), για το DQ8 μόριο (-) και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B(μ).

Παρατηρήθηκε απότομη αύξηση του RMSD για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B για το χρονικό διάστημα από 0 έως 13.5 ps (μέγιστη τιμή RMSD=8.862 Å). Την απότομη αύξηση διαδέχτηκε η απότομη μείωση του RMSD μέχρι το τέλος της προσομοίωσης (20 ps). Η τιμή του RMSD για το DQ8 μόριο και το σύμπλοκο DQ8πεπτιδίου αυξανόταν συνεχώς καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (20 ps). Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης παρατηρήθηκε αποδιάταξη της ελικοειδούς δομής των αλυσίδων α1 και β1 του μορίου DQ8, οι οποίες σχηματίζουν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου (Εικ.9). Επίσης, λόγω της απότομης μεταβολής του RMSD για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B σε ιδιαίτερα υψηλές τιμές, το πεπτίδιο φαίνεται να αποχωρεί από την αύλακα πρόσδεσης (Εικ.10).



Εικόνα 9: Απεικονίσεις των διαμορφώσεων του συμπλόκου μεταξύ του DQ8 μορίου και του πεπτιδίου της ινσουλίνης B, όπως προκύπτουν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 5, 10, 15 και 20 ps.



Εικόνα 10: Απεικονίσεις των διαμορφώσεων του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β, όπως προκύπτουν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 5, 10, 15 και 20 ps.



4.4.1 Σε κίνηση με περιορισμούς το DQ8 και το πεπτίδιο (A)

Σύμφωνα με την μεθοδολογία αυτή όλα τα άτομα του DQ8 μορίου και του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β κινήθηκαν με τους ίδιους περιορισμούς για το χρονικό διάστημα 0-50 ps. Οι περιορισμοί διατηρήθηκαν μέχρι το τέλος των προσομοιώσεων για το DQ8 μόριο, ενώ άρθηκαν για το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β, το όποιο αφέθηκε ελεύθερο να κινηθεί για το χρονικό διάστημα 51-100 ps. Η εντολή 'restrain-position' του προγράμματος TINKER εφαρμόστηκε για τα C^a άτομα του DQ8 μορίου και τα C^a άτομα του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β θέτοντας την σταθέρα δύναμης ίση με 20 Kcal/ A² για το χρονικό διάστημα 0-50 ps , ενώ για το χρονικό διάστημα 51-100 ps η σταθέρα δύναμης διατηρήθηκε 20 Kcal/ A² για τα C^a άτομα του DQ8 μορίου και μηδενίστηκε για τα C^a άτομα του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με τη μεθοδολογία αυτή διήρκεσαν 100 ps και υπολογίστηκε η μεταβολή του δομικού δείκτης RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης Β, για το DQ8 και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β ξεχωριστά (Εικ.11). Το χρονικό διάστημα από 0 έως 50 ps χαρακτηρίστηκε ως φάση εξισορρόπησης.



Εικόνα 11: Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B (-), για το DQ8 μόριο (-) και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B (*).



Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ8 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.196 Å) δεν παρουσίασε σημαντικές αυξομοιώσεις κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης (100 ps). Για το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση του RMSD τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που αίρονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από 80 έως 100 ps παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις στην τιμή του (μέση τιμή RMSD=3.385 Å, διακύμανση=0.042). Η τιμή του RMSD για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου παρέμεινε σταθερή για το χρονικό διάστημα από 0 έως 50 ps, αυξήθηκε απότομα τρεις χρονικές αυξομειώσεις στην τιμή του (μέση τιμή καν μικρότερες αυξομειώσεις στην τιμή του (μέση τιμή RMSD=1.685 Å, διακύμανση=0.002). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπεια την μετατόπιση των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων του πεπτιδίου της ινσουλίνης B που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 (Εικ.12).

Πίνακας ΙΙΙ: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ8-πεπτιδίου και του πεπτιδίου της ινσουλίνης B με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 80 εώς 100 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ8-πεπτίδιο	πεπτίδιο
Μέσος όρος	1,685	3,385
Τυπικό σφάλμα	0,004	0,014
Διάμεσος τιμή	1,694	3,378
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,049	0,205
Διακύμανση	0,002	0,042
Κύρτωση	-0,816	-0,488
Εύρος	0,196	0,894
Ελάχιστο	1,578	2,904
Μέγιστο	1,773	3,798

Η κύρτωση χαρακτηρίζει τη σχετική οξύτητα ή ομαλότητα μιας κατανομής, σε σύγκριση με την κανονική κατανομή. Θετική κύρτωση υποδηλώνει κατανομή με σχετικές οξύνσεις. Αρνητική κύρτωση υποδηλώνει σχετικά ομαλή κατανομή. Τόσο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου όσο για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B, η κύρτωση είναι αρνητική υποδηλώνοντας ότι αυτά υπόκειται σε ομαλή κατανομή. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου όσο για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B είναι πολύ μικρή.





В



Εικόνα 12: (Α) Υπέρθεση του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β για τα χρονικά διαστήματα 0 και 100 ps. (Β) Υπέρθεση του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β για τα χρονικά διαστήματα 0, 50, 68, 79 και 100 ps. Διακρίνονται τα αμινοξικά καταλοίπα Ε, Υ και Ε που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9.



4.4.2 Σε κίνηση με περιορισμούς το DQ8 και το πεπτίδιο (B)

Σύμφωνα με την μεθοδολογία αυτή όλα τα άτομα του DQ8 μορίου και του πεπτιδίου της ινσουλίνης B κινήθηκαν με τους ίδιους περιορισμούς για το χρονικό διάστημα 0-50 ps. Οι αρχικοί περιορισμοί διατηρήθηκαν μέχρι το τέλος των προσομοιώσεων για το DQ8 μόριο, ενώ άρθηκαν σταδιακά για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B, για το χρονικό διάστημα 51-150 ps. Συγκεκριμένα, η εντολή 'restrainposition' του προγράμματος TINKER εφαρμόστηκε για τα C^α άτομα του DQ8 μορίου και η σταθερά δύναμης τέθηκε ίση με 20 Kcal/ Å² σε όλη τη διάρκεια της μελέτης (0-150 ps). Η εντολή 'restrain-position' του προγράμματος TINKER εφαρμόστηκε για τα C^α άτομα του πεπτιδίου της ινσουλίνης B ενώ η σταθερά δύναμης τέθηκε ίση με 20 Kcal/ Å² για το χρονικό διάστημα 0-50 ps, ίση με 10 Kcal/ Å² για το χρονικό διάστημα 51-60 ps, ίση με 5 Kcal/ Å² για το χρονικό διάστημα 61-70 ps και μηδενίστηκε για το χρονικό διάστημα 71-150 ps επιτρέποντας στο πεπτίδιο της ινσουλίνης B να κινηθεί ελεύθερα χωρίς περιορισμούς.

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με τη μεθοδολογία αυτή διήρκεσαν 150 ps και το χρονικό διάστημα από 0 έως 50 ps χαρακτηριστηκε ως φάση εξισορρόπησης. Υπολογίστηκαν η μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε A²) για το πεπτίδιο της ινσουλίνης-B, της επιδιαλύτωσης, η οποία εκφράζεται σε όρους ελεύθερης ενέργειας (σε Kcal/mol) του συμπλόκου DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B, της ακτίνας περιστροφής (σε A) του συμπλόκου DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B, της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Å²) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης Ρ1, Ρ4 και Ρ9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου της ινσουλίνης-Β και η τέλος η μεταβολή του δομικού δείκτη RMSD για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B, για το DQ8 και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B ξεχωριστά, σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικ.13-14). Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόστηκε στο σύμπλοκο ανάμεσα στο DQ8 μόριο και στο πεπτίδιο της ινσουλίνης Β και στα σύμπλοκα ανάμεσα στο μοντελοποιημένο DQ7 μόριο και στους προβλεπόμενους Τ κυτταρικούς επιτόπους (Πίνακας Ι, Κεφ.Χ) του La/SSB αυτοαντιγόνου. Οι παράμετροι πρόβλεψης περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την συνάρτηση δυναμικής ενέργειας CHARMM27, το συνεχές μοντέλο επιδιαλύτωσης GB/SA και τον αλγόριθμο ολοκλήρωσης Verlet. Η διηλεκτρική σταθερά καθορίστηκε ίση με 1.0. Τα κατώτερα όρια (cut-offs) για τις ηλεκτροστατικές (charged-charged) και van der Waals αλληλεπιδράσεις ορίστηκαν στα 15.0 και 12.0 Å αντίστοιχα και οι παράγοντες chg-taper και vdw-taper ορίστηκαν στα 0.9 Α. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε συνεχές μέσο ήταν ιδιαίτερα χρονοβόρες για το λόγο αυτό τα σύμπλοκα εξετάστηκαν για 150 ps. BIBALOO



Εικόνα 13: (Α) Μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Å²) για το πετιτίδιο της ινσουλίνης-Β μέσα στο σύμπλοκο DQ8-πεπιτιδίου και (Β) της ενέργειας επιδιαλύτωσης (σε Kcal/mol) του συμπλόκου DQ8-πεπιτιδίου.



Εικόνα 14: (Α) Μεταβολή της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Å²) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης Ρ1, Ρ4 και Ρ9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β. (Β) Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD (για τα C^a του πεπτιδικού σκελετού) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ8πεπτιδίου της ινσουλίνης Β (-), για το DQ8 μόριο (-) και για το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β (#),

Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ8 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.195 Å) δεν παρουσίασε αυξομειώσεις καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (150 ps). Παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην τιμή του RMSD για το πεπτίδιο της ινσουλίνης B τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που μειώνονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Κατά τη χρονική στιγμή 110 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Κατά τη χρονική στιγμή 110 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα παρατηρείται εκ νέου αύξηση στην τιμή του RMSD, η οποία οδηγεί σε πλατό καθόσον δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξομειώσεις στην τιμή του (μέση τιμή RMSD=2.277 Å, διακύμανση=0.200) μέχρι το τέλος της προσομοίωσης. Περίπου ίδιο είναι το προφίλ μεταβολής του RMSD για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου με πολύ χαμηλότερες τιμές RMSD (μέση τιμή RMSD=0.740 Å, διακύμανση=0.020). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπεια την μετατόπιση του πεπτιδίου της ινσουλίνης B από την αρχική του θέση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της προσομοίωσης (Εικ.15).

Πίνακας ΙV: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ8-πεπτίδιο και του πεπτιδίου της ινσουλίνης B με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 100 εώς 150 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ8-πεπτίδιο	πεπτίδιο
Μέσος όρος	0.740	2.277
Τυπικό σφάλμα	0.006	0.023
Διάμεσος τιμή	0.807	2.519
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0.142	0.519
Διακύμανση	0.020	0.20
Κύρτωση	-0.359	0.118
Εύρος	0.516	1.950
Ελάχιστο	0.386	0.879
Μέγιστο	0.902	2.828

Όπως προαναφέρθηκε, η κύρτωση χαρακτηρίζει τη σχετική οξύτητα ή ομαλότητα μιας κατανομής, σε σύγκριση με την κανονική κατανομή. Για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου, η κύρτωση είναι αρνητική υποδηλώνοντας ότι αυτό υπόκειται σε ομαλή κατανομή σε αντίθεση με το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β, για το οποίο η κύρτωση είναι θετική και εμφανίζει σχετικές οξύνσεις στην κατανομή του. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ8-πεπτίδιο όσο για το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β είναι πολύ μικρή.







Εικόνα 15: (Α) Υπέρθεση του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β για τα χρονικά διαστήματα 0 και 150 ps. (Β) Υπέρθεση του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β για τα χρονικά διαστήματα 0, 50, 110 και 150 ps. Διακρίνονται τα αμινοξικά καταλοίπα Ε, Υ και Ε που αντιστοιχούν στις θέσεις Ρ1, Ρ4 και Ρ9.



2. HLA-DQ7/ПЕПТІΔІО(68-79)



Εικόνα 16: (Α) Μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε A²) για το πεπτίδιο 68-79 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(68-79) και (Β) της ενέργειας επιδιαλύτωσης (σε Kcal/mol) του συμπλόκου DQ7-(68-79).



197



Εικόνα 17: (Α) Μεταβολή της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Å²) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης P1, P4 και P9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου 68-79 του La/SSB αυτοαντιγόνου. (Β) Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD (για τα C^a του πεπτιδικού σκελετού) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ7-(68-79) (-), για το DQ7 μόριο (-) και για το πεπτίδιο 68-79 (¤) του La/SSB αυτοαντιγόνου.

Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ7 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.173 Å) δεν παρουσίασε αυξομειώσεις καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (150 ps). Παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην τιμή του RMSD για το πεπτίδιο 68-79 τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που μειώνονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα και μέχρι το τέλος της προσομοίωσης παρατηρούνται μικρές αυξομειώσεις στην τιμή του RMSD (πλατό, μέση τιμή RMSD=1.935 Å, διακύμανση=0,023). Πολύ πιο ομαλό είναι το προφίλ μεταβολής του RMSD για το σύμπλοκο DQ7-(68-79) με χαμηλότερες τιμές RMSD (πλατό, μέση τιμή RMSD=0.613 Å. πολύ διακύμανση=0.0007) (Εικ.17Β). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπεια την μετατόπιση του πεπτιδίου 68-79 από την αρχική του θέση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της προσομοίωσης (Εικ.18), ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη δομή του DQ7 μορίου.

Πίνακας V: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ7-(68-79) και του πεπτιδίου 68-79 με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 100 εώς 150 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ7-(68-79)	(68-79)
Μέσος όρος	0.613	1.935
Τυπικό σφάλμα	0.001	0.007
Διάμεσος τιμή	0.612	1.935
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0.027	0.152
Διακύμανση	0.0007	0.023
Κύρτωση	-0.444	0.449
Εύρος	0.127	0.828
Ελάχιστο	0.548	1.616
Μέγιστο	0.676	2.444

Για το σύμπλοκο DQ7-(68-79), η κύρτωση είναι αρνητική υποδηλώνοντας ότι αυτό υπόκειται σε ομαλή κατανομή σε αντίθεση με το πεπτίδιο 68-79, για το οποίο η κύρτωση είναι θετική και εμφανίζει σχετικές οξύνσεις στην κατανομή του. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(68-79) όσο για το πεπτίδιο 68-79 είναι πολύ μικρή.





Εικόνα 18: Γραφική απεικόνιση που προκύπτει κατά την υπέρθεση των διαμορφώσεων του πεπτιδίου 68-79 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(68-79) (A) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, και 150 ps και (B) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 ps, όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.





Εικόνα 19: (Α) Μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Å²) για το πεπτίδιο 78-90 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(78-90) και (Β) της ενέργειας επιδιαλύτωσης (σε Kcal/moi) του συμπλόκου DQ7-(78-90).





Εικόνα 20: (Α) Μεταβολή της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε A^2) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης Ρ1, Ρ4 και Ρ9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου 78-90 του La/SSB αυτοαντιγόνου. (Β) Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD (για τα C^a του πεπτιδικού σκελετού) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ7-(78-90) (-), για το DQ7 μόριο (-) και για το πεπτίδιο 78-90 (\pm) του La/SSB αυτοαντιγόνου.

ZEILZ

Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ7 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.155 Å) δεν παρουσίασε αυξομειώσεις καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (150 ps). Παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην τιμή του RMSD για το πεπτίδιο 78-90 τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που μειώνονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα και μέχρι το τέλος της προσομοίωσης παρατηρούνται αυξομειώσεις στην τιμή του RMSD και δε φαίνεται το σύστημα να τείνει σε πλατό (μέση τιμή RMSD =1.201 Å, διακύμανση=0.038). Πολύ πιο ομαλό είναι το προφίλ μεταβολής του RMSD για το σύμπλοκο DQ7-(78-90) με πολύ χαμηλότερες τιμές RMSD (πλατό, μέση τιμή RMSD=0.353 Å, διακύμανση=0.003) (Εικ.20Β). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπεια την μετατόπιση του πεπτιδίου 78-90 από την αρχική του θέση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της προσομοίωσης (Εικ.21), ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη δομή του DQ7 μορίου.

Πίνακας VI: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ7-(78-90) και του πεπτιδίου 78-90 με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 100 εώς 150 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ7-(78-90)	(78-90)
Μέσος όρος	0.353	1.201
Τυπικό σφάλμα	0.002	0.009
Διάμεσος τιμή	0.355	1.207
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0.053	0.195
Διακύμανση	0.003	0.038
Κύρτωση	-0.459	-0.766
Εύρος	0.268	0.900
Ελάχιστο	0.235	0.692
Μέγιστο	0.503	1.592

Τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(78-90) όσο και για το πεπτίδιο 78-90, η κύρτωση είναι αρνητική υποδηλώνοντας μια ομαλή κατανομή. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(78-90) όσο για το πεπτίδιο 78-90 είναι πολύ μικρή.



В

🖬 0,1 ps 📾 150 ps 0.1 ps 25 ps 50 ps 75 ps 🗮 100 pi 125 150 pi ্বিদ

Εικόνα 21: Γραφική απεικόνιση που προκύπτει κατά την υπέρθεση των διαμορφώσεων του πεπτιδίου 78-90 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(78-90) (A) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, και 150 ps και (B) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 ps, όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.



4. HLA-DQ7/ПЕПТІΔΙΟ(149-161)



Εικόνα 22: (Α) Μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Α²) για το πεπτίδιο 149-161 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(149-161) και (Β) της ενέργειας επιδιαλύτωσης (σε Kcal/mol) του συμπλόκου DQ7-(149-161).





Εικόνα 23: (Α) Μεταβολή της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε $Å^2$) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης P1, P4 και P9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου 149-161 του La/SSB αυτοαντιγόνου. (Β) Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD (για τα C^α του πεπτιδικού σκελετού) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ7-(149-161) (-), για το DQ7 μόριο (-) και για το πεπτίδιο 149-161 (\varkappa) του La/SSB αυτοαντιγόνου.

Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ7 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.153 Å) δεν παρουσίασε αυξομειώσεις καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (150 ps). Παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην τιμή του RMSD για το πεπτίδιο 149-161 τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που μειώνονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^α άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^α άτομα και μέχρι το τέλος της προσομοίωσης παρατηρούνται αυξομειώσεις στην τιμή του RMSD και δε φαίνεται το σύστημα να τείνει σε πλατό (μέση τιμή RMSD=2.090 Å, διακύμανση=0.063). Πολύ πιο ομαλό είναι το προφίλ μεταβολής του RMSD για το σύμπλοκο DQ7-(149-161) με πολύ χαμηλότερες τιμές RMSD (πλατό, μέση τιμή RMSD=0.940 Å, διακύμανση=0.003) (Εικ.23Β). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπεια την μετατόπιση του πεπτιδίου 149-161 από την αρχική του θέση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της προσομοίωσης (Εικ.24), ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη δομή του DQ7 μορίου.

Πίνακας VII: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ7-(149-161) και του πεπτιδίου 149-161 με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 100 εώς 150 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ7-(149-161)	(149-161)
Μέσος όρος	0.940	2.090
Τυπικό σφάλμα	0.002	0.011
Διάμεσος τιμή	0.945	2.077
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0.054	0.251
Διακύμανση	0.003	0.063
Κύρτωση	0.169	-0.495
Εύρος	0.296	1.222
Ελάχιστο	0.770	1.498
Μέγιστο	1.066	2.720

Για το πεπτίδιο 149-161, η κύρτωση είναι αρνητική υποδηλώνοντας ότι αυτό υπόκειται σε ομαλή κατανομή σε αντίθεση με το σύμπλοκο DQ7-(149-161), για το οποίο η κύρτωση είναι θετική και εμφανίζει σχετικές οξύνσεις στην κατανομή του. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(149-161) όσο για το πεπτίδιο 149-161 είναι πολύ μικρή.





Εικόνα 24: Γραφική απεικόνιση που προκύπτει κατά την υπέρθεση των διαμορφώσεων του πεπτιδίου 149-161 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(149-161) (A) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, και 150 ps και (B) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 ps, όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.



В

5. HLA-DQ7/ПЕПТІΔІО(152-165)



Εικόνα 25: (Α) Μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε A²) για το πεπτίδιο 152-165 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(152-165) και (Β) της ενέργειας επιδιαλύτωσης (σε Kcal/moi) του συμπλόκου DQ7-(152-165).





Εικόνα 26: (Α) Μεταβολή της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Å²) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης Ρ1, Ρ4 και Ρ9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου 152-165 του La/SSB αυτοαντιγόνου. (Β) Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD (για τα C^a του πεπτιδικού σκελετού) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ7-(152-165) (-), για το DQ7 μόριο (-) και για το πεπτίδιο 152-165 (¤)του La/SSB αυτοαντιγόνου.

ZEILZ

Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ7 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.170 Å) δεν παρουσίασε αυξομειώσεις καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (150 ps). Παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην τιμή του RMSD για το πεπτίδιο 152-165 τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που μειώνονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^α άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^α άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^α άτομα και μέχρι το τέλος της προσομοίωσης παρατηρούνται μικρές αυξομειώσεις στην τιμή του RMSD (πλατό, μέση τιμή RMSD=1.676 Å, διακύμανση=0.019). Πολύ πιο ομαλό είναι το προφίλ μεταβολής του RMSD για το σύμπλοκο DQ7-(152-165) με πολύ χαμηλότερες τιμές RMSD (μέση τιμή RMSD=0.574 Å, διακύμανση=0.003) (Εικ.26Β). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπεια την μετατόπιση του πεπτιδίου 152-165 από την αρχική του θέση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της προσομοίωσης (Εικ.27), ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη δομή του DQ7 μορίου.

Πίνακας VIII: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ7-(152-165) και του πεπτιδίου 152-165 με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 100 εώς 150 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ7-(152-165)	(152-165)
Μέσος όρος	0.574	1.676
Τυπικό σφάλμα	0.002	0.006
Διάμεσος τιμή	0.572	1.681
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0.054	0.138
Διακύμανση	0.003	0.019
Κύρτωση	0.212	-0.211
Εύρος	0.295	0.751
Ελάχιστο	0.441	1.280
Μέγιστο	0.736	2.031

Για το πεπτίδιο 152-165, η κύρτωση είναι αρνητική υποδηλώνοντας ότι αυτό υπόκειται σε ομαλή κατανομή σε αντίθεση με το σύμπλοκο DQ7-(152-165), για το οποίο η κύρτωση είναι θετική και εμφανίζει σχετικές οξύνσεις στην κατανομή του. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(152-165) όσο για το πεπτίδιο 152-165 είναι πολύ μικρή.



В



Εικόνα 27: Γραφική απεικόνιση που προκύπτει κατά την υπέρθεση των διαμορφώσεων του πεπτιδίου 152-165 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(152-165) (A) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, και 150 ps και (B) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 ps, όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

6. HLA-DQ7/NEITTIAIO(154-167)



Εικόνα 28: (Α) Μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε $Å^2$) για το πεπτίδιο 154-167 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(154-167) και (Β) της επιδιαλύτωσης (σε Kcal/mol) του συμπλόκου DQ7-(154-167).





Εικόνα 29: (Α) Μεταβολή της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε A^2) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης P1, P4 και P9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου 154-167 του La/SSB αυτοαντιγόνου. (Β) Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD (για τα C^a του πεπτιδικού σκελετού) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ7-(154-167) (-), για το DQ7 μόριο (-) και για το πεπτίδιο 154-167 (\pm)του La/SSB αυτοαντιγόνου.

NEILIS

Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ7 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.153 Å) δεν παρουσίασε αυξομειώσεις καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (150 ps). Παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην τιμή του RMSD για το πεπτίδιο 154-167 τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που μειώνονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα και μέχρι το τέλος της προσομοίωσης παρατηρούνται μικρές αυξομειώσεις στην τιμή του RMSD (πλατό, μέση τιμή RMSD=0.662 Å, διακύμανση=0.016). Πολύ πιο ομαλό είναι το προφίλ μεταβολής του RMSD για το σύμπλοκο DQ7-(154-167) με πολύ χαμηλότερες τιμές RMSD (μέση τιμή RMSD=0.234 Å, διακύμανση=0.0006) (Εικ.29Β). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπτεια την μετατόπιση του πεπτιδίου 154-167 από την αρχική του θέση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της προσομοίωσης (Εικ.30), ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη δομή του DQ7 μορίου.

Πίνακας ΙΧ: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ7-(154-167) και του πεπτιδίου 154-167 με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 100 εώς 150 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ7-(154-167)	(154-167)
Μέσος όρος	0.234	0.662
Τυπικό σφάλμα	0.001	0.006
Διάμεσος τιμή	0.230	0.645
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0.025	0.128
Διακύμανση	0.0006	0.0165
Κύρτωση	0.007	1.054
Εύρος	0.129	0.728
Ελάχιστο	0.182	0.393
Μέγιστο	0.311	1.121

Τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(154-167) όσο για το πεπτίδιο 154-167, η κύρτωση είναι θετική υποδηλώνοντας σχετικές οξύνσεις στην κατανομή του. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(154-167) όσο για το πεπτίδιο 154-167 είναι πολύ μικρή.







B

Εικόνα 30: Γραφική απεικόνιση που προκύπτει κατά την υπέρθεση των διαμορφώσεων του πεπτιδίου 154-167 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(154-167) (A) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, και 150 ps και (B) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 ps, όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

BIBAIOO

محقا والأفار الأعالية والمعاملة المادية المرابع المحالية والمحالية

7. HLA-DQ7/ΠΕΠΤΙΔΙΟ(286-299)



Εικόνα 31: (Α) Μεταβολή της συνολικής επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Α²) για το πεπτίδιο 286-299 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(286-299) και (B) της επιδιαλύτωσης (σε Kcal/mol) του συμπλόκου DQ7-(286-299).





Εικόνα 32: (Α) Μεταβολή της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (σε Å²) για τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης P1, P4 και P9 του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου 286-299 του La/SSB αυτοαντιγόνου. (Β) Μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD (για τα C^α του πεπτιδικού σκελετού) σε συνάρτηση με το χρόνο για το σύμπλοκο DQ7-πεπτίδιο (-), για το DQ7 μόριο (-) και για το πεπτίδιο 286-299 (¤) του La/SSB αυτοαντιγόνου.

NEILIS

Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης για το DQ7 μόριο (μέση τιμή RMSD=0.152 Å) δεν παρουσίασε αυξομειώσεις καθ΄ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (150 ps). Παρατηρήθηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην τιμή του RMSD για το πεπτίδιο 286-299 τη χρονική στιγμή 51 ps, όπου είναι η χρονική στιγμή που μειώνονται οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Από τη χρονική στιγμή 100 ps, όπου έχουν αρθεί οι περιορισμοί κίνησης για τα C^a άτομα και μέχρι το τέλος της προσομοίωσης παρατηρούνται μικρές αυξομειώσεις στην τιμή του RMSD (πλατό, μέση τιμή RMSD=1.328 Å, διακύμανση=0.031). Πολύ πιο ομαλό είναι το προφίλ μεταβολής του RMSD για το σύμπλοκο DQ7-(286-299) με πολύ χαμηλότερες τιμές RMSD (μέση τιμή RMSD=0.361 Å, διακύμανση=0.002) (Εικ.32B). Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης έχει σαν συνέπεια την μετατόπιση του πεπτιδίου 286-299 από την αρχική του θέση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της προσομοίωσης (Εικ.33), ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη δομή του DQ7 μορίου.

Πίνακας Χ: Στατιστική ανάλυση του συμπλόκου DQ7-(286-299) και του πεπτιδίου 286-299 με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν το χρονικό διάστημα από 100 εώς 150 ps.

Στατιστικό Μέγεθος	DQ7-(286-299)	(286-299)
Μέσος όρος	0.362	1.328
Τυπικό σφάλμα	0.002	0.008
Διάμεσος τιμή	0.355	1.331
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0.044	0.175
Διακύμανση	0.002	0.031
Κύρτωση	-0.494	-0.305
Εύρος	0.216	0.886
Ελάχιστο	0.254	0.872
Μέγιστο	0.470	1.758

Τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(286-299) όσο και για το πεπτίδιο 286-299, η κύρτωση είναι αρνητική υποδηλώνοντας μια ομαλή κατανομή. Η διακύμανση τόσο για το σύμπλοκο DQ7-(286-299) όσο για το πεπτίδιο 286-299 είναι πολύ μικρή.





Εικόνα 33: Γραφική απεικόνιση που προκύπτει κατά την υπέρθεση των διαμορφώσεων του πεπτιδίου 286-299 του La/SSB αυτοαντιγόνου μέσα στο σύμπλοκο DQ7-(286-299) (A) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, και 150 ps και (B) για τα χρονικά διαστήματα 0.1, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 ps, όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Α

220

ΠΙΝΑΚΑΣ ΧΙ: Η μέση τιμή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD για τα σύμπλοκα DQπεπτιδίου για το χρονικό διάστημα 0-150 ps, σε Å.

ΣΥΜΠΛΟΚΟ	RMSD
DQ8-πεπτίδιο	0.4160
DQ7-t ₍₆₈₋₇₉₎	0.38 85
DQ7-t ₍₇₈₋₉₀₎	0.2586
DQ7-t ₍₁₄₉₋₁₆₁₎	0.5258
DQ7-t ₍₁₅₂₋₁₆₅₎	0.3672
DQ7-t ₍₁₅₄₋₁₆₇₎	0.2042
DQ7-t(286-299)	0.2592

Η μέση τιμή του δομικού δείκτη απόκλισης για όλα τα σύμπλοκα DQπεπτιδίου υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα C^a άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Οι τιμές ελήφθησαν ανά 0.1 ps και σε θεμοκρασία 300Κ. Σύμφωνα με τις μέσες τιμές του Πίνακα XI, ο δομικός δείκτης απόκλισης για το σύμπλοκο DQ8πεπτιδίου έχει μεγαλύτερη τιμή από τα σύμπλοκα DQ7-t₍₆₈₋₇₉₎, DQ7-t₍₇₈₋₉₀₎, DQ7-t₍₁₅₂₋ 165), DQ7-t₍₁₅₄₋₁₆₇₎ και DQ7-t₍₂₈₆₋₂₉₉₎ και μικρότερη τιμή από το σύμπλοκο DQ7-t₍₁₄₉₋₁₆₁₎. Αυτό υποδηλώνει ότι οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα σε διαδοχικές δομές καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης είναι μεγαλύτερες για το σύμπλοκο-εκμαγείο, DQ8-πεπτιδίου, συγκρινόμενες με τις διαφορές για τα σύμπλοκα DQ7-t₍₆₈₋₇₉₎, DQ7-t₍₁₅₂₋₁₆₅₎, DQ7-t₍₁₅₄₋₁₆₇₎, Kai DQ7-t₍₁₅₄₋₁₆₇₎, Kai DQ7-t₍₁₅₄₋₁₆₇₎, Kai DQ7-t₍₂₈₆₋₂₉₉₎.

Η χρονική μεταβολή της ακτίνας περιστροφής δίνει πληροφορίες για την εξέλιξη του συνολικού σχήματος του συμπλόκου. Όταν η ακτίνα περιστροφής μιας μοντελοποιημένης δομής είναι μεγαλύτερη από εκείνη της κρυσταλλογραφικής δομής-εκμαγείου, τότε η μοντελοποιημένη δομή εμφανίζεται εκτεταμένη. Οι τιμές ελήφθησαν ανά 0.1 ps και σε θεμοκρασία 300Κ. Σύμφωνα με τους μέσους όρους του Πίνακα XII, οι ακτίνες περιστροφής των συμπλόκων DQ7-t₍₈₈₋₇₉₎, DQ7-t₍₇₈₋₉₀₎, DQ7-t₍₁₄₉₋₁₈₁₎, DQ7-t₍₁₅₂₋₁₆₅₎ και DQ7-t₍₁₅₄₋₁₈₇₎ έχουν παρόμοιες τιμές συγκρινόμενες με την τιμή για το σύμπλοκο DQ8-πεπτιδίου. Εξαίρεση αποτελεί η τιμή της ακτίνας περιστροφής του συμπλόκου DQ7-t₍₂₈₆₋₂₉₉₎, η οποία είναι λίγο μεγαλύτερη (24.411 Å) από την αντίστοιχη τιμή για το μόριο εκμαγείο (23.891 Å).


ΣΥΜΠΛΟΚΟ	Ακτίνα Περιστροφής
DQ8-πεπτίδιο	23.891
DQ7-t ₍₆₈₋₇₉₎	23.718
DQ7-t ₍₇₈₋₉₀₎	24.371
DQ7-t ₍₁₄₉₋₁₈₁₎	24.343
DQ7-t ₍₁₅₂₋₁₆₅₎	23.788
DQ7-t ₍₁₅₄₋₁₆₇₎	23.438
DQ7-t ₍₂₈₆₋₂₉₉₎	24.411

ΠΙΝΑΚΑΣ XII: Η μέση τιμή της ακτίνας περιστροφής (radius of gyration) για τα σύμπλοκα DQπεπτιδίου για το χρονικό διάστημα 0-150 ps, σε Å.

Η συνολική επιφάνεια των αντιγονικών πεπτιδίων, τα οποία βρίσκονται τοποθετημένα μέσα στην αύλακα πρόσδεσης των DQ μορίων, έχει υπολογισθεί ανά κατάλοιπο και υποδηλώνει το μέγεθος της επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη. Σύμφωνα με τους μέσους όρους του Πίνακα XIII, τα πεπτίδια 68-79, 154-167 και 286-299 έχουν μικρότερη εκτεθειμένη επιφάνεια ενώ τα πεπτίδια 78-90, 149-161 και 152-165 έχουν μεγαλύτερη εκτεθειμένη επιφάνεια συγκρινόμενη με την επιφάνεια του πεπτιδίου της ινσουλίνης Β.

ΠΙΝΑΚΑΣ XIII: Η μέση τιμή της συνολικής εκτεθειμένης επιφάνειας (SASA) των προβλεπόμενων αντιγονικών πεπτιδίων μέσα στα σύμπλοκα DQ-πεπτίδιο για το χρονικό διάστημα 0-150 ps, σε A².

ΣΥΜΠΛΟΚΟ	SASA	
DQ8-πεπτίδιο	1425.768	
DQ7-t ₍₆₈₋₇₉₎	1386.478	
DQ7-t ₍₇₈₋₉₀₎	1524.496	
DQ7-t ₍₁₄₉₋₁₆₁₎	1433.783	
DQ7-t ₍₁₅₂₋₁₆₅₎	1492.487	
DQ7-t ₍₁₅₄₋₁₈₇₎	1330.979	
DQ7-t ₍₂₈₆₋₂₉₉₎	1383.715	

5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ DQ-ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LIE

Ο προσδιορισμός της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, ΔG_{bind}, των προβλεπόμενων πεπτιδίων (Γίνακας Ι, Κεφ.Χ) έγινε με τη μέθοδο LIE (Linear Interaction Energy). Σύμφωνα με τη μέθοδο LIE συνυπολογίζοντας το ηλεκτροστατικό μέρος της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης καθώς και τις μη πολικές συνεισφορές κατά την πρόσδεση, όπως για παράδειγμα τις υδρόφοβες και τις van der Waals αλληλεπιδράσεις, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ακολουθεί τη γενική σχέση 5.1,

$$\Delta G_{bind} = \alpha \Delta \langle V^{vdw}_{l-s} \rangle + \beta \Delta \langle V^{el}_{l-s} \rangle + \gamma \qquad 5.1$$

Οι μέσοι όροι για τις πολικές και μη πολικές αλληλεπιδράσεις προέκυψαν από τις MD προσομοιώσεις για τα σύμπλοκα DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B και DQ7πεπτιδίου. Τα α και β στην παραπάνω εξίσωση είναι συντελεστές για την συνεισφορά των μη πολικών και πολικών αλληλεπιδράσεων στην ενέργεια πρόσδεσης και το γ είναι μια επιπλέον σταθερά. Πειραματικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι τιμές για τις παραμέτρους α, β και γ είναι περίπου σταθερές και ίσες με 0.16, 0.5 και 0 για ένα μεγάλο αριθμό συμπλόκων.

Αρχικά υπολογίστηκαν οι van der Waals (vdw) και οι ηλεκτροστατικές (el) ενέργειες για το πεπτίδιο της ινσουλίνης Β και για τα προβλεπόμενα πεπτίδια (Πίνακας Ι, Κεφ.Χ), όταν αυτά βρίσκονταν σε συμπλεγμένη και στη συνέχεια σε ελεύθερη κατάσταση με τα μόρια DQ8 και DQ7 αντίστοιχα για χρονικό διάστημα 0-150 ps, με τιμές για την ενέργεια να λαμβάνονται ανά 0.1 ps και σε θεμοκρασία 300K.

Ο μέσος όρος στην εξίσωση 5.1 προκύπτει με αφαίρεση τις τιμής της ενέργειας του πεπτιδίου σε ελεύθερη κατάσταση από την τιμή της ενέργειας στη συμπλεγμένη κατάσταση ανά 0.1 ps και διαίρεση με το πλήθος των χρονικών στιγμών (1500 στιγμές αντιστοιχούν σε 150ps). Οι όροι Δ<V₁₋₈^{vwd}> και Δ<V₁₋₈^{el}> τοποθετούνται στην εξίσωση 5.1 και υπολογίζεται η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ΔG_{bhd} για καθένα από τα σύμπλοκα. Κατά τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε η δυναμική συνάρτηση CHARMM27, η διηλεκτρική σταθερά τέθηκε ίση με τη μονάδα, ως αλγόριθμος ολοκλήρωσης επιλέχθηκε ο Verlet και ως μοντέλο επιδιαλύτωσης το GB/SA. Οι ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης για το σύμπλοκο DQ8 με το πεπτίδιο της ινσουλίνης B και τα σύμπλοκα DQ7-πεπτιδίου παρουσιάζονται στον Πίνακα XIV.



ΣΥΜΠΛΟΚΟ	ΔG _{bind}	
DQ8-epit	-164.66	
DQ7-t ₍₆₈₋₇₉₎	-197. 42	
DQ7-t (286-299)	-157. 65	
DQ7-t (152-165)	-146.23	
DQ7-t ₍₇₈₋₉₀₎	-100.92	
DQ7-t ₍₁₅₄₋₁₆₇₎	-68.94	
DQ7-t (149-161)	-27.51	

ΠΙΝΑΚΑΣ ΧΙV: Ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης για τα σύμπλοκα DQ8-πεπτιδίου της ινσουλίνης B και DQ7-πεπτιδίου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο LIE, σε Kcal/mol.

Σύμφωνα με τις υπολογιζόμενες ενέργειες πρόσδεσης όλα τα προβλεπόμενα πεπτίδια για το DQ7 μόριο ευνοούν το σχηματισμό των συμπλόκων DQ7-πεπτιδίου. Το πεπτίδιο 68-79 φαίνεται να είναι ο καλύτερος εν δυνάμει Τ κυτταρικός επίτοπος του La/SSB αυτοαντιγόνου σε αντίθεση με το πεπτίδιο 149-161, το οποίο φαίνεται να είναι ο λιγότερο καλός επίτοπος La/SSB αυτοαντιγόνου. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσει κανείς ότι το πεπτίδιο 68-79 έχει μικρότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης συγκρινόμενο με το σύμπλοκο-εκμαγείο ανάμεσα στο DQ8 μόριο και το πεπτίδιο της ινσουλίνης B.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ XII

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη αυτή περιγράφει την πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου, με υπολογιστικές μεθόδους. Η χαρτογράφηση των T κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου, σε σύνδεση με τα μόρια DQ2 και DQ7, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη T κυτταρικών αναστολέων ως θεραπευτικών σε αυτοάνοσες παθήσεις και να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς της αυτοανοσίας. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- Η υψηλή ομολογία στην πρωτοταγή δομή μεταξύ του μορίου DQ8 και των μορίων DQ2 και DQ7 επέτρεψε την δημιουργία των μοντέλων των μορίων DQ2 και DQ7, με την τεχνική της ομόλογης μοντελοποίησης, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την κρυσταλλική δομή του μορίου DQ8. Ο στερεοχημικός έλεγχος των μοντέλων DQ2 και DQ7 (PROCHECK, TINKER) επιβεβαίωσε την καλή ποιότητα αυτών.
- 2. Η αντικατάσταση της Leu²⁶⁸ στο μόριο DQ8 από Tyr²⁶⁸ στο μόριο DQ7 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους της P4 τσέπης στο μόριο DQ7, υποδεικνύοντας ότι αμινοξικά κατάλοιπα με μικρότερο μέγεθος θα μπορούσαν να 'χωρέσουν' σ' αυτή την τσέπη.
 - 3. Η επιτυχία των μοτίβων Taylor επιβεβαιώνεται από την συχνή παρουσία τους στη βιβλιογραφία είτε για την πρόβλεψη μη προσδιορισμένων πειραματικά επιτόπων είτε για τον θεωρητικό προσδιορισμό επιτόπων που έχουν προηγουμένως προσδιοριστεί πειραματικά, για συγκριτικούς κυρίως λόγους.
 - 4. Το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ επέτρεψε τη συστηματική πρόβλεψη των υποψήφιων Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου για ένα μεγάλο εύρος HLA αλλυλίων αυξάνοντας την εξειδίκευση πρόσδεσης.
 - 5. Το πρόγραμμα MULTIPRED αποτέλεσε μια ευαίσθητη και εξειδικευμένη μέθοδο για την πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου. Το πρόγραμμα προέβλεψε τους υποψήφιους επιτόπους ικανούς να προσδεθούν σε πολλαπλές HLA πρωτεΐνες επιλέγοντας έναν HLA υπέρτυπο.
 - 6. Η πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων με τις υπολογιστικές μεθόδους ΤΕΡΙΤΟΡΕ και MULTIPRED δεν αντικατέστησε τις παραδοσιακές προσεγγίσεις πρόβλεψης επιτόπων, όπως τα μοτίβα Taylor. Ο κύριος στόχος της χρησιμοποίησης του συνδυασμού των τριών διαφορετικών

μεθόδων πρόβλεψης είναι η μείωση του αριθμού των πιθανών υποψήφιων Τ κυτταρικών επιτόπων και η ασφαλέστερη πρόβλεψή τους.

- 7. Η πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων με προσεγγίσεις βιοπληροφορικής (bioinformatics) και τη χρήση αλγορίθμων πρόβλεψης θα ελαχιστοποιήσει των αριθμό των πειραμάτων που απαιτούνται για τη χαρτογράφηση αυτών.
- 8. Οι Τ κυτταρικοί επίτοποι που προσδιορίστηκαν με τη χρήση των τριών μεθόδων πρόβλεψης (Taylor, TEPITOPE και MULTIPRED) εμφάνισαν κοινά ή/και παρόμοια μοτίβα στην αλληλουχία τους, ενισχύοντας την πιθανότητα να είναι πραγματικοί Τ κυτταρικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου.
- 9. Η επιλογή των Τ κυτταρικών επιτόπων, με την διαδικασία της 'Βήμα προς Βήμα Ομολογίας', και με την υπέρθεση των προβλεπόμενων πεπτιδίων πάνω στο πεπτίδιο της ινσουλίνης Β, οδήγησε σε έξι υποψήφιους Τ κυτταρικούς επιτόπους για το DQ7 μόριο και εννέα για το DQ2 μόριο.
- 10. Οι Τ κυτταρικοί επίτοποι για τα DQ2 και DQ7 μόρια εμφανίζουν μια ποικιλία αμινοξικών καταλοίπων στις θέσεις P1, P4 και P9, όπως φαίνεται στο παρακάτω πίνακα. Η παρατήρηση αυτή ογηγεί στην υπόθεση ότι διαφορετικά κατάλοιπα μπορούν να τοποθετηθούν στις 'τσέπες' πρόσδεσης των DQ μορίων χωρίς να υπάρχει αυστηρός περιορισμός.

DQ	P1	P4	P9
DQ2	EADK	KSMQIN	WEDQTL
DQ7	EMKIVD	SIVDN	EKDAL
DQ8	E	Y	Е

- 11. Τα αμινοξικά κατάλοιπα των προβλεπόμενων επιτόπων που αντιστοιχούν στις θέσεις P1, P4 και P9 της αύλακας πρόσδεσης των μοντελοποιημένων DQ2 και DQ7 είχαν πολύ χαμηλές τιμές SASA (GETAREA) συγκρινόμενα με γειτονικά κατάλοιπα, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στα άκρα των επιτόπων είχαν υψηλές τιμές SASA, ενισχύοντας τα χαρακτηριστικά πρόσδεσης των υποψήφιων επιτόπων.
- 12. Τα αμινοξικά κατάλοιπα των προβλεπόμενων επιτόπων που αντιστοιχούν στη θέση P6 της αύλακας πρόσδεσης των μοντελοποιημένων DQ2 και DQ7 είχαν πολύ χαμηλές τιμές SASA (GETAREA), ενισχύοντας την υπόθεση η τσέπη P6 να είναι επίσης σημαντική για την πρόσδεση των υποψήφιων επιτόπων στα DQ2 και DQ7 μόρια.
- 13. Τα αμινοξικά κατάλοιπα των προβλεπόμενων επιτόπων που αντιστοιχούν στη θέση P5 της αύλακας πρόσδεσης των μοντελοποιημένων DQ2 και DQ7

είχαν υψηλές τιμές SASA (GETAREA), ενισχύοντας την υπόθεση η τσέπη P5 μπορεί να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση των υποψήφιων επιτόπων με τον Τ κυτταρικό υποδοχέα.

- 14. Οι προβλεπόμενοι επίτοποι για τα DQ2 και DQ7 μόρια είχαν υψηλές τιμές plC₅₀ (MHCPRED) και μπορούν να θεωρηθούν καλοί προσδέτες (plC₅₀ > 6.3) στα DQ2 και DQ7 μόρια. Μικρή απόκλιση από την παραπάνω τιμή παρουσίασαν τα πεπτίδια 78-90 για το DQ7 μόριο και τα 131-144 και 161-174 για το DQ2 μόριο (plC₅₀ < 6.3) τα οποία φαίνεται να έχουν μικρότερη συγγένεια πρόσδεσης στα DQ μόρια.
- 15. Επιπλέον επειδή οι τιμές plC₅₀ σχετίζονται με την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ΔG_{bind} (ΔG_{bind} ~ RTInIC₅₀) αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για την αξιοπιστία των επιτόπων.
- 16. Με τη μεθοδολογία της σταδιακής άρσης των περιορισμών κίνησης των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, που εφαρμόστηκε τόσο για το σύμπλοκο DQ8 με το πεπτίδιο της ινσουλίνης B όσο και για τα σύμπλοκα μεταξύ του DQ7 και των υποψήφιων T κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου, επιτεύχθηκε η ομαλή μετάβαση από τη μία δυναμική κατάσταση στην άλλη.
- 17. Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης (RMSD) για όλα τα σύμπλοκα DQ8-επίτοπου και DQ7-επίτοπου σε συνάρτηση με το χρόνο παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα (RMSD<1) μετά από t > 71 ps και μέχρι το τέλος των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (t = 150 ps) υποδηλώνοντας την ομαλή μετάβαση των συμπλόκων σε διαδοχικές δυναμικές καταστάσεις.
- 18. Η συνολική επιφάνεια που είναι προσβάσιμη στο διαλύτη (SASA), λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα των υποψήφιων επιτόπων, δε μεταβάλλεται με τη πάροδο του χρόνου υποδηλώνοντας ότι οι επίτοποι παραμένουν στην αύλακα πρόσδεσης.
- 19. Η επιφάνεια που είναι προσβάσιμη στο διαλύτη (SASA) και αντιστοιχεί στα αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις P1, P4 και P9 των υποψήφιων επιτόπων δε μεταβάλλεται με τη πάροδο του χρόνου υποδηλώνοντας ότι τα κατάλοιπα αυτά παραμένουν στις θέσεις πρόσδεσης.
- 20. Η μεταβολή του δομικού δείκτη απόκλισης RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο για τα όλα τα σύμπλοκα DQ7-πεπτιδίου είναι πολύ μικρή και φθάνει σε πλατό, υποδεικνύοντας την ομαλή μετάβαση του συμπλόκου σε διαδοχικές δυναμικές καταστάσεις.
- 21. Ο προσδιορισμός της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ΔG_{bind} με τη μέθοδο LIE απεκάλυψε ότι τα σύμπλοκα DQ7-επίτοπου είναι θερμοδυναμικά

BIBAR

σταθερά (ΔG_{bind} <0) και επέτρεψε την κατάταξη των συμπλόκων DQ7επίτοπου με βάση τις τιμές ΔG_{bind}, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα πεπτίδια αυτά μπορεί να είναι πραγματικοί Τ κυτταρικοί επίτοποι.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ XIII

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



Στα πλαίσια της μελέτης αυτής προσδιορίστηκαν οι υποψήφιοι Τ κυτταρικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου, που αποτελεί κύριο στόχο της αυτοάνοσης απόκρισης σε ασθενείς με Sjogren's Σύνδρομο (SS) και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (SLE), σε σύνδεση με τα μόρια HLA-DQ2 και HLA-DQ7, τα οποία είναι γενετικά συσχετισμένα με αυτοάνοσες ρευματικές ασθένειες και ειδικότερα με το Sjogren's Σύνδρομο (SS) και τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (SLE).

Η μοντελοποίηση των μορίων DQ2 και DQ7 βασίστηκε στην κρυσταλλική δομή του μορίου DQ8, το οποίο είναι ένα HLA μόριο που σχετίζεται με το διαβήτη τύπου Ι, μια επίσης αυτοάνοση ασθένεια. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μοντελοποίηση των μορίων DQ2 και DQ7, με την τεχνική της ομόλογης μοντελοποίησης, ήταν εφικτή λόγω της πολύ υψηλής ομολογίας, της πρωτοταγούς δομής, των αλυσίδων α και β των μορίων DQ2 και DQ7 με τις αντίστοιχες αλυσίδες του DQ8 μορίου. Η συμβατότητα των μοντελοποιημένων DQ2 και DQ7 ελέγχθηκε με το πρόγραμμα Prochek, το πρόγραμμα 'O' και το υπολογιστικό πρόγραμμα TINKER. Η ποιότητα των μοντέλων ήταν παρόμοια με εκείνη που αναμενόταν για δομές που έχουν προσδιοριστεί με διακριτική ικανότητα 2 Å.

_ Η αξιοπιστία των μοντελοποιημένων μορίων DQ2 και DQ7 επιβεβαιώθηκε από τα διαγράμματα Ramachandran, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό των αμινοξικών καταλοίπων βρέθηκε σε επιτρεπτές περιοχές και από τον υπολογισμό του δομικού δείκτη απόκλισης (RMSD), ο οποίος υπολογίστηκε σε 0.033 για το DQ8/DQ2 και 0.034 για το DQ8/DQ7.

Τρεις διαφορετικές μέθοδοι εφαρμόστηκαν στη μελέτη αυτή, προκειμένου να προσδιοριστούν οι υποψήφιοι Τ κυτταρικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου: η προσέγγιση Taylor, το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ και το πρόγραμμα MULTIPRED. Σύμφωνα με την προσέγγιση Taylor, ένα γενικό μοτίβο αλληλουχίας κοινό σε Τ κυτταρικούς επιτόπους, προσδιορίστηκε εξετάζοντας τα αμινοξικά κατάλοιπα των επιτόπων. Τα μοτίβα αυτά, που χαρακτηρίζουν τους επιτόπους σαν μέλη χαρακτηριστικών ομάδων που βασίζονται στις φυσικές τους ιδιότητες, ελέγχθηκε αν εμφανίζονται στην πρωτοταγή δομή του La/SSB αυτοαντιγόνου. Το πρόγραμμα ΤΕΡΙΤΟΡΕ εφαρμόστηκε στη συνέχεια για την πρόβλεψη πιθανών Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί δομικά δεδομένα από σύμπλοκα ανάμεσα σε ΜΗC μόρια και πεπτίδια και ενσωματώνει πολλαπλές ποσοτικές μήτρες. Το πρόγραμμα MULTIPRED, που χρησιμοποιεί ως μηχανή πρόβλεψης τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα, εφαρμόστηκε επίσης για την πρόβλεψη των πιθανών Τ κυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου. Οι επίτοποι που προβλέφθηκαν με βάση τα μοτίβα Taylor συγκρίθηκαν με εκείνους που προβλέφθηκαν με το TEPITOPE και το MULTIPRED και εμφάνισαν κοινά ή/και

BIBAIC

παρόμοια μοτίβα στην αλληλουχία τους. Η πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων με τις υπολογιστικές μεθόδους TEPITOPE και MULTIPRED δεν έρχεται σε αντίθεση με την παραδοσιακή προσέγγιση πρόβλεψης επιτόπων, που είναι τα μοτίβα Taylor.

Οι υποψήφιοι Τ κυτταρικοί επίτοποι που προβλέφθηκαν με βάση τα μοτίβα Taylor υπερτέθηκαν στο πεπτίδιο της ινσουλίνης Β και εφαρμόζοντας την διαδικασία της 'Βήμα προς Βήμα Ομολογίας' προέκυψε ένας μεγάλος αριθμός επιμέρους πεπτιδίων (μήκους >= 9αα), τα οποία τοποθετήθηκαν στα μοντελοποιημένα DQ2 και DQ7. Τα προκύπτοντα σύμπλοκα ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά και ελέγχθηκαν για την στερεοχημική τους ποιότητα (PROCHECK, TINKER). Τελικά προέκυψαν έξι πιθανοί επίτοποι για το DQ7 μόριο και εννέα για το DQ2 μόριο.

Υπολογίστηκε η επιφάνεια που είναι προσβάσιμη στο διαλύτη για τους έξι και τους εννέα πιθανούς επιτόπους για τα μόρια DQ7 και DQ2 αντίστοιχα, με το πρόγραμμα GETAREA. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούσαν στις θέσεις πρόσδεσης P1, P4 και P9 εμφάνισαν πολύ χαμηλές τιμές επιφάνειας, σε σύγκριση με τα γειτονικά κατάλοιπα, σε αντίθεση με τα αμινοξικά κατάλοιπα στα άκρα των επιτόπων, που εμφάνισαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές επιφάνειας, αφού είναι πολύ εκτεθειμένα στο μικρο-περιβάλλον, ως αναμενόταν.

Η βιοδραστικότητα των υποψήφιων Τ κυτταρικών επιτόπων ελέγχθηκε με το πρόγραμμα MHCPred, το οποίο εκτιμά τη συγγένεια πρόσδεσης ενός πεπτιδίου σε ένα MHC μόριο υπολογίζοντας την τιμή IC₅₀. Ένα πεπτίδιο με τιμές IC₅₀ από 0.01 έως 5000nM ή pIC₅₀ > 6.3 μπορεί να θεωρηθεί ότι προσδένεται ικανοποιητικά σε ένα MHC μόριο. Συμπεραίνεται ότι πέντε, από τους έξι, υποψήφιους Τ κυτταρικούς επιτόπους για το DQ7 μόριο και επτά, από τους εννέα, υποψήφιους Τ κυτταρικούς επιτόπους για το DQ2 μόριο, είναι καλοί προσδέτες και μπορούν να αναγνωριστούν ικανοποιητικά από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Το πρόγραμμα TINKER χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας αλληλεπίδρασης του μορίου DQ7 με τους έξι πιθανούς επιτόπους.

Στα σύμπλοκα DQ7-επίτοποι και το σύμπλοκο DQ8-πεπτίδιο της ινσουλίνης Β έγιναν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, χρονικής διάρκειας 150 ps, σε συνεχές μέσο (GBSA). Χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας CHARMM27 και οι εξισώσεις κινήσεις επιλύθηκαν με τη βοήθεια του αλγορίθμου Verlet. Για κάθε σύμπλοκο, το σύστημα προσομοίωσης περιελάμβανε μόνο τα άτομα του επιτόπου και της πρωτεΐνης. Υπολογίστηκε εκ νέου η επιφάνεια που είναι προσβάσιμη στο διαλύτη για τους επιτόπους μέσα στην αύλακα πρόσδεσης των MHC μορίων με το πρόγραμμα TINKER, η οποία δεν μεταβάλλονταν ουσιαστικά υποδηλώνοντας ότι οι προβλεπόμενοι επίτοποι παραμένουν στην αύλακα πρόσδεσης. Οι τιμές για το DQ7 παραμένουν στην αύλακα πρόσδεσης καθ' όλη τη διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης, ΔG_{bind}, υπολογίστηκε με τη μέθοδο LIE, η οποία αξιοποίησε μέσους όρους που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Όλα τα σύμπλοκα είχαν ΔG_{bind} <0 επιβεβαιώνοντας τη θερμοδυναμική σταθερότητα αυτών και ενισχύοντας την αξιοπιστία των προβλεπόμενων επιτόπων.

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι ο συνδυασμός τριών διαφορετικών μεθόδων πρόβλεψης Τ κυτταρικών επιτόπων μπορεί να οδηγήσει σε αξιόπιστα και ακριβή αποτελέσματα. Η πρόβλεψη των Τ κυτταρικών επιτόπων με προσεγγίσεις βιοπληροφορικής (bioinformatics) και τη χρήση αλγορίθμων πρόβλεψης ελπίζουμε πως θα ελαχιστοποιήσει των αριθμό των πειραμάτων που απαιτούνται για τη χαρτογράφηση αυτών.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΧΙΥ

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



T cells play a crucial role in specific immune responses against such as infectious diseases, cancer, allergies and autoimmune diseases. Identification of T cell epitopes is an important step in the desigh of vaccines and in developining immunotherapeutic drug-like inhibitors of T cell epitopes against the inappropriate response of the immune system to self-antigens. However, T cells recognize antigen only after it is processed and presented on the antigen presenting cells (APCs) in association with histocampatibility glycoproteins. This process involves major histocompatibility complex (MHC) molecules, which first bind short peptides and then display them to the T cell specific receptors resulting in the initiation of the immune response.

In particular, autoimmune rheumatic diseases as Sjogren's Syndrome (SS) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) are genetically linked to DQ2 (HLA-DQA1*0501/DQB1*0201) and DQ7 (HLA-DQA1*0501/DQB1*0301). Several lines of evidence indicate also that DQ8 is a major risk factor for increased susceptibility to type I diabetes, which is also an autoimmune disease. In this study the candidate T cell epitopes of the La/SSB autoantigen, main target of the autoimmune response in patients with SS and SLE, were predicted using as templates the HLA-DQ2 and DQ7 molecules, which are genetically linked to patients with autoimmune rheumatic diseases and in particular with Sjogren's Syndrome (SS) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

It deserves to be mentioned that the chemical structures of the α and β chains of DQ2 and DQ7 experience a great similarity with DQ8. Modeling of DQ2 and DQ7 was based on the crystal structure of DQ8, an HLA molecule of high risk factor of type I diabetes, which is also an autoimmune disease. The compatibility of the modeled DQ2 and DQ7 was verified by the Procheck suite of programs, the "O" program and the TINKER molecular modeling software. The quality of the modeled DQ2 and DQ7 is similar to the quality expected for structures determined at 2Å. Almost all residues of the modeled DQ2 and DQ7 were found in the preferred regions of the Ramachandran plot. Superimposition of modeled DQ2 and DQ7 with DQ8 using TINKER molecular modeling software gave satisfactory RMSD values (0.034 for DQ8/DQ2 and 0.033 for DQ8/DQ7) confirming the compatibility and reliability of the modeled HLA molecules.

Three different approaches were applied and compared in our study to identify T cell epitope candidates of the La/SSB autoantigen: Taylor's sequence pattern method, TEPITOPE quantitative matrices and MULTIPRED artificial neural networks.



According to Taylor's approach, a general sequence pattern common to HLAbased T cell epitopes, determined by examining the residues, which make up epitopes as members of characteristic sets based on their physical properties, was applied firstly to assess epitopes within the La/SSB sequence. The TEPITOPE program that uses structural data from MHC-peptide complexes and incorporates multiple quantitative matrices, was next employed to predict the potential of the La/SSB epitopes to bind DQ7 and DQ2. MULTIPRED computational system, using ANNs as the prediction machine, was finally applied to predict the potential T cell epitopes of the La/SSB autoantigen.

The obtained common and/or similar candidate T cell epitopes were subjected to homology modeling with the insulin-B peptide and the best superposed epitopes were placed into the modeled HLA-DQ2 and DQ7 binding grooves to perform energy minimization calculations and epitopes with the lowest structural differences were obtained. Six epitopes were attributed to the HLA-DQ7 and nine to HLA-DQ2.

Consistent with the obtained candidate T cell epitopes of the La/SSB autoantigen for the DQ2 and DQ7 molecules are our findings concerning the solvent accessible surface area of the epitopes complexed to the HLA-molecules using GETAREA program. It was found that residues corresponding to the P1, P4 and P9 pockets of the HLA-DQ2 and DQ7 binding grooves experience very low solvent accessibility in contrast with the neighbouring and the terminal residues since they are less exposed to the microenvironment of the groove.

To further confirm our findings the potential interaction energy, ΔE_{int} , of the MHC-epitope complexes was estimated, using the TINKER software, to acquire a relative energy scale that reflects the degree of the preferred interactions. On the other hand, taking in consideration that only peptides that bind to MHC with affinity above a threshold function as T cell epitopes, a quantitative prediction of the MHC-epitope binding affinities was also performed, using MHCPred, to obtain the IC₅₀ values which are inversely proportional to the binding affinities. The proposed T cell epitopes were classified according to their binding efficiency. It is concluded that five epitopes, out of six, for HLA-DQ7 and seven epitopes, out of nine, for HLA-DQ2 are good binders of MHC and they may be sufficiently recognized by the immune system.

7.54

The modeled DQ7 complexed with the proposed T cell epitopes and the DQ8 complexed with the peptide B of insulin (reference system) were subjected to molecular dynamics simulations of 150ps duration in continuum solvation (GB/SA). The CHARMM27 force field was used and the equations of motion were solved with

the VERLET algorithm. For each complex, the simulation system contained the atoms of the proposed epitope and the protein atoms. The solvent accessible surface area of the proposed epitopes within the complex was calculated. RMSD values confirmed that the proposed epitopes remained in the binding groove of MHC molecules at the end of the MD simulations. The free binding energy was obtained from molecular dynamic simulations averages. All the calculations were performed using the TINKER program on Linux machine with Dual processor running Mandrake 10.0.

Our study constitutes the ground work for a rapid and reliable experimentation concerning the T cell epitope mapping of the La/SSB autoantigen and could lead to the development of immunotherapeutic drug-like molecules as inhibitors of the T cell inappropriate immune response in autoimmune diseases.







dq2_01.ps

























dq2_04.ps

.

















dq2_06.ps











このようなななどの語の人気になるないないないないないないないないないないない







ļ




































THATTER BIBAIOGHINA HOANNING



HANNING THE BIBALOO THE HIDANNING A









うちょう ちゃく ちょうかん ないてい







dq7_06.ps











のなった。一般は大学なななななななななながでいた。









には、そのないないので、ないないという







A STATEMENT

PROCRECK Page 1 Distorted geometry dq7 Main-chain bond lengths C 121 0 1.177 A Tyr 36 C 129 1.171 1.263 1.119 B Arg: 105 B His 112-B Ass 113 Bonds differing by > 0.05A from small-molecule values. Values shown: "ideal", difference, actual . • i tiri Main-chain bond angles . <u>.</u>... ÷ 111.1 100.5 1123 1233 116.2 130.1 1112 111.2 ¢ QA 183 IRE . B A 49 B GIY 54 B The 98 B Ser 104 - B Arg 105 B Ser 104 - B Arg 105 Values shown: "ideal", actual, diff. f angles differing by > 10.0 degrees from small-mol Planar groups RMS dist. from planarity > 0.03A for rings, or > 0.02A otherwise. Value shown is RMS dist. • dq7_10.ps































BIBAIOO







DLHILFSNHGE (248-258)

X000000000000X.....

MIKFNRLNRLTTD (52-64)

Quantitative .	Analysis	۵ť	, DEHLEZNHOE,
----------------	----------	----	---------------

xx....,

DF81+0401

DR81+0402 DR81+0404

DR81+0405

DF81+0410

DF81*0421

DR81+0701

DF01+0801

DR81+0802

DF81+0804

DFB1*0806

DRB1+1101 DRB1+1104

DRB1+1106

DFB1*1107 DFB1*1305

DR81*1307

DR81*1311

DR81*1321 DR81*1501

DRB1+1502

DR85+0101

Threshold (%):	10	09	08	07	06	05	οł	03	02	01
DF81+0101	200	0000	0000		2000	2000	2000	2000		•••
DFB1*0102 DFB1*0301	200	0000	0000	2000	2000	2000				•••

Threshold	(*):	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01

Quantitative Analysis of 'HINTHREATELTTD'

• •	
DRB1+0101	
DRB1+0102	
DRB1+0301	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
DF81+0401	XXXXXXXXXXXXXXXX
DFB1+0402	XX
DR01+0404	хх
DR81+0405	XX
DRB 1#0410	XX
DRB1+0421	
DR81+0701	
DE81*0801	
D9981#0802	
DEB1#0804	
DER1#8806	
DER1#1101	
DUR1#1104	
DUB141106	
DUD1+1107	
DDD141305	
DT01-1303	
DK81*1307	
NKU1-1311	
DA01*1321	
DR81*1501	
DKE1*1502	
DX85*0101	

KFNRLNRLTTD (54-64)

Quantitative Analysis of 'KENRLURLITD'

Threshold (%):	10	09	80	07	06	05	04	93	02	01	
DR81+0101	XXX	2000		0000	0000	0000	2000		XXX.		
DR81+0102	XXX	XXX	2000	0000	2000	0000	xx.				
DR91+0301	XXX	2000	2000	0000	XXX.						
DRB1#0401											
DRB1#0402											
DR81+0404											
DR81+0405	XX.	1.1.									
DRB1+0410											
DR81+0421											
DRB1+0701	100	2027	mr.								
DRB1+0801	XXXX	XXXX	0000	0000	0000	0000	2000	0000	XXX		
DRB1+0802	700	XXX	0000	0000	0000	0000	000	0000	XXX		
D281+0804	111	n	0000	0000	0000	0000	\mathbf{x}	mr.			
DRB1+0806	222	∞	0000	0000	0000	0000	2000	mr.			
D281#1101	200	2222	0000	0000	0000	0000	2000	0000	m		
D281+1104	200	TYY	000	0000	0000	0000	0000	mm	202	CTTT -	
DDB1+1106	~~~~	m	~~~~		~~~~		m	nnn	YYYY		
DDR1+1107	200	~~~~	~~~~	$\overline{\mathbf{n}}$	$\sim \sim \sim$			~~~~		~~~~	
DDR1#1305	$\widetilde{\mathbf{n}}$	$\overline{\mathbf{n}}$	~~~~	$\overline{\mathbf{n}}$	\overline{n}			0000	\mathbf{m}	TTYT	
DDR141307	777	~~~~	~~~	~~~~		\sim	$\overline{\mathbf{m}}$		~~~		
B28141311	777	~~~		$\overline{\mathbf{n}}$	$\sim \sim \sim$	~~~~	200	~~~~	~~~	TYT	
DD0141201	~~~~		~~~~~	~~~~	~~~~	~~~~	~~~~	~~~~~	~~~~		
D00141801	~~~~	~~~~		~~~~		~~~~~	~~~~		~~~~		
DDD141800	~~~					~~~~		~~~~	~~~~	****	
DEDI-1302	~~~					ŝ		u, u		****	
NKD3=0101	- 20	للنبين	u u	uu.							

RLNRLTTDFNVIVEALSKSK (57-76)

Quantitative Analysis of 'FLERLTTDEEVIVERLSKSK'

Threshold (%):	10	09	08	07	06	05	04	03	D2	01
DE91+0101	XXX	2002	x007	жx.			· • • •	• • • •		
DRB1+0102	XX.									• • •
DRB1+0301	XXX	000	2000	2000	ω.					
DRB1+0401	XXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	2000	2003	DOX.		
DRB1+0402	XXX	∞	XXX	XXXX	XXXX	2000	xx.			• • •
DRB1+0404	XXX	$\infty \infty$	$\infty \alpha$	2222	XXXX	2000	200	DOCK.		
DRB1+0405	XXX	$\infty \infty$	xxxx	∞	2000	2007	100	0000	500 .	
DRB1+0410	XXX	xxx	xxxx	2022	XXXX	XXX	000	0000	boox.	
DFB1*0421	XXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	2000	xxx.		
DRB1+0701										
DFB1*0801	XXX	xxxx	XXXX	2020	XXX.					
DFB1+0802	XXX	xxx		xxx	XXXX	xxx	xx.			
DFB1*0804	XXX	xxx		2022	2000	XXX.				
DRB1+0805	XXX	000	2000	XXX.						
DF81+1101	XX	2022	2000	2022	XXXX	2023	xx.			
DFB1+1104	XXX	xxxx	2000	20000	XXXX	DOCK.				
DF81+1106	xxx	∞	∞	2022	xxxx	XXX.				
DFB1+1107	XXX	xxxx	∞	2000	$\infty \infty$	XXX.				
DRB1+1305	XXX	2020	2000	2000	∞x	2020	XXX.			
DF91+1307	XXX	200	2000	$\infty \alpha$	xxx	2000	200		αx.	
DFB1+1311	XXX	XXXX	2000	2000	2000	DOCX.				
DF81#1321	xx	2000	2000	2000	2000	XXX.		,		
DF81*1501						• • • •				
DF81+1502										
DFB5+0101	XXX	2000	2000	2000	2000	2022	100	0000	. xxx	•••



EIMIKFNRLNR (50-60)

...........

...........

....

NIQMRRTLHKA (139-149)

Quantitative Analysis of "EDELEPHRIDE"

\$101+\$101

3001+0102 3501+0301

DSB1+0401

DE81+0402 DE81+0404

DEB1+0405 DEB1+0418

DR81+0421

DB01+0701

3FE1+0801

DH01+0802

3481+0304 3981+0306

DSB 1+1101

DEB1+1104

DE01+1106

DH81+1107 DH81+1305

D1#1+1307 D1#1+1311

DH01+1321 DH01+1501

3681+1502

PHE 5+0101

Threshald (9):	18	89	88	07	06	05	54	03	82	01
----------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Quantitative Analysis of "HIGHRRTLHKA"

Threshold (4):	10	09	08	07	06	05	64	03	02	01
DRB 1+0101	•••	• • • •	• • • •	••••	• • • •	••••	••••			•••
DFB1+0102	• • •		• • • •	• • • •				• • • •		•••
DF81+0301	XXX	2020	2000	2000	XXX.			• • • •	• • • •	•••
DFE1+0401	XXX	2000	000	0000	200	2000	200	ж,	• • • •	•••
DF81+0402	202	2000	000	0000	2000	20000	XXX			XXX
DFE1+0404	\mathbf{x}	2000	2000	2000	2003	2000	2000	XX.		
DRB1+0403	XXX	xxx.								• • •
DRB1+0410	20	000	0000	000						
DF81+0421	200	000	2000	0000	\mathbf{x}	2000	xxx.			
DEB1+0701										
DR01+0801	XXX	2000	0000	00000	2000	0000	∞	0000	0000	XXX
DF81+0802	202	∞	0000	∞	∞	0000	∞	0000	0000	XXX
DRE1+0804	XXX	0000	0000	$\infty \infty$	2002	0000	∞	0000	0000	XXX
DFE1*0806	200	0000	0000	0000	2000	0000	∞	0000	2000	XX
DE01+1101	XXX	∞	∞	∞	∞	0000	∞	0000	000	
DF81+1104	XXX	0000	0000	0000	$\infty \alpha$	0000	∞	0000	0000	XXX
DP81+1106	X	∞	∞	∞	2000	0000	000	0000	0000	200
DF81+1107	200	0000	0000	∞	2000	0000	∞	σx.		
DRB1+1305	200	0000	0000	0000	2000	0000	0000	0000	cox.	
DF81+1307	XO	000	∞	0000	2000	0000	0000	0000	oox.	
DF8141311	XO	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		XX0
DRB1+1321	m	0000	0000	0000	0000	0000	000			
DR81+1501	200	0000	ά	0000	000	0000	000			
DF81+1502	200	0000	0000	0000	0000	0000	000			
PF0 5+0101	200	0000	0000	0000	0000	0000	0000	œα.	•••	••••

QIKLDEGWVPLEIMIKFNRL (39-58) TLHKAFKGSIFVVFDSIESA (145-164)

Quantitative Analysis of "QIRLBEDWVPLEIMINTER."

Quantitative Analysis of 'TLHKAFKGSIFVVFDSIESA'

Thrushald (%):	18 69 08 07 06 85 94 93 02 91	Threshold (%):	10 99 08 07 06 05 04 03	02 01
9781+9101		DE81+0101		2000000
200140102		DJB1+0102		100000000
3881/6381		376140301		X1000000
DEE148481		DJ891+0401		20000000
bill1+8487	THEORY	D281+0402		TRUCK
3001+8494		DE81+0404		TODOOOCT
D##1+8401		DB81+9405		TOTTOTT
D381+0414		DEB1+0410		TOTOTT
D101+8471		DE01+0421		10000000
300100701	TT CONTRACTOR OF	DER1+0701		1000000
500105001		b20140801		11100000
DER146303		BPR1+0602		
300145004		DER 1 CORDA		
NUR148864		DBR140806		mm
NOT141141		DE0141101		
		D001-1104		
		DDD1-1106		
		D101-1100		
PT01*110/				
PH01*1305		D101*1303		
990 1•1307		DHD1=1307		20000000
3997 3+1311		PHE1 *1311		00000000
9981+1321		DH01+1321		00000000
DH01+1301	202000000000000000000000000000000000000	DDB1+1501		000000000
DND1+1502	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	DD01+1502		000000000
308540101		D#05+0101		00000





1999 - Sec. - -

TTAPAPTHMA III



Ι. ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΑ 9-ΜΕΡΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ MULTIPRED

		[Mole	cules						
Pos.	Peptides	DRB1-	DRB1-	DRB1-	DRB1-	DRB1-	DRB1-	DRB1-	DRB1-	Sum*	Average*	
		0101	0301	0401	0701	0801	1101	1301	1501			
1	MAENGDNEK	1.04	1.04	1.29	1.10	1.03	1.04	1.15	1.07	8.76	8.38	
2	AENGDNEKM	1.00	1.01	1.19	1.05	1.00	1.00	1.06	1.02	8.33	8.32	
3	ENGDNEKMA	0.97	0.97	1.02	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.86	8.31	
4	NGDNEKMAA	0.98	0.97	1.02	1.00	0.97	0.97	0.99	1.00	7.90	9.82	
5	GDNEKMAAL	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.99	0.98	7.82	9.90	
6	DNEKMAALE	1.05	1.04	1.36	1.18	1.03	1.04	1.16	1.14	9.00	9.97	
7	NEKMAALEA	1.06	1.04	1.35	1.18	1.03	1.05	1.15	1.15	9.01	12.89	
8	EKMAALEAK	1.00	1.00	1.15	1.06	0.99	1.00	1.05	1.05	8.30	12.74	
9	KMAALEAKI	1.00	1.00	1.14	1.05	0.99	1.00	1.05	1.03	8.26	13.01	
10	MAALEAKIC	1.90	1.83	3.25	2.75	1.68	1.81	2.80	2.43	18.45	13.22	
11	AALEAKICH	1.01	1.01	1.21	1.07	1.01	1.01	1.08	1.05	8.45	16.85	
12	ALEAKICHQ	1.01	1.00	1.16	1.04	1.00	1.00	1.06	1.03	8.30	16.76	
13	LEAKICHQI	3.15	3.08	4.29	4.48	2.93	2.96	4.75	3.82	29.46	16.82	
14	EAKICHQIE	0.98	0.98	1.06	1.00	0.98	0.98	1.01	0.99	7.98	13.85	
15	AKICHQIEY	1.14	1.13	1.76	1.31	1.11	1.12	1.36	1.24	10.17	16.84	
<u>16</u>	KICHQIEYY	1.11	1.10	1.54	1.28	1.08	1.10	1.30	1.23	9.74	16.53	
17	ICHQIEYYF	5.14	5.06	5.26	689	4.76	4.93	16×15	5.86	43.85	19.90	
18	CHQIEYYFG	0.97	0.97	1.01	0.98	0.97	0.97	0.99	0.98	7.84	21.22	
19	HQIEYYFGD	1.04	1.04	1.27	1.09	1.04	1.03	1.13	1.05	8.69	22.20	
20	QIEYYFGDF	1.03	1.02	1.30	1.11	1.01	1.02	1.10	1.08	8.67	22.07	
21	IEYYFGDFN	3.09	2.96	4.29	4.45	2.78	2.87	4.64	3.84	28.92	22.17	
22	EYYFGDFNL	0.98	0.98	1.06	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	8.00	20.32	
23	YYFGDFNLP	3.69	3.64	4.51	4.98	3.35	3.51	5.26	4.37	33.31	20.36	
24	YFGDFNLPR	\$46	6.29	5.79	759	642	6.22	7.53	814	53.14	18.19	
25	FGDFNLPRD	1.55	1.45	2.80	2.07	1.39	1.45	2.01	1.92	14.64	11.72	
26	GDFNLPRDK	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.80	10.75	
27	DFNLPRDKF	1.08	1.08	1.50	1.21	1.06	1.08	1.24	1.15	9.40	10.83	
28	FNLPRDKFL	1.63	1.59	2.85	2.30	1.51	1.57	2.47	2.03	15.95	10.69	
29	NLPRDKFLK	1.01	1.00	1.15	1.05	1.00	1.00	1.05	1.05	8.31	11.69	
30	LPRDKFLKE	1.83	1.83	3.28	2.58	1.72	1.77	2.86	2.19	18.06	13.75	
31	PRDKFLKEQ	0.98	0.98	1.02	0.99	0.97	0.97	1.00	0.98	7.89	12.28	
32	RDKFLKEQI	0.97	0.97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.85	12.27	
33	DKFLKEQIK	1.01	1.00	1.17	1.06	1.00	1.00	1.07	1.03	8.34	12.31	
34	KFLKEQIKL	1.02	1.01	1.16	1.07	1.01	1.01	1.08	1.05	8.41	15.51	
35	FLKEQIKLD	2.38	2 26	3.87	3.48	2.10	2.21	3.64	3.02	22.96	15.42	
36	LKEQIKLDE	2.33	2 29	3.74	3.41	2.18	2.22	3.69	2.86	22.72	13.77	
37	KEQIKLDEG	0.97	0 97	0.99	0.97	0.97	0.97	0.98	0.97	7.79	11.79	
38	EQIKLDEGW	0.97	0.97	1 01	0.98	0.97	0.97	0.99	0.98	7.84	11.78	
39	QIKLDEGWV	0.99	0.99	1.14	1.02	0 98	0.99	1.02	1.01	8.14	11.77	
40	IKLDEGWVP	3.44	3 35	4.36	4.48	3 22	3.21	4.65	3.99	30.70	13.75	
41	KLDEGWVPL	0.97	0.97	0.99	0.97	0.96	0.97	0.98	0.97	7.78	12.09	

.

42	LDEGWVPLE	1.25	1.24	1.94	1.55	1.19	1.23	1.59	1.44	11.43	12.11
43	DEGWVPLEI	1.04	1.04	1.33	1.12	1.04	1.04	1.17	1.07	8.85	16.56
44	EGWVPLEIM	0.97	0.96	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.74	16.58
45	GWVPLEIMI	0.97	0.97.	0.98	0.97	0.96	0.96	0.98	0.97	7.76	22.25
46	WVPLEIMIK	2.27	2.17	3.75	3.30	2.02	2.12	3.48	2.86	21.97	25.67
47	VPLEIMIKF	1.97	1.93	3.29	2.74	1.85	1.84	3.11	2.35	19.08	29.56
48	PLEIMIKFN	0.98	0.98	1.04	1.00	0.98	0.98	1.00	0.99	7.95	28.07
49	LEIMIKFNR	4,97	4.80	5.13	6 30	4.54	4.69	16:43	5.68	42.54	32.76
50	EIMIKFNRL	1.05	1.05	1.40	1.16	1.03	1.05	1.16	1.11	9.01	27.91
51	IMIKFNRLN	5.68	5.53	5.32	6 947	5.26	5.43	6,91,	638	47.45	27.94
52	MIKFNRLNR	3.46	3.34	4.49	4.86	3.08	3.22	5.02	4.23	31.70	24.97
53	IKFNRLNRL	5.93	5.79	5.56	7,061	5.48	5.67	7.21	651	49.21	21.61
54	KFNRLNRLT	1.03	1.03	1.24	1.11	1.02	1.02	1.12	1.07	8.64	15.83
55	FNRLNRLTT	4.74	4.61	5.02	6,024	4.30	4.50	6,17	5.42	40.78	19.33
56	NRLNRLTTD	1.03	1.02	1.25	1.08	1.02	1.02	1.11	1.06	8.59	14.64
57	RLNRLTTDF	1.07	1.06	1.39	1.20	1.05	1.06	1.19	1.16	9.18	14.56
58	LNRLTTDFN	2.82	2.79	4.03	4.05	2.51	2.72	4.27	3.53	26.72	14.53
59	NRLTTDFNV	0.99	0.99	1.12	1.03	0.99	0.99	1.04	1.01	8.16	13.73
60	RLTTDFNVI	1.04	1.03	1.28	1.12	1.02	1.03	1.13	1.08	8.73	13.77
61	LTTDFNVIV	3.66	3.60	4.47	4.98	3.33	3.47	5.25	4.37	33.13	14.33
62	TTDFNVIVE	0.98	0.98	1.03	1.00	0.98	0.98	1.01	1.00	7.96	12.01
63	TDFNVIVEA	0.99	0.99	1.04	1.01	0.98	0.98	1.02	1.00	8.01	14.97
64	DFNVIVEAL	1.05	1.05	1.39	1.15	1.04	1.04	1.17	1.11	9.00	15.00
65	FNVIVEALS	2.21	2.08	3.51	3.23	1.95	2.08	3.29	2.80	21.15	14.97
66	NVIVEALSK	1.02	1.01	1.17	1.08	1.00	1.01	1.08	1.07	8.44	16.76
67	VIVEALSKS	1.34	1.32	2.36	1.69	1.27	1.29	1.79	1.57	12.63	16.70
68	IVEALSKSK	1.74	1.64	3.06	2.47	1.61	1.61	2.60	2.17	16.90	16.03
69	VEALSKSKA	3.06	2.95	4.29	4.40	2.70	2.88	4.56	3.82	28.66	14.75
70	EALSKSKAE	1.00	0.99	1.12	1.04	0.99	0.99	1.04	1.04	8.21	11.78
71	ALSKSKAEL	1.04	1.04	1.32	1.11	1.03	1.03	1.13	1.08	8.78	11.75
72	LSKSKAELM	3.79	3.62	4.55	5.07	3.39	3.55	5.28	4.46	33.71	11.62
73	SKSKAELME	0.98	0.98	1.04	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	7.98	8.24
74	KSKAELMEI	0.98	0.98	1.03	1.00	0.98	0.98	1.00	0.99	7.94	8.45
75	SKAELMEIS	0.98	0.98	1.04	1.00	0.97	0.98	1.00	0.99	7.94	8.48
76	KAELMEISE	0.97	0.97	1.04	0.99	0.97	0.97	0.99	0.99	7.89	10.54
77	AELMEISED	0.99	0.99	1.07	1.01	0.98	0.98	1.02	0.99	8.03	10.59
78	ELMEISEDK	0.97	0.97	1.02	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.83	10.58
79	LMEISEDKT	1.13	1.12	1.75	1.28	1.11	1.11	1.36	1.20	10.06	10.66
80	MEISEDKTK	1.10	1.10	1.46	1.21	1.08	1.09	1.29	1.16	9.49	10.38
81	EISEDKTKI	0.99	0.99	1.09	1.03	0.99	0.99	1.03	1.01	8.12	10.40
82	ISEDKTKIR	2.29	2.19	3.81	3.38	2.06	2.13	3.58	2.90	22.34	10.44
83	SEDKTKIRR	1.00	1.00	1.14	1.05	1.00	1.00	1.06	1.03	8.28	14.68
84	EDKTKIRRS	0.98	0.98	1.03	0.99	0.97	0.98	1.00	0.99	7.92	14.73
85	DKTKIRRSP	1.01	1.01	1.21	1.06	1.00	1.01	1.07	1.03	8.40	14.78
86	KTKIRRSPS	0.99	0.99	1.10	1.02	0.99	0.99	1.03	1.00	8.11	14.69
87	TKIRRSPSK	1.11	1.10	1.37	1.28	1.10	1.10	1.35	1.20	9.61	14.66

88	KIRRSPSKP	1.02	1.02	1.19	1.07	1.01	1.01	1.09	1.04	8.45	14.42
89	IRRSPSKPL	(6)28	614	5.67	7,50%	5.89	600	1523	699	51.99	14.33
90	RRSPSKPLP	1.03	1.03	1.26	1.10	1.02	1.02	1.12	1.08	8.66	8.01
91	RSPSKPLPE	1.00	1.00	1.12	1.04	0.99	1.00	1.05	1.03	8.23	8.01
92	SPSKPLPEV	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.98	7.81	7.97
93	PSKPLPEVT	0.97	0.97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.85	8.00
94	SKPLPEVTD	0.98	0.98	1.04	1.00	0.98	0.98	1.01	1.00	7.97	9.03
95	KPLPEVTDE	0.97	0.97	0.98	0.97	0.96	0.97	0.98	0.97	7.77	9.00
96	PLPEVTDEY	0.97	0.97	0. 9 9	0.97	0.97	0.97	0.98	0.97	7.79	9.01
97	LPEVTDEYK	1.03	1.03	1.25	1.10	1.02	1.03	1.13	1.06	8.65	9.15
98	PEVTDEYKN	0.98	0.98	1.04	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	7.98	16.55
99	EVTDEYKND	0.98	0.98	1.04	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	7.98	16.53
100	VTDEYKNDV	1.56	1.56	2.97	1.98	1.50	1.50	2.28	1.73	15.08	16.53
101	TDEYKNDVK	0.96	0.96	0.97	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.72	16.03
102	DEYKNDVKN	0.97	0.97	1.04	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.88	20.52
103	EYKNDVKNR	1.04	1.04	1.27	1.13	1.02	1.04	1.14	1.10	8.78	20.57
104	YKNDVKNRS	7.58		1531	825	7426	7635	-6:26:	796	60.41	20.67
105	KNDVKNRSV	0.97	0.97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.85	13.28
106	NDVKNRSVY	0.98	0.98	1.05	1.00	0.98	0.98	1.01	1.00	7.98	13.39
107	DVKNRSVYI	1.25	1.24	2.07	1.53	1.24	1.22	1.68	1.36	11.59	16.26
108	VKNRSVYIK	4.55	4.39	4.89	.5.75	4.16	4.27	5.98	5.14	39.13	19.26
109	KNRSVYIKG	1.00	1.00	1.14	1.05	1.00	1.00	1.06	1.03	8.28	16.97
110	NRSVYIKGF	1.09	1.09	1.53	1.19	1.08	1.08	1.27	1.14	9.47	16.91
111	RSVYIKGFP	1.03	1.03	1.26	1.11	1.02	1.03	1.12	1.08	8.68	16.86
112	SVYIKGFPT	1.03	1.02	1.21	1.10	1.01	1.02	1.10	1.08	8.57	20.25
113	VYIKGFPTD	3.01	2.93	4.19	4.26 ,	2.74	2.79	4.53	3.66	28.11	20.14
114	YIKGFPTDA	3.61	3.52	4.55	4.93	3.15	3.40	5.06	4.39	32.61	17.22
115	IKGFPTDAT	2.38	2.26	3.87	3.49	2.20	2.19	3.74	2.97	23.10	13.69
116	KGFPTDATL	0.97	0.97	1.01	0.98	0.97	0.97	0.98	0.98	7.83	11.58
117	GFPTDATLD	1.08	1.07	1.21	1.22	1.06	1.06	1.23	1.19	9.12	11.63
118	FPTDATLDD	3.60	3.47	4.58	4.90	3.15	3.38	5.03	4.33	32.44	11.55
119	PTDATLDDI	0.97	0.97	0.99	0.97	0.97	0.97	0.98	0.97	7.79	8.04
120	TDATLDDIK	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	7.68	8.03
121	DATLDDIKE	0.97	0.97	1.02	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.86	8.45
122	ATLDDIKEW	1.01	1.01	1.14	1.05	1.01	1.01	1.07	1.02	8.32	8.43
123	TLDDIKEWL	1.00	1.00	1.12	1.04	0.99	1.00	1.05	1.02	8.22	8.36
124	LDDIKEWLE	1.02	1.02	121	1.09	1.01	1.02	1.10	1.06	8.53	12.11
125	DDIKEWLED	0.97	0.98	1.03	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.88	12.96
126	DIKEWLEDK	0.96	0.96	0.99	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.74	13.00
127	IKEWLEDKG	1.17	1.16	1.78	1.40	1.17	1.15	1.51	1.26	10.60	13.10
128	KEWLEDKGQ	0.96	0.96	0 97	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	i 7.69	12.71
129	EWLEDKGQV	0 97	0 97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.85	13.08
130	WLEDKGQVL	3.93	3 79	4.65	5.11	3.61	3.66	5.17	4.57	34.49	13.46
131	LEDKGQVLN	1.49	1.48	2.81	1.98	1.42	1.46	2.12	1.74	14.50	12.27
132	EDKGQVLNI	0 99	0 99	1.09	1.02	0.99	0.99	1.03	1.01	8.11	16.41
133	DKGQVLNIQ	1.02	1.01	1.21	1.08	1.01	1.01	1.08	1.06	8.48	16.57

į

٠

295

BIBA

NEILISTHAN

•

134	KGQVLNIQM	0.97	0.97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.85	23.06
135	GQVLNIQMR	1.18	1.18	1.40	1.41	1.15	1.17	1.52	1.29	10.30	23.34
136	QVLNIQMRR	1.16	1.16	1.91	1.35	1.13	1.15	1.39	1.27	10.52	27.99
137	VLNIQMRRT	2.77	2.67	4.12	3.96	2.44	2.57	4.17	3.44	26.14	27.86
138	LNIQMRRTL	5.13	4.97	5.08	639	4.71	4.86	649	5.82	43.45	25.36
139	NIQMRRTLH	1.08	1.07	1.42	1.20	1.05	1.07	1.21	1.16	9.26	20.30
140	IQMRRTLHK	6.60+	646	5.91	-7/65/	6,097	6.37	7,55	17:30;	5 3.9 3	23.86
141	QMRRTLHKA	1.11	1.10	1.62	1.25	1.08	1.10	1.28	1.21	9.75	17.50
142	MRRTLHKAF	4.98	4.89	5.21	6 324	4.59	4.77	6.39	5.74	42.89	17.42
143	RRTLHKAFK	1.10	1.09	1.54	1.24	1.08	1.09	1.28	1.19	9.61	12.53
144	RTLHKAFKG	1.03	1.03	1.26	1.10	1.02	1.03	1.12	1.07	8.66	17.17
145	TLHKAFKGS	0.99	0.99	1.05	1.01	0.98	0.99	1.02	1.00	8.03	17.13
146	LHKAFKGSI	3.85	3.71	4,70	5.14	3.33	3.62	5,26	4.57	34.18	17.22
147	HKAFKGSIF	1.09	1.08	1.39	1.23	1.07	1.08	1.25	1.18	9.37	13.49
148	KAFKGSIFV	1.07	1.07	1.45	1.18	1.06	1.06	1.21	1.13	9.23	13.76
149	AFKGSIFVV	1.03	1.03	1.27	1.08	1.02	1.02	1.11	1.06	8.62	17.53
150	FKGSIFVVF	4.90	4.73	5.18	621	4.47	4.62	640	5.56	42.07	22.30
151	KGSIFVVFD	1.01	1.01	1.17	1.08	1.00	1.01	1.07	1.06	8.41	17.65
152	GSIFVVFDS	1.04	1.04	1.19	1.10	1.03	1.04	1.14	1.07	8.65	18.05
153	SIFVVFDSI	0.99	0.99	1.08	1.02	0.98	0.99	1.02	1.01	8.08	18.07
154	IFVVFDSIE	1.24	1.20	1.93	1.51	1.18	1.20	1.54	1.44	11.24	18.12
1 5 5	FVVFDSIES	4.04	3.8 6	4.72	5.38	3.66	3.73	5.46	4.77	35.62	20.63
156	VVFDSIESA	4.94	4.78	5.08	6.17	4.53	4.67	632	5.57	42.06	16.66
157	VFDSIESAK	1.09	1.08	1.56	1.18	1.08	1.07	1.26	1.14	9.46	11.81
158	FDSIESAKK	1.24	1,22	1.91	1.50	1.18	1.21	1.56	1.41	11.23	11.63
159	DSIESAKKF	1.04	1.04	1.30	1.13	1.03	1.03	1.15	1.10	8.82	11.20
160	SIESAKKFV	1.02	1.01	1.15	1.09	1.00	1.01	1.08	1.08	8.44	11.06
161	IESAKKFVE	3.13	2.93	4.30	4.38	2.83	2.84	4.56	3.78	28.75	15.18
162	ESAKKFVET	0.97	0.97	1.04	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.88	13.08
163	SAKKFVETP	0.99	0.99	1.09	1.02	0.99	0.99	1.03	1.01	8.11	13.12
164	AKKFVETPG	0.99	0.99	1.14	1.03	0.99	0.99	1.04	1.01	8.18	13.07
165	KKFVETPGQ	1.00	1.00	1.11	1.04	0.99	1.00	1.05	1.03	8.22	13.07
166	KFVETPGQK	0.97	0.97	1.00	0.98	0.97	0.97	0.98	0.98	7.82	13.09
167	FVETPGQKY	. 4.23	4.07	4.89	5.60	3.83	3.98	5.76	4.97	37.33	13.23
168	VETPGQKYK	1.47	1.47	2.69	1.83	1.41	1.42	2.09	1.64	14.02	9.04
169	ETPGQKYKE	0.99	0.99	1.11	1.03	0.99	0.99	1.04	1.01	8.15	11.70
170	TPGQKYKET	0.97	0.97	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.75	11.85
171	PGQKYKETD	1.00	1.00	1.10	1.04	1.00	1.00	1.05	1.02	8.21	11.88
172	GOKYKETDL	1.01	1.01	1.10	1.06	1.01	1.01	1.09	1.04	8.33	11.84
173	QKYKETDLL	1.04	1.03	1.33	1.14	1.02	1.03	1.12	1.11	8.82	11.78
174	KYKETDLLI	0.98	0.98	1.05	1.00	0.98	0.98	1.01	0.99	7.97	16.01
175	YKETDLLIL	3.63	3.48	4.52	4.94	3.24	3.40	5.08	4.35	32.64	18.30
176	KETDLLILF	1.08	1.06	1.35	1.22	1.05	1.06	1.21	1.19	9.22	16.64
177	ETDLLILFK	0.98	0.98	1.07	1.00	0.97	0.98	1.00	0.99	7.97	18.46
178	TDLLILFKD	0.98	0.98	1.01	0.99	0.97	0.98	1.00	0.99	7.90	20.71
179	DLLILFKDD	0.98	0.97	1.05	0.99	0.97	0.97	1.00	0.99	7.92	20.72

BIE

NEILETHA

180	LLILFKDDY	4.43	4.31	4.83	5.74	3.94	4.17 ^t	5.83	5.18	38.43	20.75
181	LILFKDDYF	2.50	2.40	3.80	3.63	2.34	2.31	3.98	3.08	24.04	16.61
182	ILFKDDYFA	2.14	2.05	3.57	3.16	1.96	2.01	3.38	2.71	20.98	18.36
183	LFKDDYFAK	2.27	2.22	3.75	3.20	2.16	2.11	3.54	2.71	21.96	17.39
184	FKDDYFAKK	2.47	2.38	3.88	3.62	2.26	2.32	3.74	3.10	23.77	15.38
185	KDDYFAKKN	0.98	0.98	1.03	1.01	0.97	0.98	1.00	1.00	7.95	13.09
186	DDYFAKKNE	0.99	0.99	1.07	1.03	0.98	0.99	1.02	1.02	8.09	13.07
187	DYFAKKNEE	1.09	1.09	1.55	1.19	1.08	1.07	1.26	1.14	9.47	13.07
188	YFAKKNEER	4.10	4.01	4.65	5.45	3.76	3.86	5.65	4.83	36.31	12.89
189	FAKKNEERK	1.46	1.43	2.79	1.95	1.38	1.41	2.03	1.74	14.19	8.94
190	AKKNEERKQ	0.97	0.97	1.02	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.86	8.14
191	KKNEERKQN	0.97	0.97	0.99	0.98	0.96	0.97	0.98	0.97	7.79	8.27
192	KNEERKQNK	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.98	7.81	8.36
193	NEERKONKV	0.98	0.98	1.09	1.01	0.98	0.98	1.02	1.00	8.04	8.62
194	EERKQNKVE	1.00	1.00	1.13	1.04	1.00	1.00	1.06	1.02	8.25	8.60
195	ERKQNKVEA	1.03	1.03	1.26	1.09	1.02	1.03	1.11	1.06	8.63	10.68
196	RKQNKVEAK	1.02	1.02	1.23	1.10	1.01	1.02	1.09	1.08	8.57	10.59
197	KONKVEAKL	1.04	1.03	1.29	1.12	1.03	1.03	1.15	1.08	8.77	11.03
198	QNKVEAKLR	1.01	1.00	1.19	1.09	1.00	1.00	1.05	1.09	8.43	10.91
199	NKVEAKLRA	1.12	1.08	1.50	1.32	1.06	1.08	1.20	1.31	9.67	14.04
200	KVEAKLRAK	0.97	0.97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.99	7.86	13.77
201	VEAKLRAKQ	2.33	2.24	3.84	3.45	2.15	2.18	3.69	2.92	22.80	13.78
202	EAKLRAKQE	0.99	0.98	1.09	1.02	0.98	0.98	1.02	1.00	8.06	11.64
203	AKLRAKQEQ	1.26	1.24	2.05	1.55	1.23	1.22	1.68	1.41	11.64	11.67
204	KLRAKQEQE	0.98	0.97	1.02	0.99	0.97	0,97	1.00	0.99	7.89	11.16
205	LRAKQEQEA	3.34	3.27	4.33	4.47	3.13	3.13	4.72	3.94	30.33	11.26
206	RAKQEQEAK	0.97	0.97	1.00	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.81	8.05
207	AKQEQEAKQ	0.98	0.98	1.05	0.9 9	0.97	0.97	1.00	0.98	7.92	8.08
208	KQEQEAKQK	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.80	8.06
209	QEQEAKQKL	1.00	1.00	1.17	1.04	0.99	1.00	1.05	1.02	8.27	8.05
210	EQEAKQKLE	0.99	0.99	1.08	1.02	0.98	0.99	1.03	1.01	8.09	7.97
211	QEAKQKLEE	1.02	1.02	1.28	1.07	1.01	1.02	1.10	1.05	8.57	9.08
212	EAKQKLEED	0.97	0.97	1.02	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.86	8.97
213	AKQKLEEDA	0.98	0.98	1.09	1.01	0.98	0.98	1.01	0.99	8.02	8.97
214	KQKLEEDAE	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.80	8.98
215	OKLEEDAEM	0.96	0.96	0.99	0.97	0.96	0.96	0.97	0. 97	7.74	9.00
216	KLEEDAEMK	0.96	0.96	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.73	9.03
217	LEEDAEMKS	1.62	1.62	2 87	2.22	1.53	1.59	2.47	1.91	15.83	9.72
218	EEDAEMKSL	0.97	0.97	1.00	0.98	0.97	0.97	0.98	0.98	7.82	8.57
219	EDAEMKSLE	0.97	0.97	1.01	0.98	0.97	0.97	0.99	0.98	7.84	8.56
220	DAEMKSLEE	0 99	0.99	1.08	1.02	0.98	0.99	1.03	1.00	8.08	11.09
221	AEMKSLEEK	0 98	0.98	1.06	0.99	0.98	0.98	1.00	0.98	7.95	11.08
222	EMKSLEEKI	0 98	0 98	1.05	1.00	0.97	0.98	1.00	0.99	7.95	11.38
_223	MKSLEEKIG	1 33	1.32	2.27	1.70	1.27	1.31	1.80	1.54	12.54	11.39
224	KSLEEKIGC	0.97	0.97	0.99	0.97	0.96	0.97	0.98	0.97	7.78	13.13
225	SLEEKIGCL	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.80	13.16

	Construction of the state of th				sector as an end of the sector	the state of the s	and the second s	a second s	A A A YOM A MALE AND AND A		
226	LEEKIGCLL	2.75	2.69	3.92	3.74	2.61	2.60	3.92	3.27	25.50	13.31
227	EEKIGCLLK	0.98	0.98	1.08	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	8.02	12.20
228	EKIGCLLKF	1.15	1.14	1.59	1.33	1.11	1.14	1.38	1.25	10.09	13.74
229	KIGCLLKFS	0.98	0.98	1.05	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	7.99	13.42
230	IGCLLKFSG	2.58	2.45	4.02	3.78	2.29	2.39	3.98	3.24	24.73	13.60
231	GCLLKFSGD	0.99	0.99	1.04	1.01	0.98	0.99	1.02	1.00	8.02	11.17
232	CLLKFSGDL	1.05	1.05	1.30	1.12	1.04	1.04	1.16	1.08	8.84	11.19
233	LLKFSGDLD	1.79	1.74	3.31	2.54	1.67	1.70	2.75	2.21	17.71	11.14
234	LKFSGDLDD	1.92	1.86	3.32	2.76	1.73	1.83	2.97	2.41	18.80	10.03
235	KFSGDLDDQ	0.97	0.97	1.01	0.98	0.97	0.97	0.99	0.98	7.84	8.50
236	FSGDLDDQT	1.08	1.08	1.49	1.17	1.06	1.07	1.23	1.11	9.29	8.58
237	SGDLDDQTC	0.96	0.96	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	7.69	8.39
238	GDLDDQTCR	1.00	1.00	1.05	1.03	1.00	1.00	1.05	1.01	8.14	8.44
239	DLDDQTCRE	1.02	1.01	1.22	1.08	1.01	1.01	1.09	1.06	8.50	8.68
240	LDDQTCRED	1.13	1.13	1.63	1.27	1.11	1.12	1.34	1.20	9.93	8.64
241	DDQTCREDL	0.99	0.99	1.10	1.02	0.99	0.99	1.03	1.00	8.11	8.34
242	DQTCREDLH	1.01	1.01	1.17	1.06	1.01	1.01	1.09	1.03	8.39	8.32
243	QTCREDLHI	0.98	0.98	1.05	1.00	0.98	0.98	1.00	0.99	7.96	14.12
244	TCREDLHIL	0.99	0.99	1.05	1.02	0.99	0.99	1.03	1.01	8.07	14.24
245	CREDLHILF	1.13	1.12	1.34	1.32	1.14	1.11	1.44	1.20	9.80	16.96
246	REDLHILFS	1.00	1.00	1.15	1.04	0.99	1.00	1.05	1.02	8.25	17.99
247	EDLHILFSN	0.97	0.97	0.99	0.97	0.96	0.97	0.98	0.97	7.78	18.43
248	DLHILFSNH	0.98	0.98	1.08	101	0.98	0.98	1 01	0.99	8.01	18 47
		0.00	0.00	1		0.00	0.00		0.00		<u> </u>
249	LHILFSNHG	5.88	5.70	5.43	7/132	5.45	5.59	7/18	6.62	48.98	18.45
249 250	LHILFSNHG HILFSNHGE	5.88 1.05	5.70 1.05	5.43	1.11	5.45 1.04	5.59	1.15	16.62 1.07	48.98 8.79	18.45 12.58
249 250 251	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI	5.88 1.05 2.85	5.70 1.05 2.81	5.43 1.28 4.14	1.11 4.10	5.45 1.04 2.63	5.59 1.04 2.71	1.15 4.39	1.07 3.49	48.98 8.79 27.12	18.45 12.58 12.52
249 250 251 252	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI LFSNHGEIK	5.88 1.05 2.85 1.75	5.70 1.05 2.81 1.66	5.43 1.28 4.14 3.09	1.11 1.11 4.10 2.47	5.45 1.04 2.63 1.59	5.59 1.04 2.71 1.64	1.15 4.39 2.58	6.62 1.07 3.49 2.19	48.98 8.79 27.12 16.97	18.45 12.58 12.52 9.77
249 250 251 252 253	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI LFSNHGEIK	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96	7/13 1.11 4,10 2.47 1.51	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22	1.15 4.39 2.58 1.59	16.62 1.07 3.49 2.19 1.40	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57
249 250 251 252 253 253	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI LFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKW	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03	1.07 1.07 3.49 2.19 1.40 1.00	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34
249 250 251 252 253 254 255	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI LFSNHGEIK FSNHGEIKWI SNHGEIKWI NHGEIKWID	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01	1.11 4,10 2.47 1.51 1.02 0.98	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97	1.15 1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98	1.07 1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62
249 250 251 252 253 254 255 256	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66
249 250 251 252 253 254 255 256 256 257	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI LFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFV	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03	1.11 4,10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06	0.00 5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01	1.15 1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258	LHILFSNHG HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVR	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97 1.01 0.97	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI LFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVR	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22	1.05 1.662 1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGA	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96 1.19	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGAK	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76	5.70 5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44	5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.19 2.17	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 17.05	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI FSNHGEIK SNHGEIKWI SNHGEIKWI HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGAK IDFVRGAKE	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.76 1.76	5.70 5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12	0.00 5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.49 1.49 1.49	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.54 1.63 1.49	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96 1.19 2.17 1.85	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 17.05 15.09	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFVR EIKWIDFVRG KWIDFVRGAK IDFVRGAKE DFVRGAKEG	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76 1.56 1.03	5.70 5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10	5.45 1.04 2.63 1.59 1.59 1.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.02	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63 1.49 1.03	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36 1.13	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.19 2.17 1.85 1.07	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 17.05 15.09 8.68	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDFV GEIKWIDFVR GEIKWIDFVRG KWIDFVRGAK WIDFVRGAKE DFVRGAKEG FVRGAKEG	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76 1.56 1.03 5.25	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03 5.10	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27 5.24	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10 6.54	5.45 1.04 2.63 1.59 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.02 4.83	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63 1.49 1.03 4.99	7.13 1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.58 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36 1.13 6.68	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96 1.19 2.17 1.85 1.07 5.94	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 17.05 15.09 8.68 44.57	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16 15.03
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFVR IKWIDFVRGA KWIDFVRGAK IDFVRGAKEG DFVRGAKEGI VRGAKEGI	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76 1.56 1.03 5.25 2.10	5.70 5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03 5.10 2.04	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27 5.24 3.62	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10 6.54 2.98	0.00 5.45 1.04 2.63 1.59 1.59 1.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.02 4.83 1.94	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63 1.49 1.03 4.99 1.96	7/13 1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36 1.13 6.68 3.32	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.19 2.17 1.85 1.07 5.94 2.55	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 15.09 8.68 44.57 20.51	10.17 18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16 15.03 10.19
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGA WIDFVRGAKE DFVRGAKEGI FVRGAKEGII RGAKEGII	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76 1.56 1.03 5.25 2.10 0.99	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03 5.10 2.04 0.99	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27 5.24 3.62 1.08	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10 6.54 1.02	5.45 1.04 2.63 1.59 1.59 1.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.02 4.83 1.94 0.99	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63 1.49 1.03 4.99 1.96 0.99	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36 1.13 6.69 3.32 1.03	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96 1.19 2.17 1.85 1.07 5.94 2.55 1.01	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 15.09 8.68 44.57 20.51 8.10	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16 15.03 10.19 9.59
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267	LHILFSNHG HILFSNHGE ILFSNHGEI LFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGA KWIDFVRGAKE DFVRGAKEG FVRGAKEGI VRGAKEGII RGAKEGIILF	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76 1.56 1.03 5.25 2.10 0.99 1.01	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03 5.10 2.04 0.99 1.01	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27 5.24 3.62 1.08 1.09	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10 6.544 2.98 1.02 1.06	0.00 5.45 1.04 2.63 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.49 1.49 1.49 1.22 4.83 1.94 0.99 1.00	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.54 1.63 1.49 1.03 4.99 1.01	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36 1.13 6.69 3.32 1.03 1.08	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.19 2.17 1.85 1.07 5.94 2.55 1.01 1.04	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 17.05 15.09 8.68 44.57 20.51 8.10 8.30	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16 15.03 10.19 9.59 11.78
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268	LHILFSNHG HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGAK IDFVRGAKE DFVRGAKEGI FVRGAKEGI VRGAKEGII RGAKEGIILF AKEGIILFK	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76 1.56 1.03 5.25 2.10 0.99 1.01 0.99	5.70 5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03 5.10 2.04 0.99 1.01 0.99	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27 5.24 3.62 1.08 1.09 1.13	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10 6.544 2.98 1.02 1.06 1.02	0.00 5.45 1.04 2.63 1.59 1.59 1.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.02 4.83 1.94 0.99 1.00 0.99	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63 1.49 1.03 4.99 1.96 0.99 1.01 0.99	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36 1.13 6.69 3.32 1.03 1.08 1.03	0.00 1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96 1.19 2.17 1.85 1.07 5.94 2.55 1.01 1.04	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 15.09 8.68 44.57 20.51 8.10 8.30 8.15	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16 15.03 10.19 9.59 11.78
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 263 264 265 266 267 268 269	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGAK IDFVRGAKEGI FVRGAKEGI FVRGAKEGI VRGAKEGIIL RGAKEGIILF AKEGIILFKE	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.76 1.76 1.76 1.56 1.03 5.25 2.10 0.99 1.01 0.99 1.01	5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03 5.10 2.04 0.99 1.01 0.99 0.97	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27 5.24 3.62 1.08 1.09 1.13 1.01	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10 6.54 1.02 1.03 0.98	0.00 5.45 1.04 2.63 1.59 1.59 1.19 0.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.02 4.83 1.94 0.99 1.00 0.99 0.97	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63 1.49 1.03 4.99 1.01 0.99 1.01 0.99 1.03	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 1.00 1.03 0.98 1.03 1.03 1.03 0.98	1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96 1.19 2.17 1.85 1.07 5.94 2.55 1.01 1.04 1.00 0.98	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 17.05 15.09 8.68 44.57 20.51 8.10 8.10 8.10 8.15 7.83	10.17 18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16 15.03 10.19 9.59 11.78 13.30
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 265 266 267 268 269 270	LHILFSNHGE HILFSNHGEI ILFSNHGEIK FSNHGEIKW SNHGEIKWI NHGEIKWID HGEIKWIDF GEIKWIDFV EIKWIDFVRG KWIDFVRGAK IDFVRGAKEG DFVRGAKEGI FVRGAKEGI VRGAKEGII RGAKEGIILFK KEGIILFKE EGIILFKEK	5.88 1.05 2.85 1.75 1.24 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.60 1.12 1.76 1.56 1.03 5.25 2.10 0.99 1.01 0.99 1.01 0.97 0.97	5.70 5.70 1.05 2.81 1.66 1.23 0.99 0.97 0.98 1.02 0.97 1.55 1.13 1.66 1.52 1.03 5.10 2.04 0.99 1.01 0.99 0.97 0.99 0.97 0.99	5.43 1.28 4.14 3.09 1.96 1.09 1.01 1.03 1.11 1.04 3.01 1.49 3.20 2.70 1.27 5.24 3.62 1.08 1.09 1.13 1.01 0.99	1.11 4.10 2.47 1.51 1.02 0.98 1.00 1.06 0.99 2.21 1.27 2.44 2.12 1.10 6.544 2.98 1.02 1.06 0.98 0.98 0.98 0.97	0.00 5.45 1.04 2.63 1.59 1.59 1.99 0.97 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.01 0.97 1.02 4.83 1.94 0.99 0.97 0.99 0.97 0.97	5.59 1.04 2.71 1.64 1.22 0.99 0.97 0.98 1.01 0.97 1.54 1.12 1.63 1.49 1.03 4.99 1.96 0.97 0.97	1.15 4.39 2.58 1.59 1.03 0.98 1.00 1.09 1.00 2.22 1.33 2.58 2.36 1.13 6.63 3.32 1.03 0.98 1.03 0.98 0.97	0.00 1.07 3.49 2.19 1.40 1.00 0.97 0.99 1.03 0.98 1.96 1.19 2.17 1.85 1.07 5.94 2.55 1.01 1.04 1.00 0.98 0.97	48.98 8.79 27.12 16.97 11.34 8.10 7.82 7.93 8.34 7.89 15.58 9.75 15.09 8.68 44.57 20.51 8.10 8.30 8.30 8.15 7.83 7.75	18.45 12.58 12.52 9.77 9.57 9.34 10.62 11.66 11.77 16.94 18.75 17.68 17.47 16.20 15.16 15.03 10.19 9.59 11.78 13.30 17.69

BA

272	IILFKEKAK	1.72	1.62	2.93	2.28	1.61	1.57	2.52	2.06	16.31	17.40
273	ILFKEKAKE	2.42	2.32	3.95	3.55	2.16	2.26	3.75	3.05	23.46	16.20
274	LFKEKAKEA	1.94	1.82	3.42	2.81	1.78	1.79	2.95	2.44	18.95	14.14
275	FKEKAKEAL	4.49	4.34	4.98	5.67	4.09	4.26	5.93	5.09	38.85	12.62
276	KEKAKEALG	0.98	0.98	1.06	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	8.00	8.23
277	EKAKEALGK	1.00	1.00	1.14	1.05	0.99	1.00	1.05	1.02	8.25	8.63
278	KAKEALGKA	0.98	0.98	1.05	1.01	0.97	0.98	1.00	1.00	7.97	8.77
279	AKEALGKAK	0.98	0.97	1.02	0.99	0.97	0.97	1.00	0.99	7.89	8.85
280	KEALGKAKD	1.06	1.05	1.36	1.18	1.04	1.05	1.17	1.14	9.05	8.91
281	EALGKAKDA	1.00	1.00	1.16	1.06	0.99	1.00	1.05	1.04	8.30	8.77
282	ALGKAKDAN	0.99	0.99	1.13	1.02	0.99	0.99	1.03	1.01	8.15	8.77
283	LGKAKDANN	1.19	1.16	1.86	1.47	1.13	1.16	1.39	1.41	10.77	8.84
284	GKAKDANNG	1.09	1.09	1.32	1.22	1.07	1.08	1.26	1.16	9.29	8.47
285	KAKDANNGN	1.02	1.02	1.23	1.08	1.01	1.02	1.10	1.05	8.53	8.27
286	AKDANNGNL	1.00	1.00	1.18	1.05	0.99	1.00	1.05	1.03	8.30	8. 23
287	KDANNGNLQ	0.99	0.99	1.07	1.02	0.98	0.99	1.03	1.01	8.08	8.21
288	DANNGNLQL	1.00	1.00	1.17	1.04	1.00	1.00	1.06	1.02	8.29	14.18
289	ANNGNLQLR	1.03	1.03	1.28	1.10	1.01	1.02	1.10	1.07	8.64	14.11
290	NNGNLQLRN	0.99	0.99	1.13	1.04	0.99	0.99	1.03	1.02	8.18	16.75
291	NGNLQLRNK	0.97	0.97	1.02	0.99	0.97	0.97	0.99	0.99	7.87	16.72
292	GNLQLRNKE	1.00	1.00	1.09	1.05	1.00	1.00	1.06	1.03	8.23	16.76
293	NLQLRNKEV	1.00	1.00	1.12	1.02	0.99	0.99	1.04	1.01	8.17	16.72
294	LOLRNKEVT	61024	5.88	5.66	V.C	5.54	5.79	748.	1665	49.87	16.73
295	QLRNKEVTW	0.97	0.97	1.00	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.81	10.85
296	LRNKEVTWE	2.84	2.81	4.18	4.10	2.61	2.70	4.39	3.48	27.11	10.84
297	RNKEVTWEV	0.98	0.98	1.05	1.01	0.98	0.98	1.01	0.99	7.98	9.42
298	NKEVTWEVL	0.99	0.99	1.12	1.03	0.99	0.99	1.03	1.02	8.16	9.38
299	KEVTWEVLE	0.98	0.98	1.04	1.00	0.97	0.98	1.00	0.99	7.94	9.72
300	EVTWEVLEG	1.00	1.00	1.12	1.04	0.99	1.00	1.05	1.02	8.22	10.06
301	VTWEVLEGE	1.04	1.03	1.31	1.10	1.03	1.03	1.12	1.07	8.73	10.00
302	TWEVLEGEV	0.96	0.96	0.97	0.97	0.96	0.96	0.97	0.96	7.71	9.85
303	WEVLEGEVE	1.76	1.68	3.12	2.52	1.63	1.65	2.65	2.19	17.20	9.89
304	EVLEGEVEK	0.96	0.96	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.73	9.32
305	VLEGEVEKE	1.18	1.17	1.77	1.39	1.13	1.16	1.43	1.31	10.54	9.40
306	LEGEVEKEA	1.15	1.14	1.70	1.34	1.15	1.13	1.44	1.23	10.28	9.14
307	EGEVEKEAL	0.97	0.97	0.99	0.98	0.96	0.97	0.98	0.97	7.79	8.86
308	GEVEKEALK	0.96	0.96	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.73	8.92
309	EVEKEALKK	0.98	0.98	1.05	1.00	0.97	0.98	1.00	0.99	7.95	9.31
310	VEKEALKKI	1.39	1.36	2.57	1.78	1.30	1.34	1.87	1.63	13.24	9.29
311	EKEALKKII	1.00	1.00	1.15	1.06	0.99	1.00	1.05	1.04	8.29	8.56
312	KEALKKIIE	1.03	1.03	1.26	1.13	1.02	1.03	1.10	1.10	8.70	11.67
313	EALKKIIED	1.01	1.01	1.16	1 05	1.00	1.00	1.08	1.03	8.34	12.07
314	ALKKIEDQ	0.99	1.00	1.14	1.02	0.99	0.99	1.03	1.00	8.16	11.98
315	LKKIIEDQQ	1.16	1.16	1.86	1.35	1.15	1.15	1.44	1.24	10.51	11.94
316	KKIIEDQQE	0.97	0.97	0.99	0.97	0.96	0.97	0.98	0.97	7.78	11.57
317	KIEDQQES	1.00	1.00	1.09	1.03	0.99	0.99	1.05	1.01	8.16	11.63

BIBA

NEILIZTHAN

.

318	IEDQQESL	3.24	3.13	4.38	4.60	2.91	3.03	4.77	3.99	30.05	11.59
319	IEDQQESLN	1.23	1.22	2.10	1.51	1.21	1.21	1.61	1.37	11.46	8.45
320	EDQQESLNK	0.96	0.96	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.73	10.29
321	DQQESLNKW	0.98	0.98	1.03	0.99	0.97	0.98	1.00	0.98	7.91	10.44
322	QQESLNKWK	0.97	0.97	1.04	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.88	10.55
323	QESLNKWKS	1.00	1.00	1.15	1.04	0.99	1.00	1.04	1.02	8.24	13.21
324	ESLNKWKSK	0.97	0.97	1.02	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.86	13.18
325	SLNKWKSKG	0.99	0.99	1.07	1.01	0.98	0.99	1.02	1.00	8.05	13.18
326	LNKWKSKGR	2.52	2.43	4.05	3.68	2.25	2.36	3.91	3.16	24.36	13.29
327	NKWKSKGRR	1.04	1.03	1.32	1.14	1.02	1.03	1.10	1.12	8.80	10.98
328	KWKSKGRRF	1.04	1.03	1.20	1.11	1.02	1.03	1.12	1.09	8.64	11.17
329	WKSKGRRFK	2.79	2.69	4.14	4.03	2.53	2.58	4.29	3.45	26.50	11.08
330	KSKGRRFKG	0.98	0.98	1.08	1.01	0.98	0.98	1.02	1.00	8.03	11.42
331	SKGRRFKGK	0.98	0.98	1.03	0.99	0.97	0.97	1.00	0.98	7.90	11.42
332	KGRRFKGKG	1.04	1.04	1.28	1.12	1.03	1.04	1.14	1.09	8.78	11.47
333	GRRFKGKGK	1.00	1.01	1.09	1.03	1.00	1.00	1.06	1.01	8.20	11.37
334	RRFKGKGKG	1.14	1.14	1.78	1.29	1.12	1.13	1.37	1.20	10.17	11.35
335	RFKGKGKGN	0.98	0.98	1.07	1.00	0.98	0.98	1.02	1.00	8.01	11.16
336	FKGKGKGNK	3.11	2.98	4.37	4.40	2.72	2.90	4.54	3.84	28.86	11.17
337	KGKGKGNKA	0.98	0.98	1.06	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	8.00	8.36
338	GKGKGNKAA	1.01	1.01	1.09	1.05	1.00	1.00	1.07	1.03	8.26	8.35
339	KGKGNKAAQ	0.99	0.99	1.07	1.02	0.98	0.98	1.02	1.01	8.06	8.32
340	GKGNKAAQP	1.00	0.99	1.06	1.03	0.99	0.99	1.04	1.02	8.12	8.31
341	KGNKAAQPG	1.05	1.04	1.28	1.14	1.03	1.04	1.16	1.10	8.84	8.30
342	GNKAAQPGS	0.99	0.99	1.06	1.02	0.99	0.99	1.03	1.01	8.08	8.16
343	NKAAQPGSG	1.06	1.06	1.45	1.18	1.04	1.06	1.18	1.14	9.17	8.18
344	KAAQPGSGK	0.98	0.98	1.03	0.99	0.97	0.98	1.00	0.98	7.91	8.04
345	AAQPGSGKG	0.99	0.99	1.11	1.01	0.98	0.99	1.02	1.00	8.09	8.06
346	AQPGSGKGK	0.98	0.98	1.06	1.00	0.98	0.98	1.01	0.99	7.98	8.02
347	QPGSGK GKV	0.98	0.98	1.07	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	8.01	8.06
348	PGSGKGKVQ	0.98	0.98	1.01	1.00	0.97	0.98	1.00	0.99	7.91	8.12
349	GSGKGKVQF	1,00	1.00	1.07	1.04	1.00	1.00	1.06	1.02	8.19	11.60
350	SGKGKVQFQ	1.00	1.00	1.09	1.04	0.99	1.00	1.05	1.02	8.19	11.73
351	GKGKVQFQG	0.99	0.99	1.05	1.02	0.99	0.99	1.03	1.00	8.06	16.70
352	KGKVQFQGK	0.97	0.97	1.00	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.81	16.72
353	GKVQFQGKK	1.00	1.00	1.09	1.05	1.00	1.00	1.06	1.03	8.23	16.81
354	KVQFQGKKT	1.01	1.01	1.20	1.07	1.01	1.01	1.08	1.04	8.43	16.91
355	VOFOGKKTK	3.59	3.55	4.32	4,84	3.29	3.38	5.12	4.23	32.32	16.84
356	QFQGKKTKF	1.06	1.05	1.43	1.15	1.04	1.05	1.17	1.13	9.08	13.34
357	FQGKKTKFA	5.05	4.88	5.13	6337	4.62	4.76	1628	5.70	42.95	13.18
358	QGKKTKFAS	1.00	0.99	1.16	1.02	0.99	0.99	1.04	1.01	8.20	10.33
359	GKKTKFASD	1.02	1.01	1.15	1.09	1.00	1.01	1.08	1.07	8.43	10.27
360	KKTKFASDD	1.05	1.04	1.33	1.15	1.04	1.04	1.16	1.12	8.93	10.16
361	KTKFASDDE	0.98	0.98	1.05	1.00	0.98	0.98	1.00	0.99	7.96	9.99
362	TKFASDDEH	0.97	0.97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.85	9.99
363	KFASDDEHD	0.98	0.98	1.04	1.01	0.98	0.98	1.00	1.00	7.97	9.96

ΒI

NUEIII2THA

364	FASDDEHDE	2.38	2.34	3.86	3.37	2.21	2.23	3.73	2.85	22.97	9.92
365	ASDDEHDEH	0.97	0.97	0.99	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	7.78	7.84
366	SDDEHDEHD	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	7.68	7.83
367	DDEHDEHDE	0.96	0.96	0.97	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96	7.70	7.84
368	DEHDEHDEN	0.98	0.98	1.06	1.00	0.98	0.98	1.00	0.98	7.96	7.99
369	EHDEHDENG	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	7.68	8.00
370	HDEHDENGA	0.96	0.96	0 97	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96	7.70	8.11
371	DEHDENGAT	1.01	1.01	1.18	1.05	1.01	1.01	1.07	1.03	8.37	8.24
372	EHDENGATG	0.96	0.96	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.96	7.72	8.23
373	HDENGATGP	0.97	0.97	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.75	8.28
374	DENGATGPV	1.03	1.03	1.33	1.12	1.02	1.03	1.12	1.07	8.75	8.30
375	ENGATGPVK	0.98	0.98	1.06	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	8.00	8.28
376	NGATGPVKR	1.02	1.02	1.23	1.07	1.01	1.01	1.09	1.04	8.49	10.03
377	GATGPVKRA	1.04	1.03	1.13	1.12	1.02	1.03	1.13	1.10	8.60	9.93
378	ATGPVKRAR	1.01	1.01	1.19	1.04	1.00	1.00	1.06	1.02	8.33	9.81
379	TGPVKRARE	0.99	0.98	1.03	1.02	0.98	0.98	1.01	1.02	8.01	9.72
380	GPVKRAREE	0.98	0.98	1.01	1.00	0.98	0.98	1.01	0.99	7.93	9.72
381	PVKRAREET	1.03	1.02	1.21	1.11	1.02	1.02	1.11	1.08	8.60	9.73
382	VKRAREETD	2.07	1.98	3.47	3.00	1.93	1.92	3.28	2.57	20.22	9.60
383	KRAREETDK	0.97	0.97	1.01	0.98	0.97	0.97	0.99	0.98	7.84	7.80
384	RAREETDKE	0.97	0.97	0.99	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	7.76	7.83
385	AREETDKEE	0.96	0.96	0.97	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96	7.70	7.83
386	REETDKEEP	0.98	0.98	1.04	1.00	0.98	0.98	1.01	0.99	7.96	7.85
387	EETDKEEPA	0.98	0.98	1.07	1.01	0.98	0.98	1.01	0.99	8.00	7.86
388	ETDKEEPAS	0.96	0.96	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	7.69	7.85
389	TDKEEPASK	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	7.68	7.93
390	DKEEPASKQ	0.98	0.98	1.05	1.01	0.98	0.98	1.02	1.00	8.00	8.01
391	KEEPASKQQ	0 97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	7.80	8.06
392	EEPASKQQK	0.97	0.97	1.01	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	7.85	8.12
393	EPASKQQKT	0.98	0.98	1.05	1.00	0.98	0.98	1.01	0.99	7.97	8.13
394	PASKQQKTE	0.98	0.98	1.03	1.00	0.98	0.98	1.01	0.99	7.95	8.14
395	ASKOOKTEN	1.00	1.00	1.16	1.03	1.00	1.00	1.05	1.02	8.26	
396	SKOQKTENG	1.00	1.00	1.15	1.05	0.99	1.00	1.05	1.03	8.27	<u> </u>
397	KOOKTENGA	1.01	1.01	1.16	1.05	1.00	1.01	1.06	1.02	8.32	<u></u>
398	QQKTENGAG	1.00	1.00	1.15	1.03	0.99	1.00	1.04	1.01	8.22	Ļ
3 9 9	QKTENGAGD	0.98	0.98	1.05	1.00	0.97	0.98	1.00	0.99	7.95	
400	KTENGAGDQ	0.98	0.98	1.06	1.01	0.98	0.98	1.01	1.00	8.00	<u> </u>





Εικόνα 1: Απεικόνιση των προβλεπόμενων πεπτιδίων με την μορφή διαγράμματος.



Εικόνα 2: Απεικόνιση των 'κρίσιμων περιοχών' με την μορφή διαγράμματος.



こうちょうしょうかんがいでん あいましょう しょうてい ひんしょう あんせんせいがくたい

ΙΙ. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΩΝ ΚΡΙΣΙΜΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ LA/SSB ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ

Position	Peptides	Average
18-32'	CHQIEYYFGDFNLPR	21.22
19-33'	HQIEYYFGDFNLPRD	22.20
20-34'	QIEYYFGDFNLPRDK	22.07
21-35'	IEYYFGDFNLPRDKF	22.17
22-36'	EYYFGDFNLPRDKFL	20.32
23-37'	YYFGDFNLPRDKFLK	20.36
45-59'	GWVPLEIMIKFNRLN	22.25
46-60'	WVPLEIMIKFNRLNR	25.67
47-61'	VPLEIMIKFNRLNRL	29.56
48-62'	PLEIMIKFNRLNRLT	28.07
49-63'	LEIMIKFNRLNRLTT	32.76
50-64'	EIMIKFNRLNRLTTD	27.91
51-65'	IMIKFNRLNRLTTDF	27.94
52-66'	MIKFNRLNRLTTDFN	24.97
53-67'	IKFNRLNRLTTDFNV	21.61
102-116	DEYKNDVKNRSVYIK	20.52
103-117	EYKNDVKNRSVYIKG	20.57
104-118'	YKNDVKNRSVYIKGF	20.67
112-126	SVYIKGFPTDATLDD	20.25
113-127'	VYIKGFPTDATLDDI	20.14
134-148'	KGQVLNIQMRRTLHK	23.06
135-149'	GQVLNIQMRRTLHKA	23.34
136-150'	QVLNIQMRRTLHKAF	27.99
137-151'	VLNIQMRRTLHKAFK	27.86
138-152	LNIQMRRTLHKAFKG	25.36
139-153	NIQMRRTLHKAFKGS	20.30
140-154'	IQMRRTLHKAFKGSI	23.86
150-164'	FKGSIFVVFDSIESA	22.30
155-169'	FVVFDSIESAKKFVE	20.63
178-192'	TDLLILFKDDYFAKK	20.71
179-193'	DLLILFKDDYFAKKN	20.72
180-194'	LLILFKDDYFAKKNE	20.75


and some of State of Land en and an an article and an article and an article and an article and the second second second Sara i n Sa E S ÷., • • • $z_{2} \sim 10^{-1}$ -ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

化合物化学 化合金合金

6

a ingga sa

```
1. IIPOPPANEA ANALYZE.sh*
```

```
2 1 2 1 2 2 1
. . . .
```

.

.

1000

```
#!/bin/sh
```

```
i=1
while test $i -le 9
```

```
do
  x=` /usr/local/tinker41/bin/analyze t39_mv.00$i -k restrain.key <</pre>
analyze.inp | head -28 | tail -3 | cut -c38-47 `
  echo $1 $x
                                                      S. 1999.
  i=` expr $i + 1 `
done
```

". F .

1.1.

2. IIPOTPANNA GYRATION.sh*

```
#!/bin/sh
```

```
i=1
while test $i -le 9
```

```
do
```

```
x=` /usr/local/tinker41/bin/analyze t39_mv.00$i ~k restrain.key <</pre>
gyration.inp | head -38 | tail -1 | cut -c43-49
 echo $i $x
 i=' expr $i + 1 '
done
```

1.1.1

```
3. IIPOTPANSA SOLVATE.sh*
```

۰ ،

#!/bin/sh

1=1 while test \$1 -le 9

```
do
 x=` /usr/local/tinker41/bin/analyze restrain_new.00$i -k
solvate.key < solvate.inp | tail -1 | cut -c38-49 `</pre>
                                                        . .
  echo $1 $x
  i=' expr $i + 1 '
done
```

4. HPOTPANNA SPACEFILL.sh*

```
!/bin/sh
```

```
i=1
while test $i -le 9
do
x=` /usr/local/tinker41/bin/spacefill restrain.00$i -k spacefill.key
< spacefill.inp | tail -n 2 | cut -c26-33 `
                                             .
 echo $1 $x
 i=' expr $i + 1'
done
```

307

5. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ

```
program distance
 dimension na(34230), xa(34230), ya(34230), za(34230)
 dimension nb(190), xb(190), yb(190), zb(190)
 real*8 x,y,z
 real*8 xa,ya,za
 real*8 xb, yb, zb
 real*8 dis
 integer a,b
 integer i,j
 integer n, N1, N2
 character*4 atom, atomw, atome
 open(1,file='waternln.xyz')
 open(2,file='501301 t9e.xyz')
 open(3,file='w12.txt')
 open(4,file='w15.txt')
 open(5,file='wl18.txt')
 open(6,file='wg18.txt')
 read(1,*) N1
 do i=1, N1
     read(1,*) na(i), atomw, xa(i), ya(i), za(i)
 enddo
 read(2,*) N2
 do j=1, N2
     read(2, *) nb(j), atome, xb(j), yb(j), zb(j)
 enddo
 do i=1, N1
  do j=1, N2
   dis = sqrt((xb(j)-xa(i))**2 +
                    (yb(j)-ya(i))**2 +
£
                    (zb(j)-za(i))**2)
&
    if (dis .lt. 12.0d0) then
      write(3,30) i
      goto 900
    elseif (dis .lt. 15.0d0) then
      write(4,30) i
      goto 900
    elseif (dis .lt. 18.0d0) then
      write(5,30) i
      goto 900
    elseif (dis .gt. 18.0d0) then
      write(6,30) i
```

HINNY BIBALOOHHHH LOANNINON

308

endif

enddo 900 continue enddo 30 FORMAT (2X, I5) close(1) close(2) close(3) close(4) close(5) close(6) stop

end

6. **ПРОГРАММА** FONIEE

というないとうでもあったとう

program phi_psi_omega

real*8 x,y,z real*8 xa,ya,za real*8 xb,yb,zb real*8 xc,yc,zc real*8 xd, yd, zd real*8 xab, yab, zab real*8 xba,yba,zba real*8 xcb, ycb, zcb real*8 xdc, ydc, zdc real*8 xt,yt,zt real*8 xu, yu, zu real*8 rt2, ru2, rtru real*8 cosine real*8 sign real*8 dihedral integer a,b,c,d integer t,u integer k character*4 atom radian = 57.29577951 dihedral = 0.0d0open(1,file='501301_t11be.xyz') write(*,*)'give a,b,c,d' read(*,*)a,b,c,d do i=1,d read(1,*) k,atom,x,y,z if (k .eq. a) then Xa=X ya=y Z**A=**2 endif if (k .eq. b) then xb=x

```
yb≖y
       zb≖z
   endif
   if (k.eq. c) then
       XC≓X
       ус=у
       zc≠z
   endif
   if ( k .eq. d ) then
       xd≖x
       yd=y
       zd=z
   endif
enddo
write(*,*)xa,ya,za
write(*,*)xb,yb,zb
write(*,*)xc,yc,zc
write(*,*)xd,yd,zd
xba = xb-xa
yba = yb-ya
zba = zb-za
xcb = xc-xb
ycb = yc-yb
zcb = zc-zb
xdc = xd-xc
ydc = yd-yc
zdc = zd-zc
xt = yba*zcb - ycb*zba
yt = xcb*zba - xba*zcb
zt = xba*ycb - xcb*yba
xu = ycb*zdc - ydc*zcb
yu = xdc*zcb - xcb*zdc
zu = xcb*ydc - xdc*ycb
rt2 = xt*xt + yt*yt + zt*zt
ru2 = xu*xu + yu*yu + zu*zu
rtru = sqrt(rt2 * ru2)
write(*,*) xba,yba,zba
write(*,*) xcb,ycb,zcb
write(*,*) xdc,ydc,zdc
write(*,*) xt,yt,zt
write(*,*) xu,yu,zu
write(*,*) rt2,ru2,rtru
if (rtru .ne. 0.0d0) then
     cosine = (xt*xu + yt*yu + zt*zu) / rtru
     cosine = min(1.0d0, max(-1.0d0, cosine))
     dihedral = radi * acos(cosine)
     sign = xba*xu + yba*yu + zba*zu
     write(*,*) 'cosine=', cosine
write(*,*) 'dihedral=', dihedral
     write(*,*) 'sign=', sign
endif
```

close(1)

stop end

7. IIPOTPANNA APIGMHEH CHARMM27

```
program arithmisi
```

```
real*8 x,y,z
integer n, in
integer k
integer i
integer m
integer j
character*4 atom,watom
```

an sayar s

20 - 1 1 T ...

A. 574

Gara' :-

0. 70 (Jøj

老子,<u>我</u>我们会一些

ina in the sec

ા તે સુંદ છે. છે.

• 2 L

2.

274 2007

181 B

100

- - - 1.¥

x teş

n ya sa

. A. E.

2**6**5

```
open(1,file='water.xyz')
open(2,file='waternln.xyz')
```

```
read(1,*) n
```

```
do i=1,n
 read(1,*) in,atom,x,y,z,k
  if (atom .eq. "OH2") then
      watom= "OT"
      k=101
      m = i+1
      i = i+2
      write(*,30) i,watom,x,y,z,k,m,j
      write(2,30) i,watom,x,y,z,k,m,j
  elseif (atom .eq. "H1") then
      watom= "HT"
      k=88
      m = i - 1
      write(*,40) i,watom,x,y,z,k,m
      write(2,40) i,watom,x,y,z,k,m
  elseif (atom .eq. "H2") then
      watom= "HT"
      k=88
      m = i-2
      write(*,40) i,watom,x,y,z,k,m
      write(2,40) i,watom,x,y,z,k,m
  endif
```

enddo

1

311

and the second second

```
close(1)
close(2)
stop
end
```

8. ПРОГРАММА ЕПІЛОГН_ОТ

```
program test12
integer N, ia
open(1,file='w12.txt')
open(2,file='w12ot.txt')
read(1,*) N
do i=1, N
    read (1,*) ia
    if ( mod(ia,3) .eq. 1) then
       write (2,30) ia, 'OT'
    endif
enddo
```

```
30 FORMAT (15,2X,A4)
```

```
close(1)
close(2)
stop
```

```
end
```

9. ПРОГРАММА MEEOI OPOI

```
program analyze
integer n
integer i
integer N1, N2
real sum
real ave
real k
real x
open (1, file='super_ca.dat')
open (2, file='super_meso_ca.dat')
open (3, file='super_ave_ca.dat')
n=1
do i= 1, 1500
read (1,*) n, x
if (n.gt. 1000)then
```



```
sum = sum +x
write (2,*)n, sum
endif
```

2 continue

ave= sum / n
write (3,*) n, ave
enddo

close (1) close (2) close (3)

```
stop
end
```

10. IIPOTPAMMA CHG-MEEOI OPOI 1

program analyze

```
integer n
integer i
integer N1, N2
real k
real m
real x
```

```
open (1, file='analyze_chg.dat')
open (2, file='analyze_chg_1.dat')
```

n=1

3

```
do i= N1, N2
   read (1,*) n, x
   m= -197.852
   k= x-m
   write (2,*) n, k
```

enddo

```
close (1)
close (2)
```

stop end

11. **ПРОГРАММА CHG-MEEOI OPOI_2**

```
program analyze
                         -
      integer n
      integer i
      integer N1, N2
      real sum
      real ave
      real k
      real x
      open (1, file='analyze_chg_1.dat')
      open (2, file='analyze_chg_meso.dat')
      open (3, file='analyze_chg_ave.dat')
      n=1
      sum=0.0
      do i = 1, 1500
          read (1,*) n, x
          sum = sum + x
          write (2,*)n, sum
  2
      continue
      ave= sum / n
      write (3,*) n, ave
      enddo
      close (1)
      close (2)
      close (3)
       stop
       end
12.
      ПРОГРАММА CHG-MEEOI OPOI_3
       program analyze
       integer n
       integer i
       integer N1, N2
```

```
integer N1, N2
real k
real b
real x
open (1, file='analyze_chg_ave.dat')
open (2, file='analyze_chg_2.dat')
n=1
```

do i= N1, N2 read (1,*) n, x

```
b=0.5 size stars and the
 ي.
و روايون مر
                               k = x^*b
                                                                                                        -
                                write (2,*) n, k
                       enddo
                                                                                                             •
                      close (1)
                                                        j.
                      close (2)
                       stop
                                                                                                 end
                                                                                                                                                 25. F
                                                                                                                                                                                                          IPOPPANNA VDW-MEEOI OPOI 1
13.
                                                                                                                                                                                      program analyze
                                                                                                                                                           £
                                                                                                                                                                                                     1 1 1 5
                       integer n
                                                                             - <u>-</u>
                       integer i
                                                                                                                                                                                               1 - MARCA C
                       integer N1, N2 👘 🖏 🗤
                                                                                                                                                                                                  real k
                                                                                                                                                                                                   585 (J.:
                      real m
                       real x
                                                                                                                                                                                                        1) (.)
                       open (1, file='analyze_vdw.dat')
                      open (1, file='analyze_vdw_1.dat')
                                                                                                                                                                                                                                   . 51
                                                                                                                                                                     ೆಕ್ ನಿರ್ದೇಶ ಪ್ರಜ್ಞಾನ
                      n=1
                                                                                                                                                                       1 744 ···
                                                                                                                                                                                      do i = N1, N2
                                read (1,*) n, x
                                                                                                                                                                       and the second
                                m= -18.515
   k= x-m
                                write (2,*) n, k a fait
                       enddo
                                                                                                          close (1)
                       close (2)
                       stop
                       end
                                                                                                                                                                   "你是我们,我们的是你是
你们们就是你们的要做你。"
                                                                                                                      *a <
                                                                                                                                                                - 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997年1月1日
- 1997
- 1997年1月1日
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 1997
- 197
 14.
                    IIPOTPANSA VDW-MEEOI OPOI 2
                                                                                                                                                                    Nº ST ATLES
                       program analyze
                                                                                                                                                                                           - 胡桃花 (14)
                                                                                           J. 28 .....
                                                                                the state in the second sec
                                                                                                                                                                     Contractor Contractor
                        integer n
                                                                                                                                                                                   · 资料: 经办公式公
                        integer i
                         integer N1, N2
                         real sum
                                                                                                                                                                                                    75028
                         real ave
                                                                                                                                                                                                      1.1.1
                         real k
                         real x
                                                                                                             315
```

and the second

```
open (1, file='analyze_vdw_1.dat')
   open (2, file='analyze_vdw_meso.dat')
   open (3, file='analyze_vdw_ave.dat')
   n=1
   sum=0.0
   do i = 1, 1500
       read (1,*) n, x
       sum = sum + x
       write (2,*)n, sum
2
    continue
    ave= sum / n
    write (3,*) n, ave
    enddo
    close (1)
    close (2)
    close (3)
    stop
    end
   ПРОГРАММА VDW-MEEOI OPOI 3
    program analyze
    integer n
    integer i
    integer N1, N2
    real k
    real a
    real x
    open (1, file='analyze_vdw_ave.dat')
    open (2, file='analyze_vdw_2.dat')
    n=1
    do i = N1, N2
       read (1,*) n, x
       a=0.16
       k= x*a
       write (2,*) n, k
    enddo
    close (1)
    close (2)
    stop
    end
```

15.



16. ΠΡΟΓΡΑΝΜΑ ΔGbind-Υπολογισμός

```
program analyze
integer n, m
integer i, j
integer N1, N2
real k
real x, y
open (1, file='analyze_vdw_2.dat')
open (2, file='analyze_chg_2.dat')
open (3, file='analyze_DG.dat')
n=1
m=1
do i= 1, 1500
    do j=1, 1500
        read (1,*) n, x
        read (2,*) m, y
        k = x + y
        write (3,*) n, k
    enddo
enddo
close (1)
close (2)
close (3)
stop
end
```

17. **MPOTPAMMA_RESTRAIN_POSITION**

```
program restrain_position
integer n
integer i
integer N1,N2
real x, y, z
character*4 atom
open (1, file='CT1.txt')
open (2, file='restrain_20.key')
```

read (1,*) n

```
do i= N1, N2
    read (1,*) n, atom, x, y, z
    write (2,*) 'restrain-position', n, x, y, z, 20
enddo
```

```
close (1)
close (2)
stop
end
```

BIBAR

ł





Διαγράμματα επιφάνειας GETAREA για τους επιτόπους του DQ2 μορίου

















Διαγράμματα επιφάνειας GETAREA για τους επιτόπους του DQ7 μορίου





















FAS

_

in an airte Ring Angel Ange Ring Ring Angel
TTAPAPTHMA VI

•

HUNNING HILL HUNNING N

Ι. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΤΙΝΚΕR

1. ANALYZE

Παρέχει πληροφορίες για μια συγκεκριμένη μοριακή δομή. Το πρόγραμμα χρειάζεται το όνομα του αρχείου, που περιέχει τη συγκεκριμένη δομή και είναι της μορφής .xyz, και τον τύπο της επιθυμητής ανάλυσης. Με το πρόγραμμα 'analyze' μπορούν να υπολογιστούν τα εξής: (1) η συνολική δυναμική ενέργεια του συστήματος, (2) η αναλυτική παράθεση της ενέργειας, (3) η συνολική διπολική ροπή και τα συστατικά της, ροπή αδράνειας και ακτίνα περιστροφής, (4) η παράθεση των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό επιλεγμένων ενεργειών αλληλεπίδρασης και (5) οι ενέργειες που σχετίζονται με συγκεκριμένες ανεξάρτητες αλληλεπιδράσεις.

2. MINIMIZE

Το πρόγραμμα 'minimize' εκτελεί μια ελαχιστοποίηση περιορισμένης μνήμης (limited-memory) L-BFGS μιας δομής καρτεσιανές συντεταγμένες σε χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη δομή του αλγορίθμου του Jorge Nocedal. Η μέθοδος απαιτεί μόνο τη δυναμική ενέργεια και την παράγωγο σε κάθε βήμα της ελαχιστοποίησης. Απαιτεί αποθηκευτικό χώρο ανάλογο με τον αριθμό των ατόμων στην δομή. Η διαδικασία ελαχιστοποίησης με το πρόγραμμα 'Minimize' συνίσταται για προκαταρκτικές ελαχιστοποιήσεις δομών με μια παράγωγο του RMS από 1.0 έως 0.1 Kcal/mol/A. Έχει έναν σχετικά γρήγορο χρονικό κύκλο και αποδέχεται αρχικές δομές με άσχημη γεωμετρία συγκλίνοντας όμως σε μια αργή, γραμμική συμπεριφορά κοντά στο ελάχιστο. Ο χρήστης εισάγει το όνομα του αρχείου σε μορφή .χγz και ορίζει την τιμή της παραγώγου, στην οποία θα τερματιστεί η ελαχιστοποίηση. Η έξοδος του προγράμματος αποτελείται από τα στατιστικά στοιχεία που φαίνονται στην οθόνη, και από τις νέες συντεταγμένες που αποθηκεύονται σε ένα νέο αρχείο, μορφής επίσης .xyz.

3. DYNAMIC

Το πρόγραμμα 'dynamic' εκτελεί ένα υπολογισμό Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ) ή Στοχαστικής Δυναμικής (ΣΔ). Αρχίζει είτε εισάγοντας μια αρχική μοριακή δομή, μορφής .xyz, είτε από ένα σύνολο δομής-ταχύτητας-επιτάχυνσης, το οποίο έχει αποθηκευτεί από έναν προηγούμενο υπολογισμό ΜΔ, μορφής .dyn. Οι τροχιές Μοριακής Δυναμικής πολλαπλασιάζονται χρησιμοποιώντας είτε τον τροποποιημένο αλγόριθμο Beeman είτε τη μέθοδο ολοκλήρωσης της ταχύτητας Verlet. Ο χρήστης εισάγει τον επιθυμητό αριθμό των βημάτων δυναμικής, το χρονικό διάστημα μεταξύ

AIBAN

των βημάτων και το διάστημα, στο οποίο θα αποθηκεύονται τα αρχεία που περιέχουν τις συντεταγμένες των τροχιών μοριακής δυναμικής. Οι τροχιές ΜΔ αποθηκεύονται σειριακά αρχίζοντας από το πρώτο αρχείο που θα έχει κατάληξη .001 ή απευθείας σε ένα αρχείο της μορφής .arc. Κάθε στιγμή που αποθηκεύεται μια τροχιά όλες οι πληροφορίες που απαιτούνται για την επανεκκίνηση της τροχιάς από αυτό το σημείο αποθηκεύονται σε ένα αρχείο της μορφής .dyn.

4. SUPERPOSE

Το πρόγραμμα 'superpose' υπερθέτει δύο μοριακές δομές στις 3 διαστάσεις. Μια ποικιλία επιλογών προσφέρεται στο χρήστη για την εισαγωγή των ατόμων που θα χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της υπέρθεσης. Η υπέρθεση μπορεί να είναι mass-weighted και οι συντεταγμένες της δεύτερης δομής που έχει υπερτεθεί στην πρώτη δομή μπορούν να αποτελέσουν την έξοδο του προγράμματος. Αν χρησιμοποιηθούν τα αρχεία της μορφής .arc σαν είσοδος, το πρόγραμμα θα υπολογίσει όλες τα ζεύγη υπερθέσεων ανάμεσα στις δομές των αρχείων εισόδου.

5. SPACEFILL

Το πρόγραμμα 'spacefill' υπολογίζει τον όγκο και την επιφάνεια των μορίων. Χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη εκδοχή της πρωτότυπης αναλυτικής εκδοχής του Connoly για την μοριακή επιφάνεια, το πρόγραμμα προσδιορίζει (1) την van der Waals και τον αντίστοιχο όγκο, (2) την προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη και τον μοριακό όγκο και (3) την επιφάνεια επαφής και τον αντίστοιχο όγκο. Η επιφάνεια και ο όγκος αναλύονται στα γεωμετρικά τους συστατικά και η επιφάνεια αποσυντίθεται στην κυρτή συνεισφορά κάθε ατόμου ξεχωριστά. Η ακτίνα του μορίου ανιχνευτή (probe radius) εισάγεται από τον χρήστη και η ατομικές ακτίνες μπορούν να τεθούν μέσω ενός αρχείου-κλειδί (keyword file).

6. XYZEDIT

Το πρόγραμμα 'xyzedit' μπορεί να εκτελέσει ένα πλήθος διεργασιών σε ένα αρχείο της μορφής . xyz, το οποίο περιέχει τις καρτεσιανές συντεταγμένες. Οι επιλογές του προγράμματος είναι οι εξής: (1) αντισταθμίζει τους αριθμούς των τρεχόντων ατόμων, (2) διαγράφει συγκεκριμένα άτομα, (3) διαγράφει συγκεκριμένους τύπους ατόμων, (4) διαγράφει άτομα που βρίσκονται εκτός της περιοχής αποκοπής (cutoff range), (5) εισάγει συγκεκριμένα άτομα, (6) αντικαθιστά παλιούς τύπους ατόμων με νέους, (7) προσδιορίζει τη συνδεσιμότητα βασισμένη στην απόσταση, (8) μετατρέπει τις μονάδες από Bohrs σε Angstroms, (9) αναστρέφει περί την αρχή των αξόνων ώστε να προκύψει το εναντιομερές, (10) μεταφέρει το κέντρο μάζας στην αρχή των αξόνων, (11) μεταφέρει ένα συγκεκριμένο άτομο στην αρχή των αξόνων, (12) μεταφέρει και περιστρέφει στο αδρανειακό πλαίσιο (inertial frame), (13) μετακινεί σε συγκεκριμένες συντεταγμένες άκαμπτου σώματος (14) δημιουργεί και γεμίζει ένα περιοδικό κουτί (periodic boundary box), (15) εμβαπτίζει το μόριο στο κουτί με το διαλύτη, (16) προσαρτεί άλλο ένα αρχείο της μορφής .xyz στο ήδη υπάρχον. Συνήθως, πολλαπλές επιλογές μπορούν να εκτελεστούν διαδοχικά στο αρχείο εισόδου. Στο τέλος της διαδικασίας, ένα νέο αρχείο εξόδου της μορφής .xyz θα δημιουργηθεί.

7. XYZPDB

Το πρόγραμμα 'xyzpdb' μετατρέπει ένα αρχείο της μορφής .xyz σε αρχείο της μορφής .pdb.

8. PDBXYZ

Το πρόγραμμα 'pdbxyz' μετατρέπει ένα αρχείο της μορφής .pdb σε αρχείο της μορφής .xyz. Το πρόγραμμα έχει επίσης τη δυνατότητα να προσθέτει ή να αφαιρεί άτομα υδρογόνου από μια πρωτεΐνη όπως απαιτείται από το πεδίο δυνάμεων κατά τη διάρκεια του υπολογισμού.

ΙΙ. ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ ΤΙΝΚΕR

1. ACTIVE (λίστα ακεραίου)

Θέτει μια λίστα των 'active' ατόμων κατά τη διάρκεια ενός TINKER υπολογισμού. Ξεχωριστοί δυναμικοί ενεργειακοί όροι υπολογίζονται όταν τουλάχιστον ένα άτομο θεωρείται ως 'active'. Για υπολογισμούς στους οποίους λαμβάνονται υπόωη οι καρτεσιανές συντεταγμένες, ως 'active' άτομα θεωρούνται αυτά που επιτρέπεται να κινηθούν. Πολλαπλές γραμμές με 'active' άτομα μπορούν να βρίσκονται σε ένα αρχείο-κλειδί (keyfile) και χειρίζονται αθροιστικά. Σε κάθε γραμμή η λέξη-κλειδί ακολουθείται από έναν ή περισσότερους αριθμούς ατόμων ή εύρος ατόμων. Η παρουσία του κλειδιού 'active' αγνοεί κάθε κλειδί 'inactive' στο αρχείο.

2. CHG-CUTOFF (πραγματικός αριθμός)

Θέτει την τιμή της απόστασης αποκοπής σε Angstroms για ηλεκτροστατικές δυναμικές ενεργειακές αλληλεπιδράσεις φορτίου-φορτίου. Η ενέργεια για κάθε ζεύγος αλληλεπιδράσεων περά από την απόσταση αποκοπής μηδενίζεται. Απουσία του όρου 'CHG-CUTOFF' η προκαθορισμένη απόσταση αποκοπής είναι άπειρη για μη περιοδικά συστήματα και 9.0 για περιοδικά συστήματα.

3. CHG-TAPER (πραγματικός αριθμός)

Αυτή η λέξη-κλειδί επιτρέπει την τροποποίηση του παράθυρου αποκοπής για ηλεκτροστατικές δυναμικές ενεργειακές αλληλεπιδράσεις φορτίου-φορτίου. Είναι παρόμοιο στον τύπο και στην λειτουργία του με το κλειδί 'TAPER', εκτός από το ότι η τιμή του ισχύει μόνο για δυναμικό φορτίου-φορτίου. Απουσία του όρου 'CHG-TAPER' η προκαθορισμένη τιμή είναι να αρχίσει το παράθυρο αποκοπής στα 0.65 της αντίστοιχης απόστασης αποκοπής.

4. VDW-CUTOFF (πραγματικός αριθμός)

Θέτει την τιμή της απόστασης αποκοπής σε Angstroms για van der Waals δυναμικές ενεργειακές αλληλεπιδράσεις. Η ενέργεια για κάθε ζεύγος van der Waals περά από την απόσταση αποκοπής μηδενίζεται. Απουσία του όρου 'VDW-CUTOFF' η προκαθορισμένη απόσταση αποκοπής είναι άπειρη για μη περιοδικά συστήματα και 9.0 για περιοδικά συστήματα.

5. VDW-TAPER (πραγματικός αριθμός)

Αυτή η λέξη-κλειδί επιτρέπει την τροποποίηση του παράθυρου αποκοπής για van der Waals δυναμικές ενεργειακές αλληλεπιδράσεις. Είναι παρόμοιο στον τύπο και στην λειτουργία του με το κλειδί 'TAPER', εκτός από το ότι η τιμή του ισχύει μόνο για δυναμικό van der Waals. Απουσία του όρου 'VDW-TAPER' η προκαθορισμένη τιμή είναι να αρχίσει το παράθυρο αποκοπής στα 0.9 της αντίστοιχης απόστασης αποκοπής.

6. DIELECTRIC (πραγματικός αριθμός)

Θέτει την τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς που χρησιμοποιείται για να μετριάσει όλες τις ενέργειες λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων για κάθε μία από τις συναρτήσεις ηλεκτροστατικού δυναμικού. Η προκαθορισμένη τιμή εξαρτάται από το πεδίο δυνάμεων, αλλά συνήθως είναι ίση με 1.0.

Ē

7. INTEGRATE [VERLET/BEEMAN/STOCHASTIC/RIGIDBODY]

Το κλειδί αυτό επιλέγει τη μέθοδο ολοκλήρωσης για τη διάδοση των δυναμικών τροχιών και ακολουθείται στην ίδια γραμμή από το όνομα της επιλογής. Για κλασικές νευτώνειες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ο αλγόριθμος Verlet είτε ο αλγόριθμος Beeman, ΟΒΛ προκαθορισμένος αλγόριθμος σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής είναι ο αλγόριθμος Beeman.

8. ΜΑΧΙΤΕΡ (ακέραιος αριθμός)

Θέτει το μέγιστο αριθμό των επαναλήψεων ελαχιστοποίησης που θα επιτραπούν για οποιοδήποτε πρόγραμμα TINKER, που χρησιμοποιεί οποιαδήποτε μη γραμμική ρουτίνα βελτιστοποίησης. Η προκαθορισμένη τιμή απουσία του κλειδιού 'MAXITER' εξαρτάται από το πρόγραμμα, αλλά πάντα ισούται με ένα πολύ μεγάλο αριθμό.

9. PARAMETERS (όνομα αρχείου)

Παρέχει το όνομα του αρχείου με όλες τις παραμέτρους του πεδίου δυνάμεων, που θα χρησιμοποιηθεί σε ένα συγκεκριμένο TINKER υπολογισμό και είναι της μορφής .prm. Απουσία του αρχείου 'PARAMETERS', το πρόγραμμα θα ζητήσει να εισαχθούν οι επιμέρους παράμετροι διαδοχικά.

10. RESTRAIN-POSITION (1 ακέραιος & 5 πραγματικοί αριθμοί)

Αυτό το κλειδί παρέχει την δυνατότητα να περιοριστεί ένα συγκεκριμένο άτομο σε μία συγκεκριμένη θέση. Ο πρώτος ακέραιος τροποποιητής περιέχει τον αριθμό του ατόμου που θα περιοριστεί. Ο πρώτος πραγματικός τροποποιητής θέτει τη σταθερά δύναμης σε Kcal/Å² για την αρμονικό δυναμικό. Οι επόμενοι τρεις πραγματικοί τροποποιητές δίνουν τις Χ, Υ και Ζ συντεταγμένες στις οποίες το άτομο βρίσκεται προσδεδεμένο. Ο τελευταίος πραγματικός τροποποιητής προσδιορίζει μια σφαίρα γύρω από τις συγκεκριμένες συντεταγμένες μέσα στην οποία η τιμή περιορισμού είναι μηδέν. Αν ο τελευταίος πραγματικός αριθμός παραληφθεί, τότε θεωρείται από το πρόγραμμα μηδέν. Αν οι συντεταγμένες παραληφθούν, τότε λαμβάνονται υπόψη οι αρχικές συντεταγμένες του ατόμου. Τέλος, αν παραληφθεί η τιμή για τη σταθερά δύναμης, η τιμή της λαμβάνεται είναι ίση με 100.0.

11. SOLVATE [ASP/SASA/ONION/STILL/HCT/ACE/GBSA]

Η χρήση του κλειδιού 'SOLVATE' κατά τη διάρκεια ενεργειακών υπολογισμών με οποιοδήποτε πεδίο δυνάμεων ενεργοποιεί ένα όρο συνεχούς ελεύθερης ενέργειας ενδιαλύτωσης. Διάφοροι αλγόριθμοι είναι διαθέσιμοι κα βασίζονται στον τροποποιητή που χρησιμοποιείται: (1) ASP: Eisenberg- McLachlan, η ASP μέθοδος χρησιμοποιεί τις Wesson-Eisenberg αέριο προς υγρό παραμέτρους, (2) SASA: the Ooi-Scheraga μέθοδος, (3) ONION: the original 1990 Still "Onion-shell" η GB/SA μέθοδος, (4) STILL: η αναλυτική GB/SA μέθοδος από την ομάδα του Still (1997), (4) HCT: η μέθοδος των Hawkins, Cramer και Truhlar, (5) ACE: η αναλυτική μέθοδος ενδιαλύτωσης συνεχών ηλεκτροστατικών (Analytical Continuum Electrostatics solvation method) από την ομάδα του Karplus και (6) GB/SA: μέθοδος ισοδύναμη με τον τροποποιητή STILL. Προς το παρόν, οι μέθοδοι του τύπου GB/SA είναι έγκυρες μόνο για τα πεδία δυνάμεων που χρησιμοποιούν απλά μερικά ηλεκτροστατικά φορτία.

12. STEEPEST-DESCENT

Αυτό το κλειδί αναγκάζει την ρουτίνα βελτιστοποίησης L-BFGS, που χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα 'MINIMIZE' και άλλα προγράμματα, να εκτελέσει ελαχιστοποίηση απότομης κατάβασης (steepest descent minimization). Αυτή η επιλογή μπορεί να είναι χρήσιμη σε σχέση με μικρά βήματα για ακόλουθα ελάχιστα ενεργειακά μονοπάτια, αλλά γενικά είναι χαμηλότερο από το L-BFGS για τους περισσότερους σκοπούς βελτιστοποίησης.





Tυπικό Σφάλμα =
$$\sqrt{\left[\frac{1}{n(n-2)}\right] \left[n\Sigma y^2 (\Sigma y)^2 - \frac{\left[n\Sigma xy - (\Sigma \chi)(\Sigma y)\right]^2}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}\right]^2}$$

Κύρτωση =
$$\frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)}$$
 Σ $\left[\frac{x-\overline{x}}{s}\right]^4 - \frac{3(n-1)^2}{(n-2)(n-3)}$



•

2

TAPAPTHMA VIII

•

·

HUNDER BIBALOOTHER

Conferences/Workshops/Seminars/Lectures

1. <u>14.04.00-15.04.00</u>

2° Hellenic Forum of Bioactive Peptides, University of Patras, Greece, <u>Poster</u> <u>Presentation</u>: 'Design and synthesis of the zinc-finger domain of the Ro60KD autoantigen'.

2. <u>10.09.00- 16.09.00</u>

2° Hellenic Forum of Bioinorganic Chemistry, University of Thessalonica, Chalkidiki, <u>Poster Presentation</u>: 'Design and synthesis of the zinc-finger domain of the Ro60KD autoantigen and its analogues for the immunoregulation of systemic autoimmune diseases'.

3. <u>16.05.01-</u> <u>18.05.01</u>

4° Chemistry Conference of the Department of Chemistry, University of loannina, Greece, 'Basic and Applied Chemical Research', <u>Poster</u> <u>Presentation</u>: 'Design and synthesis of the zinc-finger domain of the Ro60KD autoantigen and its analogues for the immunoregulation of systemic autoimmune diseases', <u>Oral Presentation</u>: 'Design and synthesis of the zinc-finger domain of the Ro60KD autoantigen and its analogues for the immunoregulation of the zinc-finger domain of the Ro60KD autoantigen and its analogues for the immunoregulation of the Ro60KD autoantigen and its analogues for the immunoregulation of systemic autoimmune diseases'.

4. <u>11.04.02-14.04.02</u>

3° Hellenic Forum of Bioactive Peptides, University of Patras, Greece, <u>Poster</u> <u>Presentation</u>: 'Design and synthesis of the zinc-finger domain of the Ro60KD autoantigen and its analogues for the immunoregulation of systemic autoimmune diseases'.

5. <u>31.08.02-06.09.02</u>

27° European Peptide Symposium, Sorrento, Italy, <u>Poster Presentation</u>: 'The Ro60KD zinc-finger motif: Design, synthesis and molecular interactions'

6. <u>25.10.02-27.10.02</u>

54° Conference of the Hellenic Biochemical and Molecular Biology Society (EEBMB), Ioannina, Greece, <u>Oral Presentation</u>: 'The Ro60KD zinc-finger motif: Design, synthesis and molecular interactions'.



7. <u>27.02.03-02.03.03</u>

23rd European Workshop for Rheumatology Research, Marseille, France, <u>Meeting Abstract</u>: 'Zinc finger domain of Ro60kD autoantigen is essential for binding of Ro52kD and autoantibodies'.

8. <u>13.11.03-15.11.03</u>

55° Conference of the Hellenic Biochemical and Molecular Biology Society (HBMBS), Athens, Greece, Institute of Medical ang Biological Research of the Athens Academy, *Poster Presentation*: 'Detection of T-cell epitopes of La/SSB autoantigen and modelling of DQ2 and DQ7 molecules using computational methods'.

9. 22.04.04-24.04.04

4° Hellenic Forum of Bioactive Peptides, University of Patras, Greece, <u>Poster</u> <u>Presentation</u>: 'Detection of T-cell epitopes of La/SSB autoantigen and modelling of DQ2 and DQ7 molecules using computational methods '.

10. <u>31.07.04-04.08.04</u>

12° International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology and 3° European Conference on Computational Biology, ISMB/ECCB 2004, Glasgow, UK, <u>Poster Presentation</u>: 'Detection of T-cell epitopes of La/SSB autoantigen and modelling of DQ2 and DQ7 molecules using computational methods'.

11. <u>05.09.04-10.09.04</u>

3° International and 28° European Peptide Symposium, 28EPS 2004, Prague, Czech Republic, <u>Poster Presentation</u>: 'Detection of T-cell epitopes of La/SSB autoantigen and modelling of DQ2 and DQ7 molecules using computational methods'.

12. <u>28.09.05-01.10.05</u>

4° European Conference on Computational Biology 2005, ECCB05, Madrid, Spain. <u>Poster Presentation</u>: 'Prediction of the solvent accessible surface areas of the modeled HLA-DQ2 and HLA-DQ7 molecules using computational methods'.

13. <u>14.05.06-16.05.06</u>

5° Hellenic Forum of Bioactive Peptides, University of Patras, Greece, <u>Poster</u> <u>Presentation</u>: 'Molecular Dynamics Simulation of the modelled HLA-DQ7 complexed with six potential T cell epitopes of the La/SSB autoantigen'.

Publications/Proceedings

- <u>Aggeliki</u> <u>Kosmopoulou</u>, Metaxia Vlassi, Athanassios Stavrakoudis, Constantinos Sakarellos and Maria Sakarellos-Daitsiotis, 'T cell epitopes of the La/SSB autoantigen: Prediction based on the homology modeling of HLA-DQ2/DQ7 with the crystal structure of the insulin-B peptide/HLA-DQ8 complex', *Journal of Computational Chemistry*, 27(9), 1033-1044, 2006.
- 2. <u>Aggeliki Kosmopoulou</u>, Athanassios Stavrakoudis, Metaxia Vlassi, Maria Sakarellos-Daitsiotis, and Constantinos Sakarellos, 'Detection of T cell epitopes and modeling of DQ2 and DQ7 molecules using computational methods', *Proceedings* of the 3° International and 28° European Peptide Symposium, 28EPS 2004, Prague, Czech Republic, Copyright by Kenes International, 2005.
- Maria Sakarellos-Daitsiotis, Mahn-Thong Cung, Constantinos Sakarellos, Zouhair El Hilali, <u>Aggeliki Kosmopoulou</u>, Chryssa Voitharou, 'Complementary peptide epitopes and anti-idiotypic antibodies in autoimmunity', *Proteins and Peptide Letters*, 11(4) 367-375(9), 2004.
- 4. John G.Routsias, <u>Aggeliki Kosmopoulou</u>, Athina Makri, Eugenia Panou-Pomonis, Constantinos Sakarellos, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Haralampos M.Moutsopoulos, Athanasios G.Tzioufas, 'A zinc ion depended B-cell epitope associated with primary Sjogren's syndrome, resides within the putative zinc-finger domain of Ro60KD autoantigen: Physical immunologic properties', *Journal of Medicinal Chemistry*, **12**, **47**(17),4327-4334, 2004.
- <u>Aggeliki Kosmopoulou</u>, Athanasios Stavrakoudis, Metaxia Vlassi, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Constantinos Sakarellos, 'Detection of T-cell epitopes of La/SSB autoantigen and modelling of DQ2 and DQ7 molecules using computational methods', *Journal of Peptide Science*, Suppl10, 53, 2004.



- John G. Routsias, Athina Makri, Constantinos Sakarellos, Maria Sakarellos-Daitsiotis, <u>Aggeliki Kosmopoulou</u>, Haralampos M. Moutsopoulos and Athanasios G.Tzioufas, 'Zinc finger domain of Ro60kD autoantigen is essential for binding Ro52kD and autoantibodies', *Arthritis Res. Ther.*, 2003, 5Suppl(1), 22.
- Aggeliki Kosmopoulou, Athanasios Stavrakoudis, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Eugenia Panou-Pomonis, Vasillios Tsikaris, Constantinos Sakarellos, John G. Routsias, Athina Makri, Athanasios G. Tzioufas and Haralampos M. Moutsopoulos, 'Molecular Interactions of the Ro60KD zinc-finger motif and analogues', *Proceedings* of the 54th Conference of the Hellenic Biochemical and Molecular Biology Society (EEBMB), 2002.

Honors/Fellowships

- 4th Chemistry Conference of the Chemistry Department, University of Ioannina, Greece. I was awarded for the best poster presentation.
- 55th Conference of the Hellenic Biochemical and Molecular Biology Society (HBMBS), Athens, Greece. I was provided a *Travel Fellowship* to the attendance of the Conference by the HBMBS.
- 12th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology and 3th European Conference on Computational Biology, ISMB/ECCB 2004, Glasgow, UK. I was provided a *Travel Fellowship* to the attendance of the Conference by the Biosapiens.
- 4th European Conference on Computational Biology 2005, ECCB05, Madrid, Spain. I was provided a *Travel Fellowship* to the attendance of the Conference.
- 3rd EMBO Practical Course on Biomolecular Simulation from 28th June to 4th July 2006, at the Pasteur Institute in Paris. I was provided a *Fellowship* to attend the course.

Interests

> Poetry studying and writing. Some of my poems are published in relative journals.



346