

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
Τμήμα Χημείας  
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Βιοανόργανης Χημείας

**ΔΟΜΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ  
ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ**

Διδακτορική διατριβή.

**Χρήστου Χασάπη**  
**Χημικού M.Sc.**

Επιβλέπων  
**Νικόλαος Χατζηλιάδης**  
Καθηγητής Χημικού Τμήματος  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

*Επιστημονικός Υπέυθυνος του Προγράμματος*  
**N. Χατζηλιάδης**  
Καθηγητής Χημικού Τμήματος  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Ιωάννινα 2005

*Στην οικογένεια μου.*

\*

Η διδακτορική διατριβή έγινε στα πλαίσια του προγράμματος Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. στη Βιοανόργανη Χημεία με επιστημονικό υπεύθυνο τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Νικόλαο Χατζηλιάδη τον οποίο ευχαριστώ θερμά τόσο για την συμμετοχή μου στο πρόγραμμα όσο και για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του σε όλα τα στάδια της εργασίας. Η εργασία αυτή έγινε στο σύνολο της στο Ινστιτούτο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Φλωρεντίας (Magnetic Resonance Center CERM) κάτω από την επίβλεψη του καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Φλωρεντίας κ. Ivano Bertini τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις, συμπαράσταση και ενθάρρυνση του σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Φλωρεντίας Lucia Banci για την καθοδήγηση της σε όλα τα στάδια της εργασίας καθώς και τον Dr. Antonio Rosato (Associate Professor of Chemistry University of Florence) για την επίλυση επιστημονικών προβλημάτων που προέκυψαν.

Τους Post Doc φοιτητές: Dr Simone Ciofi, Dr. Francesca Cantini, (Magnetic Resonance Center CERM). για την συνεργασία τους και τις υποδείξεις τους σε θέματα δομικής βιολογίας.

Ευχαριστώ ακόμη όλους τους συναδέλφους μου στο ερευνητικό εργαστήριο του CERM για την συνεργασία και την αρμονική συνύπαρξη και ιδιαίτερα τους: Murugendra Vanarotti, Massimiliano Peana και Ηλιάνα Λεοντάρη.

<b>1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>4</b>
1.1 Ο ΧΑΛΚΟΣ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ .....	5
1.1.1 Γενικά .....	5
1.1.2 Η χημεία του χαλκού στα βιολογικά συστήματα. ....	6
1.1.3 Κέντρα σύνδεσης χαλκού. ....	8
1.1.4 Πρωτεΐνες Χαλκού.....	13
1.1.5 Εσωτερική δομή και οργάνωση των πρωτεϊνών χαλκού.....	19
1.1.6. Δομική σταθερότητα των πρωτεϊνών. ....	23
1.1.7.Γενικές ιδιότητες διαλυμάτων πρωτεϊνών. ....	26
1.2 ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΧΑΛΚΟΥ.....	27
1.2.1 Γενικά .....	27
1.2.2 Ομοιόσταση του χαλκού στα βακτήρια <i>Enterococcus hirae</i> . ....	28
1.2.3 Ομοιόσταση του χαλκού στους κατώτερους και ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.....	29
1.3 ΜΕΝΚΕΣ ΚΑΙ ΓΟΥΪΛΣΟΝ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ: ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ρ ΤΥΠΟΥ ΑΤΡάση.....	35
1.3.1 Ιδιότητες των πρωτεϊνών Ρ τύπου ΑΤΡάσης. ....	35
1.3.2 Μένκες και Γουΐλσον πρωτεΐνες.....	37
1.3.3 Ο ρόλος των δομικών περιοχών ένταξης χαλκού στο Ν-άκρο των πρωτεϊνών Μένκες και Γουΐλσον.....	39
1.3.4 Καταλυτική δράση της πρωτεΐνης Μένκες.....	40
1.3.5 Μοριακή δομή του γονιδίου Μένκες στον ανθρώπινο οργανισμό. ....	43
1.3.6 Μελέτες μετάλλαξης στην πρωτεΐνη Μένκες.....	46
1.4 ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΛΟΓΩ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΕΝΚΕΣ ΚΑΙ ΓΟΥΪΛΣΟΝ.....	52
1.4.1 Νόσος Μένκες .....	52
1.4.2 Νόσος Γουΐλσον. ....	58
1.4.3 Σύνδρομο ΟΗΣ. (Occipital Horn Syndrome) .....	63
1.5 ΔΟΥΛΕΥΟΝΤΑΣ ΜΕ ΔΟΜΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΗ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ.....	66
1.5.1 Γενικά. ....	66
1.5.2 Φιλοσοφία και στρατηγική. ....	67
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>70</b>
<b>2) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>72</b>
2.1.ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕΝΚΕΣ.....	73
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ: MNK <sub>r</sub> 5 ΚΑΙ MNK <sub>r</sub> (4-6) ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ. (PCR reaction).....	75
2.2.1 Βασικές αρχές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	75
2.2.2 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	77
2.2.3 Διαλύματα εργασίας .....	77
2.2.4 Πειραματική διαδικασία για την απομόνωση των γονιδίων MNK <sub>r</sub> 2, MNK <sub>r</sub> 5 και MNK <sub>r</sub> 4-6 με την τεχνική PCR. ....	78
2.2.5 Σχεδιασμός εκκινητών για την αντίδραση PCR. ....	79
2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2% ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR.....	81
2.3.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	81
2.3.2 Διαλύματα εργασίας .....	81

2.3.3 Πειραματική διαδικασία.....	82
2.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ MNK <sub>r</sub> 5 και MNK <sub>r</sub> (4-6) ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%. .....	84
2.5 ΚΟΨΙΜΟ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ MNK <sub>r</sub> 5 και MNK <sub>r</sub> (4-6) ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ. ....	85
2.5.1 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....	85
2.5.2 Πειραματική διαδικασία. ....	85
2.6 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ.....	86
2.6.1 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....	88
2.6.2 Πειραματική διαδικασία .....	88
2.7 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ MNK <sub>r</sub> 5 και MNK <sub>r</sub> (4-6) ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pET-20b(+). ....	89
2.7.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	89
2.7.2 Πειραματική διαδικασία. ....	89
2.8 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ pCC1 ΚΑΙ pCC2 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΞΕΝΙΣΤΕΣ E.coli DH5a. ....	91
2.8.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	91
2.8.2 Διαλύματα εργασίας .....	91
2.8.3 Πειραματική διαδικασία. ....	92
2.9 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ pCC1 ΚΑΙ pCC2 ΑΠΟ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ DH5a. ....	93
2.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ MNK <sub>r</sub> 5 ΚΑΙ MNK <sub>r</sub> (4-6).....	94
2.10.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού αλληλουχίας. ....	94
2.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΗΜΕΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MNK <sub>r</sub> (4-6) ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pCC2.....	95
2.11.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	96
Διαλύματα εργασίας .....	96
2.11.2 Πειραματική διαδικασία .....	97
2.11.3 Αποτελέσματα του προσδιορισμού αλληλουχίας του μεταλλαγμένου γονιδίου MNK <sub>r</sub> (4-6). ....	98
2.12. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ pCC1 ΚΑΙ pCC2(wt) ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ E.Coli BL21(DE3)pLys. ....	99
2.12.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	99
2.12.2 Διαλύματα εργασίας .....	99
2.12.3 Πειραματική διαδικασία. ....	99
2.13 ΕΥΡΕΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNK <sub>r</sub> 5 ΚΑΙ MNK <sub>r</sub> (4-6). ....	100
2.13.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	101
2.13.2 Διαλύματα εργασίας .....	101
2.13.3 Πειραματική διαδικασία. ....	102
2.14 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ SDS.....	103
2.14.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	103
2.14.2 Διαλύματα εργασίας .....	104
2.14.3 Ετοιμασία δειγμάτων .....	105
2.14.4 Πειραματική διαδικασία .....	105
2.15 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNK <sub>r</sub> 5 ΚΑΙ MNK <sub>r</sub> (4-6). ....	106

2.15.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	106
2.15.2 Διαλύματα εργασίας .....	107
2.15.3 Πειραματική διαδικασία. ....	107
<b>2.16 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6)....</b>	<b>108</b>
2.16.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	109
2.16.2 Διαλύματα εργασίας .....	109
2.16.3 Πειραματική διαδικασία. ....	109
<b>2.17 ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ <sup>13</sup>C ΚΑΙ <sup>15</sup>N ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6).....</b>	<b>112</b>
2.17.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.....	112
2.17.2 Διαλύματα εργασίας .....	112
2.17.3 Πειραματική διαδικασία. ....	113
<b>2.18 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ. ....</b>	<b>114</b>
2.18.1 Προετοιμασία των δειγμάτων αποMNKr5 ΚΑΙ αποMNKr(4-6).....	114
2.18.2 Τιτλοδότηση με Cu(I) των δειγμάτων αποMNKr5 και αποMNKr(4-6).....	114
2.18.3 Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων (2D) <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC. (Heteronuclear Single Quantum Coherence).....	116
<b>2.19 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ. ....</b>	<b>118</b>
<b>3) ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6). ....</b>	<b>119</b>
3.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	120
3.2 Αποτελέσματα των υπολογισμών PROSA II και PoPMSC. ....	120
<b>4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>125</b>
<b>4.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5. ΚΑΙ MNKr(4-6).....</b>	<b>126</b>
4.1.1 Τεστ έκφρασης της περιοχής MNKr5. ....	126
4.1.2. Καθαρισμός πρωτεϊνικού στόχου MNKr5. ....	127
4.1.3 Τεστ έκφρασης της πρωτεΐνης MNKr(4-6). ....	129
4.1.4 Καθαρισμός του πρωτεϊνικού στόχου MNKr(4-6).....	130
<b>4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....</b>	<b>131</b>
4.2.1ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	131
4.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΣΜΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ. ....	133
4.2.2.1 Φασματοσκοπία <sup>1</sup> H-NMR .....	133
4.2.2.2 Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων (2D) <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC. (Heteronuclear Single Quantum Coherence).....	135
4.3 ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ apo-MNKr5 ΚΑΙ Cu(I)-MNKr5.....	161
4.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HAHI ΜΕ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΚΑΙ ΠΕΜΠΤΗ ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΝΤΑΞΗΣ ΧΑΛΚΟΥ (I) ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕΝΚΕΣ.....	168
4.5. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HAHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΝΤΑΞΗΣ ΧΑΛΚΟΥ (I) MNKr(4-6) ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕΝΚΕΣ.....	175
4.6 ΗΛΕΚΤΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΗΣ Cu(I)-MNKr5. ....	183
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>186</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>206</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....</b>	<b>209</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....</b>	<b>210</b>

## **1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Ο ΧΑΛΚΟΣ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.

### 1.1.1 Γενικά

Ο χαλκός είναι ένα ιχνοστοιχείο απαραίτητο στο φυτικό και ζωικό βασίλειο. Η κύρια βιοχημική δράση του χαλκού είναι η συμμετοχή του σε ενζυματικές αντιδράσεις ως ενεργοποιητού ή ως συστατικού των ενζύμων που περιέχουν χαλκό. [1] Το ποσοστό του χαλκού στα φυτά ποικίλει από 0,0001 ως 0.05 τις εκατό και εξαρτάται από το είδος του φυτού και την περιεκτικότητα σε χαλκό του εδάφους. Η μέση περιεκτικότητα του στο στερεό φλοιό της γης είναι  $4,7 \cdot 10^{-3}$  τις εκατό κατά βάρος. Το κατώτερο τμήμα του στερεού φλοιού που συνιστάται από βασικά πετρώματα περιέχει περισσότερο χαλκό από ότι το ανώτερο τμήμα. Ο χαλκός είναι συστατικό των ενζύμων οξειδασών και της πρωτεΐνης της πλαστοκυανίνης στα φυτά. Στις βέλτιστες συγκεντρώσεις ο χαλκός αυξάνει την ανθεκτικότητα των φυτών στο ψύχος και προάγει την αύξηση και ανάπτυξη τους. Μεταξύ των ζώων μερικά ασπόνδυλα περιέχουν μεγάλες ποσότητες χαλκού ( τα μαλάκια και στα οστρακόδερμα περιέχουν ποσοστό 0.15-0.26 τις εκατό χαλκό στην αιμοκυανίνη).

Στον ανθρώπινο οργανισμό, η μέση ημερήσια φυσιολογική πρόσληψη χαλκού είναι από 2,5-5 χιλιοστόγραμμα. [2] Ο χαλκός απορροφάται στο έντερο, συνδυάζεται με την αλβουμίνη στον ορό του αίματος και κατόπιν απορροφάται από το συκώτι από το οποίο επιστρέφει στο αίμα με την δράση της καιρουλοπλασμίνης και μεταφέρεται κατόπιν στα όργανα και στους ιστούς. Η περιεκτικότητα του χαλκού στον άνθρωπο ποικίλει από πέντε χιλιοστόγραμμα χαλκού στο συκώτι μέχρι 0,7 χιλιοστόγραμμα χαλκού στα οστά ( ανά εκατό γραμμάρια ξηρού βάρους ). Στα υγρά του σώματος η περιεκτικότητα ποικίλει από εκατό μικρογραμμάρια ( ανά εκατό χιλιοστόλιτρα ) στο αίμα, μέχρι δέκα μικρογραμμάρια στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Ο ενήλικας οργανισμός περιέχει συνολικά εκατό χιλιοστόγραμμα χαλκού. [3]

**Πίνακας 1:** Συγκεντρώσεις (σε mM) απαραίτητων ιχνοστοιχείων στο θαλάσσιο ύδωρ και στο πλάσμα του αίματος [4].

	Na	Mg	Ca	K	Fe	Zn	Cu	Co	Ni
<b>Θαλάσσιο ύδωρ</b>	470	50	10	10	0,0001	0,0001	0,001	$10^{-5.5}$	$10^{-5.5}$
<b>Πλάσμα αίματος</b>	138	1	3	4	0.02	0.02	0,015	0,002	0



### 1.1.2 Η χημεία του χαλκού στα βιολογικά συστήματα.

Στα βιολογικά συστήματα, ο χαλκός αποτελεί μέρος των ενεργών κέντρων πρωτεϊνών ή ενζύμων. Οι διάφοροι τρόποι με τους οποίους ο χαλκός συνδέεται στα ενεργά αυτά κέντρα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. [5]

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο χαλκός συμμετέχει άμεσα στο καταλυτικό κύκλο. Ωστόσο, σε κάποια ένζυμα, απλώς αναπαράγει έναν εσωτερικό συμπαράγοντα χωρίς να συμμετέχει ο ίδιος στην κατάλυση. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται είτε μεταξύ χαλκού και υποστρώματος είτε μεταξύ χαλκού και του άλλου εταίρου του οξειδοαναγωγικού ζεύγους, τα δε δυναμικά οξειδοαναγωγής των ενώσεων που συμμετέχουν καθορίζουν και την ροή ηλεκτρονίων. Στα βιολογικά συστήματα ο χαλκός έχει παρατηρηθεί μέχρι στιγμή τουλάχιστον, σαν Cu(I) και Cu(II). Μοντέλα ενώσεων που προτείνουν την ύπαρξη χαλκού (III) έχουν καταρριφθεί. Γιατί όμως ο Cu(III) βρίσκεται μόνο σε μικρά πεπτίδια, ενώ ο Cu(I) και Cu(II) επικρατεί σε πρωτεΐνες και ένζυμα; Η ηλεκτρονική απεικόνιση του στοιχειακού χαλκού είναι  $3d^{10} 4s^1$ . Απομακρύνοντας ένα ηλεκτρόνιο από την 4s στοιβάδα, δημιουργείται το διαμαγνητικό ιόν  $Cu^+$  με ηλεκτρονική απεικόνιση  $3d^{10}$ . Οι Cu(II) και Cu(III) δημιουργούνται απομακρύνοντας ένα και δύο ηλεκτρόνια από την 3d-στοιβάδα. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του d-τροχιακού κάνει τον Cu(II) να είναι παραμαγνητικός (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Ηλεκτρονιακή απεικόνιση και μαγνητικές ιδιότητες των τριών οξειδωτικών καταστάσεων του χαλκού.[5]

Οξειδωτική κατάσταση	Ηλεκτρονιακή απεικόνιση	Μαγνητικές ιδιότητες
$Cu^+$	$3d^{10}$	Διαμαγνητικός
$Cu^{2+}$	$3d^9$	Παραμαγνητικός
$Cu^{3+}$	$3d^8$	Διαμαγνητικός

Σε υδατικά διαλύματα οι τρεις τύποι των ιόντων του χαλκού σχηματίζουν σύμπλοκα με κατάλληλους υποκαταστάτες παρουσιάζοντας διαφορετικούς αριθμούς ένταξης και στερεοχημεία. Υπάρχει ο γενικός κανόνας ότι σκληρά οξέα σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με σκληρές βάσεις, ενώ μαλακά οξέα σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με σκληρές βάσεις. Αυτός ο κανόνας εφαρμόζεται και στα σύμπλοκα του

χαλκού: έτσι η αύξηση του βαθμού οξειδωσής μετατρέπει τα ιόντα χαλκού από μαλακά σε σκληρά επηρεάζοντας τους προτιμώμενους υποκαταστάτες συμπλοκοποίησης. Στα ενεργά κέντρα των πρωτεϊνών, ο χαλκός μπορεί να συμπλεχθεί μόνο με αμινοξέα ή μικρές ενώσεις όπως  $H_2O$ ,  $OH^-$  ή  $PO_4^{3-}$ . Σε συμφωνία με την αντίληψη περί σκληρών και μαλακών ενώσεων, το μαλακό ιόν του  $Cu^+$  προτιμά να συμπλοκοποιείται με αμινοξέα όπως Cys, Cys<sup>-</sup> και Met, ενώ το σκληρότερο ιόν του  $Cu^{+2}$  μπορεί επίσης να ενταχθεί με το σκληρότερο  $H_2O$  ή με αμινοξέα όπως Tyr, Tyr<sup>-</sup>, Ser, Thr, ή His. Ο  $Cu^{3+}$  είναι σταθερός μόνο σε σύμπλοκα που περιέχουν αποκλειστικά σκληρού υποκαταστάτες όπως Tyr,  $OH^-$  και Tyr<sup>-</sup>. Μια πρωτεΐνη που περιέχει  $Cu^{3+}$  στο ενεργό κέντρο της κέντρο θα μπορούσε να συμμετέχει σε αντιδράσεις που απαιτούν υπερβολικά υψηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής.

Οι διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις των ιόντων του χαλκού όχι μόνο εννοούν διαφορετικούς υποκαταστάτες αλλά και διαφορετικούς στερεοχημείες των συμπλόκων τους. Η γεωμετρία διαμόρφωσης ενός συμπλόκου εξαρτάται από την γεωμετρία του τροχιακού του κεντρικού ιόντος. Εξαιρώντας τις στεरिकές παρεμποδίσεις, για αριθμό ένταξης τέσσερα, το σύστημα του  $Cu^+$ - υποκαταστάτες εννοεί τετραεδρική διαμόρφωση, ενώ εκείνο  $Cu^{2+}$  εννοεί παραμορφωμένη τετραεδρική διαμόρφωση. (Πίνακας 3)

**Πίνακας 3:** Ευνοούμενες στερεοχημείες στις δύο οξειδωτικές καταστάσεις του χαλκού.

Οξειδωτική κατάσταση	Αριθμός ένταξης	Στερεοχημεία
$Cu^+$	2	Γραμμική
	3	Επίπεδη
	4	Τετραεδρική <sup>α</sup>
$Cu^{2+}$	4	Επίπεδη τετραγωνική
	4	Παραμορφωμένη τετραεδρική
	5	Τετραγωνική πυραμίδα
	5	Τριγωνική διπυραμίδα
	6	Παραμορφωμένη οκταεδρική

### 1.1.3 Κέντρα σύνδεσης χαλκού.

Τα σύμπλοκα του χαλκού είναι πιο σταθερά όταν οι προτιμώμενοι υποκαταστάτες γύρω από το κεντρικό ιόν κατέχουν την καλύτερη για αυτούς γεωμετρία. Διαταραχές από μια τέτοια διευθέτηση αποσταθεροποιούν την αναμενόμενη κατάσταση οξειδωσης. Ωστόσο, αν οι οξειδωτικές καταστάσεις του χαλκού στις πρωτεΐνες και στα ένζυμα ήταν σταθερές, τότε τα αποκτούμενα κέντρα σύνδεσης χαλκού θα ήταν ακατάλληλα για την κατάλυση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Ένα ενεργό οξειδοαναγωγικό κέντρο χαλκού πρέπει να κινείται μεταξύ των οξειδοαναγωγικών καταστάσεων Cu(I) και Cu(II) απαιτώντας μικρή ενέργεια. Στα κέντρα σύνδεσης χαλκού πρωτεϊνών και ενζύμων αυτό επιτυγχάνεται με δύο διαφορετικούς τρόπους. Πρώτον, ο χαλκός εντάσσεται εν μέρει με υποκαταστάτες που προτιμούνται από τον Cu(I) και εν μέρει με άλλους που προτιμούνται από τον Cu(II). Δεύτερον, οι γεωμετρίες των υποκαταστατών δημιουργούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να εμπίπτουν μεταξύ των κοινών γεωμετριών για Cu(I) και Cu(II). Στην τελευταία περίπτωση, οι υποκαταστάτες ακινητοποιούνται στις θέσεις τους με τη βοήθεια πρωτεϊνικού σκελετού.

Η επιλογή των υποκαταστατών και η στερεοχημεία τους προσδιορίζουν το δυναμικό οξειδοαναγωγής του κεντρικού ιόντος χαλκού. Για παράδειγμα η τετραεδρική παραμόρφωση, η οποία προτιμάται από τον Cu(II), διευκολύνει την αναγωγή του  $\text{Cu}^{2+}$  σε  $\text{Cu}^+$  αυξάνοντας το δυναμικό οξειδοαναγωγής. Η ίδια επίδραση επιτυγχάνεται εισάγοντας 'μαλακούς' υποκαταστάτες ευνοώντας το  $\text{Cu}^+$ . [5]

Σε υδατικά διαλύματα, το δυναμικό οξειδοαναγωγής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  είναι  $E^0=+153\text{mV}$ . Σε αντίθεση με αυτό, τα δυναμικά οξειδοαναγωγής που βρέθηκαν στα ένζυμα και στις πρωτεΐνες χαλκού εκτείνονται από +183 mV στην αλοκυανίνη σε +785 mV στο κέντρο χαλκού Τύπου 1 της λακτάσης. Αυτή η μεγάλη ποικιλία των σχετικά μεγάλων δυναμικών οξειδοαναγωγής επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη διαφόρων κέντρων σύνδεσης χαλκού. Σ' αυτά τα κέντρα, η σταθερή ένταξη των αμινοξικών καταλοίπων γίνεται μέσω του σχετικά δύσκαμπτου πρωτεϊνικού σκελετού. Και ως εκ τούτου πιέζουν το κεντρικό ιόν του χαλκού να καταλάβει μια καθορισμένη στερεοχημεία. Στις πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων που λειτουργούν παροδικά με  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Cu}^+$ , υποκαταστάτες και στερεοχημείες βρίσκονται μεταξύ αυτών που προτιμούνται και από τις δυο οξειδωτικές

καταστάσεις χωρίς να ευνοείται καμία τους. Αυτό ελαχιστοποιεί την τοπική ενέργεια επαναδιοργάνωσης και εξηγεί το πώς βελτιστοποιούνται τα δυναμικά οξειδοαναγωγής για τις αντίστοιχες αντιδράσεις. Ειδικότερα, τα υψηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής των πρωτεϊνών του χαλκού τις καθιστούν κατάλληλες για αντιδράσεις με οξυγόνο.

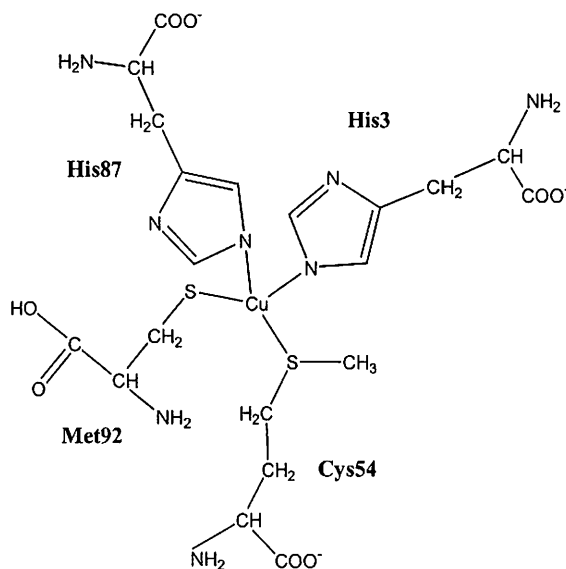
#### 1.1.3.1 Κέντρα σύνδεσης Χαλκού Τύπου 1.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα κάποιων πρωτεϊνών του χαλκού είναι ένα έντονο μπλε χρώμα που βασίζεται στις φασματοσκοπικές ιδιότητες του κέντρου χαλκού Τύπου 1. Έχουν μια χαρακτηριστική ταινία απορρόφησης στα εξακόσια περίπου nm με συντελεστή απόσβεσης που ξεπερνά τα τρία  $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Για σύγκριση, ο συντελεστής απόσβεσης του εξα-ένυδρου συμπλόκου του Cu(II),  $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ , του οποίου το μπλε χρώμα είναι πιο ασθενές, είναι μόνο 5-10  $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Οι διαφορές στις φασματοσκοπικές ιδιότητες σε σύγκριση με εκείνες του έξα-ένυδρου συμπλόκου του Cu(II) είναι πολύ πιο μεγάλες στα κέντρα χαλκού τύπου 1. Αυτά τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά καθώς και η αύξηση των δυναμικών οξειδοαναγωγής, είναι αποτέλεσμα της γεωμετρικής διευθέτησης των υποκαταστατών γύρω από τη θέση σύνδεσης του χαλκού.

Συνήθως ο χαλκός Τύπου 1 εντάσσεται με δυο ιστιδίνες, μια κυστεΐνη και μια μεθειονίνη του πρωτεϊνικού σκελετού. (Σχήμα 1) Οι στερεοχημείες των κέντρων χαλκού εξαρτώνται από την πρωτεΐνη και είναι συνήθως τριγωνική διπυραμίδα ή παραμορφωμένη τετραεδρική (π.χ. πλαστοκυανίνη). Και στις δυο περιπτώσεις ο πιο μακρινός υποκαταστάτης του ιόντος χαλκού είναι η μεθειονίνη.

Επιπλέον από τους υποκαταστάτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ένας πέμπτος υποκαταστάτης έχει πρόσφατα ανακαλυφθεί σε κάποια κέντρα χαλκού Τύπου 1, ένα καρβονυλικό οξυγόνο τοποθετημένο απέναντι από τη μεθειονίνη. Στην αζουρίνη, ο πέμπτος υποκαταστάτης σχηματίζει γεωμετρία παραμορφωμένης τριγωνικής διπυραμίδας. Στην πλαστοκυανίνη ωστόσο, είναι πολύ πιο μακριά από τον χαλκό και αυτή η ασθενής αλληλεπίδραση επιβάλλει μια κανονική τετραεδρική γεωμετρία. Η μεθειονίνη δεν είναι απαραίτητη για τις φασματοσκοπικές ή τις λειτουργικές ιδιότητες των κέντρων χαλκού Τύπου 1: στις φυτοκυανίνες, μια ομάδα μικρών μπλε πρωτεϊνών, έχει αντικατασταθεί από μια γλουταμίνη και στην σερουπλασμίνη σε ένα από τα κέντρα χαλκού Τύπου 1 λείπει τελείως αυτός ο υποκαταστάτης. Κέντρα χαλκού Τύπου 1 βρέθηκαν στις μικρές μπλε πρωτεΐνες, στις μπλε οξειδάσες και στην νιτρορεδοουκτάση.

Στην τελευταία, η παραμορφωμένη γεωμετρία του υποκαταστάτη μετατοπίζει την ταινία απορρόφησης παρέχοντας ένα πράσινο και όχι ένα μπλε ένζυμο.



**Σχήμα 1:** Μοντέλο κέντρο χαλκού Τύπου 1 της πλαστοκυανίνης.

### 1.1.3.2 Κέντρα σύνδεσης Χαλκού Τύπου 2.

Οι ιδιότητες των κέντρων χαλκού Τύπου 2 μοιάζουν με εκείνες των συμπλόκων του χαλκού (II). Αυτό σημαίνει ότι οι συνθήκες γεωμετρίας είναι λιγότερο κρίσιμες από ότι στα κέντρα χαλκού Τύπου 1. Κέντρα χαλκού Τύπου 2 εμφανίζονται στις οξειδάσεις στην νιτριτορεδουκτάση και στην Cu,Zn-υπεροξειδική δισμουτάση. Ενώ τα κέντρα χαλκού Τύπου 1 περιορίζονται στην μεταφορά ηλεκτρονίων, τα κέντρα χαλκού Τύπου 2 περιλαμβάνονται κυρίως στον μεταβολισμό του οξυγόνου. Στην αμινοξειδάση και την γαλακτοξειδάση είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενός εσωτερικού συμπαραγόντα. Οξειδάσες, οξυγενάσες και νιτριτορεδουκτάση ανάγουν το οξυγόνο σε υπεροξειδίου του υδρογόνου με μεταφορά δυο ηλεκτρονίων. Η υπεροξειδική δισμουτάση καταλύει την μετατροπή δυο ανιονικών ριζών υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο.

Τα κέντρα χαλκού Τύπου 2 δεν παρουσιάζουν ομοιομορφία όσον αφορά τους υποκαταστάτες και την στερεοχημεία τους. Ένα κοινό γνώρισμα τους ωστόσο είναι ότι στο ενεργό ένζυμο, μια θέση ένταξης είναι πάντα ελεύθερη για να δεσμευτεί το οξυγόνο. Ο πιο κοινός υποκαταστάτης των κέντρων χαλκού Τύπου 2 είναι η ιστιδίνη. Επίσης απατούνται συχνά τυροσίνη (συνήθως τροποποιημένη), μεθειονίνη και κυστεΐνη. Στην αμινοξειδάση και λυσοξειδάση υπάρχουν τρεις ιστιδίνες και μια τροποποιημένη τυροσίνη. Στην διαμινοξειδάση, δύο ιστιδίνες έχουν πιθανώς

αντικατασταθεί από κυστεΐνες. Στην γαλακτοξείδαση, ο χαλκός εντάσσεται με δυο τυροσίνες, δυο ιστιδίνες και ένα οξικό ανιόν. Η β-υδροξυλάση ντοπαμίνης περιέχει δυο διαφορετικά ενταγμένα ιόντα χαλκού ανά λειτουργική μονάδα. Ο ένας εντάσσεται με τρεις ιστιδίνες και μια μεθειονίνη και ο άλλος με δυο ιστιδίνες και έναν τρίτο, άγνωστο μέχρι στιγμής υποκαταστάτη. Ο χαλκός Τύπου 2 της Cu,Zn υπεροξειδικής δισμουτάσης εντάσσεται με τέσσερις ιστιδίνες, μια από τις οποίες συνδέει το ιόν του χαλκού με εκείνο του ψευδαργύρου, που είναι το δεύτερο μεταλλικό ιόν του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

### 1.1.3.3 Κέντρα σύνδεσης Χαλκού Τύπου 3.

Τα κέντρα χαλκού (II) Τύπου 3 απαντούνται στην αιμοκυανίνη ( μια πρωτεΐνη μεταφοράς οξυγόνου) και στη τυροσινάση ( μια μονοοξυγενάση) και είναι διπυρηνικά κέντρα με συζευγμένα μεταξύ τους αντισιδηρομαγνητικά τα δυο ιόντα χαλκού. Αν και η λειτουργία τους διαφέρει, τα κέντρα χαλκού αυτών των δυο ενζύμων μοιάζουν πολύ μεταξύ τους. Κάθε ένας από τους δυο χαλκούς, εντάσσεται με τρεις ιστιδίνες σε μια επίπεδη τριγωνική γεωμετρία και οι υποκαταστάτες των δύο χαλκών μεταξύ τους διευθετούνται αντιπρισματικά. Οι ανοιγμένες μορφές των αιμοκυανινών είναι άχρωμες, ενώ οι οξειδωμένες μπλε. Τα κέντρα χαλκού Τύπου 3 εμφανίζουν μια ισχυρή απορρόφηση στα 345 nm περίπου η οποία προκαλείται από την μεταφορά φορτίου υποκαταστάτη-μετάλλου.

### 1.1.3.4 Τριπυρηνικά Κέντρα.

Οι μπλε οξειδάσεις περιέχουν τριπυρηνικά κέντρα, που κανονικά αποτελούνται από ένα απλό κέντρο χαλκού Τύπου 2 και ένα κέντρο χαλκού Τύπου 3, με το οποίο το τρίτο ιόν χαλκού σχηματίζει ένα τρίγωνο. Και τα δύο ιόντα χαλκού του κέντρου χαλκού Τύπου 3 εντάσσονται με τρεις ιστιδίνες, ενώ δυο ιστιδίνες εντάσσονται στο ιόν του χαλκού Τύπου 2. Σε αντίθεση με τα κέντρα χαλκού Τύπου 3 αιμοκυανίνης και τυροσινάσης, εδώ οι υποκαταστάτες των δύο ιόντων χαλκού διευθετούνται πρισματικά σαν αποτέλεσμα στερικής παρεμπόδισης από το κέντρο χαλκού Τύπου 2 που παρεμποδίζει μια αντιπρισματική διευθέτηση. Αυτά τα τριπυρηνικά κέντρα είναι μια από τις δυο γνωστές ενζυμικές δομές που είναι ικανές να ανάγουν το οξυγόνο σε νερό.

### 1.1.3.5 Κέντρα Cu<sub>A</sub>.

Τα κέντρα χαλκού Cu<sub>A</sub> βρίσκονται στις οξειδάσεις του κυτοχρώματος c και στην N<sub>2</sub>O-ρεδουκτάση. Και στις δύο ομάδες ενζύμων, τα κέντρα Cu<sub>A</sub> αφαιρούν

ηλεκτρόνια από έναν εξωτερικό δότη και τα μεταφέρουν είτε άμεσα στο ενεργό κέντρο είτε έμμεσα μέσω ενός επιπλέον οξειδοαναγωγικού κέντρου. Μέχρι πρόσφατα, η γνώση μας για την δομή των κέντρων  $Cu_A$  ήταν ελλιπής. Αυτή η κατάσταση άλλαξε το 1995 με την δημοσίευση των κρυσταλλικών δομών της οξειδάσης του κυτοχρώματος c από *Paracoccus denitrificans* και καρδιά βοοειδούς. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα τα κέντρα  $Cu_A$  περιέχουν δομές του τύπου  $[2Cu-2S]$  όμοιες με εκείνες των συμπλεγμάτων του τύπου του σιδήρου θείου  $[2Fe-2S]$ . Και οι δύο υποκαταστάτες θείου παρέχονται από κυστεΐνες της πεπτιδικής αλυσίδας και σχηματίζουν μια επίπεδη δομή με τα ιόντα χαλκού. Και στις δύο δομές, ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να απεντοπισθεί πάνω και από τα δύο μεταλλικά ιόντα χαλκού. Στα κέντρα σιδήρου θείου αυτό το φαινόμενο παρατηρείται στον ανηγμένο τύπο  $[Fe^{2.5+} - Fe^{2.5+}]$ , ενώ στα κέντρα  $Cu_A$  το απεντοπισμένο ηλεκτρόνιο βρέθηκε στον οξειδωμένο τύπο:  $[Cu^{1.5+} - Cu^{1.5+}]$ . Στο κέντρο  $Cu_{A1}$ , το ιόν του χαλκού συνδέεται με μια ιστιδίνη, μια μεθειονίνη και με δυο κυστεΐνες.

Στο κέντρο  $Cu_{A2}$ , η μεθειονίνη αντικαθίσταται από ένα γλουταμικό. Το περιβάλλον των υποκαταστατών των δύο ιόντων χαλκού μοιάζει με τα κέντρα Τύπου 1 της πλαστοκυανίνης και της στελλακυανίνης. Αυτή η ομοιότητα επεκτείνεται επίσης στην τριτοταγή δομή και στην αμινοξική ακολουθία των περιοχών που καλύπτουν το  $Cu_A$ -διμερές. Και τα δύο ιόντα χαλκού παρουσιάζουν παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία.

#### 1.1.3.6 Κέντρα $Cu_B$ .

Τα κέντρα χαλκού  $Cu_B$  βρίσκονται στις οξειδάσεις του κυτοχρώματος όπου είναι πάντοτε ενταγμένα με μια ομάδα αίμης σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα  $Cu_B$ -αίμης. Τα μεταλλικά ιόντα των δυο οξειδοαναγωγικών-ενεργών κέντρων είναι συζευγμένα αντισιδηρομαγνητικά και δεν φέρουν γεφυροποιούς υποκαταστάτες. Ιστιδίνες κατέχουν τις τρεις θέσεις ένταξης του  $Cu_B$  καθώς επίσης και την πέμπτη θέση ένταξης του αιμικού-σιδήρου, κείμενη απέναντι από το ιόν του χαλκού. Το σύμπλεγμα  $Cu_B$ -αίμης είναι η θέση δέσμευσης του οξυγόνου. Αυτά τα συμπλέγματα  $Cu_B$ -αίμης και τα τριπυρηνικά κέντρα των μπλε οξειδασών είναι οι μόνες γνωστές δομές ικανές να ανάγουν το οξυγόνο σε νερό μέσω μιας τεσσάρων-ηλεκτρονίων αναγωγής.

#### 1.1.4 Πρωτεΐνες Χαλκού.

Οι πρωτεΐνες του χαλκού απατούνται και στα τρία βασίλεια της ζωής: τα αρχαία, τα βακτήρια και τα ευκάρυα καταλύοντας αντιδράσεις που απαιτούν υψηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής. Οι μη-καταλυτικές πρωτεΐνες του χαλκού είναι πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων ή οξυγόνου. Τα ένζυμα του χαλκού μπορεί να διαιρεθούν σε οξειδάσες, μόνο- και δυ-οξυγενάσες και σε ένζυμα αποικοδόμησης του υπεροξειδίου. Ο τύπος των κέντρων χαλκού ποικίλει ανάλογα με την λειτουργία τους και η λειτουργία των κέντρων χαλκού ποικίλει ανάλογα με το περιβάλλον του. Στα βιολογικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού υπάρχουν ένζυμα που χρησιμοποιούν το χαλκό ως συνένζυμο: (Πίνακας 4) [5,6].

**Πίνακας 4:** Μερικά ένζυμα στον άνθρωπο που χρησιμοποιούν το χαλκό ως συνένζυμο. [6]

Ένζυμο	Λειτουργία	Συνέπειες ανεπαρκούς λειτουργίας
Οξειδάσες κυτοχρώματος c	Μεταφορά ηλεκτρονίων	Ανωμαλίες στον εγκέφαλο, υποθερμία, μυϊκοί αδυναμία.
β-υδροξυλάση ντοπαμίνης	Βιοσύνθεση των κατεχολαμινών	Νευρολογικές ανωμαλίες
Λυσυλοξειδάση	Διασύνδεση κολλαγόνου και ελαστίνης	Κακώς συνδεδεμένοι ιστοί
Υπεροξειδική δισμουτάση	Άμυνα κατά των ελεύθερων ριζών	Ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες
Τυροσινάση	Σχηματισμός της μελανίνης	Υποχρωματισμός
Καιρουλοπλασμίνη	Μεταφορά χαλκού και σιδήρου.	Συσσώρευση σιδήρου και νευρολογικές διαταραχές.
Άγνωστα ένζυμα	Διασύνδεση κερατίνης	Ανωμαλίες στο τριχωτό της κεφαλής

A) Οι οξειδάσες κυτοχρώματος c είναι μια ετερογενής ομάδα ενζύμων, που αναλόγως του οργανισμού από τον οποίο προέρχονται από τρεις (προκαρυώτες) έως



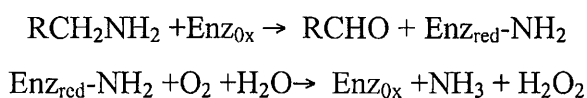
δεκατρείς (θηλαστικά) διαφορετικές υπομονάδες. Οι διάφορες οξειδάσες έχουν τρεις ή τέσσερις ενεργές-οξειδοαναγωγικές ομάδες, που διευθετούνται σε ακολουθία, ώστε να μεταφέρουν τα τέσσερα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c στο οξυγόνο. Αυτές οι ενεργές-οξειδοαναγωγικές ομάδες είναι κυτοχρώματα (a, b, c) και κέντρα χαλκού (Cu<sub>A</sub>, Cu<sub>B</sub>) και όλα εντοπίζονται στις υπομονάδες I και II. Οι οξειδάσες κυτοχρώματος c κατατάσσονται ανάλογα με την ομάδα αίμης που χρησιμοποιούν. (Πίνακας 5)

Αίμη a και Cu<sub>A</sub> είναι κέντρα ενός απλού-ηλεκτρονίου, ενώ το αντιοξειδοαναγωγικά συζευγμένο ζευγάρι a<sub>3</sub>Cu<sub>B</sub> είναι ένα κέντρο δυο-ηλεκτρονίων. Στον τύπο αα<sub>3</sub> οξειδάσης κυτοχρώματος c, τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c αρχικά μεταφέρονται στο κέντρο Cu<sub>A</sub>. Έπειτα μεταφέρονται μέσω μιας αίμης a στο διπυρηνικό κέντρο αίμης a<sub>3</sub>Cu<sub>B</sub>, από όπου τελικά παρέχονται στο οξυγόνο. Ο τύπος cbb<sub>3</sub> οξειδάσης κυτοχρώματος c δεν έχει καθόλου κέντρο Cu<sub>A</sub>. Αυτό αποσπά ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c μέσω μιας αίμης c, που τα μεταφέρει μέσω μιας αίμης b στο διπυρηνικό κέντρο αίμης b<sub>3</sub>Cu<sub>B</sub>. Η οξειδάση κυτοχρώματος c έχει πολύ υψηλή συγγένεια προς το οξυγόνο και εκφράζεται κάτω από αναερόβιες ή μικροαερόβιες συνθήκες.

**Πίνακας 5:** Διάφοροι τύποι οξειδάσης κυτοχρώματος c.

Τύπος	Αίμη/ χαλκός υπομονάδα I	Αίμη/ χαλκός υπομονάδα II
cbb <sub>3</sub>	bb <sub>3</sub> /Cu <sub>B</sub>	c/-
αα <sub>3</sub>	αα <sub>3</sub> /Cu <sub>B</sub>	-/Cu <sub>A</sub>
σαα <sub>3</sub>	αα <sub>3</sub> /Cu <sub>B</sub>	c/Cu <sub>A</sub>
βα <sub>3</sub>	βα <sub>3</sub> /Cu <sub>B</sub>	-/Cu <sub>A</sub>

B) Η λυσυλοξειδάση είναι μέλος των αμινοξειδασών και παρουσιάζει μικρή ομολογία στη δομή ή στην αμινοξική ακολουθία με τις άλλες μη-μπλε-οξειδάσες. Το φυσικό ένζυμο είναι ένα μονομερές των 32kD. Η φυσιολογική της λειτουργία είναι η διασύνδεση των δομικών πρωτεϊνών κολλαγόνου και ελαστίνης. Αυτό κατορθώνεται με οξείδωση μιας πεπτιδο-λυσίνης σε μια αμινο-αδιπικο-ημι-αλδεΐδη: το υπόστρωμα οξειδώνεται ανάγοντας το ένζυμο. Το ένζυμο αναγεννάται στο επόμενο στάδιο:



Απομάκρυνση του ενταγμένου χαλκού καταλυτικά απενεργοποιεί την λυσυλοξειδάση. Δίαιτα με χαμηλό ποσοστό χαλκού, οδηγεί σε ελάττωση της διασύνδεσης κολλαγόνου και ελαστίνης και έχει σαν αποτέλεσμα κακώς συνδεδεμένους ιστούς. Έχει προταθεί και μια επιπλέον λειτουργία της λυσυλοξειδάσης, η συμμετοχή στην καταστολή όγκων. Όπως και στις άλλες αμινοξειδάσες, η TOPA κινόνη ( 2,4,5-τρι-υδροξυ-φαινυλαλανιν-κινόνη) χρησιμοποιείται σαν συμπαράγοντας. Ο καταλυτικός κύκλος λειτουργεί όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Η λυσυλοξειδάση συντίθεται σε μια πρόδρομη μορφή των 47 kD. Μετά-αποκωδικοποιημένη πορεία οδηγεί στην απομάκρυνση ενός πεπτιδίου 21 αμινοξέων, που ακολουθείται από ένα τριπεπτίδιο της θέσης 62-64 και τελικά από ένα διπεπτίδιο της θέσης 134-135. Αυτό το τελευταίο διπεπτίδιο περιέχει το μόνο αμινοξύ που διατηρείται και είναι γλυκοζυλιωμένο ( Asp 91 στα ποντίκια και Asp 97 στους ανθρώπους). Η γλυκοζυλίωση παίζει ρόλο στην μετά-αποκωδικοποιημένη πορεία και μεταφορά της πρωτεΐνης από τα σωματίδια Golgi στο εξωκυτταρικό υλικό.

Η περιοχή μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων 284 και 301 της λυσυλοξειδάσης διατηρείται σε ανθρώπους και ποντίκια. Αυτή περιέχει τέσσερις ιστιδίνες ( 289, 292, 294 και 296) από τις οποίες το λιγότερο τρεις συμμετέχουν στη σφαίρα ένταξης του χαλκού, σχηματίζοντας ένα τετραγωνικά παραμορφωμένο οκτάεδρο.

Γ) Η β-υδροξυλάση ντοπαμίνης είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που υδροξυλιώνει την ντοπαμίνη σε νορεπινεφρίνη κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών. Το ολοένζυμο είναι ένα τετραμερές μοριακής μάζας 290 kD αποτελούμενο από δύο διμερή συζευγμένα δισουλφίδια που είναι αντίστροφα προσανατολισμένα μεταξύ τους. Η β-υδροξυλάση ντοπαμίνης βρίσκεται σε μια διαλυτή και μια συνδεδεμένη με μια μεμβράνη μορφή, που και οι δυο αποκωδικοποιούνται από το ίδιο mRNA. Αποδιάταξη του ενζύμου οδηγεί σε μονομερή μοριακής μάζας περίπου 72-72 ή 75-77 kD. Ενώ τα ελαφρότερα μονομερή μπορούν να βρίσκονται και στις δυο μορφές, τα βαρύτερα βρίσκονται μόνο στο ένζυμο που είναι συνδεδεμένο με την μεμβράνη.

Αυτός ο τελευταίος τύπος είναι μάλλον ο πρόδρομος του διαλυτού ενζύμου. Απελευθέρωση του θα μπορούσε να γίνει με απομάκρυνση του από την ακίνητη μεμβράνη με σπάσιμο ενός μη ομοιοπολικού φωσφολιπιδικού δεσμού που μάλλον συνεργάζεται κρατώντας το ένζυμο συνδεδεμένο με την μεμβράνη. Αυτές οι διαφορές στο βάρος των δύο μορφών του ενζύμου μπορούν ωστόσο να οφείλονται σε διαφορές

στο βαθμό γλυκοζυλίωσης και όχι στα μήκη των πεπτιδικών τους αλυσίδων, μια εξήγηση που ενισχύεται από το γεγονός ότι τα μονομερή των 72-73 kD υπάρχουν και στις δυο μορφές.

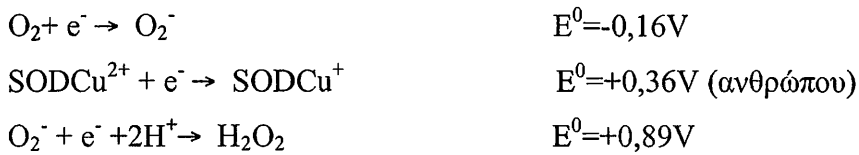
Κάθε υπομονάδα του ενζύμου περιέχει ένα ενεργό κέντρο με δυο άτομα χαλκού, που έχουν διαφορετικούς υποκαταστάτες και σχηματίζουν δυο μονοπυρηνικά κέντρα. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες που έχουν δυο ιόντα χαλκού ανά ενεργό κέντρο σχηματίζοντας διπυρηνικά κέντρα στα οποία τα ιόντα χαλκού δεν είναι απομονωμένα μεταξύ τους. Αν η β-υδροξυλάση ντοπαμίνης είχε ένα διπυρηνικό κέντρο, τα δύο ιόντα χαλκού θα ήταν αντισιδηρομαγνητικά συζευγμένα και έτσι ανενεργά στο EPR. Αυτό ωστόσο δεν συμβαίνει. Έχει προταθεί μια δομή, βασισμένη σε διάφορες φασματοσκοπικές μελέτες, στην οποία το πρώτο άτομο χαλκού ( $Cu_A$ ) έχει τρεις και το δεύτερο άτομο χαλκού ( $Cu_B$ ) δυο ιστιδινικούς υποκαταστάτες. Το ανοιγμένο κέντρο  $Cu_A$  εντάσσεται με έναν τέταρτο υποκαταστάτη, μια μεθειονίνη που αντικαθιστάται από ένα μόριο νερού κατά την οξειδωση. Το κέντρο  $Cu_A$  έχει τέσσερις υποκαταστάτες και στις δυο οξειδωτικές καταστάσεις. Ο τρίτος υποκαταστάτης του  $Cu_B$ , που δεν ανταλλάσσεται κατά την οξειδοαναγωγή δεν έχει ακόμη προσδιορισθεί. Η τέταρτη θέση ένταξης του οξειδωμένου κέντρου  $Cu_B$  κατέχεται από ένα μόριο νερού, ενώ κατά την αναγωγή, χρησιμοποιείται για την σύνδεση ενός μορίου οξυγόνου. Η οξειδωμένη μορφή ανάγεται από ασκορβικό οξύ.

Η δομική αλληλουχία που βρίσκεται επίσης και σε άλλα ένζυμα χαλκού, ανακαλύφθηκε ψάχνοντας για τους πιθανούς υποκαταστάτες του χαλκού στην β-υδροξυλάση ντοπαμίνης. Αυτή η δομική αλληλουχία  $HXH^*$  ( $H=His$  ή  $Met$ ), κανονικά συμμετέχει στη δέσμευσή του χαλκού. Συγκεκριμένα ενώνει τα δύο κέντρα χαλκού Τύπου 2. Η περιοχή που διατηρείται στην β-υδροξυλάση ντοπαμίνης είναι η V(248)HHM. Η His 249 και η Met 251 είναι υποκαταστάτες του  $Cu_A$ , ενώ η His 250 ανήκει στους υποκαταστάτες  $Cu_B$ . Διαχωρίζοντας έτσι τα δυο άτομα χαλκού, αυτή η μορφή διευθέτησης των υποκαταστατών της πεπτιδικής αλυσίδας καθιστά δυνατή τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των δυο κέντρων χαλκού.

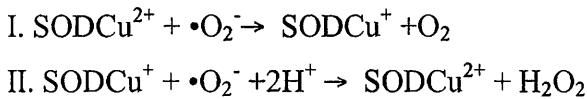
Δ) Η υπεροξειδική δισμουτάση ( $Cu,Zn$ -SOD) μπορεί να απαντηθεί σε όλους σχεδόν τους τύπους των ευκαρυωτικών οργανισμών ιστών. Η ενδοκυτταρική μορφή της  $Cu,Zn$ -SOD στα βοοειδή είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο με υπομονάδες μοριακής μάζας 16kD και μήκος 151 αμινοξέων η κάθε μια. Κάθε υπομονάδα έχει ένα ενεργό κέντρο

που περιέχει ένα ιόν  $\text{Cu}^{+2}$  και ένα ιόν  $\text{Zn}^{+2}$ . Ενώ η αμινοξική ακολουθία της εξωκυτταρικής, τετραμερούς Cu,Zn-SOD είναι εν μέρει ομόλογη με εκείνη της ενδοκυτταρικής μορφής, τα δύο ένζυμα αποκωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Επιπλέον της διμερούς και τετραμερούς μορφής, υπάρχει και μονομερής Cu,Zn-SOD επίσης. Η διμερής Cu,Zn-SOD είναι πιο σταθερή και παρουσιάζει επτά φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από τον μονομερή τύπο.

Η αποδεδειγμένη φυσιολογική λειτουργία της (Cu,Zn-SOD) είναι η μετατροπή των υπεροξειδικών ριζών ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) σε οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ) και υπεροξείδιο ( $\text{O}_2^{2-}$ ). Το δυναμικό οξειδοαναγωγής της (Cu,Zn-SOD) βρίσκεται μεταξύ εκείνων των ημιαντιδράσεων, έτσι μπορεί να δράσει εναλλακτικά μεταφέροντας ηλεκτρόνια ή αφαιρώντας ηλεκτρόνια από μια υπεροξειδική ρίζα.



Επομένως υπάρχουν δυο απλές αντιδράσεις για την μετατροπή της υπεροξειδικής ρίζας:



Το ενεργό κέντρο της Cu,Zn-SOD βρίσκεται στο τέλος ενός καναλιού τα τοιχώματα του οποίου αποτελούνται από φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα που διατηρούνται. Η υπεροξειδική ρίζα δεν φθάνει στο ενεργό κέντρο μέσω διάχυσης, αυτή κατευθύνεται εκεί απ' τα κατάλοιπα. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται κυριολεκτικά θαμμένο κάτω από ένα δομικό σύμπλεγμα που αποτελείται από οκτώ αντιπαράλληλους β-κλώνους και τρεις εξωτερικούς βρόγχους.

Το ενεργό κέντρο της (Cu,Zn-SOD) είναι μοναδικό μεταξύ των ενζύμων χαλκού στο ότι δεν περιέχει μόνο ένα ιόν χαλκού Τύπου 2 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) αλλά και ένα άλλο μεταλλικό ιόν επίσης ( $\text{Zn}^{+2}$ ). Το ιόν  $\text{Cu}^{2+}$  εντάσσεται με την His46, His48, His63 και His120 έχοντας παραμορφωμένη επίπεδη τετραγωνική διαμόρφωση. Η γεωμετρία γύρω από το ιόν  $\text{Zn}^{+2}$  είναι παραμορφωμένη τετραεδρική που δημιουργείται από τρεις ιστιδίνες και ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος : His63, His71, His80 και Asp83. Ο γεφυρωμένος υποκαταστάτης His63 βρίσκεται σε μια ευθεία γραμμή μεταξύ  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Zn}^{+2}$ , που βρίσκονται σε απόσταση 6 Å μεταξύ τους. Κατά την κατάλυση ο χαλκός είναι ο

οξειδοαναγωγικός εταίρος της υπεροξειδικής ρίζας, μιας και η οξειδωτική κατάσταση του  $Zn^{2+}$  δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου. Το ιόν  $Zn^{+2}$  δεν φαίνεται να εμπλέκεται άμεσα στην κατάλυση.

Ε) Η τυροσινάση βρίσκεται σε όλους σχεδόν τους τύπους των οργανισμών, από βακτήρια έως θηλαστικά. Είναι υπεύθυνη για την παραγωγή μελανίνης και σχετικών χρωμάτων. Καταλύει την ο-υδροξυλίωση των μονοφαινόλων σε ο-διφαινόλες, καθώς και την δύο-ηλεκτρονίων οξείδωση των διφαινόλων σε ο-κινόνες.

Τα ενεργά κέντρα τυροσινάσης και αιμοκυανινών μοιάζουν πολύ μεταξύ τους, αν και εκπληρώνουν πολύ διαφορετικές λειτουργίες. Και στις δυο πρωτεΐνες ένα διπυρηνικό κέντρο εντάσσεται με έξι ιστιδίνες, αφήνοντας δυο θέσεις συναρμογής ελεύθερες για να δεσμευθεί το οξυγόνο. Η κύρια διαφορά των ενεργών κέντρων των δυο πρωτεϊνών είναι η θέση τους μέσα στην πρωτεΐνη. Στην αιμοκυανίνη των αρθρόποδων, το κέντρο χαλκού εντοπίζεται στην περιοχή δύο της κάθε υπομονάδας. Η περιοχή τρία συγκρατείται πάνω από το κέντρο χαλκού, κάνοντας το απροσπέλαστο σε υποστρώματα μεγαλύτερα του οξυγόνου. Ένα C-τελικό πεπτίδιο 200 αμινοξέων απομακρύνεται μέσω μιας μετά-την αποκωδικοποίηση πορείας. Αυτό το πεπτίδιο είναι ισοδύναμο της περιοχής τρία, της αιμοκυανίνης των αρθρόποδων. Μετά την απομάκρυνση του, η θέση δέσμευσης οξυγόνου της τυροσινάσης είναι ελεύθερα προσπελάσιμη σε διαλύτη και υποστρώματα, καθιστώντας έτσι δυνατή την μετατροπή τους. Η αιμοκυανίνη των μαλακίων έχει και αυτή ένα C τελικό πεπτίδιο, ισοδύναμο της περιοχής τρία της αιμοκυανίνης των αρθρόποδων, αν και μικρότερο. Το γεγονός ότι αυτό το προστατευτικό πεπτίδιο είναι μικρότερο φαίνεται να κάνει τη θέση δέσμευσης οξυγόνου αυτών των αιμοκυανινών προσβάσιμη σε υπόστρωμα.

ΣΤ) Η καιρουλοπλασμίνη παίζει σπουδαίο ρόλο στην μεταφορά του χαλκού στους ανθρώπινους ιστούς. Η μεταφορά αυτή πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: ο χαλκός μεταφέρεται από το έντερο στο συκώτι και στο νεφρό και έπειτα μέσω της καιρουλοπλασμίνης απομακρύνεται από το συκώτι με προορισμό τα άλλα όργανα. Στον άνθρωπο το συκώτι και το νεφρό έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση χαλκού (4-6 και 7-12μg/g αντίστοιχα) και αποτελούν τις περιοχές σύνθεσης της καιρουλοπλασμίνης. [7]

## 1.1.5 Εσωτερική δομή και οργάνωση των πρωτεϊνών χαλκού.

### 1.1.5.1 Πρωτοταγής δομή

Οι πρωτεΐνες συντίθενται στο ριβόσωμα. Η πρωτοταγής αλληλουχία των αμινοξέων περιέχει συνεπώς όλες τις βασικές πληροφορίες που απαιτούνται για την επακόλουθη αναδιευθέτηση της διαμόρφωσης, οδηγώντας σε δομές που προσδίδουν βιολογική δράση στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Επειδή η αλληλουχία των αμινοξέων είναι η κυριότερη ιδιότητα της πρωτεΐνης, κατ' αρχήν είναι πιθανό να υπολογισθούν οι ανώτερες δομές μιας πρωτεΐνης από την πρωτοταγή αλληλουχία. Παρά τις πολλές προσπάθειες αυτό δεν έχει γίνει ακόμα εφικτό. Σε μερικές περιπτώσεις η πρωτοταγής δομή μπορεί να συσχετισθεί με λειτουργία.

Το κυτόχρωμα c των σπονδυλωτών περιέχει 100 αμινοξέα, από τα οποία μόνο τα 36 διατηρούνται πλήρως σε όλα τα είδη. Αυτό περιλαμβάνει μια πλήρη αλληλουχία από 11 κατάλοιπα στις θέσεις 70-80 (-NPKKYIPGTKM-). Παρά το μεγάλο βαθμό της χημικής μεταβλητότητας, η πρωτεΐνη εκπληρώνει την ίδια λειτουργία σε όλα τα είδη. Ο πίνακας 6 δίνει λεπτομέρειες για το βαθμό διατήρησης των πιο σπάνιων αμινοξέων που πιστεύεται ότι είναι απαραίτητα στη δομή και τη λειτουργία του κυτοχρώματος c.

**Πίνακας 6:** Διατήρηση των πιο σπάνιων αμινοξέων στο κυτόχρωμα c.

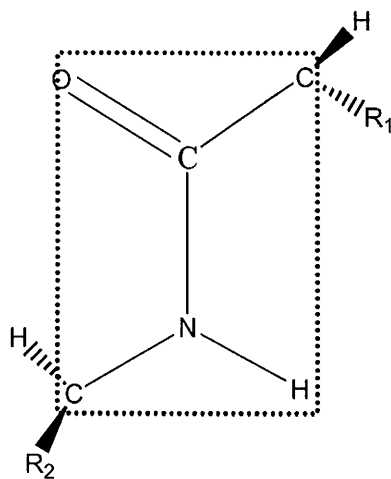
Αμινοξύ	Θέση (εις)
Φαινυλαλανίνη: Phe	10,82
Κυστεΐνη: Cys	14,17
Ιστιδίνη: His	18
Λυσίνη: Lys	27,72,73,79,87
Προλίνη: Pro	30,71,76
Τυροσίνη: Tyr	48,67,74
Τρυπτοφάνη: Trp	59

Όσο περισσότερες αλληλουχίες γίνονται γνωστές στη βιβλιογραφία, μπορεί να αναζητηθούν μοτίβα αλληλουχίας και δομής και αναλογίες / ομοιότητες που έχουν καθιερωθεί που μπορεί στο μέλλον να βοηθήσουν στο σχεδιασμό μεταλλαγμένων ή νέων πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο, ομάδες πρωτεϊνών μπορούν να αναγνωρισθούν ότι έχουν παρόμοιες δομές αλλά τελείως διαφορετικές λειτουργίες και το αντίστροφο. Η βάση δεδομένων μπορεί επίσης να ελεγχθεί για μοτίβα αλληλουχιών που έχουν διαχωριστεί από τις ομόλογες αλληλουχίες. Τα μοτίβα αλληλουχιών που σχετίζονται με

τη δομή, είναι μοτίβα αλληλουχιών που σχετίζονται με αξιοπιστία με τις κοινές δομές. Η έρευνα μπορεί να εκτελεσθεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, π.χ., με την αλληλουχία, με τις γωνίες στρέψης, την επιδεκτικότητα του διαλύτη, τις τεταρτοταγείς αλληλεπιδράσεις, ή τις δισουλφιδικές γέφυρες. [8]

### 1.1.5.2 Δευτεροταγής δομή

Σε σύγκριση με τις ενέργειες του ομοιοπολικού δεσμού στην πρωτοταγή δομή ( $> 200$  kJ/mol), η δευτεροταγής δομή βασίζεται σε ασθενείς αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου (10 kJ/mol). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προέρχονται από τη στεreoχημεία του πεπτιδικού δεσμού. Τα έξι άτομα μέσα στο περίγραμμα (Σχήμα 2) βρίσκονται σε ένα επίπεδο γιατί ο δεσμός C-N έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού. Είναι δυνατόν να παρουσιάζεται η περιστροφή στους C-C και C-N δεσμούς και τα διαδοχικά αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα χαρακτηρίζονται από ένα ζευγάρι στέψιμων γωνιών  $\phi$  και  $\psi$  (Σχήμα 3). Κατά συμφωνία  $\phi=0$  όταν τα τέσσερα άτομα C-N-C $_{\alpha}$ -C βρίσκονται σε ένα επίπεδο και  $\psi=0$  όταν N-C $_{\alpha}$ -C-N είναι ομοεπίπεδα. Εάν τα διαδοχικά κατάλοιπα πάρουν παρόμοιους προσανατολισμούς το ένα προς το άλλο (ίδιες τιμές  $\phi$  και  $\psi$ ), προκύπτει μια συμμετρική δομή. Τέτοια συμμετρία είναι πιο πιθανή σε περιπτώσεις, που η αλληλουχία των αμινοξέων δείχνει επαναλαμβανόμενα μοτίβα.



Σχήμα 2: Στεreoχημεία του *trans* πεπτιδικού δεσμού των πρωτεϊνών.



**Σχήμα 3:** Διέδρες γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  που καθορίζουν τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών.

#### 1.5.2.1 Η $\alpha$ -έλικα.

Πέρα από τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, η  $\alpha$ -έλικα είναι η μορφή της χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας. Η  $\alpha$  έλικα περιγράφεται με το δείκτη συμμετρίας  $n_m$  όπου  $n$  είναι ο αριθμός των καταλοίπων που διαμορφώνουν μια τέλεια επανάληψη μετά από τις στροφές. Για την  $\alpha$  έλικα,  $180^\circ = 3.6$  πεπτιδικοί δεσμοί ανα στροφή. Η έλικα είναι δεξιόστροφη με ύψος 0,54nm και ένα μέσου όρου ύψος ανά κατάλοιπο 0,15nm. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ των NH ομάδων και των CO ομάδων στο τέταρτο κατά σειρά κατάλοιπο κατά μήκος της αλυσίδας. Οι δεσμοί υδρογόνου είναι σχεδόν παράλληλοι με τον άξονα της έλικας. Αυτό δίνει μέγιστη δύναμη στο δεσμό και μακροσκοπική ελαστικότητα. Οι ενδογενείς σταθεροποιητικές δυνάμεις μπορούν να ενισχυθούν ή να ελαττωθούν από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Η προλίνη και η υδροξυπρολίνη είναι ανίκανες να συμπεριληφθούν στη έλικα επειδή δεν περιέχουν NH ομάδες. Η γλυκίνη επίσης, θεωρείται ότι είναι καταστροφική για τη δομή της  $\alpha$ -έλικας.

#### 1.5.2.2 Το $\beta$ -πτυχωτό φύλλο.

Άλλη μια μορφή υψηλής συμμετρίας είναι η επονομαζόμενη  $\beta$ -δομή ή  $\beta$ -πτυχωτή δομή, που παίρνουν οι πεπτιδικές αλυσίδες όταν δεν μπορούν εύκολα να σχηματίσουν  $\alpha$  έλικα. Είναι μια εκτενής πτυχωτή δομή με  $n_m=2$  στην οποία εναλλασσόμενες πλευρικές αλυσίδες προβάλλονται πάνω και κάτω από τον άξονα της αλυσίδας αντίστοιχα. Οι αλυσίδες συνδέονται πλευρικά με δεσμούς υδρογόνου για να σχηματίσουν ελάσματα. Δυο πιθανές αλληλεπιδράσεις με γειτονικές αλυσίδες είναι δυνατές, αυτές που κατευθύνονται παράλληλα ή όχι.

#### 1.1.5.3 Μη δομικά στοιχεία.

Ο περιοχές βρόχοι, αναφέρονται επίσης και ως ανάστροφες σειρές, συνδέουν κανονική έλικα και  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα. Στις περισσότερες πρωτεΐνες, οι βρόχοι αντιστοιχούν σε περισσότερες από τριάντα τις εκατό της δομής. Βρίσκονται κυρίως

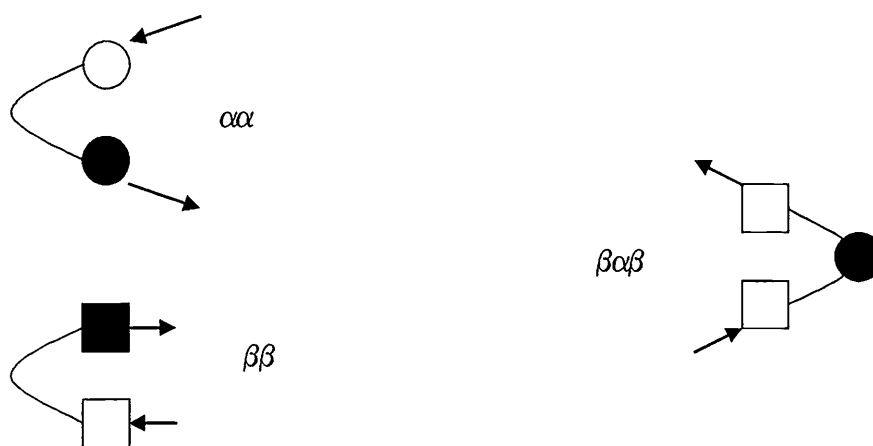


στην επιφάνεια της πρωτεΐνης είναι ελαστικές και αποτελούν σημεία δέσμευσης και αναγνώρισης όπως π.χ. στις ανοσοσφαιρίνες και στις DNA-δεσμευμένες πρωτεΐνες. Οι βρόχοι μπορεί να είναι πολύ μικροί, ακόμη ενός κατάλοιπου ή εκτεταμένοι μιας σειράς καταλοίπων.

#### **1.1.5.4 Τριτοταγής Δομή.**

Η τριτοταγής δομή είναι η διάταξη στο χώρο διαφόρων ταξινομημένων περιοχών με στενή σχέση μεταξύ τους. Είναι επίσης και η βάση της φυσικής ή λειτουργικής κατάστασης μιας πρωτεΐνης *in vivo*. Οι αλληλεπιδράσεις που διατηρούν τις τριτοταγείς δομές είναι ασθενείς (<5 kJ/mol) (εκτός από τις περιπτώσεις που εμπλέκονται δισουλφιδικοί δεσμοί), μικρού εύρους και ευαίσθητες σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως πίεση, θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύ και η σύσταση του διαλύτη. Γι αυτό η τριτοταγής δομή είναι ευμετάβλητη και εύκολα καταστρέφεται.

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για καταγραφή των γνωστών τριτοταγών δομών με σκοπό να υπολογισθεί η δημιουργία τους από την πρωτοταγή αλληλουχία. Οι τριτοταγείς δομές μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με την αλληλουχία δευτεροταγών δομών στην πεπτιδική αλυσίδα, όπως φαίνεται στο σχήμα 4 όπου οι  $\alpha$  έλικες αναπαριστώνται με κύκλους και οι  $\beta$ -δομές με τετράγωνα. Τα δομικά στοιχεία συνδέονται με βρόχους. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της πεπτιδικής αλυσίδας από το άμινο- προς το καρβόξυ-άκρο. Έχειδειχθεί ότι αυτά τα δομικά στοιχεία μορφοποιούνται κατά τη διαδικασία αναδίπλωσης. Διακρίνουμε ανάμεσα στις αλληλουχίες  $\alpha$  έλικα, αλληλουχίες  $\beta$ -δομής και εναλλασσομένων  $\alpha$ -και  $\beta$ - δομών. Σε όλες τις  $\alpha$ - ή όλες τις  $\beta$ -δομές, οι δομικές περιοχές είναι αντιπαράλληλες. Στις  $\alpha/\beta$ -δομές, τα  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα τείνουν να βρίσκονται παράλληλα το ένα με το άλλο, διαχωριζόμενα από τις  $\alpha$ -έλικες που κατευθύνονται στην αντίθετη κατεύθυνση.



**Σχήμα 4:** Ταξινόμηση τριτοταγών δομών σύμφωνα με τις αλληλουχίες της δευτεροταγούς δομής. [9α]

Η σχέση ανάμεσα στην πρωτοταγή αλληλουχία και την τελική αναδιπλωμένη τριτοταγή δομή έχει απολύτως τεκμηριωθεί, αλλά συχνά η πρωτοταγής δομή, όταν αναδιπλώνεται σε α-έλικα, δίνει ένα κύλινδρο με υδρόφοβες επιφάνειες που χρησιμεύουν ως θέσεις έναρξης κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης ή συγκρότησης. [9α]

### 1.1.6. Δομική σταθερότητα των πρωτεϊνών.

Η σταθερότητα της πρωτεΐνης δηλαδή η χρησιμότητα της σαν ένα βιολογικά ενεργό μόριο εξαρτάται από το συγκεκριμένο περιβάλλον και από την έκθεση σε συνθήκες που μπορούν να προωθήσουν χημική αλλοίωση ή δομικές αλλαγές. [8]

#### 1.1.6.1 Σταθερότητα *in vivo*.

Κάτω από *in vivo* συνθήκες, η σταθερότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται κυρίως από τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Οι χρόνοι ζωής της πρωτεΐνης ποικίλουν από χιλιοστά του δευτερολέπτου μέχρι χρόνια. Πέρα από τους φυσιολογικούς λόγους, *in vivo* σταθερότητα είναι σημαντική στη μεταφορά των φαρμάκων και στη στόχευση. Έρευνες δεδομένων αποκαλύπτουν ότι συγκεκριμένες ακολουθίες (PEST: Προλίνη-Γλουταμινικό οξύ-Σερίνη -Θρεονίνη) σχετίζονται με σύντομους και μεγάλους χρόνους ημιζωής, αντιστοίχως.

#### 1.1.6.2 Σταθερότητα *in vitro*.

Η σταθερότητα μιας απομονωμένης πρωτεΐνης σε διάλυμα, δηλαδή μακριά από το φυσικό περιβάλλον, είναι περιορισμένη λόγω επιβλαβών χημικών αντιδράσεων και / ή δομικών αλλαγών (μετουσίωση). Η αποσταθεροποίηση μπορεί να προκληθεί από

χημικές αντιδράσεις και η περίπτωση αυτή είναι μόνιμη ή μπορεί να είναι αποτέλεσμα δομικών αλλαγών που προκαλούνται από αλλαγές στο διαλύτη που περιβάλλει την πρωτεΐνη. Στην τελευταία περίπτωση μπορεί να είναι μόνιμη ή προσωρινή. Η προσωρινή αποσταθεροποίηση συχνά αναφέρεται ως μετουσίωση και αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται πρακτικά κατά την απομόνωση και καθορισμό των πρωτεϊνών. Η μόνιμη αποσταθεροποίηση είναι αμετάκλητα επιβλαβής επειδή προκαλεί αδρανοποίηση. Στον πίνακα 7 φαίνονται με περισσότερες λεπτομέρειες οι μηχανισμοί χημικής απενεργοποίησης και οι συνθήκες που προάγουν τις διάφορες αντιδράσεις.

#### **1.1.6.3 Δομική σταθερότητα σε διάλυμα.**

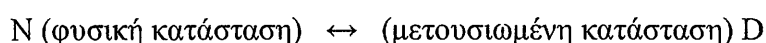
Οι πρωτεΐνες σε διάλυμα μπορούν να απενεργοποιηθούν από αλλαγές στην τριτοταγή τους και σε ανώτερες δομές. Τέτοιες αλλαγές μπορούν, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να αντιστραφούν και η πρωτεΐνη να ανακτήσει τη δράση της. Η δομική αποσταθεροποίηση προκαλείται από τις ακόλουθες περιβαλλοντικές αλλαγές: ακραίες τιμές pH, υδρόφοβη συσσωμάτωση (π.χ δράση απορρυπαντικού), πίεση, διατμητικές δυνάμεις, θερμοκρασία, ρόφηση στις διεπιφάνειες, δέσμευση με μέταλλο και επιπτώσεις διαλύτη, λυοτροπισμός (εναλάτωση).

Εφόσον η διαμόρφωση της πρωτεΐνης και η δράση της είναι συνδεδεμένες και είναι πολύ ευαίσθητες στη φύση του περιβάλλοντος διαλύτη, τότε μερικές από τις παραπάνω επιπτώσεις, όταν χρησιμοποιηθούν κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν έτσι ώστε να σταθεροποιούν ή να επανενεργοποιούν τις πρωτεΐνες. Τέτοιοι σταθεροποιητικοί χειρισμοί περιλαμβάνουν: ακινητοποίηση, π.χ., σε πηκτή, σε στήλες ή μέσα στα κύτταρα, πρόσδεση από συνένζυμα / υπόστρωμα / μέταλλα, χαμηλές θερμοκρασίες, υδροφυλίωση και λυοτροπισμός.

**Πίνακας 7:** Μερικοί μηχανισμοί μη-αντιστρεπτής ανενεργοποίησης ενζύμων.

Μηχανισμός ενεργοποίησης	Συνθήκη μετουσίωσης
Συσσωμάτωση	Θέρμανση, υδροχλωρική γουανιδίνη, ουρία, SDS, ανακίνηση
Όξινη και αλκαλικά- καταλυόμενη υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού.	Ακραίες τιμές pH, Θέρμανση, πρωτεΐνάσες
Οξείδωση καταλοίπων αμινοξέων (Cys, Trp, His)	Οξυγόνο (ειδικά κατά τη διάρκεια της θέρμανσης), ελεύθερες ρίζες
Αναγωγή δεσμών -S-S-, με ανταλλαγή διαμοριακών γεφυρών -S-S-	Θέρμανση, υψηλό pH,θειόλες, δισουλφίδια
Αναγωγή δεσμών -S-S-, με διαδοχικό σχηματισμό νέων αμινοξέων ή διαμοριακές επαναδιευθετήσεις -S-S- γεφυρών.	Θέρμανση, υψηλό pH
Τροποποίηση ομάδων -SH	Ιόντα μετάλλων δισουλφίδια
Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών	Πρωτεϊνικές κινάσες.

Το απλούστερο μοντέλο χειρίζεται τη σταθερότητα της πρωτεΐνης σε δυο καταστάσεις σε δυναμική ισορροπία:



Η φυσική κατάσταση καθορίζεται μοναδικά από τους όρους της εξειδίκευσης και της βιολογικής δραστηριότητας. Εάν η λεπτομερής τριτοταγής δομή είναι γνωστή, αυτό παρέχει ακόμα μια περαιτέρω περιγραφή της N κατάστασης. Συχνά η μετουσιωμένη κατάσταση, χρησιμοποιείται στην επιστήμη των πολυμερών και αναφέρεται σε ένα μακρομόριο με τέλεια ελαστικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων. Για τις πρωτεΐνες, αυτή είναι μια υπεραπλούστευση εξαιτίας της ακαμψίας του πεπτιδικού δεσμού C-N, ο οποίος δεν επιτρέπει ολοκληρωτική ευκαμψία. Η μετουσίωση μπορεί να συνδεθεί με αλλαγές σε ένα ή περισσότερα επίπεδα δομής και μπορούν να δοκιμαστούν από ποικίλες φασματοσκοπικές και άλλες φυσικές τεχνικές. Ο πιο ευαίσθητος και ακριβής δείκτης της μετουσίωσης είναι η αλλαγή στη βιολογική δραστηριότητα. [8]

### 1.1.7.Γενικές ιδιότητες διαλυμάτων πρωτεϊνών.

Η συμπεριφορά των πρωτεϊνών σε διάλυμα καθορίζονται από:

- 1.Ενδομοριακές επιδράσεις (μέγεθος, φορτίο, διαμόρφωση)
- 2.Αλληλεπιδράσεις ενδιάλυσης
- 3.Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μακρομορίων (υπομονάδες)
4. Εξωτερικές μεταβλητές (Θερμοκρασία, πίεση, pH κοκ)

Η ενδιάλυση (ενυδάτωση) είναι επίσης ευαίσθητη στις ίδιες εξωτερικές μεταβλητές. Αλλαγές στη λειτουργία ή στη δραστηριότητα μπορούν να επηρεαστούν από αλλαγές στις περιβαλλοντικές μεταβλητές και στη σύσταση του μέσου διάλυσης. Η τεχνολογική επίδοση εξαρτάται αποφασιστικά από τη διαμόρφωση, την ενυδάτωση (δυνατότητα συγκράτησης νερού) και τη διαλυτότητα. Η βιολογική δράση συνήθως περιορίζεται από στενές φυσιολογικές κλίμακες πίεσης, θερμοκρασίας και σύστασης του μέσου. Υπάρχουν ωστόσο πολλά παραδείγματα εξελικτικής προσαρμογής σε ακραία φυσικά και χημικά περιβάλλοντα: θερμοφιλα, ψυχρόφιλα, αλόφιλα, οξεόφιλα, κοκ. Τέτοιες προσαρμογές συχνά επιτυγχάνονται μέσω μικρών αλλαγών στη σύσταση των αμινοξέων.

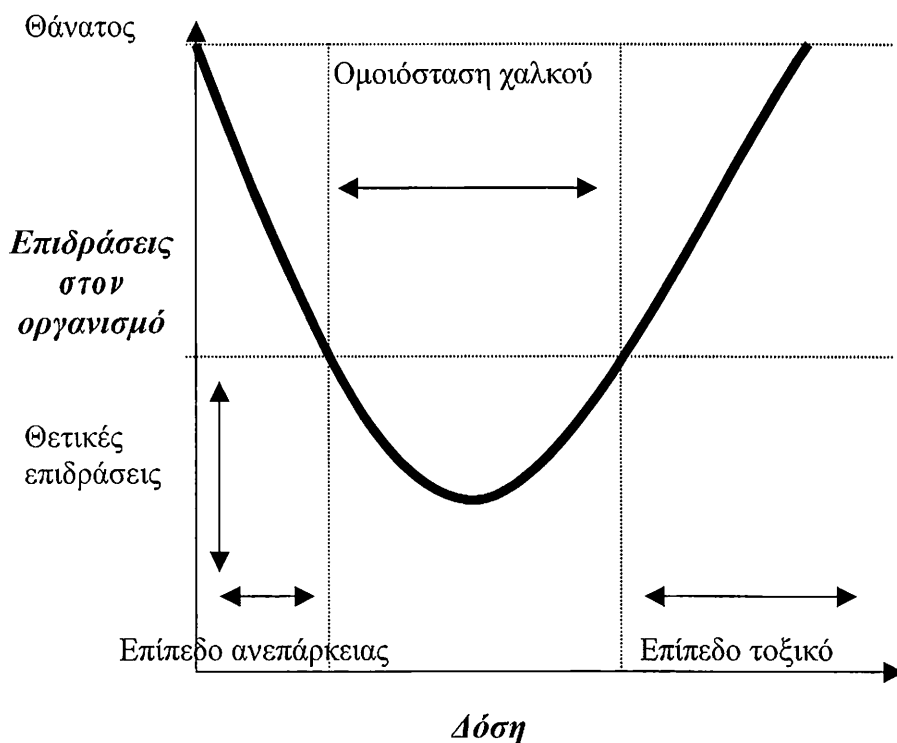
Όπως τα μακρομόρια έτσι και οι πρωτεΐνες μπορούν να χαρακτηριστούν από τη διαμόρφωση της αλυσίδας τους, όπου διαδοχικά, περιγράφονται από τις τιμές που υιοθετούνται από τις γωνίες στρέψης. Οι ιδιότητες της αλυσίδας των περισσότερων συνθετικών πολυμερών σε διάλυμα, όπως η απόσταση από άκρο σε άκρο, το μοριακό βάρος, η ακτίνα περιστροφής εκφράζονται σε σχέση με τις μέσες τιμές που μπορούν να υπολογιστούν από τις μονομερείς διαστάσεις, την ελαστικότητα των κύριων δεσμών της αλυσίδας, το βαθμό πολυμερισμού και τη φύση των πλευρικών αλυσίδων. Σε αντίθεση, οι μέθοδοι στατιστικών των πολυμερών δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε φυσικές πρωτεΐνες, γιατί οι διαμορφώσεις τους είναι σταθερές κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. [9β]

## 1.2 ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΧΑΛΚΟΥ

### 1.2.1 Γενικά

Κατά την εξέλιξη της ζωής οι ζώντες οργανισμοί προσαρμόζονται στις μεταβολές του περιβάλλοντος αναπτύσσοντας αμυντικούς μηχανισμούς.. Με την έννοια ομοιόσταση εννοούμε τις αντιδράσεις συντήρησης που κάνουν τα βιολογικά συστήματα προκειμένου να εξουδετερώσουν τις εξωτερικές μεταβολές του περιβάλλοντος. Π.χ η θερμοκρασία του σώματος μας δεν πρέπει να είναι κάτω από 35<sup>0</sup> και πάνω από 42 <sup>0</sup>C. Εάν οι εξωτερικές συνθήκες είναι διαφορετικές και υπάρχει κίνδυνος να προκαλέσουν βλάβη, τότε αναπτύσσονται μηχανισμοί διόρθωσης όπως ρίγος για να ανέβει η θερμοκρασία ή ιδρώτας για να κατέβει. Άλλα ζώα αναπτύσσουν ανάλογους μηχανισμούς όπως στρώμα λίπους ή γούνα σε ψυχρά κλίματα ή μεγάλες επιφάνειες αερισμού όπως τα αφτιά των ελεφάντων σε θερμά κλίματα. Το ίδιο συμβαίνει και με τη χημική σύσταση των βιολογικών υγρών, π.χ. απόκλιση των τιμών του χλωριούχου νατρίου από τις φυσιολογικές στο αίμα σημαίνει ότι ο οργανισμός είναι άρρωστος και αν δεν γίνουν ενέργειες διόρθωσης μπορεί να μπει σε κίνδυνο η ζωή μας.

Ο χαλκός είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για τα βιολογικά συστήματα των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών, αλλά μπορεί να γίνει τοξικός όταν η συγκέντρωση του ξεπερνάει τα φυσιολογικά επίπεδα. [10] Η διατήρηση μη-τοξικής αλλά φυσιολογικής και λειτουργικής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του χαλκού ρυθμίζεται από ομοιοστατικούς μηχανισμούς. Η βιωσιμότητα ενός βιολογικού συστήματος βρίσκεται σε συνάρτηση με την δόση χαλκού που χορηγείται σε αυτό. Η γραφική παράσταση της παραπάνω συνάρτησης είναι μια καμπύλη και απεικονίζεται στο Σχήμα 5. [11] Όπως φαίνεται από το γράφημα η ανεπάρκεια σε χαλκό αλλά και η τοξικότητα του οδηγούν στον θάνατο. Οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί σε ένα βιολογικό σύστημα είναι ικανοί να διατηρήσουν την συγκέντρωση του χαλκού σε ιδανικά επίπεδα, δηλαδή μεταξύ ανεπάρκειας και τοξικότητας, (άξονας χ, σχήμα 5) εξασφαλίζοντας την σωστή του λειτουργία (θετικές επιδράσεις, άξονας ψ).

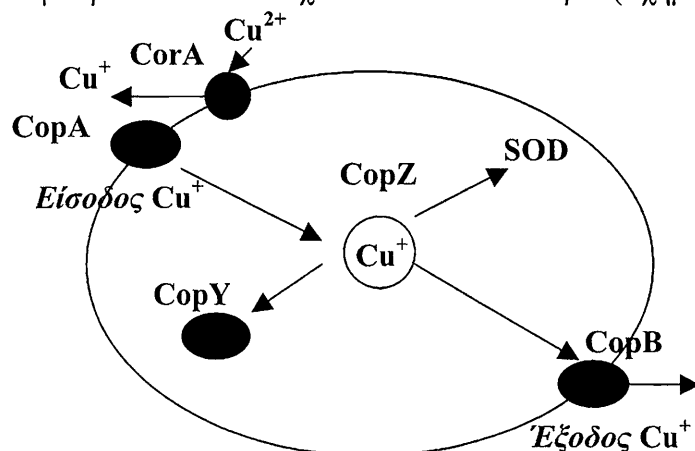


**Σχήμα 5:** Σχηματικό διάγραμμα ομοιόστασης χαλκού. Η πλήρης ανεπάρκεια καθώς και η μέγιστη τοξικότητα οδηγούν στον θάνατο κάθε βιολογικού συστήματος. [11]

### 1.2.2 Ομοιόσταση του χαλκού στα βακτήρια *Enterococcus hirae*.

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, δηλαδή δεν διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα. Το γενετικό τους υλικό (DNA) βρίσκεται κατά κανόνα σε μια συγκεκριμένη περιοχή, που ονομάζεται πυρηνική περιοχή. Συχνά διαθέτουν, επιπλέον, μικρότερα μόρια γενετικού υλικού, τα πλασμίδια. Η πλασματική τους μεμβράνη περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα και έχουν ριβοσωμάτια στα οποία γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών τους. Τα *Enterococcus hirae* είναι Gram-θετικά γαλακτικού οξέος βακτήρια και περιέχουν μια μονή κυτταρική μεμβράνη και πολύ απλό γλυκολιτικό μεταβολισμό.[12] Σε αυτά τα βακτήρια η ομοιόσταση του χαλκού ρυθμίζεται από το *cop* γονίδιο. Αυτό αποκωδικοποιεί δυο ένζυμα P-τύπου ATPάση *copA* και *copB*, τα οποία είναι ομόλογα των ανθρώπινων πρωτεϊνών P-τύπου ATPάση, τις Μένκες και Γουίλσον. Το ένζυμο *copA* είναι υπεύθυνο για την λήψη του χαλκού (I) και μεταφορά του μέσα από την κυτταρική μεμβράνη ενώ το ένζυμο *copB* απομακρύνει το χαλκό (I) από το βακτηριακό κύτταρο.[13] Το ένζυμο *copY* είναι αισθητήρας χαλκού που ρυθμίζει την υπερέκφραση των γονιδίων *copA* και *copB* ανάλογα από τα ενδοκυττάρια επίπεδα χαλκού. Η κυκλοφορία του χαλκού (I) στον ενδοκυττάριο χώρο

γίνεται με την δράση του ενζύμου copZ το οποίο είναι συνοδός χαλκού (*chaperone*).[14] Ο χαλκός (I) καταλήγει στην υπεροξειδική δισμουτάση ή στο ένζυμο copB το οποίο απομακρύνει το ιόν του χαλκού από το κύτταρο. (Σχήμα 6)



Σχήμα 6: Ομοιόσταση χαλκού στα βακτήρια *Enterococcus hirae*. [15]

### 1.2.3 Ομοιόσταση του χαλκού στους κατώτερους και ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Στους ζυμομύκητες και στον ανθρώπινο οργανισμό η ομοιόσταση του χαλκού ελέγχει την εισαγωγή του χαλκού στο κύτταρο, την διανυσματική μεταφορά του μέσα σε αυτό, την σωστή αποθήκευση του και τέλος την αποβολή του από το κύτταρο. [16]

#### 1.2.3.1 Πρόσληψη χαλκού

Ο μηχανισμός πρόσληψης χαλκού από τα κύτταρα ευκαρυωτικών οργανισμών δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως. Έχει υποστηριχθεί ότι στον ανθρώπινο οργανισμό η αλβουμίνη παίζει σπουδαίο ρόλο στην πρόσληψη του χαλκού από τα ηπατικά κύτταρα [17], ενώ η πλαστοκυανίνη μεταφέρει το χαλκό στους εξωηπατικούς ιστούς [18].

Μελέτες που έχουν γίνει στους ζυμομύκητες είναι πιο αποκαλυπτικές και ακριβείς στον προσδιορισμό των γονιδίων που αποκωδικοποιούν ένζυμα υπεύθυνα στην πρόσληψη του χαλκού μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Πρόσφατα στους ζυμομύκητες *S.cerevisiae* έχουν χαρακτηριστεί δύο ένζυμα Ctr1, Ctr3 τα οποία αποτελούνται από δύο μοτίβα ένταξης χαλκού, MXM , MXXM και CXXC, CC αντίστοιχα, (όπου M= μεθειονίνη, X= οποιοδήποτε αμινοξύ, C=κυστεΐνη ).[19-22] Ο χαλκός που δεσμεύεται σε αυτά τα ένζυμα μεταφέρεται έπειτα σε μία άλλη σειρά ενζύμων, στους συνοδούς χαλκού (π.χ Atx1), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την



κυκλοφορία του ιόντος μέσα στο κύτταρο.[23] (Σχήμα 7) Παράλληλα έχει προταθεί και ενδοκυττάριος εντοπισμός του ενζύμου Ctr1 σε συνθήκες υψηλής εξωκυτταρικής συγκέντρωσης του χαλκού. [23] Σε αυτή την περίπτωση δημιουργείται ένα επιπλέον μονοπάτι μεταφοράς του χαλκού μέσα στο κύτταρο στις πρωτεΐνες στόχους (π.χ. Ccc2p). [22]

Στον ανθρώπινο οργανισμό η εισαγωγή του χαλκού στο κύτταρο γίνεται με τη δράση του ανθρώπινου ενζύμου (hCtr1) το οποίο είναι ομόλογο του Ctr1 των ζυμομυκήτων.[21] (Σχήμα 8) Όμως υπάρχει η πιθανότητα παρουσίας πρωτεϊνών πρόσληψης χαλκού οι οποίες καθορίζονται από τον τύπο του κυττάρου αφού υπάρχει μεγάλη ποικιλία στην κατανομή της συγκέντρωσης του χαλκού στα διάφορα μέρη του ανθρώπινου οργανισμού: από 0.2μg Cu/g λιπώδους ιστού σε 12μg Cu/g νεφρού.[24] Πρόσφατες μελέτες σε μηχανισμούς γνωστών νευρογενών ασθενειών προτείνουν ότι η εισαγωγή του χαλκού σε νευρωνικά κύτταρα γίνεται μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών: τα ένζυμα αμυλόλυσης [25] και τις prion πρωτεΐνες.[26-30] Και οι δυο κατηγορίες ενζύμων συσχετίζονται άμεσα με βαριές μορφές ασθενειών, στην πρώτη τα ένζυμα αμυλόλυσης είναι υπεύθυνα για τη λύση του β-αμυλοειδούς που συσσωρεύεται στον εγκέφαλο ασθενών που πάσχουν από τη νόσο Αλτσχάιμερ, ενώ μεταλλάξεις στις prion πρωτεΐνες οδηγούν στη νόσο σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας. [31] Γενικά στις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την εισαγωγή του Cu(I) στον κυτταρικό χώρο το μοτίβο ένταξης αποτελείται από κυστεϊνικά, μεθειονικά και ιστιδινικά κατάλοιπα ενώ στις prion πρωτεΐνες ο Cu(II) εντάσσεται από ένα πλούσιο σε γλυκίνη οκταπεπτιδικό μοτίβο.[32-33]

### 1.2.3.2 Ενδοκυττάρια μεταφορά χαλκού.

Ο χαλκός είναι ένα βασικό στοιχείο πολλών σημαντικών μεταλλοενζύμων. Μέχρι πρόσφατα πίστευαν ότι ο χαλκός αφού περάσει την κυτταρική μεμβράνη αμέσως δεσμεύεται από σουλφυδρυλικούς υποκαταστάτες, μεταλλοθειονεΐνες και γλουταθειόνες οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στους περισσότερους τύπους κυττάρων.[34] Ελάχιστες πληροφορίες υπήρχαν για την ενδοκυττάρια μεταφορά του χαλκού μέχρι που ανακαλύφθηκε η δράση των συνοδών χαλκού (*chaperone*). Αυτές οι πρωτεΐνες εντοπίστηκαν πρώτα στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (ζυμομύκητες) και έπειτα στα ανθρώπινα κύτταρα. Σε αντίθεση με τις

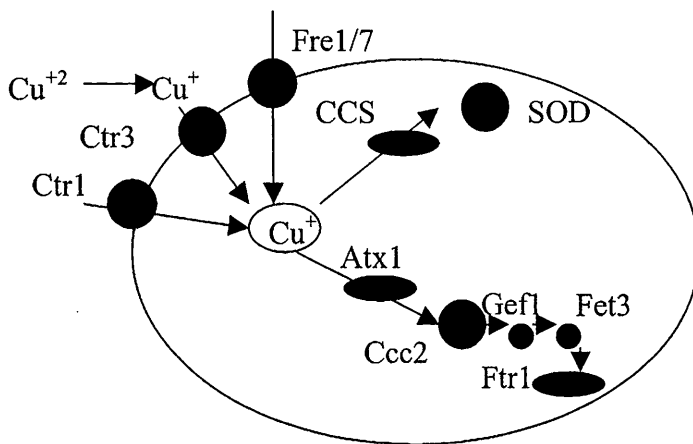
μεταλλοθειονεΐνες στις οποίες ο χαλκός εντάσσεται σταθερά από ένα μοτίβο υψηλού κυστεΐνικού περιεχομένου [35] στους συνοδούς χαλκού το μεταλλικό ιόν εντάσσεται από ένα ασταθή μοτίβο που επιτρέπει την ανταλλαγή υποκαταστάτη όταν ο συνοδός διασυνδέεται με την πρωτεΐνη στόχο.[36-38]

Στους ζυμομύκητες έχει εντοπιστεί μια μικρή σε μοριακό βάρος πρωτεΐνη Atx1 που προστατεύει τα κύτταρα με έλλειψη υπεροξειδικής δισμουτάσης (Cu,Zn-SGD) από το οξειδωτικό στρες. Ο μηχανισμός προστασίας περιορίζεται στη αποτοξίνωση των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες. Ο συνοδός χαλκού Atx1 έχει μια αλληλουχία από αμινοξέα GMxMCxxC η οποία αποτελεί το μοτίβο ένταξης του ιόντος Cu<sup>+</sup> και εμφανίζεται στο N-άκρο σε όλες τις πρωτεΐνες P τύπου ATPάση. [39-40] Κρυσταλλογραφικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι το μοτίβο GMxMCxxC βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης επιτρέποντας υψηλή συγγένεια ένταξης του μεταλλικού ιόντος Cu(I). [41] Η Atx1 παίζει βασικό ρόλο στην παράδοση του χαλκού στην Ccc2 η οποία είναι ομόλογη πρωτεΐνη των ανθρώπινων πρωτεϊνών Μένκες (MNK) και Γουΐλσον (WND). (Σχήμα 7) [42] Ένα θεωρητικό μοντέλο προτεινόμενο από την ομάδα του Pufahl, [36] υποστηρίζει ότι η μεταφορά του μεταλλικού ιόντος από την [Atx1-Cu] στην Ccc2 γίνεται μέσω ενός μηχανισμού ανταλλαγής υποκαταστάτη. Μόλις ο χαλκός δεσμευτεί από την Ccc2 μεταφέρεται στη συσκευή Golgi, πού εκεί τέσσερα ιόντα χαλκού (I) μέσω του καναλιού Gef1 ενεργοποιούν το ένζυμο Fet3. Παρόμοια με τους ζυμομύκητες, στον ανθρώπινο οργανισμό η ομόλογη της ευκαρυωτικής Atx1, η ανθρώπινη πρωτεΐνη ATOX1 (HAH1) η οποία δρα σαν συνοδός χαλκού και τον παραδίδει στις ανθρώπινες πρωτεΐνες Μένκες και Γουΐλσον.[40] (Σχήμα 8) Και σε αυτή τη περίπτωση η μεταφορά του χαλκού γίνεται με μηχανισμό ανταλλαγής υποκαταστάτη.[36]

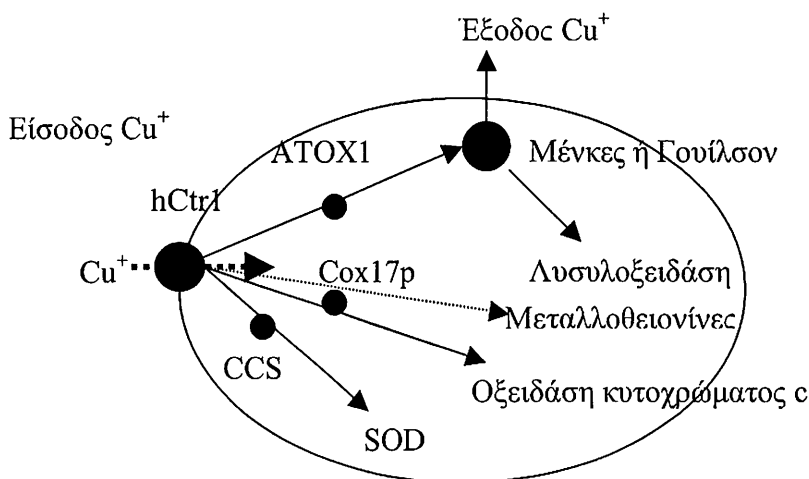
Στους ζυμομύκητες η παράδοση του χαλκού στην οξειδάση κυτοχρώματος c εξαρτάται από την έκφραση του γονιδίου *cox17* το οποίο αποκωδικοποιεί μια πλούσια σε κυστεΐνη πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια [43] στην οποία εντάσσονται δύο ιόντα χαλκού(I). Η κυτταρική σειρά ζυμομυκήτων *Δcox17* παρουσιάζει ανεπαρκή φαινότυπο κατά την καλλιέργεια τους και αυτό διορθώνεται αυξάνοντας την εξωκυττάρια συγκέντρωση του χαλκού ή με την υπερέκφραση της πρωτεΐνης πρόσληψης χαλκού Ctr1.[43] Υπερέκφραση των μεμβρανικών πρωτεϊνών Sco1 και Sco2 που είναι και αυτές εντοπισμένες στα μιτοχόνδρια συμπληρώνουν το φαινότυπο των ζυμομυκήτων

*Δcox17*, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για πρωτεΐνες που παίζουν σπουδαίο ρόλο στην μεταφορά ιόντων χαλκού στην οξειδάση κυτοχρώματος c.[44]

Στους ζυμομύκητες η παράδοση του χαλκού στην Cu/Zn υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) γίνεται από τον συνοδό χαλκού Lys7, ενώ στον ανθρώπινο οργανισμό από την CCS πρωτεΐνη της οποίας το μοτίβο στο οποίο εντάσσεται ο χαλκός (I) είναι η αλληλουχία MHCxxC. (όπου M= μεθειονίνη, H= ιστιδίνη, X= οποιοδήποτε αμινοξύ, C=κυστεΐνη).[45] Σε σειρές ανθρώπινων κυττάρων έχει βρεθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες CCS και SOD αλληλεπιδρούν *in vitro*. [46] Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές οδηγούν στη μη σωστή συνεργασία τους με αποτέλεσμα ατροφία των μυών, του ανθρώπινου οργανισμού.[47]



Σχήμα 7: Ομοίωση χαλκού στους ζυμομύκητες *S.cerevisiae*. [19]



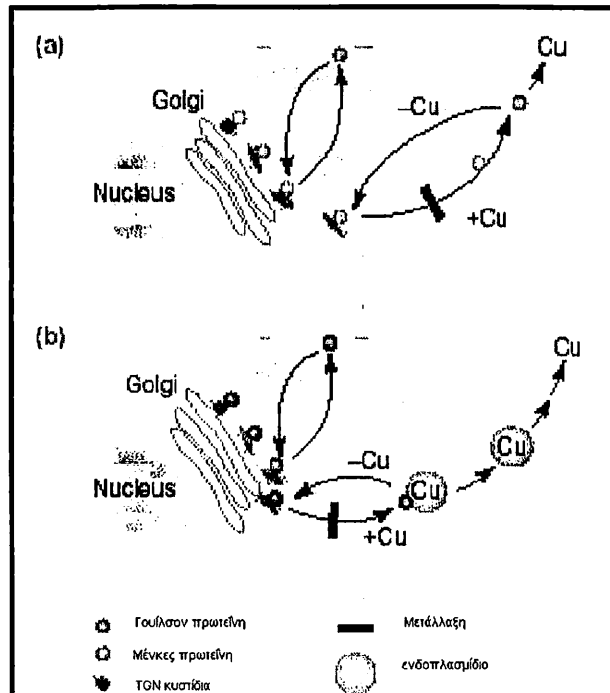
**Σχήμα 8:** Ομοιόσταση χαλκού στον άνθρωπο.[40,44,45]

### 1.2.3.3 Ρυθμισμένη ενδοκυττάρια κυκλοφορία των Μένκες και Γουίλσον πρωτεϊνών στα ανθρώπινα κύτταρα

Πρόσφατη έρευνα στον ενδοκυττάριο εντοπισμό των πρωτεϊνών Μένκες (ATP7a) και Γουίλσον (ATP7b) αποκάλυψε έναν μηχανισμό με τον οποίο αυτές οι πρωτεΐνες παραδίδουν ιόντα χαλκού σε άλλα ένζυμα διατηρώντας το επίπεδο του ενδοκυττάριου χαλκού σταθερό.[48] Χρησιμοποιώντας αντιβιοτικά κατά των N άκρων της Μένκες πρωτεΐνης και ανθρώπινα κύτταρα με υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη έγινε εντοπισμός της στην Trans Golgi συσκευή των κυττάρων (TGN). Η συσκευή Golgi αποτελείται από ένα σύστημα κυτταροπλασματικών χώρων που εμφανίζουν χαρακτηριστική μορφή και διάταξη, τις δεξαμενές και κυστίδια. Όταν η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε περιβάλλον με υψηλά επίπεδα χαλκού η πρωτεΐνη Μένκες απεντοπίζεται από το σύστημα TGN και μεταφέρεται μέσα σε κυστίδια στην πλασματική μεμβράνη.[48] Αποτέλεσμα αυτής της ανακατανομής είναι ο πλεονάζων χαλκός να αποβάλλεται από την πρωτεΐνη Μένκες έξω από το κύτταρο. Όταν τα επίπεδα του χαλκού επανέλθουν στις φυσιολογικές τιμές η πρωτεΐνη επιστρέφει στο σύστημα TGN του κυττάρου μέσα σε δεκαπέντε λεπτά. [48](Σχήμα 9α)

Η ενδοκυττάρια κυκλοφορία της πρωτεΐνης Γουίλσον ρυθμίζεται από τις απαιτήσεις του ανθρώπινου κυττάρου σε χαλκό. (Σχήμα 9α) Στην περίπτωση υψηλής συγκέντρωσης εξωκυττάριου χαλκού, η πρωτεΐνη Γουίλσον απομακρύνεται από το σύστημα TGN του κυττάρου εγκλεισμένη σε κυστίδια που έχουν τον χαρακτήρα

εκκριτικών κοκκίων με κατεύθυνση το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Εκεί εξέρχεται ο χαλκός με εξωκύττωση στη χολή.[49]



Σχήμα 9: Κυκλοφορία των Μένκες (α) και Γουλσον (β) πρωτεϊνών στα ανθρώπινα κύτταρα.[50]

## 1.3 ΜΕΝΚΕΣ ΚΑΙ ΓΟΥΙΛΣΟΝ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ: ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ P ΤΥΠΟΥ ΑΤΡάση.

### 1.3.1 Ιδιότητες των πρωτεϊνών P τύπου ΑΤΡάσης.

Οι πρωτεΐνες P τύπου ΑΤΡάση είναι μια σημαντική ομάδα πρωτεϊνών που μεταφέρουν μεταλλικά ιόντα (Πίνακας 8) [51] Πάνω από εκατό αυτής της κατηγορίας πρωτεΐνες έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα και παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ομοίωση κατιόντων στα βακτήρια και στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν ένα μοτίβο αλληλουχίας αμινοξέων στην κυτταρική μεμβράνη το οποίο περιέχει ένα κατάλοιπο προλίνης ( *Proline* ) και για αυτό το λόγο οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται P τύπου. Γνωστά παραδείγματα είναι η  $Ca^{+2}$ -ΑΤΡάση που βρίσκεται στα κύτταρα των μυϊκών ιστών ,η  $Na^{+}K^{+}$ -ΑΤΡάση στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, η  $H^{+}$ -ΑΤΡάση στη πλασματική μεμβράνη των μυκήτων και των φυτών και  $H^{+}K^{+}$ -ΑΤΡάση στα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου. Τα ένζυμα P τύπου ΑΤΡάση έχουν τρεις χαρακτηριστικές ιδιότητες: α) μια μονομερή καταλυτική περιοχή με μέγεθος 70-200kDa, β) αναστολή τους από μικροποσότητες βαναδικού άλατος, γ) δημιουργία ακυλοφωσφορικού ενδιάμεσου που σχηματίζεται από την μεταφορά ενός γ-φωσφορικού του ΑΤΡ στο κατάλοιπο ασπαρτικό οξύ.[52]]

Μελέτη στους μηχανισμούς αντίστασης κατά της υψηλής συγκέντρωσης καδμίου σε κύτταρα μικροοργανισμών αποκαλύπτουν σημαντική διαφορά στη δράση των πρωτεϊνών P τύπου ΑΤΡάση που μεταφέρουν τοξικά βαρέα μέταλλα από αυτές που μεταφέρουν μικρά ιόντα. Χαρακτηριστική  $Cd^{+2}$ -ΑΤΡάση πρωτεΐνη στα κύτταρα των *Staphylococcus aureus* βακτηρίων είναι το ένζυμο CadA το οποίο αποβάλλει το κάδμιο στον εξωκυττάριο χώρο. *In vitro* μελέτες απέδειξαν ότι αυτοί οι μεταφορείς εμφανίζουν τις ίδιες βιοχημικές ιδιότητες με αυτές των μεταφορών μικρών ιόντων.[53]

Οι μεταφορείς P τύπου ΑΤΡάση του μεταλλικού ιόντος  $Cu(I)$  εντοπίστηκαν πρώτα στα βακτήρια *Enterococcus hirae* [54] και έπειτα στους ζυμομύκητες και στον ανθρώπινο οργανισμό. Όλες οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν το ίδιο τοπολογικό μοντέλο για την δομή τους. Πρόκειται για ένα λειτουργικό μοντέλο που κάνει δυνατό το κύκλο μιας αντίδρασης που ρυθμίζεται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ΑΤΡ) με αποτέλεσμα τη μεταφορά ιόντων χαλκού διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Σε αυτόν τον κύκλο ένα ασπαρτικό οξύ (D) που συνοδεύεται από την αλληλουχία DKTGT είναι το πρώτο που φωσφορυλιώνεται από το ΑΤΡ που είναι

ενταγμένο από μια περιοχή της πρωτεΐνης. Ταυτόχρονα με την αποφωσφορυλίωση του ακυλοφωσφορικού από μία φωσφατάση γίνονται αλλαγές στη διαμόρφωση διαφόρων περιοχών της πρωτεΐνης καθώς και μεταφορά πιθανώς ενός ή δύο ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. [55,56] Εκτός από τα κλασσικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών P τύπου ATPάσες οι πρωτεΐνες Cu<sup>+</sup>-P τύπου ATPάσες εμφανίζουν και νέα: α) περιοχές στο N άκρο της πρωτεΐνης από τις οποίες δεσμεύεται το μεταλλικό ιόν, β) περιοχή στην κυτταρική μεμβράνη το οποίο περιέχει μοτίβο με την αλληλουχία PX όπου P= προλίνη και X=C,H,S (C=κυστεΐνη, H= ιστιδίνη, S= σερίνη) γ) περιοχή στο C άκρο με ένα κρυμμένο διπεπτίδιο ιστιδίνης-προλίνης δ) και μια σειρά από περιοχές εντοπισμένες στη κυτταρική μεμβράνη με άνισο αριθμό αμινοξέων. [57]

**Πίνακας 8:** Ιδιότητες γνωστών πρωτεϊνών P τύπου ATPάσε. [51]

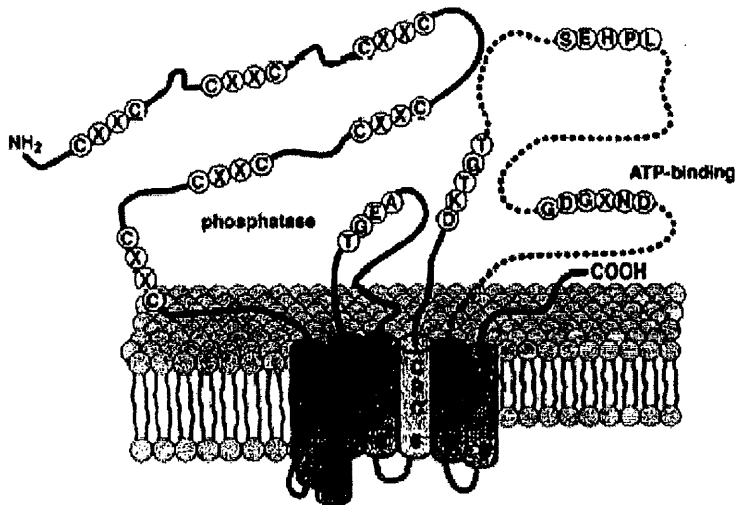
Όνομα	Λειτουργία	Οργανισμός	Κατάλοιπα	CPX
CadA	Cd <sup>+2</sup> -αποβολή	Staphylococcus aureus	727	CPC
CadA	Cd <sup>+2</sup> αποβολή	St.aureus	804	CPC
CadA	Cd <sup>+2</sup> αποβολή	Bacillus firmus	723	CPC
CadA	Cd <sup>+2</sup> αποβολή	Listeria monocytogenes	71	CPC
CopA	Cu <sup>+</sup> /Ag <sup>+</sup> εισαγωγή	Enterococcus hirae	727	CPC
CopB	Cu <sup>+</sup> /Ag <sup>+</sup> αποβολή	Enterococcus hirae	745	CPH
CtaA	Cu- μεταφορά	Synechococcus PCC7942	790	CPC
PacS	Cu- μεταφορά	Synechococcus PCC7942	747	CPC
CopA	Άγνωστη	Haemophilus influenzae	700	CPS
hpCopA	Άγνωστη	Helicobacter pylori	611	CPC
HRA-1	Άγνωστη	E.coli	732	CPH
HRA-1	Άγνωστη	E.coli	721	CPH
Pca1	Cu- μεταφορά	Saccharomyces cerevisiae	1216	CPC
CCC2	Cu- μεταφορά	S.cerevisiae	1004	CPC
Μένκες	Cu- μεταφορά	Άνθρωπος	1500	CPC
Μένκες	Cu- μεταφορά	Hamster	1476	CPC
Μένκες	Cu- μεταφορά	Ποντίκι	1491	CPC
Γουίλσον	Cu- μεταφορά	Άνθρωπος	1465	CPC
Γουίλσον	Cu- μεταφορά	Ποντίκι	1451	CPC

### 1.3.2 Μένκες και Γουίλσον πρωτεΐνες

Οι Μένκες (ATP7a) και Γουίλσον (ATP7b) είναι πρωτεΐνες CP τύπου ATPάση στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι CP τύπου είναι υποομάδα της P τύπου ATPάση και έχουν το κατάλοιπο κυστεΐνη στο μοτίβο με την αλληλουχία CPX στην έκτη δομική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Οι ATP7a και ATP7b πρωτεΐνες έχουν πολύ υψηλή ομολογία με άλλες P τύπου ATPάση όπως Ca-ATPάση (SR) [58], SERCA1a και την H-ATPάση [59] των οποίων οι κρυσταλλικές δομές τους έχουν προσδιοριστεί. Υψηλή ομολογία στην αλληλουχία τους υπάρχει και ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες Μένκες και Γουίλσον που φτάνει στο εξήντα πέντε τις εκατό.

Το τοπολογικό μοντέλο των ATP7a και ATP7b (Σχήμα 10) περιέχει οκτώ περιοχές στην κυτταρική μεμβράνη, από τις οποίες η έκτη περιέχει την αλληλουχία CPC. Αυτό το μοτίβο παίζει το ρόλο καναλιού από το οποίο τα μεταλλικά ιόντα περνούν μέσα από την κυτταρική μεμβράνη. Στο κυτταρόπλασμα εντοπίζονται δύο βρόχοι οι οποίοι αποτελούνται από τρεις περιοχές. Η πρώτη περιέχει τη χαρακτηριστική αλληλουχία TGEA, η δεύτερη αποτελείται από σιράντα τρία αμινοξέα με κρυμμένη αλληλουχία: DKTG, που είναι θέση φωσφορλίωσης και η τρίτη με δύο κρυμμένα μοτίβα με αντίστοιχες αλληλουχίες: SEHPL και GDGXD (όπου T= θρεονίνη, G= γλυκίνη, E= γλουταμικό, A= αλανίνη, D= ασπαρτικό οξύ, S= σερίνη, H=ιστιδίνη, P= προλίνη, L=λευκίνη, X= οποιοδήποτε αμινοξύ). Η τελευταία περιοχή είναι υπεύθυνη για την δέσμευση του ATP. Στο N-άκρο της πρωτεΐνης βρίσκονται έξι δομικές περιοχές από τις οποίες δεσμεύεται ο χαλκός (I) και είναι εντοπισμένες στην κυτταρική μεμβράνη.





**Σχήμα 10:** Προτεινόμενο τοπολογικό μοντέλο των Μένκες και Γουίλσον ανθρώπινων πρωτεϊνών. [60]

Οι έξι περιοχές στις οποίες εντάσσεται το μεταλλικό ιόν στην πρωτεΐνη Μένκες (συμβολίζονται *MNKr(1-6)*) αποτελούνται η κάθε μία σε μέσο όρο από εβδομήντα αμινοξέα. Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των περιοχών είναι ότι περιέχουν ένα μοτίβο αμινοξέων με αλληλουχία GMT/HCXXC (όπου G= γλυκίνη M= μεθειονίνη, T= θρεονίνη H= ιστιδίνη, X= οποιοδήποτε αμινοξύ, C=κυστεΐνη ) (Σχήμα 11). Οι περιοχές όμοιες με τις *MNKr(1-6)* εμφανίζονται και σε άλλες βαρέων μετάλλων πρωτεΐνες P τύπου ATPάση και στους συνοδούς μεταλλικών ιόντων των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο αριθμός τους αυξάνεται από μία και δύο περιοχές στα βακτήρια, [61] στους ζυμομύκητες [62] και στα φυτά [63] τρεις στα *C.Elegans*, [64] τέσσερις στα δροσόφυλλα, [65] πέντε στα ποντίκια [66] και τελικά έξι στους ανθρώπους. Η αύξηση του αριθμού των περιοχών που βρίσκονται στο N-άκρο των πρωτεϊνών είναι δείγμα της εξέλιξης τους με σκοπό την ικανοποίηση των υψηλών απαιτήσεων του πολύπλοκου ανθρώπινου οργανισμού.

*MNK1*: VNSVTISVE **GMTC** NS *C* VWTIEQQIGK VNGVHHIKV SLEEKNA THYDPK LQTPKTLQE AIDDMGFDAV  
*MNK2*: VVLKMKVE **GMTC** HS *C* TSTIEGKIGK LQGVQRIK VSLDNQEATIVYQPH LISVEEMKKQIEAMGPPAF  
*MNK3*: DSTATFIID **GMHC** KS *C* VSNIESTLSALQYVISSIVV SLENRS AIVKYNASSVTPESLRKAIEAVSPGLY  
*MNK4*: TQETVINID **GMTC** NS *C* VQSIEGVISKPKPGVKSIRVSLANSNGTVEYDPLLTSPETLRGA IEDMGFDAT  
*MNK5*: SSKCYIQVT **GMTC** AS *C* VANIERNL RREEGIYSILVALMAGKAEVRYNPAV IQPPMIAEFIRELGF GATV  
*MNK6*: GVLELVVR **GMTC** AS *C* VHKIESSLTKHRGILYCSVALATNKAHIKYDPEIIGPRDIHTIESLGF EASLVK

**Σχήμα 11:** Σύγκριση της αλληλουχίας των έξι περιοχών ένταξης μετάλλου *MNKr(1-6)* της πρωτεΐνης Μένκες. [60]

### 1.3.3 Ο ρόλος των δομικών περιοχών ένταξης χαλκού στο N-άκρο των πρωτεϊνών Μένκες και Γουίλσον .

Η κατανόηση του ρόλου των έξι περιοχών ένταξης χαλκού στο N-άκρο των πρωτεϊνών αποτελεί σημαντικό βήμα στο χαρακτηρισμό του μηχανισμού μεταφοράς ιόντος χαλκού από τα ένζυμα συνοδούς στις πρωτεΐνες στόχος. Η στοιχειομετρία ένταξης του χαλκού από τις περιοχές *MNKR(1-6)* και *WNR(1-6)* των πρωτεϊνών Μένκες των Γουίλσον αντίστοιχα είναι: ένα ιόν χαλκού για κάθε μια περιοχή. [67-69] Ο χαλκός (I) εντάσσεται από δυο κυστεΐνες που βρίσκονται στο επαναλαμβανόμενο μοτίβο και για τις έξι περιοχές, με αλληλουχία GMT/HCXXC. Η γεωμετρία ένταξης είναι γραμμική.[70,71] Μελέτες κυκλικού διχρωϊσμού απέδειξαν ότι κατά την ένταξη του χαλκού από τις περιοχές *MNKR(1-6)* των πρωτεϊνικών στόχων εμφανίζονται αλλαγές στις δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές τους. [70,71] Ακόμα δεν είναι γνωστό αν αυτές οι αλλαγές στην διαμόρφωση επηρεάζουν την δράση των πρωτεϊνών. Έχει προταθεί όμως πως αυτές οι αλλαγές είναι το ερέθισμα για την ενδοκυττάρια κυκλοφορία των πρωτεϊνών από την συσκευή Golgi του κυττάρου στην πλασματική μεμβράνη. [71]

Έκτός από τον ρόλο της ενδοκυττάριας κυκλοφορίας των πρωτεϊνών οι περιοχές από τις οποίες εντάσσεται το μέταλλο εμφανίζουν και ρυθμιστικό ρόλο. Έχει προταθεί ότι οι περιοχές του N-άκρου αλληλεπιδρούν με τις περιοχές δέσμευσης του ATP, με αποτέλεσμα όταν ο χαλκός (I) εντάσσεται από τις κυστεΐνες των περιοχών του N-άκρου να προκαλούνται αλλαγές στη διαμόρφωση των περιοχών δέσμευσης του ATP αλλάζοντας την διασύνδεση πρωτεΐνης στόχου με ένζυμα που έχουν συμπάραγοντα τον χαλκό.[72]

Οι έξι περιοχές ένταξης του μεταλλικού ιόντος στις πρωτεΐνες Μένκες και Γουίλσον έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μια ποικιλία από μέταλλα με διαφορετική συγγένεια: Cu(II) > Zn(II) > Ni(II) > Co(II). [68] Παρόλα αυτά μόνο η ένταξη του χαλκού μπορεί να προκαλέσει τις σωστές αλλαγές στη διαμόρφωση του N-άκρου. Μελέτες ακτινών X αποκαλύπτουν ότι ψευδάργυρος δεσμεύεται από άτομα αζώτου και όχι από κυστεϊνικά κατάλοιπα όπως συμβαίνει στην ένταξη του χαλκού και προκαλεί τελειώς διαφορετικές αλλαγές στη διαμόρφωση του N-άκρου. [69]

Οι περιοχές αυτές στο N-άκρο δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμες. Συγκεκριμένα μεταλλάξεις διαγραφής που έγιναν στο επαναλαμβανόμενο μοτίβο και για τις έξι

περιοχές, WNDr(1-6) (της Γουίλσον πρωτεΐνης) με αλληλουχία GMT/HCXXC έδειξαν ότι οι περιοχές κοντά στην κυτταρική μεμβράνη εμπλέκονται πιο πολύ από τις απομακρυσμένες στην μεταφορά του χαλκού. [73] Ίδιες μελέτες αποκάλυψαν ότι η ένταξη του χαλκού γίνεται εκλεκτικά από μερικές αλλά όχι από όλες τις περιοχές του N άκρου της πρωτεΐνης Μένκες. [74] *In vivo* μελέτες απέδειξαν ότι ο συνοδός χαλκού ATOX1 αλληλεπιδρά με μερικές, αλλά όχι με όλες τις περιοχές ένταξης του μεταλλικού ιόντος στο N άκρου των πρωτεϊνών Μένκες και Γουίλσον. [75,76] Από ομολογιακή μοντελοποίηση και των έξι περιοχών ένταξης χαλκού της πρωτεΐνης Γουίλσον προκύπτει ότι το ηλεκτροστατικό επιφανειακό φορτίο δεν είναι το ίδιο σε όλες, με αποτέλεσμα σε μερικές από αυτές να μην επιτρέπεται η διασύνδεση της με το ένζυμο συνοδό HAH1. Αρχικά το ιόν του χαλκού παραδίδεται από την HAH1 σε κάποια από τις τρεις τελευταίες περιοχές και έπειτα μεταφέρεται μεταξύ αυτών με τελικό προορισμό στο κανάλι ιόντων της κυτταρικής μεμβράνης για την απομάκρυνση του.

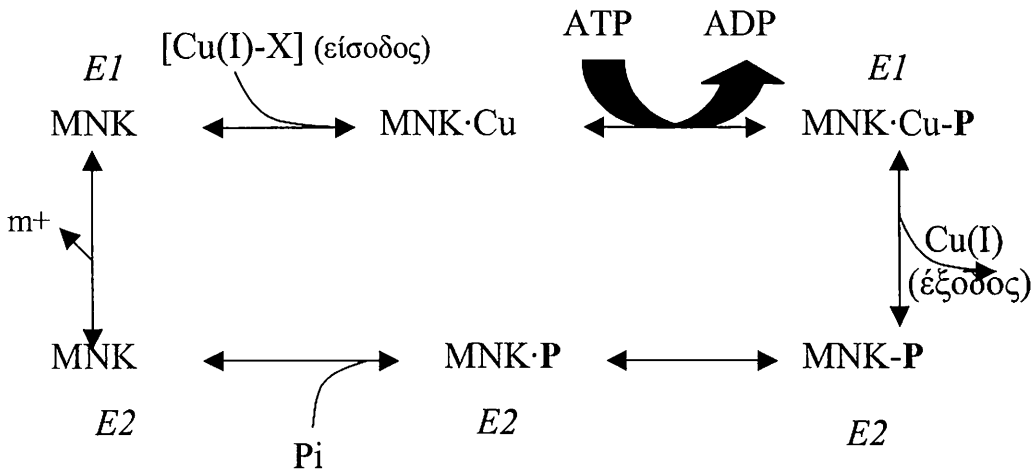
#### **1.3.4 Καταλυτική δράση της πρωτεΐνης Μένκες.**

Υπάρχει μικρή γνώση για τη καταλυτική δράση των πρωτεϊνών Cu-ΑΤΡάση. Δύο αναφορές στην βακτηριακή πρωτεΐνη *copB* αποκαλύπτουν ότι κατά τον καταλυτικό κύκλο σχηματίζεται ένα ακυλοφωσφορικό ενδιάμεσο.[77,78] Οι περισσότερες μελέτες καταλυτικής δράσης *wild type* και μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Μένκες και Γουίλσον στηρίζονται στη συμπληρωματική πρόσληψη χαλκού και σιδήρου σε κυτταρική σειρά ζυμομυκήτων στην οποία υπάρχει έλλειψη του ένζυμου Ccc2p που είναι ομόλογο των ανθρώπινων πρωτεϊνών Μένκες και Γουίλσον. [79,81] Έχει αποδειχθεί ότι και οι δύο πρωτεΐνες μπορούν να συνεισφέρουν στην πρόσληψη σιδήρου παραδίδοντας χαλκό στην φεροξειδάση Fet3p στην κυτταρική σειρά ΔCCC2. [80,81] Ένα σύστημα ζυμομυκήτων σε περιβάλλον έλλειψης χαλκού, παρέχει ένα έμμεσο τρόπο μέτρησης της καταλυτικής δράσης των πρωτεϊνών Cu-ΑΤΡάση. Προς το παρόν οι καταλυτικές ιδιότητες του Ccc2p καθώς και των ανθρώπινων πρωτεϊνών ΑΤΡάση που έχουν εκφραστεί σε ζύμη είναι ανίκανες να προσδιοριστούν άμεσα. Υπάρχουν σημαντικά εμπόδια στο προσδιορισμό των επιπτώσεων των μεταλλάξεων των πρωτεϊνών Μένκες και Γουίλσον στην καταλυτική δράση. Οι μεταλλάξεις μπορεί να μην ακυρώνουν τελείως την καταλυτική δράση αλλά είναι ανεπαρκείς για να συμπληρώσουν το φαινότυπο της σειράς ΔCCC2. [80-82] Υπήρχαν διαφωνίες στο παρελθόν για τον φυσιολογικό ρόλο του *wild type* των περιοχών από τις οποίες

δεσμεύεται το μεταλλικό ιόν δηλαδή αν χρειάζεται τουλάχιστον μία από τις έξι περιοχές για να συμπληρώσει το φαινότυπο της σειράς ΔCCC2. Απάντηση δόθηκε από μια πολύ ενδιαφέρουσα έρευνα που απέδειξε ότι μια πρωτεΐνη ομόλογη της Γουίλσον που εντοπίζεται σε ανθρώπινους νευραδένες μπορεί και συμπληρώνει το φαινότυπο της σειράς ΔCCC2 χωρίς την παρουσία και των έξι περιοχών στο N-άκρο.[83]

Πρόσφατα έχουν γίνει πειράματα σε ανθρώπινα κυστίδια της Golgi μεμβράνης εμπλουτισμένα με ραδιενεργό χαλκό ( $^{64}\text{Cu}$ ) για την μελέτη των μηχανισμών μεταφοράς του χαλκού από τις ανθρώπινες πρωτεΐνες Cu-ATPάση. [84] *In vitro*, η μεταφορά του χαλκού γίνεται μόνο κατά την παρουσία αναγωγικού μέσου, αποδεικνύοντας ότι το μεταλλικό ιόν που μεταφέρεται μέσα από τα κυστίδια είναι ο Cu(I) παρά ο Cu(II). Η ενζυματική δράση των πρωτεϊνών Cu-ATPάση αναστέλλεται από το ορθοβανάδιο [84]

Ο καταλυτικός κύκλος των πρωτεϊνών P τύπου ATPάση χαρακτηρίζεται από μια διπλή αντίδραση δέσμευσης του κατιόντος και υδρόλυσης του ATP με το παροδικό σχηματισμό φωσφορικού άλατος του ασπαρτικού οξέος σαν μέρος του κύκλου αντίδρασης. Η φωσφορυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την μετάβαση του ένζυμου από τη διαμόρφωση E1 η οποία επιτρέπει τη δέσμευση του κατιόντος, στη διαμόρφωση E2 που είναι χαμηλότερης συγγένειας σε δέσμευση κατιόντων. Μετά την απομάκρυνση του κατιόντος Cu(I), απελευθερώνεται ένα ορθοφωσφορικό και το ένζυμο από την διαμόρφωση E2 μεταβαίνει στην E1 για να δεσμεύσει νέο κατιόν και να ξεκινήσει ένας καινούργιος καταλυτικός κύκλος. (Σχήμα 12) Η E1-P διαμόρφωση χαρακτηρίζεται ως «ADP-ευαίσθητη κατάσταση» γιατί το ένζυμο μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί από το ADP (αντίστροφη αντίδραση), ενώ η E2-P είναι εντελώς απαθής στη παρουσία του ADP. [85-87]



**Σχήμα 12:** Προτεινόμενος καταλυτικός κύκλος της πρωτεΐνης Μένκες..[88]

Μεταλλάξεις αντικατάστασης στις έξι περιοχές στο N-άκρο της πρωτεΐνης Μένκες στο μοτίβο GMXCXXC σε GMXSXXS (S: σερίνη) αποκαλύπτουν ότι όλες οι μεταλλαγμένες περιοχές παρουσιάζουν καταλυτική δράση.[89] Αντικαταστάσεις και στις έξι περιοχές μειώνουν κατά σαράντα πέντε τις εκατό την καταλυτική δράση. Ίδιες μελέτες δείχνουν ότι παρόλο που η πέμπτη και η έκτη περιοχή παίζουν σημαντικό ρόλο στη ενδοκυττάρια κυκλοφορία του χαλκού η δέσμευση του χαλκού από τις περιοχές του N-άκρου δεν είναι σημαντική στην καταλυτική δράση. [89] Οι μεταλλαγμένες περιοχές δεν επιτρέπουν την κυκλοφορία του χαλκού με αποτέλεσμα να δημιουργείται σε όλα τα κύτταρα ένας υπερσυσσωρευμένος σε χαλκό φαινότυπος, στα οποία το μεταλλικό ιόν να είναι εγκλωβισμένο στα κυστίδια της συσκευής Golgi. Αυτά τα αποτελέσματα είναι ένδειξη ότι η καταλυτική δράση δεν εξαρτάται από την ενδοκυττάρια κυκλοφορία της πρωτεΐνης Μένκες αλλά η ενδοκυττάρια κυκλοφορία για να πραγματοποιηθεί απαιτεί την καταλυτική δράση της πρωτεΐνης. [90] Όταν η πρωτεΐνη Μένκες δέχεται το ιόν του χαλκού (I) από την ATOX1 και ξεκινάει ο καταλυτικός κύκλος εντοπίζεται στη συσκευή Golgi του κυττάρου ενώ όταν αποβάλλεται ο χαλκός η πρωτεΐνη απεντοπίζεται από την αρχική της θέση και καταλήγει στην πλασματική μεμβράνη.

Έχει προταθεί ότι οι περιοχές κοντά στην κυτταρική μεμβράνη που αλληλεπιδρούν με το ένζυμο ATOX1 δέχονται αλλαγές στη διαμόρφωση τους οι οποίες συμβαδίζουν με τα στάδια του καταλυτικού κύκλου. [60] Στην πρωτεΐνη Μένκες το καταλυτικό μέρος αποτελείται από την περιοχή φωσφορυλίωσης και από την περιοχή δέσμευσης του ATP. Όταν η πρωτεΐνη δεσμεύει το κατιόν του χαλκού οι δυο περιοχές

δημιουργούν μια ανοιχτή διαμόρφωση. Η περιοχή με τη χαρακτηριστική αλληλουχία TGEA, δίπλα στις άλλες δυο, ενεργοποιεί τις μετακινήσεις όλων των περιοχών και είναι τελείως διαχωρισμένη από τον κύριο κορμό. Κλείνοντας το άνοιγμα μεταξύ των παραπάνω περιοχών η αλληλουχία TGEA πλησιάζει την θέση φωσφορυλίωσης. Αυτή η διαμορφωτική αλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της ένταξης του κατιόντος. Η αρχική ένταξη ακολουθείται από την υδρόλυση του ATP και την απελευθέρωση του κατιόντος. Τελικά η περιοχή με την αλληλουχία TGEA επιτρέπει την διέλευση του νερού για την υδρόλυση του ενζύμου και απελευθέρωση ενός ορθοφωσφορικού.[60]

Ένα άλλο μοντέλο που έχει προταθεί να εξηγήσει τον καταλυτικό ρόλο των περιοχών του N-άκρου είναι ότι αυτές είναι ο αρνητικός ρυθμιστής και βυσματώνει το κανάλι της κυτταρικής μεμβράνης, που είναι θετικός ρευματολήπτης. Όταν ο χαλκός εντάσσεται από τις κατάλληλες περιοχές η πρωτεΐνη γίνεται καταλυτικά ενεργή και μεταφέρεται μέσα από τα κυστίδια του συστήματος Golgi στην πλασματική μεμβράνη. Όταν όμως υπάρχουν μεταλλάξεις αντικατάστασης οι μεταλλαγμένες περιοχές δεν αναγνωρίζονται από τα κυστίδια του συστήματος εξοκύτωσης. Αύτη η υπόθεση μπορεί να εξηγήσει τον φαινότυπο υπερσυσσώρευσης χαλκού σε σειρά ανθρώπινων κυττάρων με υπερεκφρασμένη την πρωτεΐνη Μένκες με μεταλλαγμένες περιοχές. [89] Η ανακάλυψη ότι οι έξι περιοχές του N-άκρου δεν είναι σημαντικές στην καταλυτική δράση της πρωτεΐνης υποστηρίζει την ιδέα ότι παίζουν μόνο το ρόλο του αισθητήρα χαλκού.

Η εξέλιξη του αριθμού των περιοχών του N-άκρου των πρωτεϊνών P τύπου ATPάση από μία (στα βακτήρια) στις έξι (στον άνθρωπο) έγινε κάτω από τις υψηλές απαιτήσεις του ανθρώπινου οργανισμού σε καταλυτικούς μηχανισμούς. Ο πυρήνας των πρωτεϊνών ATPάση καθώς και οι περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης είναι κρυμμένες. Αυτό το φαινόμενο πιθανώς οφείλεται στο ότι αλλαγές σε αυτές τις περιοχές να προκαλούν επιβλαβή αποτελέσματα στην καταλυτική δράση της πρωτεΐνης. [91]

### **1.3.5 Μοριακή δομή του γονιδίου Μένκες στον ανθρώπινο οργανισμό.**

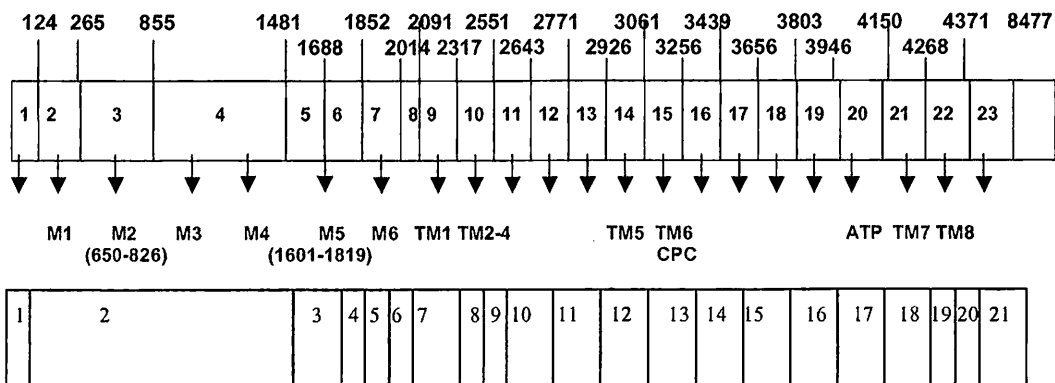
Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Γουίλσον εντοπίζεται στο συκώτι του ανθρώπινου οργανισμού ενώ το γονίδιο της Μένκες εκφράζεται σε πολύ μικρό ποσοστό σε αυτό το όργανο, αλλά σε πολύ υψηλό ποσοστό στους άλλους ιστούς. [92]

Έχουν αναγνωρισθεί είκοσι τρία εξόνια στο γονίδιο της Μένκες καθώς και τα περιοριστικά όρια μεταξύ των ιντρονίων και εξονίων. (Σχήμα 13) Το μέγεθος των εξονίων κυμαίνεται από εβδομήντα επτά βάσεις στο εξόνιο οκτώ μέχρι και επτακόσια είκοσι έξι στο εξόνιο τέσσερα. Το πρώτο εξόνιο εντοπίζεται εξήντα βάσεις αριστερά του δεύτερου εξονίου, και περιέχει την αλληλουχία ATG που είναι το μήνυμα έναρξης της μετάφρασης. Επειδή το πρώτο εξόνιο που περιέχει την αρχή του γνωστού cDNA δεν κωδικοποιείται και βρίσκεται από αριστερά του δεύτερου οδηγεί στην σκέψη ότι είναι απίθανο να υπάρχει και πιο μακριά άλλο εξόνιο. Αυτό θα επιβεβαιωθεί όταν η θέση έναρξης της μετάφρασης προσδιοριστεί πλήρως. Ανάμεσα από το πρώτο και δεύτερο εξόνιο έχει προσδιοριστεί και ένα ψευδογονίδιο και αποτελεί το πρώτο παράδειγμα εμφάνισης τέτοιας περιοχής σε ένα γονίδιο.

Όλα τα σημεία συνένωσης των νετρονίων-εξονίων στο γονίδιο της πρωτεΐνης Μένκες ακολουθούν τον κύριο κανόνα διασύνδεσης GT-AC, (όπου G= γουανίνη, T= θυμίνη, A= αδενίνη, C= κυτοσίνη) εκτός από τη θέση δότη του ιντρονίου εννιά. Εξάιρεση από τον παραπάνω κανόνα έχει εμφανιστεί μόνο σε άλλα τρία ανθρώπινα γονίδια αλλά σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η φυσιολογική αλληλουχία GT αντικαθίσταται από την GC.[93] Η αλληλουχία GC όταν περιέχεται στη θέση δότη του ιντρονίου βρέθηκε να έχει λειτουργική σημασία σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η απουσία του εξονίου δέκα από το γονίδιο της πρωτεΐνης Μένκες σε αρκετούς φυσιολογικούς ιστούς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία δύο δομικών περιοχών της πρωτεΐνης που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτές οι περιοχές λείπουν σε διάφορες πρωτεΐνες P-τύπου ATPάση μη βαρέων μετάλλων Το ίδιο φαινόμενο παρουσιάζεται και στην πρωτεΐνη Γουίλσον χωρίς να οφείλεται σε αυτή τη περίπτωση σε λάθος στα σημεία συνένωσης των ιντρονίων-εξονίων. [94]

Έχει αναφερθεί μετάλλαξη στην θέση -2 από την θέση δότη του ιντρονίου έντεκα σε ασθενής που πάσχουν από το σύνδρομο OHS (*Occipital Horn Syndrome*). Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση της σερίνης από γλυκίνη και οδηγεί στην απώλεια του εξονίου έντεκα.[95] Απώλεια εξονίου από μετάλλαξη, έχει αναφερθεί και σε ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Μένκες. [96] Συγκεκριμένα σε αυτή τη μετάλλαξη προκαλείται ενεργοποίηση μιας κρυμμένης θέσης ματίσματος στην θέση 2772 στο εξόνιο δώδεκα.



**Σχήμα 13:** Σύγκριση των δομών των εξονίων του γονιδίου της Μένκης (επάνω) και της Γουίλσον (κάτω). Τα βέλη δείχνουν τις δομικές περιοχές που κωδικοποιούνται από τα εξόνια της Μένκης. {M(1-6): οι έξι περιοχές δέσμευσης μετάλλου, TM(1-8): οι περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, ATP: περιοχή δέσμευσης του ATP.} [92]

Η δομή του γονιδίου της πρωτεΐνης Μένκης έχει υψηλή ομολογία με την αντίστοιχη της Γουίλσον. Από το εξόνιο πέντε και πέρα οι θέσεις ματίσματος είναι ακριβώς οι ίδιες και για τα δύο γονίδια εκτός από την θέση μεταξύ των εξονίων δεκαεπτά και δεκαοχτώ για το γονίδιο της Μένκης ( εξόνια δεκαπέντε και δεκαέξι για της Γουίλσον ) και σε ένα κωδικίο (αποτελούμενο από τρεις βάσεις) μεταξύ των εξονίων τέσσερα και πέντε για της Μένκης ( δύο και τρία για της Γουίλσον). Το δέκατο όγδοο εξόνιο στο γονίδιο Μένκης είναι κατά εκατό σαράντα τέσσερις βάσεις μεγαλύτερο από το αντίστοιχο δέκατο έκτο εξόνιο του γονιδίου Γουίλσον. Τα υπόλοιπα αντίστοιχα εξόνια είναι ισοδύναμα σε μέγεθος έκτος από κάποιες μικρές διαφορές λόγω εσωτερικών διαγραφών ή εισαγωγών. Ενδιαφέρον φαινόμενο παρουσιάζεται στο δέκατο έβδομο εξόνιο και των δυο γονιδίων από το οποίο το πρώτο μισό κωδικοποιεί μέχρι την λευκίνη 1130 ( για την Μένκης ) ίδιες αλληλουχίες από αμινοξέα και μετά τελείως διαφορετικές περιοχές για σαράντα εννιά αμινοξέα. [92]

Η απότομη εναλλαγή μεταξύ υψηλής ομολογίας και ανομοιότητας που προκύπτει από τις συγκρίσεις των αντίστοιχων εξονίων των δύο γονιδίων οφείλεται στο σχηματισμό ανασυνδιασμένων γονιδίων που περιέχουν δομικά στοιχεία τα οποία δεν βλάπτουν την λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Σε αυτή τη περίπτωση ανήκει και η περιοχή με το μοτίβο SEPHL στην πρωτεΐνη Μένκης η οποία είναι μεγαλύτερη κατά εβδομήντα με ογδόντα αμινοξέα από τις αντίστοιχες στις βακτηριακές πρωτεΐνες P



τύπου ΑΤΡάση. [94] Οι διαφορές στο μέγεθος αυτής της περιοχής από ευκαρυωτική πρωτεΐνη σε βακτηριακή οφείλεται στους ιδιαίτερους ρυθμιστικούς ρόλους που καλείται να παίζει η περιοχή ανάλογα με τις απαιτήσεις του οργανισμού.

Η υψηλή ομολογία των γονιδίων Μένκες και Γουίλσον αποκαλύπτει ότι αυτά τα γονίδια έχουν εξελιχθεί από κοινό πρόδρομο γονίδιο.[94] Αυτό το πρόδρομο γονίδιο αποκλίνει από τα γονίδια των άλλων πρωτεϊνών P τύπου ΑΤΡάση στο ότι έχει τέσσερις μεμβρανικές περιοχές αντί δυο στο N-άκρο. Όμως τα δύο γονίδια διαφέρουν σημαντικά στο 5' άκρο γεγονός που εκφράζει διαφορές σημαντικές στη ρύθμιση αυτών των γονιδίων. Αυτή η διαφοροποίηση έρχεται σε διαφωνία με την αρχική θεωρία ότι τα γονίδια εξελίχθηκαν από έναν αρχικό πυρήνα γιατί έτσι θα έπρεπε να υπήρχε υψηλή ομολογία στο 5' άκρο. Το πιο πιθανό είναι το πρόδρομο γονίδιο να έχει μόνο μια περιοχή δέσμευσης μετάλλου όπως συμβαίνει στην βακτηριακή πρωτεΐνη *copA*. Η αναπαραγωγή της περιοχής αυτής σε έξι αντίγραφα έγινε κατά την εξέλιξη των οργανισμών από βακτηριακό σε ανώτερο ευκαρυωτικό επίπεδο. Το γονίδιο της Μένκες στο οποίο κάθε εξόνιο κωδικοποιεί μια δομική περιοχή είναι πιο κοντά στην πρωτότυπη δομή από ότι το γονίδιο της Γουίλσον όπου οι πρώτες τέσσερις δομικές περιοχές κωδικοποιούνται από ένα εξόνιο. [92]

### 1.3.6 Μελέτες μετάλλαξης στην πρωτεΐνη Μένκες

Πρόσφατα έχουν γίνει αναλύσεις στην ανθρώπινη πρωτεΐνη Μένκες με κύριο σκοπό τη κατανόηση του ρόλου διαφόρων αμινοξέων που βρίσκονται στην έκτη και έβδομη δομική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης.[97] Αυτές οι περιοχές εμφανίζονται σε όλες τις πρωτεΐνες τύπου ΑΤΡάση μεταφοράς μετάλλων. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις αντικατάστασης: H1086Q, K1079A, R1208G, DD1219/1220AA, D1230A, K1233M και N1366A (όπου G= γλυκίνη, A= αλανίνη, D= ασπαρτικό οξύ, L=λευκίνη, K= λυσίνη, M= μεθειονίνη, N= ασπαραγίνη, X= οποιοδήποτε αμινοξύ) οι οποίες εκφράστηκαν στην κυτταρική σειρά *Δccc2*. (Πίνακας 9) Καμία από αυτές τις αντικαταστάσεις δεν προκάλεσαν μεταβολή στη σταθερότητα τη πρωτεΐνης κρίνοντας από το υψηλό επίπεδο έκφρασης σε σχέση με αυτού στο *wild type* της πρωτεΐνης.

Για την παραπέρα μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων στην καταλυτική δράση της πρωτεΐνης Μένκες πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων *in vitro* με βιοχημικές μετρήσεις της συγκέντρωσης του χαλκού που μεταφέρεται ενδοκυττάρια και

της ATP που δεσμεύεται από την πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα που δόθηκαν από επισημασμένα κυστίδια με  $^{64}\text{Cu}$  ενδοκυττάριας μεταφοράς αποκάλυψαν ότι όλες οι μεταλλάξεις εκτός της N1366A είναι καταλυτικά ενεργές. Οι μεταλλάξεις K1079A, R1208G, DD1219/1220AA δείχνουν να μην επηρεάζουν την καταλυτική δράση γεγονός που αποκαλύπτει ότι τα κατάλοιπα αυτά που έχουν αντικατασταθεί δεν παίζουν σπουδαίο ρόλο στην κατάλυση της μεταφοράς του χαλκού. Σε αντίθεση οι μεταλλάξεις H1086Q, D1230A, K1233M επηρεάζουν σημαντικά την καταλυτική δράση ελαττώνοντας την κατά ογδόντα τις εκατό. [97]

Παράλληλα έχουν γίνει μελέτες για τον χαρακτηρισμό του λειτουργικού ρόλου του καταλοίπου ιστιδίνη 1086. Η μετάλλαξη H1086Q στην πρωτεΐνη Μένκες είναι ανάλογη της μετάλλαξης H1069Q που εμφανίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό που πάσχει από την νόσο Γουίλσον. Η μετάλλαξη αυτή στην Γουίλσον μειώνει την δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη H1086Q στην πρωτεΐνη Μένκες μειώνει την συγγένεια για δέσμευση της ATP όπως φαίνεται από την τιμή  $K_m$  (Πίνακας 9). Όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της ATP είναι  $\approx 1\text{mM}$  η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα στην μεταφορά του χαλκού. [98] Συγκεκριμένα όταν η συγκέντρωση της ATP είναι  $1\text{mM}$  η δραστηριότητα στην μεταφορά  $^{64}\text{Cu}$  είναι μόνο το δέκα τις εκατό της δραστηριότητας που παρουσιάζει η *wild type* της πρωτεΐνης. Στην πρωτεΐνη Γουίλσον η αντίστοιχη μετάλλαξη H1069Q προκαλεί καταστροφή στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης. [99] Αντίθετα ανάλογες μεταλλάξεις αντικατάστασης της ιστιδίνης στις βακτηριακές πρωτεΐνες P τύπου ATPάση, CopB και ZntA δεν προκαλούν καταστροφή της αναδίπλωσης. Στην περίπτωση της CopB τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης οδηγούν στην απώλεια της καταλυτική δράσης. Οι μεταλλάξεις στην ZntA μειώνουν την δραστηριότητα της πρωτεΐνης κατά εξήντα τις εκατό.

**Πίνακας 9:** Κινητικές παράμετροι διαφόρων μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη Μένκες.

	Καταλυτική δράση	Επί τις εκατό παραμένουσα δραστηκότητα <sup>β</sup>	Φαινομενική τιμή $K_m^{ATP}$ (μM) <sup>γ</sup>
MNK (κοντρόλ)	0.476±0.017	100	16±4
H1086Q	0.151±0.027	20	2020±670
K1079A	0.251±0.014	91	24±7
R1208G	0.151±0.021	100	9±3
DD1219/1220AA	0.101±0.004	80	4±3
D1230A	0.079±0.004	21	0.87±0.2
K1233M	0.155±0.007	17	150±10
N1366A	δ	δ	δ

α: pmol/<sup>64</sup>Cu/min/mg στην πρωτεΐνη παρουσία 2 μM <sup>64</sup>Cu και 5mM ATP.

β: σχετική καταλυτική δράση εκφρασμένη ως επί τις εκατό της δράσης του *wild type* της Μένκες.

γ: φαινομενική τιμή  $K_m^{ATP}$  παρουσία 2 μM <sup>64</sup>Cu και 0-10 mM ATP

δ: το επίπεδο της μετάλλαξης N1366A είναι 75% του επιπέδου του *wild type* της Μένκες.

Έχουν γίνει μελέτες μετάλλαξης στο μοτίβο <sup>1230</sup>DxxK στην πρωτεΐνη Μένκες το οποίο εμφανίζεται σε όλες τις πρωτεΐνες P τύπου ATPάση βαρέων μετάλλων καθώς και στους κατώτερους οργανισμούς με τη μορφή DxxR. Συνήθως μεταφορείς μη βαρέων μετάλλων περιέχουν το μοτίβο DPPR, το οποίο βρίσκεται στην καταλυτική περιοχή είκοσι εννιά αμινοξέων μετά από το μοτίβο TGD. Μελέτες μετάλλαξης στις Ca, Na/K και H-ATPάσε αποκάλυψαν ότι η αλληλουχία DPPR είναι απολύτως απαραίτητη για την ολοκλήρωση του καταλυτικού κύκλου και στην μεταφορά των κατιόντων. [100-102] Παρόλλες τις δομικές διαφορές της περιοχής που περιέχει το μοτίβο DxxK στο C άκρο των πρωτεϊνών βαρέων μετάλλων από την αντίστοιχη με την αλληλουχία DPPR στους μεταφορείς μη βαρέων μετάλλων, οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν όμοια λειτουργία. [103]

Στην πραγματικότητα η μετάλλαξη K1233M προκαλεί μια σημαντική μείωση της συγγένειας σε ATP (περίπου δέκα φορές) καθώς και της ενδοκυττάριας μεταφοράς. (Πίνακας 6) Όπως προκύπτει από πειράματα με επισημασμένα κυστίδια με  $^{64}\text{Cu}$  οι μεταλλάξεις H1086Q και K1233M παρουσιάζουν δράση άκυλο-φωσφορυλίωσης, ενώ η μετάλλαξη D1044E ανενεργή θέση φωσφορυλίωσης και μηδενική καταλυτική δράση. [103] Εμφανίστηκαν και περιπτώσεις στις οποίες μεταλλάξεις με υψηλή συγγένεια σε ATP να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης. Αυτό εξηγείται αν η μετάλλαξη επηρεάζει διαφορετικά στάδια του καταλυτικού κύκλου π.χ μόνο το στάδιο της δέσμευσης της ATP ή ταυτόχρονα το στάδιο της δέσμευσης με το στάδιο υδρόλυσης.

Απρόβλεπτα η μετάλλαξη D1230A ενώ δείχνει μια σημαντική μείωση στην μεταφορά του χαλκού παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση της συγγένειας σε ATP (περίπου είκοσι φορές), (Πίνακας 6). Παραπέρα ανάλυση αποκαλύπτει ότι παρουσία χαλκού η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη σχηματίζει ένα άκυλο-φωσφορικό ενδιάμεσο από το  $[\gamma\text{-}^{32}\text{ATP}]$  σε ένα σημαντικά υψηλότερο επίπεδο ( $178\pm 20\%$ ) από αυτό του *wild type* της πρωτεΐνης. Επίσης μπορεί και η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη να αποφωσφορυλιώνεται από το ADP όπως ακριβώς συμβαίνει και με το *wild type*. Η απομάκρυνση του χαλκού από αυτές τις μελέτες δεν επιτρέπει διαδοχικούς καταλυτικούς κύκλους της μετάλλαξης D1230A. Η εξαρτώμενη από το χαλκό άκυλο-φωσφορυλίωση και η μειωμένη μεταφορά χαλκού προδίδουν το γεγονός ότι συμβαίνουν αλλαγές στη διαμόρφωση της μεταλλαγμένης περιοχής κατά την ολοκλήρωση του καταλυτικού κύκλου.

Έχει δοθεί μια υπόθεση για το πως διαμορφώνεται ο καταλυτικός κύκλος κατά την μετάλλαξη D1230A στην πρωτεΐνη Μένκες. [97] Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή ένα μεγάλο μέρος του χαλκού παραμένει ενταγμένος μέσα στο κανάλι της κυτταρικής μεμβράνης κατά την μετάβαση από την διαμόρφωση E1 στην E2 και μόνο μια μικρή αναλογία (21%) μεταφέρεται διαμέσου της μεμβράνης. (Σχήμα 12) Η κατακράτηση χαλκού στο κανάλι της μεμβράνης δεν επηρεάζει την μετάβαση από την E2 στην E1. Αντιθέτως φαίνεται να είναι απαραίτητη, τουλάχιστον μερικές φορές, στη διατήρηση της υψηλής συγγένειας σε ATP. [104] Στον *wild type* της πρωτεΐνης Μένκες η μετάβαση E2 σε E1 είναι ανεξάρτητη από τον χαλκό, όμως στην περίπτωση της μετάλλαξης D1230A εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση του χαλκού που εντοπίζεται δεσμευμένος στο κανάλι της κυτταρικής μεμβράνης. Με αυτό τον τρόπο

μπορεί να εξηγηθεί ο φαινότυπος της μετάλλαξης D1230A που χαρακτηρίζεται από υπέρ-φωσφορυλίωση και ταυτόχρονη μειωμένη μεταφορά χαλκού. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν έναν καινούργιο και πρωτοποριακό ρόλο του ασπαρτικού οξέος ( $^{1230}\text{D}$ ) στο μοτίβο DxxK στο ταίριασμα της δέσμευσης του ATP, της υδρόλυσης, και της άκυλο-φωσφορυλίωσης με την ενδοκυττάρια μεταφορά του χαλκού.

Για την διερεύνηση της σχέσης μεταξύ κατάλυσης και ενδοκυττάριας κυκλοφορίας των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών έχουν γίνει μια σειρά από πειράματα σε μεταλλάξεις με μειωμένη την καταλυτική τους δράσης κατά είκοσι τις εκατό σε σχέση με τη δράση του *wild type* της πρωτεΐνης. [97] Όπως έχει προαναφερθεί ο *wild type* της πρωτεΐνης καθώς και οι μεταλλαγμένοι του, εντοπίζονται στο σύστημα Golgi του κυττάρου. [48] Μετά από δυο ώρες έκθεσης σε 200 $\mu\text{M}$  χαλκού, οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις π.χ D1230A και K1233M απομακρύνθηκαν από το σύστημα Golgi ενώ η μετάλλαξη H1086Q παρέμεινε στην αρχική περιοχή του κυττάρου. Υψηλότερη δόση χαλκού (200 $\mu\text{M}$ ) αποτέλεσε να απεντοπισθεί και η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη H1086Q από το σύστημα Golgi αποκαλύπτοντας ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη μειώνει την ευαισθησία της ρυθμιζόμενης από το χαλκό κίνησης. Όταν τα κύτταρα επανήλθαν σε κανονικά επίπεδα όλες οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες επανήλθαν στο σύστημα Golgi. Μηδενική ενδοκυττάρια κυκλοφορία παρουσίασε η μη καταλυτικά δραστική μετάλλαξη N1366A ακόμα και στην παρουσία 300 $\mu\text{M}$  συγκέντρωσης χαλκού.

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα βρέθηκαν κατά την μελέτη της κυκλοφορίας της μετάλλαξης H1086Q η οποία είχε την μικρότερη συγγένεια σε ATP αλλά φυσιολογική συγγένεια σε χαλκό. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη μπόρεσε να μετακινηθεί στην πλασματική μεμβράνη σε παρουσία 300 $\mu\text{M}$  ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χαλκού. Αυτό το φαινόμενο αποκαλύπτει ότι απαιτούνται υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης χαλκού για την ενίσχυση της καταλυτικής δράσης κάτω από συνθήκες περιορισμένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ATP. Έχουν γίνει προβλέψεις κατά τις οποίες όταν η συγκέντρωση του ATP είναι 1 mM η δραστικότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης περιορίζεται ακόμη περισσότερο. Η μειωμένη συγγένεια σε ATP, καθώς και η περιορισμένη κυκλοφορία αποτελεί τα κύρια χαρακτηριστικά του φαινοτύπου της μετάλλαξης H1086Q της πρωτεΐνης Γουίλσον. [97]

Σήμερα επικρατούν δυο υποθέσεις που είναι ικανές να συνδυάσουν την καταλυτική δράση της πρωτεΐνης Μένκες με την ικανότητα κυκλοφορία της. [105]: α)

Η ικανότητα εξοκύττωσης χαλκού είναι αποτέλεσμα των ενδομοριακών αλλαγών στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και γίνεται κατά ένα τρόπο που ρυθμίζεται από την ATP κατά την διάρκεια του καταλυτικού κύκλου, αλλά είναι ανεξάρτητη από την ικανότητα δέσμευσης του χαλκού από την περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης. β) Η εξοκύττωση προκαλείται από την συσσώρευση μιας συγκεκριμένης συγκέντρωσης του χαλκού στο σύστημα Golgi. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι ακόμη και πολύ μικρές τιμές λειτουργικής πρωτεΐνης είναι σε θέση να διασώσουν το φαινότυπο της νόσου Μένκες. [106] Παρόλα αυτά οι μεταλλάξεις της Μένκες με μικρή συγγένεια σε ATP ή σε χαλκό απαιτεί υψηλά επίπεδα ενδοκυττάριου χαλκού, τα οποία βέβαια δεν πετυχαίνονται σε ένα υγιή οργανισμό με αποτέλεσμα να εμφανιστούν δυσλειτουργίες της ομοιόστασης του χαλκού.

## 1.4 ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΛΟΓΩ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΕΝΚΕΣ ΚΑΙ ΓΟΥΙΛΣΟΝ.

### 1.4.1 Νόσος Μένκες

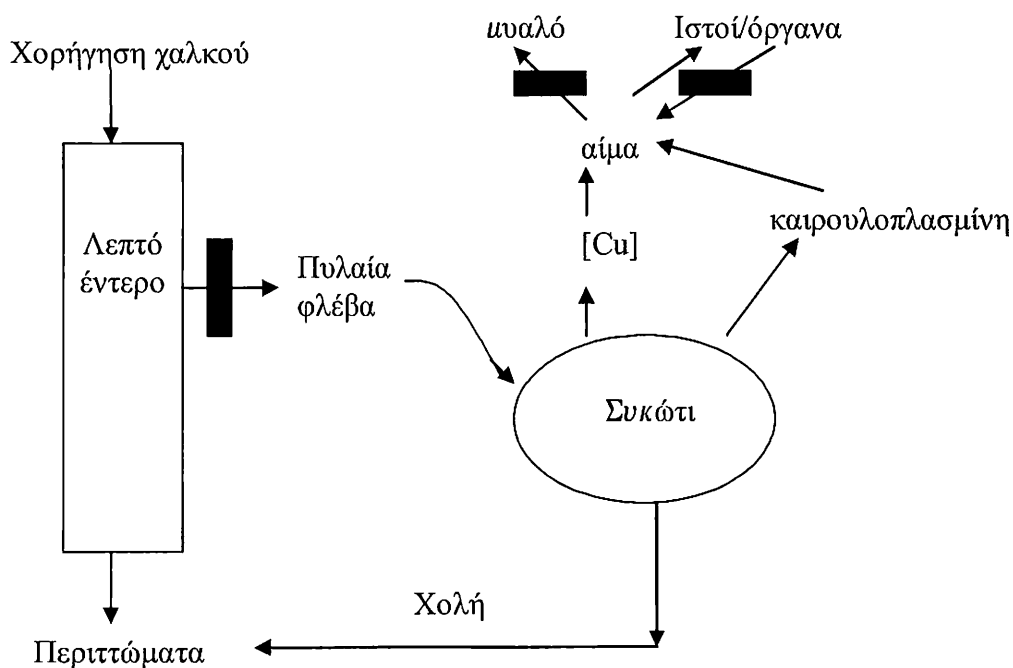
Η ασθένεια του Μένκες ανακαλύφθηκε από τον John Menkes το 1962. [107] Η ασθένεια εντοπίστηκε σε πέντε ασθενείς από την ίδια οικογένεια οι οποίοι όλοι πέθαναν πριν από τα πρώτα τρία χρόνια της ηλικίας τους. Και οι πέντε ασθενείς παρουσίασαν ίδια κλινικά συμπτώματα τα οποία ο Μένκες και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν για να προσδιορίσουν την νόσο. Γενολογική ανάλυση της οικογένειας αποκάλυψε ότι η νόσος περιοριζόταν στους άνδρες και ότι επρόκειτο για κληρονομική ασθένεια η οποία μεταδιδόταν από τους γονείς. Η έναρξη της νόσου γινόταν πολύ νωρίς στη ζωή και πιθανόν από την κατάσταση του εμβρύου. Για την περίπτωση των πρώτων πέντε ασθενών μόνο ένα έμβρυο παρουσίασε προβλήματα κατά τον τοκετό. Τα βάρη των νεογνών ήταν φυσιολογικά αλλά έπειτα κέρδισαν πολύ λίγο βάρος κατά την διάρκεια των πρώτων μηνών της ζωής τους αν και η διατροφή τους ήταν φυσιολογική. Αξιοσημείωτο είναι ότι όλα τα νεογνά που έπασχαν από την νόσο παρουσίασαν ανωμαλίες στο τριχωτό της κεφαλής οι οποίες έγιναν πολύ πιο αισθητές μετά το πέρασμα των πρώτων μηνών. Τα μαλλιά τους είχαν ασυνήθιστα σκληρή αφή και το χρώμα τους ήταν γκριζό. Ο αποχρωματισμός τους αυξανόταν σταδιακά στους πρώτους μήνες της ζωής τους. Παρατήρηση τρίχας, με τη βοήθεια μικροσκοπίου, που απομονώθηκε από άτομο που πάσχει από την νόσο Μένκες αποκάλυψε ότι βρίσκεται σε δύο μορφές: εμφανίζει συστροφές με διαμέτρους που ποικίλουν ή είναι σπασμένη σε διάφορα σημεία. Παρόλο αυτές τις σημαντικές ανωμαλίες στο τριχωτό της κεφαλής, το επίπεδο των σουλφυδρυλίων στα μαλλιά των ασθενών βρέθηκε κανονικό. [107]

Όλοι οι ασθενείς ανέπτυξαν αντίληψη μεταξύ των δύο και δεκαπέντε πρώτων μηνών. Περαιτέρω παρακολούθηση δυο ασθενών αποκάλυψε εκτεταμένο εκφυλισμό του εγκεφάλου του οποίου το μέγεθος ήταν πολύ πιο μικρό του φυσιολογικού. Τα επόμενα χρόνια αναφέρθηκαν και άλλα περιστατικά που ταίριαζαν απόλυτα με τον αρχικό χαρακτηρισμό της νόσου. Αυτά τα περιστατικά εμπλούτισαν τα αρχικά κλινικά χαρακτηριστικά με υποθερμία, θρόμβωση, σκελετικές αλλοιώσεις, αρτηριακή ρήξη και έκζεμα στην επιδερμίδα του προσώπου. [108-109] Παρόλα αυτά χρειάστηκαν δέκα χρόνια για να ανακαλυφθεί ότι η νόσος του Μένκες οφειλόταν στην βλάβη του ανθρώπινου οργανισμού στους μηχανισμούς απορρόφησης και μεταβολισμού του

χαλκού. [108-110] Όλοι οι ασθενείς που εξετάστηκαν έπασχαν από έλλειψη χαλκού στο συκώτι, στον εγκέφαλο και στον ορό του αίματος. (Σχήμα 14) Το χαμηλό επίπεδο χαλκού στον ορό συνοδεύονταν κάθε φορά και με χαμηλά επίπεδα καιρουλοπλασμίνης. Χορήγηση δίαιτας πλούσιας σε χαλκό στους ασθενείς, δεν ήταν ικανή να ανεβάσει τα επίπεδα του χαλκού στον ορό του αίματος αλλά ενδοφλέβιες ενέσεις χαλκού κατάφεραν να αυξήσουν τα επίπεδα καιρουλοπλασμίνης στους ασθενείς. Ο συνδυασμός των παραπάνω παρατηρήσεων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η συμπτωματολογία της νόσου Μένκες οφειλόταν στην ελαττωματική απορρόφηση χαλκού από το έντερο στον ανθρώπινο οργανισμό. [110]

Επί πλέον δουλειά αποκάλυψε ότι τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου οφείλονταν όχι μόνο στην μη φυσιολογική απορρόφηση του χαλκού αλλά και στην προβληματική ενδοκυττάρια μεταφορά. [111-112] Πειράματα σε καλλιέργειες συνδετικού ιστού ασθενών που πάσχουν από την νόσο Μένκες έδειξαν αύξηση στην συσσώρευση ραδιενεργού χαλκού καθώς και υψηλά επίπεδα ενδοκυττάριου χαλκού. [113-114] Μελέτες σε καλλιέργειες μυϊκών ιστών έδειξαν ότι ο συσσωρευμένος ενδοκυττάριος χαλκός βρισκόταν δεσμευμένος με μεταλλοθειονείνες. [115-117] Παράλληλα μετρήσεις των επιπέδων του χαλκού στα μιτοχόνδρια κυτταρικών ιστών σε ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Μένκες δείχνουν ότι είναι στα όρια της ανεπάρκειας. [118]





**Σχήμα 14:** Μονοπάτια που ακολουθεί η κίνηση του χαλκού στο ανθρώπινο οργανισμό και τα μπλοκαρίσματα της από τη νόσο Μένκες. [43]

Στους ασθενείς με την νόσο Μένκες ο χαλκός είναι ανίκανος να απορροφηθεί από το πεπτικό σύστημα και για αυτό μέσω του αίματος διανέμεται σε άλλα όργανα. Αντίθετα ο χαλκός παγιδεύεται στα κύτταρα του εντέρου με την μορφή χαλκός-μεταλλοθειονεΐνες ο οποίος αποβάλλεται από το σώμα όταν τα κύτταρα αυτά πεθάνουν. Η έλλειψη διαθέσιμου χαλκού οδηγεί στην μειωμένη παραγωγή σημαντικών ενζύμων που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το χαλκό όπως π.χ η οξειδάση κυτοχρώματος c, η λυσυλοξειδάση, η β-υδροξυλάση ντοπαμίνης, η υπεροξειδική δισμουτάση, η τυροσινάση και η καιρουλοπλασμίνη [119-120]. (Πίνακας 10) Η λυσυλοξειδάση είναι απαραίτητο ένζυμο στην διασύνδεση κολλαγόνου και ελαστίνης. Η απώλεια αυτού του ενζύμου δικαιολογεί ανωμαλίες στους συνδετικούς ιστούς στον ανθρώπινο οργανισμό που πάσχει από την νόσο Μένκες. [121-122] Χαμηλά επίπεδα κυτοχρώματος c μπορούν να οδηγήσουν σε αστάθεια της θερμοκρασίας του οργανισμού ενώ η έλλειψη τυροσινάσης στον αποχρωματισμό του τριχωτού της κεφαλής. [123] (Εικόνα1) Είναι αξιοσημείωτο ότι μελέτες σε πειραματόζωα προσβεβλημένα από την νόσο έδειξαν φυσιολογική δράση των χαλκό-ενζύμων στο συκώτι παρόλο το χαμηλό επίπεδο του

χαλκού στο όργανο αυτό. [124] Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεταφορά του χαλκού στο συκώτι είναι ανεπηρέαστη από την εμφάνιση της νόσου.

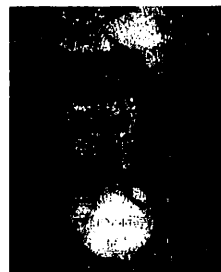
**Πίνακας 10:** Εργαστηριακές μετρήσεις σε ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Μένκες.

	<b>Αποτελέσματα (mg/dl)</b>	<b>Φυσιολογικές τιμές (mg/dl)</b>
Χαλκός στον ορό του αίματος	<70	80-160
Καιρουλοπλασμίνη στον ορό του αίματος	<20	20-60
Αναλογία (DOPA/DHPG) <sup>α</sup> στον ορό του αίματος	>5	1.7-3.3
Αναλογία (DOPA/DHPG) στον εγκεφαλονωτιαίο υγρό.	>1	0.3-0.7

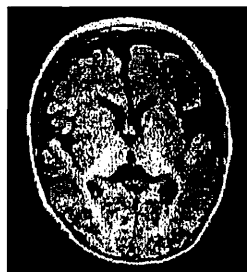
α: DOPA=υδρόξυ-φαινυλανίνη, DHPG= δι-υδρόξυ-φαινυλανίνη



α



β



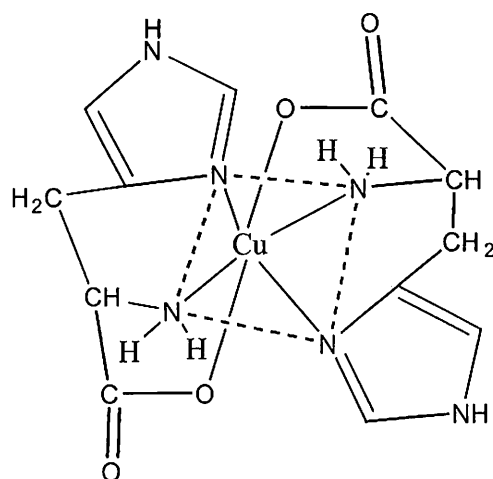
γ

**Εικόνα 1:** Συμπτωματολογία της νόσου Μένκες, α) ανωμαλίες στο τριχωτό της κεφαλής, έκζεμα στο δέρμα, β) διογκωμένη ουροδόχος κύστη με κυστίδια να την περιβάλλουν γ) ατροφία εγκεφάλου και έκχυση υγρών στο αριστερό ημισφαίριο

Η απομόνωση του γονιδίου της Μένκες αποκάλυψε πολλές πληροφορίες για την πηγή της ασθένειας. Το γονίδιο της Μένκες βρίσκεται στο Xq13 περιοχή του X

χρωμοσώματος. [125-126] Έχει απομονωθεί το γονίδιο από τρεις ερευνητικές ομάδες συνολικά. [127-129] Μελέτες αποκαλύπτουν ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε όλους τους ιστούς εκτός από το συκώτι. [128-129] Περίπου το δεκαπέντε με είκοσι της εκατό των μεταλλάξεων σε ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Μένκες είναι μεταλλάξεις διαγραφής διαφόρων περιοχών. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι στους ασθενείς που πάσχουν από την νόσο υπάρχουν μεταλλάξεις αντικατάστασης, διαγραφής, στην θέση ματίσματος που οδηγούν στην έλλειψη του εξονίου. [130] Παρόλο αυτά είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχουν μεταλλάξεις στη θέση ματίσματος που δεν οδηγούν στην κλασική μορφή της ασθένειας του Μένκες. Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις οδηγούν σε πιο ήπιες μορφές της νόσου όπως η χαλάρωση του δέρματος ή το σύνδρομο OHS (*Occipital Horn Syndrome*). [131-132] Αυτές οι καταστάσεις χαρακτηρίζονται μόνο από ανωμαλίες συνδετικών ιστών όπως υπερελαστικό δέρμα και κρανιακές αλλοιώσεις ενώ τα άλλα χαρακτηριστικά της νόσου Μένκες απουσιάζουν. [133]

Η θεραπεία των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο Μένκες αποβλέπει στην αποκατάσταση των φυσιολογικών επιπέδων χαλκού στο σώμα με την χορήγηση χαλκού. Αφού η συσσώρευση του χαλκού στο έντερο είναι πάρα πολύ χαμηλή ο χαλκός πρέπει να χορηγείται παρεντερικά. Ο χαλκός χορηγήθηκε με διάφορες μορφές όπως χλωριούχος χαλκός, θεικό χαλκό και σύμπλοκο του χαλκού με EDTA. Όμως βρέθηκε ότι αυτά τα σύμπλοκα δεν είναι ικανά να προκαλέσουν σημαντική βελτίωση στην όλη κλινική εικόνα και κυρίως στο νευρικό ιστό. [134] Το σύμπλοκο του χαλκού με ιστιδίνη έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα στην θεραπεία της νόσου Μένκες. [135] Το σύμπλοκο αυτό είναι φυσικό συστατικό του ορού του αίματος και παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση και μεταφορά του χαλκού. [136-138] Μελέτες απορρόφησης *in vitro* αποκάλυψαν ότι ο χαλκός προσλαμβάνεται από τους ιστούς του μυαλού με τη μορφή συμπλόκου με ιστιδίνη. [138-140]



**Σχήμα 15:** Το σύμπλοκο δι-(ιστιδινάτο-O,N) χαλκός (II). [135]

Οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν υποδερμικές ενέσεις του συμπλόκου δι-(ιστιδινάτο-O,N) χαλκός (II) παρουσίασαν σημαντική κλινική και βιοχημική βελτίωση.[141-143] Σε αυτές τις περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ομαλοποίηση του επιπέδου του χαλκού στον ορό του αίματος, της καιρουλοπλασμίνης, της ντοπαμίνης και της νορεπινεφρίνης μετά από τρεις μήνες θεραπείας. [143] Η ομαλοποίηση των επιπέδων της ντοπαμίνης και της νορεπινεφρίνης οφείλεται στην αποκατάσταση της λειτουργίας του ενζύμου β-υδροξυλάση ντοπαμίνης. Οι ασθενείς που παρουσίασαν βελτίωση με τη χορήγηση του συμπλόκου χαλκού-ιστιδίνης υποβλήθηκαν σε εξετάσεις προσδιορισμού της αλληλουχίας DNA. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη Μένκες κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη P τύπου ATPάση στην οποία λείπουν σημαντικές περιοχές στο πυρήνα της πρωτεΐνης. [144] Παρόλες της σημαντικής βελτίωσης της κλινικής εικόνας, οι ασθενείς εξακολουθούσαν να εμφανίζουν ανωμαλίες στους συνδετικούς ιστούς. Αυτό οφειλόταν στο ότι ο χαλκός με αυτή τη μορφή που χορηγήθηκε δεν ήταν ικανός να δεσμευτεί από την λυσυλοξειδάση. Μελέτες σε πειραματόζωα που πάσχουν από την νόσο Μένκες έδειξαν ότι η χορήγηση χαλκού (I) με υποδερμικές ενέσεις ήταν ικανή να αυξήσει δραματικά τα επίπεδα της λυσυλοξειδάσης. [145] Αυτό το αποτέλεσμα αποτελεί ένδειξη ότι η οξειδωτική κατάσταση του χαλκού επηρεάζει την κινητικότητα του χαλκού στο ενδοκυττάριο χώρο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η θεραπεία με συνδυασμό χαλκού (I) και (II) μπορεί να είναι η πιο αποτελεσματική από κάθε άλλη.

Οι πρώτες μεταλλάξεις σε ποντίκια που αποδόθηκαν στην νόσο Μένκες ή στο σύνδρομο OHS ανακαλύφθηκαν το 1950. [109,146-147] Γενετική ανάλυση αυτών των

ποντικιών καθώς και απομόνωση του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Μένκες αποκάλυψαν ότι τα δυο γονίδια παρουσίαζαν υψηλή ομολογία που έφτανε το ενενήντα τις εκατό. [148] Ο μηχανισμός ο οποίος ρυθμίζει τα γονίδια αυτά στο ανθρώπινο οργανισμό ή στα ποντίκια είναι άγνωστος προς το παρόν.

#### **1.4.2 Νόσος Γουίλσον.**

Η ασθένεια Γουίλσον είναι μια κληρονομικά μεταδιδόμενη, με αυτοσωμικό γονίδιο, ασθένεια, χωρίς φαινοτυπική δράση και χαρακτηρίστηκε πρώτα από τον Kinear Wilson. [149]. Τα άτομα που πάσχουν από την νόσο αυτή πάσχουν από συσσώρευση χαλκού στο συκώτι και στο μυαλό. [150-151] Οι ασθενείς ταξινομούνται σε τρεις ομάδες: αυτούς που εμφανίζουν ηπατικά συμπτώματα, νευρολογικά συμπτώματα και τέλος την ομάδα εκείνη των ασθενών που εμφανίζουν και ηπατικά και νευρολογικά συμπτώματα. Γενικά τα συμπτώματα της νόσου δεν είναι συγκεκριμένα και έτσι η διάγνωση της γίνεται δύσκολα και απαιτεί πολύ έμπειρο γιατρό. Η έναρξη της νόσου γίνεται στο όγδοο η ένατο έτος της ηλικίας των ασθενών ενώ στην εφηβεία τους συνήθως παρουσιάζονται οι πρώτες δυσλειτουργίες του ήπατος. [152]

Το φάσμα της συμπτωματολογίας το οποίο αποδίδεται στην δυσλειτουργία του ήπατος είναι πολύ ευρύ και μπορεί να περιέχει ακόμα και ίκτερο, κίρρωση, ήπια μορφή ηπατίτιδας ή χρόνια ηπατίτιδα. [153] Πέρα από τα παραπάνω ηπατικά συμπτώματα ένα μικρό ποσοστό των ασθενών (περίπου είκοσι τις εκατό) στο τελευταίο στάδιο της ασθένειας πάσχει από σκελετικές ανωμαλίες, όπως οστεοπόρωση και αρθρίτιδα..[154]

Η εξέλιξη της νόσου Γουίλσον χωρίζεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο, ο χαλκός συσσωρεύεται στα ηπατικά κύτταρα. Στο δεύτερο στάδιο η αύξηση των επιπέδων χαλκού στο ενδοκυττάριο χώρο προκαλεί μετακίνηση του χαλκού, ο οποίος είναι πιθανώς δεσμευμένος από μεταλλοθειονεΐνες, στα λυσοσώματα. [155] Το υψηλό επίπεδο του χαλκού οδηγεί στην ηπατική νέκρωση και στην απελευθέρωση υψηλής ποσότητας καιρουλοπλασμίνης στον ορό του αίματος. Όμως η απότομη αύξηση της συγκέντρωσης του χαλκού στον ορό του αίματος προκαλεί βλάβη στις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων οδηγώντας σε αιμολυτική αναιμία. [153-154] Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει συσσώρευση σε άλλα όργανα όπως το μυαλό, τους πνεύμονες και στον κερατοειδή χιτώνα. Η συσσώρευση στον κερατοειδή χιτώνα ευνοεί τους δακτυλίους Kayser-Fleischer οι οποίοι είναι κύρια χαρακτηριστικά της νόσου. Αυτοί οι δακτύλιοι παρουσιάζονται στο ενενήντα πέντε τις εκατό των ασθενών με τη νόσο Γουίλσον και

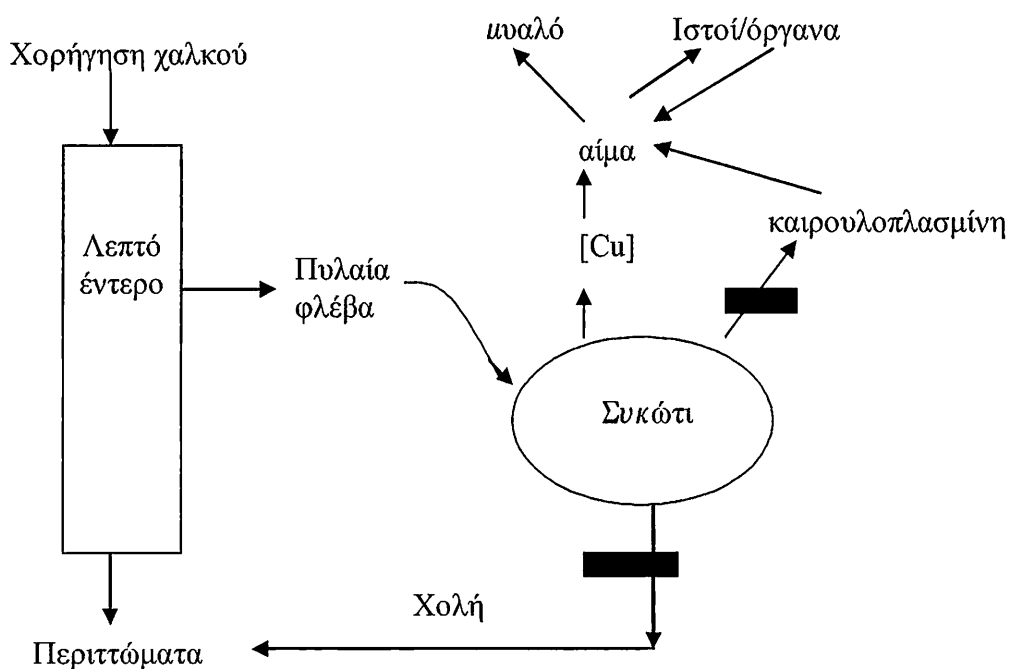
στο εκατό τις εκατό των ασθενών με νευρολογικές ασθένειες. [120] Στα τελευταία στάδια της ασθένειας η συσσώρευση του χαλκού στο μυαλό είναι η αιτία για την εμφάνιση νευρολογικών διαταραχών. Αυτή η παρατήρηση συμβαδίζει με τη γενική εικόνα δηλαδή ότι τα ηπατικά συμπτώματα εμφανίζονται στα πρώτα χρόνια μετά την εμφάνιση της νόσου, ενώ τα νευρολογικά σε πολύ πιο προχωρημένο στάδιο από την στιγμή έναρξης. [156-157] Τα νευρολογικά συμπτώματα τη νόσου συνήθως είναι ρίγος, παραφροσύνη, παραλογία, αλλαγή προσωπικότητας, προβλήματα άρθρωσης, και συμπεριφοράς. [153,158]

Βιοχημικές εξετάσεις σε ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Γουίλσον αποκάλυψαν διαταραχές στα επίπεδα ομοιόστασης του χαλκού στον οργανισμό. (Σχήμα 16). Η αποβολή του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό αλλάζει με την ελαττωματική απομάκρυνση του από τη χολή και την αυξημένη απομάκρυνση του από την ουροδόχο κύστη. [159] Τα επίπεδα της καιρουλοπλασμίνης είναι μειωμένα στον ορό του αίματος με αποτέλεσμα να ευνοείται η δέσμευση του χαλκού από την αλβουμίνη και από άλλα χαμηλού μοριακού βάρους σύμπλοκα. Συνολικά όμως τα επίπεδα του στον ορό του αίματος είναι μειωμένα. [160] Ο εγκέφαλος, το συκώτι και το νεφρό παρουσιάζουν πολύ υψηλά επίπεδα χαλκού με αποτέλεσμα τα όργανα αυτά να υπολειπώνονται. [152] Τελικά ο πιο σημαντικός λόγος συσσώρευσης χαλκού στην νόσο Γουίλσον είναι η ελαττωματική απομάκρυνση του από την χολή. [157]

Η καιρουλοπλασμίνη είναι μια μπλε γλυκοπρωτεΐνη και είναι υπεύθυνη για την συγκέντρωση του χαλκού στο πλάσμα. Τα χαμηλά επίπεδα καιρουλοπλασμίνης στην νόσο Γουίλσον είναι το αποτέλεσμα των διαταραχών στην μεταφορά του χαλκού στην άπο-μορφή της πρωτεΐνης κατά την σύνθεση της στο κυτόπλασμα. Μελέτες στην ενσωμάτωση του χαλκού στην καιρουλοπλασμίνη προτείνουν ότι η ένταξη γίνεται χωρίς σε ένα βιοσυνθετικό στάδιο στο ενδοπλασματικό δίκτυο. [165]

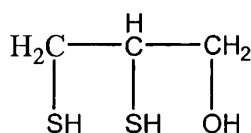
Η κρυσταλλική δομή της καιρουλοπλασμίνης, στην μορφή της που είναι ενταγμένος ο χαλκός, έχει λυθεί.[161] Η πρωτεΐνη περιέχει έξι άτομα χαλκού, από τα οποία τα τρία βρίσκονται σε ένα τριπυρηνικό κέντρο. Η ακριβής λειτουργία της καιρουλοπλασμίνης στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται κάτω από μελέτη ακόμα και μέχρι σήμερα. Υπάρχουν αρκετές αναφορές κατά τις οποίες η καιρουλοπλασμίνη παίζει σπουδαίο ρόλο στην μεταφορά του χαλκού [162-163] καθώς και στο μεταβολισμό του σιδήρου. [164-166] Έχει αναφερθεί ότι διάφορες μεταλλάξεις στη καιρουλοπλασμίνη

οδηγούν σε δυσλειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. [166] Ασθενείς που βρίσκονται κάτω από τέτοιες συνθήκες παρουσιάζουν διαβήτη, νευρολογικές ασθένειες, εκφυλισμό του αμφιβληστροειδούς και συσσώρευση σιδήρου στον εγκέφαλο. Όμως η μεταφορά του χαλκού και η ομοιοστάση του παραμένει αμετάβλητη. Συσσώρευση του σιδήρου δεν περιέχεται στα συμπτώματα της νόσου Γουίλσον και αυτό ισοδυναμεί αυτόματα με το ότι στους ασθενείς της νόσου η υπολειπόμενη ποσότητα της καιρουλοπλασμίνης διατηρεί σε ισορροπία τους μηχανισμούς ομοιοστάσης του σιδήρου.

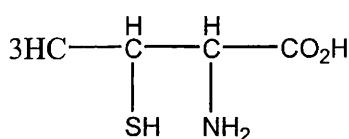


**Σχήμα 16:** Τα μονοπάτια της κίνησης του χαλκού στο ανθρώπινο οργανισμό και τα μπλοκαρίσματα της από τη νόσο Γουίλσον. [43]

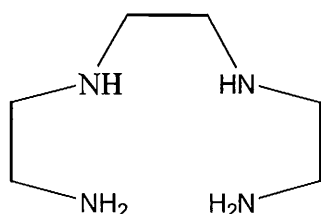
Η θεραπευτική αγωγή της νόσου του Γουίλσον περιλαμβάνει τη χρήση διαφόρων χηλικών αντιδραστηρίων ( Σχήμα 17), τα οποία μπορούν να μετακινήσουν το χαλκό από προσβαλλόμενα όργανα και να προωθήσουν την απομάκρυνση του από τα ούρα.



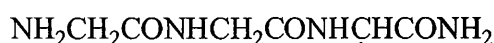
Διμερκαπρόλη(BAL)



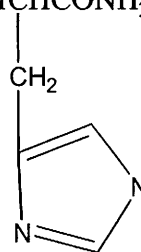
D-πενικιλλαμίνη



1,8-διαμυνο-3,6-διαζωοκτάνιο (trien)



GlyglyhisNH<sub>2</sub>



**Σχήμα 17:** Χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιούμενα για τη θεραπεία της νόσου του Γουίλσον.

Το πρώτο χημικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στην θεραπεία της νόσου είναι η Διμερκαπρόλη (BAL). [167] Σημαντική κλινική βελτίωση με την χορήγηση του αντιδραστηρίου BAL παρουσιάστηκε μετά από μακρά περίοδο θεραπείας και ήταν λιγότερο σημαντική στις δύσκολες μορφές της νόσου.[168] Όμως οι ασθενείς είχαν να αντιμετωπίσουν επίπονες χορηγήσεις ενδομυϊκών ενέσεων. Το επόμενο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για την θεραπευτική αγωγή της νόσου του Γουίλσον ήταν η D-πενικιλλαμίνη.[169] Η D-πενικιλλαμίνη προτιμήθηκε από το αντιδραστήριο BAL στο ότι αυτή χορηγείται από το στόμα, είναι λιγότερο τοξική και περισσότερο δραστική. Η κανονική δόση για τους ενήλικες είναι 500 mg δύο φορές την ημέρα. Με αυτή τη δόση η αποβολή χαλκού από τα ούρα αυξάνεται κατά 4-5 mg την ημέρα. [170] Η θεραπευτική αγωγή με D-πενικιλλαμίνη συνήθως διαρκεί ισόβια και εμφανίζει σημαντικές κλινικές και βιολογικές βελτιώσεις σε πολλές μορφές της νόσου του Γουίλσον. Σε μερικούς ασθενείς τα νευρολογικά συμπτώματα εξαφανίζονται, το συκώτι λειτουργεί κανονικά και οι δακτύλιοι Kayser-Fleischer υποχωρούν. [171] Όμως όπως και στα περισσότερα φάρμακα έτσι και η D-πενικιλλαμίνη παρουσιάζει αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες. Μερικές από αυτές είναι ο πυρετός, ανορεξία και η καταστολή των λευκοκυττάρων [153,170,172]. Σε πολύ μεμονωμένες περιπτώσεις



εμφανίζονται παρενέργειες λόγω τοξικότητας όπως ο ερυθρηματώδης λύκος και το σύνδρομο Goodpasture. [153-170] Παράλληλα καταγράφηκαν τουλάχιστον δυο περιπτώσεις όπου ασθενείς μετά την χορήγηση D-πενικιλλαμίνης παρουσίασαν νευρολογικά προβλήματα. [173-174]

**Πίνακας 11:** Διαφορές της ασθένειας του Μένκες από του Γουίλσον. [6]

	<b>Μένκες ασθένεια</b>	<b>Γουίλσον ασθένεια</b>
<b>Εργαστηριακά αποτελέσματα</b>	1) Αύξηση των επιπέδων χαλκού στον ορό του αίματος 2) Μείωση των επιπέδων χαλκού στο συκώτι 3) Αύξηση των επιπέδων χαλκού στο έντερο και νεφρό.	1) Μείωση των επιπέδων χαλκού στον ορό του αίματος 2) Αύξηση των επιπέδων χαλκού στο συκώτι 3) Αύξηση των επιπέδων χαλκού στην ουροδόχο.
<b>Επίδραση στον οργανισμό</b>	Απορρόφηση του χαλκού στο έντερο	Μείωση της αποβολής του χαλκού από την χολή
<b>Θεραπεία</b>	Χορήγηση ενέσεων χαλκού-ιστιδίνης	Χρήση χηλικών αντιδραστηρίων
<b>Εντοπισμός γονιδίου</b>	X χρωμόσωμα	Χρωμόσωμα 13

Στις περιπτώσεις όπου η D-πενικιλλαμίνη εμφάνισε τοξικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό χρησιμοποιήθηκαν άλλα χηλικά αντιδραστήρια όπως το 1,8-διαμονο-3,6-διαζωοκτάνιο (*trien*) [175-176], το  $\text{glyglyhisNH}_2$  και η θεραπεία με ψευδάργυρο. [177-180] Η θεραπευτική αγωγή με *trien* παρουσίασε μεγάλη επιτυχία σε γυναίκες κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης χωρίς παρενέργειες στο έμβρυο. [181] Κατά τη θεραπεία με ψευδάργυρο η αποβολή του χαλκού γίνεται μέσω των κοπράνων και όχι των ούρων όπως συμβαίνει με τις άλλες θεραπευτικές αγωγές. Ο ψευδάργυρος επιτρέπει την αποβολή του χαλκού ευνοώντας τη σύνθεση των μεταλλοθειονεϊνών στο έντερο μπλοκάροντας έτσι την απορρόφηση του χαλκού. [182] Αξιοσημείωτο είναι ότι παρόλο που ο ψευδάργυρος ευνοεί την σύνθεση των μεταλλοθειονεϊνών περισσότερο από το χαλκό οι μεταλλοθειονεϊνες έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με το χαλκό παρά με τον ψευδάργυρο. [183] Ασθενείς με εξασθένηση του ήπατος και εγκεφαλοπάθεια

βρίσκονται κάτω από θεραπευτική αγωγή με χηλικά αντιδραστήρια. Σε αυτές τις περιπτώσεις μεταμόσχευση ήπατος είναι η μόνη ελπίδα για επιβίωση των ασθενών. Στατιστικά αποτελέσματα από πενήντα επτά ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση ήπατος αποκάλυψαν ότι το ποσοστό βιωσιμότητας ήταν 72% μετά από τον πρώτο χρόνο. [153,184]

### 1.4.3 Σύνδρομο OHS. (Occipital Horn Syndrome)

Επίσημα το σύνδρομο OHS είναι γνωστό με το όνομα “χαλάρωση του μεσοδερμικού στρώματος”, ή “Ehlers-Danlos σύνδρομο τύπου 9”. Ο φαινότυπος αυτής της νόσου είναι πολύ πιο ήπιος από αυτόν της νόσου Μένκες και περιλαμβάνει εμφανείς συνδετικούς ιστούς, χαλάρωση του δέρματος, ευερεθιστότητα στις κλειδώσεις, διογκωμένη ουροδόχος κύστη και περιστασιακά νευρολογικές εμπλοκές. [133,185-186] Έχει αναφερθεί ότι ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο OHS παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα για διάφορα χαλκοένζυμα όπως την λυσυλοξειδάση που είναι υπεύθυνη για την διασύνδεση ελαστίνης και κολλαγόνου.[133] Στο παρελθόν έχουν γίνει υποθέσεις ότι το σύνδρομο OHS οφείλεται στην παρουσία χαμηλών επιπέδων πρωτεΐνης Μένκες στον ανθρώπινο οργανισμό. [132] Πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση αφού αποδεικνύουν ότι στην περίπτωση του συνδρόμου OHS τα επίπεδα αντιγραφής του γονιδίου *ATP7a* μειώνονται κατά πέντε τις εκατό από τα φυσιολογικά επίπεδα. [87] Η λυσυλοξειδάση είναι πολύ πιο ευαίσθητη από όλα τα άλλα χαλκοένζυμα στην απουσία χαλκού και γι αυτό παρουσιάζει χαμηλή δράση στους ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο OHS. [188]

Υπάρχουν 35-40 διαφορετικές περιπτώσεις του συνδρόμου OHS [187] αλλά μόνο οκτώ μεταλλάξεις που οδηγούν στο σύνδρομο αυτό έχουν απομονωθεί σε μοριακό επίπεδο. (Πίνακας 12) Οι επτά από τις οκτώ μεταλλάξεις οδηγούν σε μη φυσιολογικό μάτισμα κατά την αντιγραφή του γονιδίου *ATP7a*. [95,189-191] Τέσσερις περιπτώσεις μεταλλάξεων στη θέση ματίσματος παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα αντιγραφής.[129] Δύο από τις παραπάνω περιπτώσεις όπου οι μεταλλάξεις οδηγούν σε μη φυσιολογικό μάτισμα στο στάδιο αντιγραφής, με αλλαγή ενός αμινοξέος από την αλληλουχία του *wild type*, δεν επηρέασαν καθόλου την λειτουργία της πρωτεΐνης Μένκες. [189] Στην οικογένεια των μεταλλάξεων του συνδρόμου OHS αυτή που εμφανίζεται στο ιντρόνιο δέκα δεν παρουσιάζει φυσιολογική μεταγραφή του γονιδίου και κατά επέκταση χαμηλά

επίπεδα παραγωγής φυσιολογικής πρωτεΐνης Μένκες. [187] Επίσης έχει αναφερθεί και μετάλλαξη όχι στην περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου *ATP7a* αλλά διαγραφή ενενήντα οκτώ βάσεων στην ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου. [188]

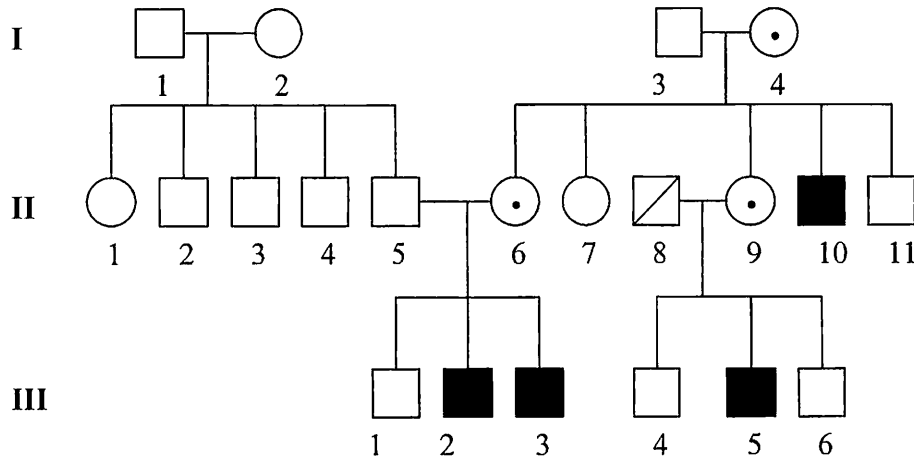
**Πίνακας 12:** Η ομάδα των μεταλλάξεων στο σύνδρομο OHS.

Μετάλλαξη	Μετάλλαξη στη θέση ματίσματος.	mRNA
-403del98nt	Όχι	Ρυθμιστική περιοχή.
IVS6+3del(tag)	Ναι	Εξόνιο έξι
2055C→ T	Ναι	Εξόνιο οκτώ
IVS10+3a→ t	Ναι	Εξόνιο δέκα
2642A→ G	Ναι	Εξόνιο έντεκα
IVS14-4a→ g	Ναι	Εξόνιο δεκαπέντε
IVS17+5g→ a	Ναι	Εξόνιο δεκαεπτά
4497-4499delG	Όχι	Εξόνιο είκοσι τρία

Το σύνδρομο OHS είναι κληρονομικό και μεταδίδεται όπως φαίνεται το σχήμα 18. Ενδιαφέρον ιδιαίτερο παρουσίασε ο ασθενής 2 της τρίτης γενιάς (III) (Σχήμα 18). Ο ασθενής αυτός μπόρεσε να σταθεί όρθιος χωρίς βοήθεια στα επτά χρόνια της ηλικίας του. Υποβλήθηκε σε εξετάσεις και τα αποτελέσματα έδειξαν κυστίδια γύρω από την ουροδόχο κύστη, νεφρική ανεπάρκεια, κήλη στη βουβωνική χώρα. Ταυτόχρονα είχε υπερελαστικό δέρμα κυρίως στην κοιλιακή χώρα. Δεν παρουσίασε χρόνια διάρροια ή συμπτώματα δυσεντερίας. Η σκελετική εξέταση του ατόμου αυτού αποκάλυψε ασθeneίς θωρακικές αλλοιώσεις, οσφυϊκή πλατυσπονδυλίτιδα, διαπλάτυνση ωμοπλάτης και αυχένα και σκελετικές αλλοιώσεις στις κλείδες. Στα οκτώ χρόνια της ηλικίας του το επίπεδο του χαλκού στον ορό του αίματος ήταν ελαφρώς πιο χαμηλό από τα φυσιολογικά επίπεδα 60μg/dl (φυσιολογική περιοχή:70-150 μg/dl) καθώς και τα επίπεδα της καιρουλοπλασμίνης 18,9μg/dl (φυσιολογική περιοχή:20-42 μg/dl).[192]

Η πιο συνηθισμένη μορφή του συνδρόμου OHS είναι η διαγραφή μιας γουανίνης στο εξόνιο είκοσι τρία του γονιδίου *ATP7a* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Μένκες. Αυτή η διαγραφή οδηγεί στην εμφάνιση δεκατριών νέων αμινοξέων και την απουσία του μοτίβου L1487L1488 που βρίσκεται στο *wild type* της πρωτεΐνης Μένκες. Το μοτίβο αυτό αποτελείται από δύο λευκίνες και δίνει το ερέθισμα για την μετακίνηση

της πρωτεΐνης από το Golgi σύστημα στην πλασματική μεμβράνη. Παρόλο αυτά η μετάλλαξη στο εξόνιο είκοσι τρία δεν οδηγεί στην νόσο Μένκες αλλά στο σύνδρομο OHS. [192]



**Σχήμα 18:** Η κληρονομική μετάδοση του συνδρόμου OHS μέσα από τρεις γενιές (I,II,III). Μαυρισμένα τετράγωνα αντιστοιχούν σε άνδρες που έχουν προσβληθεί, ενώ τα λευκά σε υγιείς άνδρες. Κύκλοι με τελεία αντιστοιχούν σε γυναίκες φορείς ενώ απλοί κύκλοι σε υγιείς γυναίκες. [192]

## 1.5 ΔΟΥΛΕΥΟΝΤΑΣ ΜΕ ΔΟΜΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΗ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ.

### 1.5.1 Γενικά.

Μετά από τον πρώτο επιτυχή προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδίου του βακτηρίου *H.influenzae* το 1995, αυξήθηκε αισθητά ο αριθμός παρόμοιων εργασιών στην παγκόσμια ερευνητική κοινότητα. [193] Παράλληλα, ο χρόνος που απαιτείται για τον προσδιορισμό ολόκληρης της αλληλουχίας ενός γονιδίου έχει μειωθεί αισθητά. Το γεγονός ότι σήμερα στις βάσεις δεδομένων προστίθενται με γρήγορους ρυθμούς όλο και περισσότερα γονίδια με πλήρους προσδιορισμένη αλληλουχία, το θεμελιώδες πρόβλημα απόκτησης πληροφοριών για την λειτουργικότητα κάθε κωδικοποιημένης πρωτεΐνης έχει γίνει πρόκληση. Η ικανότητα εξαγωγής συμπερασμάτων από τριών διαστάσεων δομικά δεδομένα πολύ πιο αξιόπιστα από αυτά που βγαίνουν, π.χ από τις μεθόδους σύγκρισης αλληλουχίας, οδήγησαν την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα σε προσπάθειες επίλυσης δομών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από μια ευρεία ομάδα γονιδίων. Οι προσπάθειες αυτές αποδίδονται με την έκφραση “*Δομικά γονίδια*” ή “*Structural Genomics/Structural Proteomics*” στα διεθνή επιστημονικά περιοδικά. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτές οι προσπάθειες απαιτούν αυστηρό χρονοδιάγραμμα για όλα τα στάδια από την έκφραση /καθαρισμός της πρωτεΐνης μέχρι και την προετοιμασία του δείγματος για προσδιορισμό της δομής. Για την ικανοποίηση των παραπάνω απαιτήσεων είναι απαραίτητες παράλληλοι μέθοδοι εργασίας και όσο το δυνατόν υψηλά επίπεδα αυτοματισμού.

Ακόμα και για τις πρωτεΐνες που είναι διαθέσιμες, άμεσες πληροφορίες για την λειτουργία τους από βιοχημικές ή γονιδιακού επιπέδου μελέτες, είναι απαραίτητες και οι γνώσεις των δομικών πληροφοριών. Οι πληροφορίες αυτές οδηγούν στη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους οι πρωτεΐνες εκτελούν τις λειτουργίες τους. Οι δομικές πληροφορίες είναι επίσης απαραίτητες για την κατανόηση της δυσλειτουργίας μιας πρωτεΐνης. Επιπλέον πειραματικές δομές μπορούν να εκμεταλλευθούν στο να «χτίσουν» υπολογιστικά μοντέλα για δομές που δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα. [194] Για να γίνει αυτό εφικτό είναι απαραίτητο να υπάρχουν πειραματικές δομές πρωτεϊνών διαφορετικού τύπου και από διαφορετικούς οργανισμούς έτσι ώστε να υπάρχουν αρκετές δομικές φόρμες για όλες τις πρωτεΐνες. [195]

### 1.5.2 Φιλοσοφία και στρατηγική.

Η νέα στροφή στον ερευνητικό χώρο των δομικών γονιδίων είναι η προσαρμογή των δομικών πληροφοριών μιας τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης στην κατανόηση λειτουργιών και μηχανισμών που παίρνουν μέρος σε βιο-ανόργανα συστήματα. Ο κύριος σκοπός είναι η βαθιά γνώση του ρόλου των μεταλλικών ιόντων σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα, προσδιορίζοντας όχι μόνο τις δομές των μέταλλο-ενζύμων αλλά και την δυνατότητα τους να αλληλεπιδρούν με άλλα ένζυμα και πιθανώς με νουκλεϊκά οξέα. Στις εργασίες με δομικά γονίδια στη βιο-ανόργανη χημεία το μοναδικό κριτήριο επιλογής της πρωτεΐνης στόχου είναι η βιο-ανόργανη λειτουργία του ενζύμου σε αντίθεση με τις συνηθισμένες έρευνες με δομικά γονίδια που εστιάζουν την προσοχή τους σε συγκεκριμένους οργανισμούς ή στον εμπλουτισμό των πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων με καινούργιες αναδιπλώσεις. Συμπερασματικά στην περίπτωση της βιο-ανόργανης έρευνας από το σύνολο των δομικών γονιδίων επιλέγονται τα λειτουργικά γονίδια (*Functional Genomics*).

Μέχρι σήμερα υπάρχει ένα πλήθος εργασιών που αποβλέπουν στον προσδιορισμό της δομής πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του χαλκού. Από βιο-πληροφορικές αναλύσεις και βιβλιογραφικά δεδομένα αριθμούνται γύρω στις 350 πρωτεΐνες αυτές που δεσμεύουν ιόντα χαλκού ή είναι άμεσα συνδεδεμένες με την ομοιόσταση του χαλκού.[196] Αυτές οι πρωτεΐνες είναι χωρισμένες σε 20 ομάδες, με βάση φυλογενετικά δένδρα και συγκρίσεις αλληλουχιών από κατάλοιπα. Από κάθε ομάδα επιλέχτηκαν πρωτεΐνες στόχοι ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους όπως προβλεπόμενη σταθερότητα, μέγεθος πρωτεΐνης και ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Όπου ήταν δυνατόν οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από περισσότερους από έναν οργανισμούς. Πρωτεΐνες από ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς με παρόμοια αλληλουχία καταλοίπων ομαδοποιούνταν στην ίδια οικογένεια.

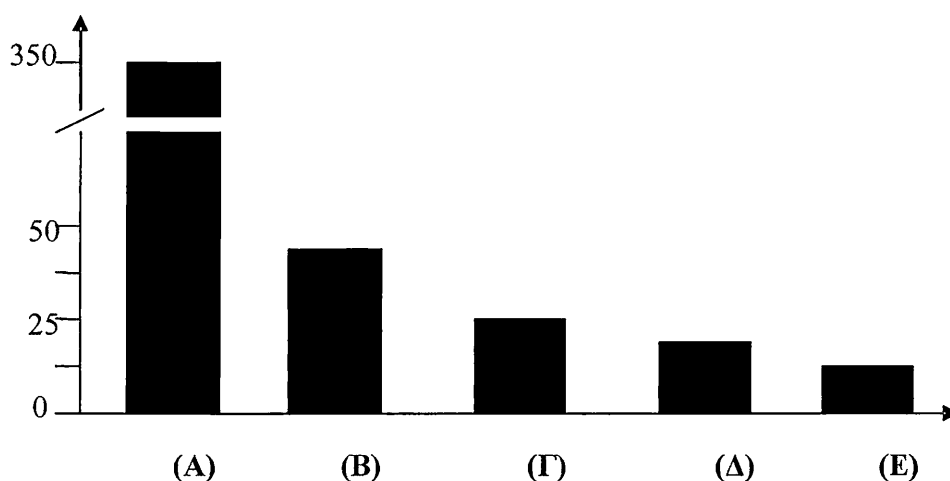
Συνολικά συγκεντρώθηκαν 39 στόχοι για έκφραση (Σχήμα 19), από τις οποίες 20 έδειξαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (*SDS-page*) ικανοποιητική απόδοση έκφρασης. Οι στόχοι που παρουσίασαν καλή έκφραση καθαρίστηκαν σε πολύ υψηλό επίπεδο από συνδυασμό χρωματογραφίας αχιστείας και διαχωρισμού με βάση το μοριακό βάρος.

Το φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC<sup>24</sup> χρησιμοποιήθηκε για όλες τις πρωτεΐνες με σκοπό να εξεταστεί η αναδίπλωση τους. Αρχικά εξετάστηκε η αναδίπλωση της άπο-μορφής της

πρωτεΐνης (χωρίς την ένταξη του μετάλλου) και μετά πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες ένταξής του μετάλλου. Για τις πρωτεΐνες που δεν παρουσίασαν καλής ποιότητας φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC<sup>24</sup> έγιναν προσπάθειες για βελτίωση της αναδίπλωσης. Τελικά μόνο σε δεκαπέντε πρωτεΐνες ήταν εφικτό να προσδιοριστεί η δομή τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR. (Σχήμα 19)

Η στρατηγική που απαιτείται για να διεξαχθούν ολοκληρωμένα συμπεράσματα, από την χρήση δομικών γονιδίων, για την λειτουργία ενός ένζυμου που συμμετέχει στην ομοίωση του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό παρατίθεται παρακάτω:

- ✓ Αναζήτηση ανθρώπινου γονιδιακού στόχου από ενημερωμένες γονιδιακές βάσεις δεδομένων. (Genome Browsing)
- ✓ Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης στόχος.
- ✓ Προσδιορισμός της δομής της πρωτεΐνης χωρίς και με ενταγμένο το μεταλλικό ιόν με την φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).
- ✓ Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και λειτουργία.



**Σχήμα 19:** Συγκεντρικό διάγραμμα αποτελεσμάτων σε διάφορα στάδια εργασίας με Δομικά Γονίδια στην ομοίωση του χαλκού. [196]

(Α): Συνολικός αριθμός πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν σε σχέση με την ομοίωση χαλκού.

(Β): Αριθμός των πρωτεϊνών που επιλέχτηκαν.

(Γ): Αριθμός των πρωτεϊνών που εκφράστηκαν

(Δ): Αριθμός των πρωτεϊνών που είναι διαλυτές και με αναδίπλωση

(E): Αριθμός των πρωτεϊνών με προσδιορισμένη τη δομή τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η ομοιόσταση του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων λειτουργιών που γίνονται σε ένα κύτταρο. Για την φυσιολογική λειτουργία ενός κυττάρου θα πρέπει πολλοί παράγοντες να είναι ρυθμισμένοι με ακρίβεια. Για παράδειγμα η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων χαλκού θα πρέπει να διατηρείται αμελητέα γιατί τα ιόντα αυτά είναι πολύ τοξικά λόγω των οξειδοαναγωγικών τους ιδιοτήτων, π.χ κατάλυση στον σχηματισμό ριζών που μπορούν να καταστρέψουν το κύτταρο. Τα ιόντα χαλκού στα κύτταρα βρίσκονται σε διάλυμα και δεσμεύονται από τις πρωτεΐνες. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν ένζυμα που για να ενεργοποιηθούν χρειάζεται να δεσμεύσουν ιόντα χαλκού. Όταν η συγκέντρωση του ελεύθερου ιόντος χαλκού στο κύτταρο είναι πολύ χαμηλή ( $<10^{-18}$ ) το σύστημα επιτρέπει άμεση και αποτελεσματική ενδοκυττάρια μεταφορά του μεταλλικού ιόντος εμποδίζοντας την ύπαρξη μη σχετικών με το χαλκό αντιδράσεων. [197] Στους βακτηριακούς οργανισμούς η μεταφορά αυτή γίνεται μέσω του συνοδού copZ που αλληλεπιδρά με το ένζυμο copB. Η αλληλεπίδραση των ενζύμων αυτών καθώς και η δομή τους έχει μελετηθεί πλήρως στο παρελθόν. [14-15] Στους ζυμομύκητες που είναι κατώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, η ενδοκυττάρια μεταφορά γίνεται με την δράση του συνοδού Atx1. Το ένζυμο αυτό παίζει βασικό ρόλο στην παράδοση του ιόντος  $\text{Cu}^+$  στην Ccc2. Και σε αυτό το σύστημα οι δομές των περιοχών των δύο ενζύμων που αλληλεπιδρούν έχουν προσδιοριστεί πλήρως καθώς και ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης έχει μελετηθεί. [198-199] Στον άνθρωπο που είναι ανώτερος ευκαρυωτικός οργανισμός, η ενδοκυττάρια μεταφορά του ιόντος  $\text{Cu}^+$  γίνεται μέσω του συνοδού HAH1 που αλληλεπιδρά επιλεκτικά μόνο με τις τρεις τελευταίες (MNK4,5,6) από τις έξι συνολικά περιοχές ένταξης μετάλλου στο N-άκρο της πρωτεΐνης Μένκες. [74-76] Οι περιοχές της HAH1 από τις οποίες δεσμεύεται το μεταλλικό ιόν έχουν προσδιοριστεί δομικά στο παρελθόν με ανάλυση ακτίνων X. [200] Αλλά για τις περιοχές (MNK5,6) στο N-άκρο της πρωτεΐνης Μένκες που είναι στόχοι της αλληλεπίδρασης δεν γνωρίζουμε καμία απολύτως δομική πληροφορία για τα ενεργά κέντρα δέσμευσης του μεταλλικού ιόντος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είναι άγνωστος μέχρι σήμερα ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των δύο ενζύμων HAH1 και Μένκες παρόλο που είναι η πιο σημαντική διεργασία στην ομοιόσταση του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη του μηχανισμού αυτού. Στην διατριβή αυτή

απομονώνονται και προσδιορίζονται δομικά για πρώτη φορά στην ερευνητική κοινότητα η πέμπτη περιοχή (MNK5) και η πολλαπλή περιοχή MNK(4-6) της πρωτεΐνης Μένκες που είναι οι κύριοι στόχοι κατά την αλληλεπίδραση με το ένζυμο HAH1. Πιο συγκεκριμένα, η στρατηγική που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

α) Απομόνωση του λειτουργικού γονιδίου (MNK5) που κωδικοποιεί την πέμπτη περιοχή ένταξης μεταλλικού ιόντος της πρωτεΐνης Μένκες (ATP7a) και παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην μεταφορά του χαλκού (I) από την συνοδό HAH1 στην πρωτεΐνη Μένκες.

β) Έκφραση του πρωτεϊνικού στόχου MNK5 χωρίς (*apo*) και με δεσμευμένο Cu(I) (*holo*).

γ) Μελέτη της αλληλεπίδρασης της <sup>15</sup>N επισημασμένης δομικής περιοχής, *apo*-MNK5 με την <sup>15</sup>N επισημασμένη συνοδό χαλκού Cu(I)-HAH1 με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, HSQC για την βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού μεταφοράς κατιόντος από την HAH1 στην πέμπτη δομική περιοχή της πρωτεΐνης Μένκες.

δ) Απομόνωση του πολλαπλού γονιδιώματος MNK(4-6) και έκφραση της τριπλής περιοχής MNK(4-6) χωρίς (*apo*) και με δεσμευμένο Cu(I) (*holo*).

ε) Μελέτη της αλληλεπίδρασης της <sup>15</sup>N επισημασμένης τριπλής περιοχής, *apo*-MNK(4-6) με την συνοδό χαλκού Cu(I)-HAH1 με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, HSQC για την άντληση πληροφοριών του τρόπου μεταφοράς του χαλκού (I) από το ένζυμο συνοδό HAH1 στον τριπλό πρωτεϊνικό στόχο MNK(4-6).

## **2) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **2.1.ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕΝΚΕΣ.**

Η εύρεση των γονιδιακών στόχων (Genomic Browsing) έγινε από μια γονιδιακή βάση δεδομένων στο διαδίκτυο με ηλεκτρονική διεύθυνση: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

- Κωδικός πρόσβασης: NM\_000052
- Έκδοση: NM\_000052.1 GI: 4502320
- Όνομα γονιδίου: ATP7a
- Χαρακτηριστικά: Μέγεθος γονιδίου= 8478 bp [Παράρτημα Ι]

Οργανισμός= άνθρωπος

Χρωμόσωμα= X

Γονιδιακός χάρτης= Xq13.2-q13.3

Τύπος κυττάρου= κύτταρο συνεκτικού ιστού

Τύπος ιστού= συνεκτικός ιστός

Οι έξι περιοχές ένταξης μεταλλικού ιόντος βρίσκονται στις εξής περιοχές του γονιδιακού χάρτη της Μένκες:

MNKr1: 173-364

MNKr2: 662-859

MNKr3: 983-1168

MNKr4: 1280-1477

MNKr5: 1613-1810

MNKr6: 1841-2038

Η αλληλουχία βάσεων του γονιδιακού στόχου MNKr2:

```
GGTGAAGTCGTGCTGAAGATGAAAGTGGAAGGGATGACCTGCCATTCATGT
ACTAGCACTATTGAAGGAAAAATTGGGAAACTGCAAGGTGTTTCAGCGATTA
AAGTCTCCCTGGACAATCAAGAAGCTACTATTGTTTATCAACCTCATCTTAT
CTCAGTAGAGGAAATGAAAAAGCAGATTGAAGCTATGGGCTTTCCAGCATT
TGTCAAAAAG
```

Η αλληλουχία βάσεων του γονιδιακού στόχου MNKr5:

```
AATTCATCTAAGTGTTACATACAGGTCACTGGCATGACTTGCGCTTCCTGTG
TAGCAAACATTGAACGGAATTTAAGGCGGGAAGAAGGAATATATTCTATAC
TTGTGGCCCTGATGGCTGGCAAGGCAGAAGTAAGGTATAATCCTGCTGTTAT
ACAACCCCAATGATAGCAGAGTTCATCCGAGAACTTGGATTTGGAGCCAC
TGTGATAGAAAAT
```

Η αλληλουχία βάσεων του γονιδιακού στόχου MNKr4-6

```
ACTGTGATAAACATTGATGGCATGACTTGTAATCCTGTGTGCAGTCTATTG
AGGGTGTTCATATCAAAAAAGCCAGGTGTAATCCATACGAGTCTCCCTTG
CAAATAGCAATGGGACTGTTGAGTATGATCCTCTACTAACCTCTCCAGAAAC
GTTGAGAGGAGCAATAGAAGACATGGGATTTGATGCTACCTTGTGAGACAC
GAATGAGCCGTTGGTAGTAATAGCTCAGCCTTCATCGGAAATGCCGCTTTTG
ACTTCAACTAATGAATTTTATACTAAAGGGATGACACCAGTTCAAGACAAG
GAGGAAGGAAAGAATTCATCTAAGTGTTACATACAGGTCACTGGCATGACT
TGCGCTTCCTGTGTAGCAAACATTGAACGGAATTTAAGGCGGGAAGAAGGA
ATATATTCTATACTTGTGGCCCTGATGGCTGGCAAGGCAGAAGTAAGGTAT
AATCCTGCTGTTATACAACCCCAATGATAGCAGAGTTCATCCGAGAACTTG
GATTTGGAGCCACTGTGATAGAAAATGCTGATGAAGGAGATGGTGTTTTGG
AACTTGTTGTGAGGGGAATGACGTGTGCCTCCTGCGTACATAAAATAGAGT
CTAGTCTCACAAAACACAGAGGGATCCTATACTGCTCCGTGGCCCTGGCAA
CCAACAAAGCACATATTAATATGACCCAGAAATTATTGGTCCTAGAGATA
TTATCCATACAATTGA
```

## **2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ: MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6) ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ. (PCR reaction).**

### **2.2.1 Βασικές αρχές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* απομόνωση συγκεκριμένου γονιδιακού στόχου με την επιμήκυνση εκκινητών που έχουν συμπληρωματική αλληλουχία με τις μονόκλινες αλυσίδες του DNA. Η τεχνική PCR εφευρέθηκε από τον Mullius και τους συνεργάτες του [201], ενώ περιγράφηκε λεπτομερώς από τον Khorana και τους συνεργάτες του μετά από μία δεκαετία. [202,203] Το κύριο προτέρημα της τεχνικής αυτής είναι η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του γονιδιακού στόχου.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελείται από τρία κύρια στάδια (Σχήμα1), το κάθε ένα από αυτό επαναλαμβάνεται για τριάντα με σαράντα κύκλους.

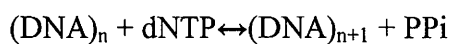
1. Μετουσίωση: Κατά το στάδιο αυτό οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν την διπλή έλικα του DNA διακόπτονται με θέρμανση στους 95°C. Οι δύο αλυσίδες του δίκλωνου μορίου χωρίζουν εντελώς όταν «σπάσουν» όλοι οι δεσμοί υδρογόνου και σχηματίζονται δυο μονόκλωνες αλυσίδες. Το μέσο σημείο του εύρους θερμοκρασιών εντός του οποίου χωρίζουν οι αλυσίδες καλείται σημείο τήξεως και συμβολίζεται σε  $T_m$ . Η θερμοκρασία αυτή για μόρια DNA υπό φυσιολογικές συνθήκες κυμαίνεται μεταξύ 85-95°C. Μόρια DNA πλούσια σε ζεύγη G-C έχουν μεγαλύτερη  $T_m$  ενώ μόρια DNA πλούσια σε ζεύγη A-T μικρότερη. Η  $T_m$  αυξάνει κατά 0.4°C για κάθε ποσοστιαία αύξηση του περιεχομένου G-C.

#### 2. Σύνδεση των εκκινητών με τις μονόκλωνες αλυσίδες του πρότυπου DNA.

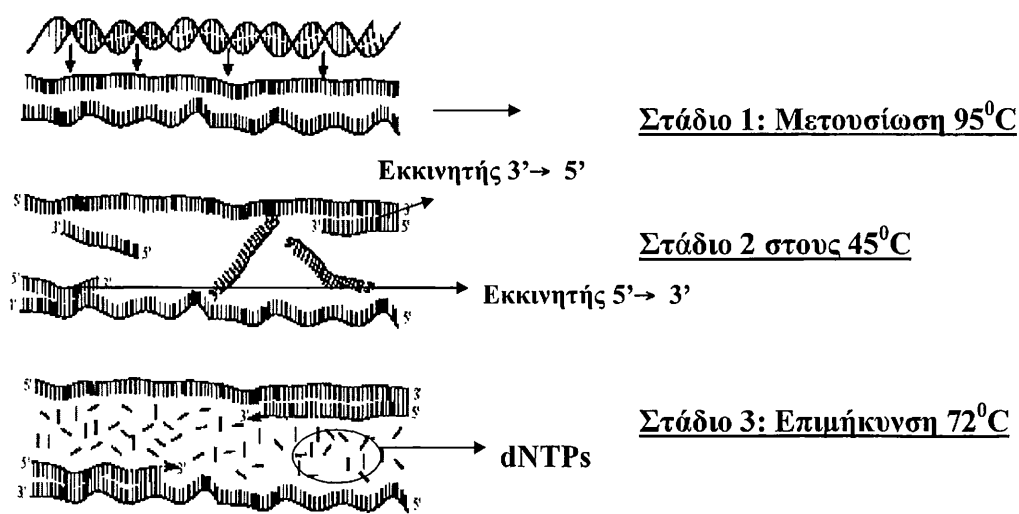
Στο στάδιο αυτό προστίθονται οι εκκινητές στο διάλυμα αντίδρασης. Είναι δύο ειδών οι εκκινητές: ο εμπρόσθιος που αναπτύσσεται κατά την κατεύθυνση 5'-3' και κολλάει με δεσμούς υδρογόνου στο 5'-άκρο της μονόκλωνης αλυσίδας του γονιδιακού στόχου και ο εκκινητής που αντιγράφει κατά την κατεύθυνση 3'-5' και κολλάει στο 3' άκρο της μονόκλωνης αλυσίδας του DNA.

3. Επιμήκυνση. Στο στάδιο αυτό γίνεται η αντιγραφή του γονιδιακού στόχου. Γενικά κατά την αντιγραφή του DNA υπάρχει ένα ένζυμο η DNA πολυμεράση που καταλύει την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA κατά την κατεύθυνση

5'-3' επιμηκύνοντας μια αλυσίδα εκκίνησης που βρίσκεται στο 5' άκρο του γονιδιακού στόχου με ελεύθερο 3'-OH άκρο. Η DNA πολυμεράση καταλύει την προσθήκη βήμα προς βήμα μονάδων δεοξυριβονουκλεοτιδίων σε μια αλυσίδα DNA.

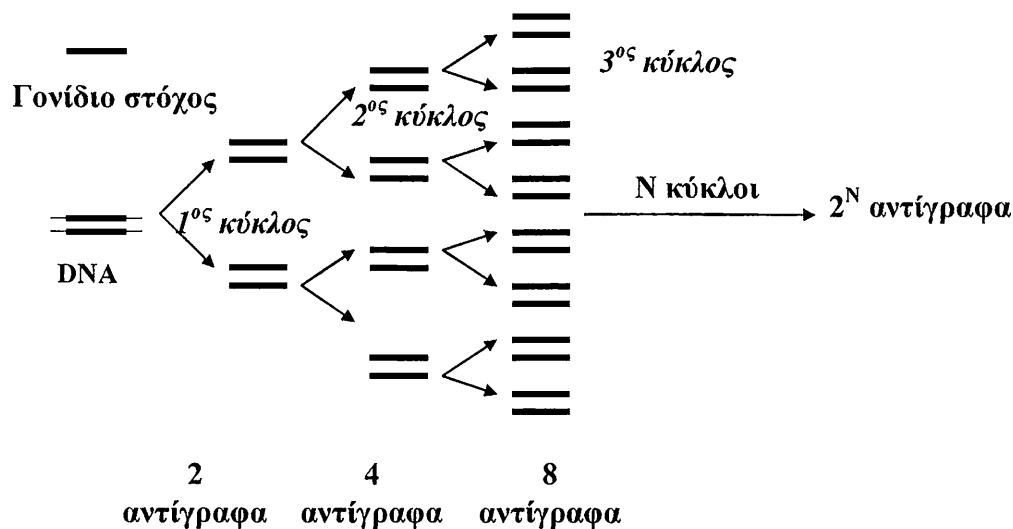


Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στηρίζεται στην ίδια αρχή με την διαφορά ότι χρησιμοποιεί δύο αλυσίδες εκκίνησης οι οποίες έχουν αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική με αυτή των μονόκλωνων αλυσίδων του DNA που σχηματίστηκαν κατά την μετουσίωση του στο προηγούμενο στάδιο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό είναι η Taq πολυμεράση η οποία προστίθεται στο διάλυμα αντίδρασης μαζί με τις τέσσερις πρόδρομες ενώσεις -τα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), dATP, dGTP, dTTP, και dCTP. Για την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης απαιτούνται επίσης και ιόντα  $Mg^{+2}$ .



**Σχήμα 20:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Όπως είναι αντιληπτό και από το Σχήμα 2 και οι δύο μονόκλωνες αλυσίδες αντιγράφονται κατά την διάρκεια του PCR. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μια εκθετική αύξηση των αντιγράφων του επιθυμητού γονιδίου. Θεωρώντας ότι υπάρχει μόνο ένα αντίγραφο πριν ξεκινήσουν οι κύκλοι της αντίδρασης PCR, μετά από ένα κύκλο, θα σχηματισθούν δύο αντίγραφα, μετά από δυο κύκλους, τέσσερα αντίγραφα και εκθετικά μετά από N κύκλους  $2^N$  αντίγραφα. (Σχήμα 21)



**Σχήμα 21:** Σχηματική απεικόνιση της εκθετικής αντιγραφής του γονιδιακού στόχου με την τεχνική PCR.

### 2.2.2 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.

- Ζεύγος εκκινητών forward και reverse. Ο σχεδιασμός τους έγινε από τον ερευνητή της διατριβής αυτής και η προέλευσή τους ήταν από την QIAGEN.
- Νουκλεοτίδια dATP, dGTP, dTTP, και dCTP (100mM το καθένα) και προέλευσης QIAGEN.
- Taq DNA πολυμεράση προέλευσης BIOLABS. Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και αποψύχεται λίγο πριν τη χρήση της.
- Ρυθμιστικό διάλυμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR buffer) και προέλευσης SIGMA. Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Θερμοκυκλοποιητής (BIORAD My Cycler <sup>TM</sup> Thermal Cycler).

### 2.2.3 Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα εκκινητών :** Οι εκκινητές αραιώνονται σε ddH<sub>2</sub>O, ώστε η συγκέντρωσή τους (πριν την εισαγωγή τους στο μίγμα PCR) να είναι {25pmol/μl}. Φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **Διάλυμα μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) :** Για την παρασκευή 1 ml διαλύματος αναμιγνύονται 15 μl από κάθε νουκλεοτίδιο. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .



## 2.2.4 Πειραματική διαδικασία για την απομόνωση των γονιδίων MNKr2, MNKr5 και MNKr4-6 με την τεχνική PCR.

Παρασκευάζεται το μίγμα PCR σε eppendorf και τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται με την ακόλουθη σειρά:

ddH <sub>2</sub> O	= 17μl
Εκκινητής forward	= 4μl
Εκκινητής reverse	= 4μl
10xBuffer Taq	= 10μl
dNTPs (100mM)	= 4μl
Taq DNA πολυμεράση	= 1μl
<hr/>	
Συνολικός όγκος	= 40 μl

Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιούνται για ένα δείγμα και επομένως πολλαπλασιάζονται με το δύο που είναι ο αριθμός των δειγμάτων της PCR.

Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα, κάθε μίγμα PCR (40 μl), μεταφέρεται στα ειδικά eppendorf για PCR όπου προστίθενται 10 μl αραιωμένου (5ng/ μl) γενετικού υλικού MNKr5 και MNKr(4-6) αντίστοιχα. Ακολουθεί νέα ανάδευση και τα δείγματα μεταφέρονται στο θερμοκυκλοποιητή. Το πρόγραμμα της PCR για την απομόνωση και των γονιδίων έχει ως εξής.

35 sec στους 95°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA)

45 sec στους 45°C (σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA)

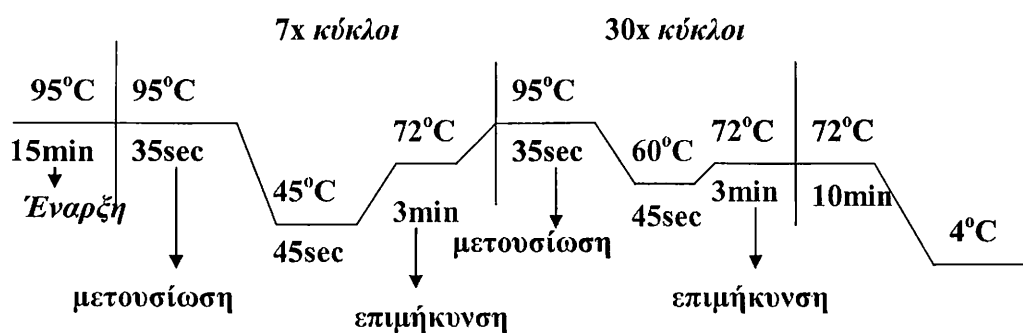
3 min στους 72°C (επιμήκυνση)

35 sec στους 95°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA)

45 sec στους 60°C (σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA)

3 min στους 72°C (επιμήκυνση)

Οι κύκλοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση των παραπάνω σταδίων φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα. (Σχήμα 22)



**Σχήμα 22:** Οι κύκλοι της αντίδρασης PCR.

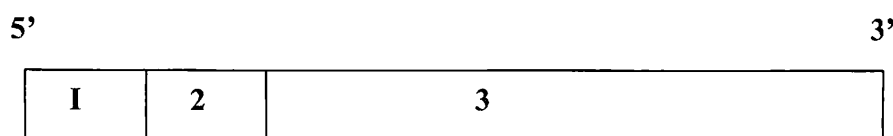
Μετά την παραπάνω διαδικασία το πολυμερισμένο γενετικό υλικό διατηρείται στους 4°C.

### 2.2.5 Σχεδιασμός εκκινητών για την αντίδραση PCR.

Το μήκος και η αλληλουχία των εκκινητών είναι πολύ σημαντικοί παράμετροι στο σχεδιασμό των εκκινητών για μια επιτυχημένη απομόνωση του γονιδίου με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μήκος μεταξύ 25 με 45 βάσεις και το ποσοστό γουανίνης κυτοσίνης GC >40%. Η μικρότερη από τις θερμοκρασίες τήξης (Tm) των δύο εκκινητών πρέπει να είναι μεγαλύτερη κατά 5°C από την θερμοκρασία του δεύτερου σταδίου σύνδεσης των εκκινητών στην αντίδραση PCR. Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο.

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Ο κύριος κορμός των εκκινητών forward χωρίστηκε σε τρεις περιοχές, (Σχήμα 23).

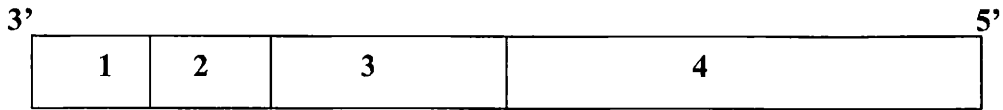


**Σχήμα 23 :** Σχεδιασμός εκκινητή forward.

Η τρίτη περιοχή που βρίσκεται στο 3' άκρο του εκκινητή συμπληρώθηκε με τις είκοσι πρώτες βάσεις στο N-άκρο του γονιδιακού στόχου. Η μεσαία περιοχή συμπληρώθηκε από την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου NdeI CATATG. Και τέλος η περιοχή 1 στο 5' άκρο του εκκινητή συμπληρώθηκε από την

αλληλουχία GGAATTC η οποία ενισχύει και σταθεροποιεί την δράση του περιοριστικού ενζύμου NdeI.

Ο κύριος κορμός των εκκινητών reverse χωρίστηκε σε τέσσερις περιοχές. (Σχήμα 24).



**Σχήμα 24 :** Σχεδιασμός εκκινητή reverse.

Η τέταρτη περιοχή που βρίσκεται στο 5' άκρο του εκκινητή συμπληρώθηκε με τις συμπληρωματικές βάσεις των είκοσι τελευταίων βάσεων που βρίσκονται στο C άκρο του γονιδιακού στόχου. Η περιοχή τρία συμπληρώθηκε από την αλληλουχία βάσεων ACGACCTTCGAT που αναγνωρίζεται από το ένζυμο Factor Xa. Η δεύτερη περιοχή συμπληρώθηκε από την αλληλουχία CTCGAG η οποία αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο XhoI ενώ η πρώτη περιοχή στο 3' άκρο του εκκινητή συμπληρώθηκε από την αλληλουχία βάσεων TATT που ενισχύει την δράση του περιοριστικού ενζύμου XhoI.

Τελικά οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για κάθε γονιδιακό στόχο είναι οι εξής:

MNKr5:

5'-GGGAATTCATATGAATTCATCTAAGTGTTACATACAGG-3'

Tm=66,8°C, Μήκος= 39, GC=40%

3'-TATTCTCGAGACGACCTTCGATATTTTCTATCACAGTGGCTCCAAATC-5'

Tm=71,57°C, Μήκος= 48, GC=42%

MNKr(4-6):

5'-GGGAATTCATATGCTGACACAAGAACTGTGATACAGG-3'

Tm=67,93°C, Μήκος= 38, GC=41%

3'-TATTCTCGAGACGACCTTCGATCTTGACCAAAGAAGCTTCAAAACC-5'

Tm=71,86°C, Μήκος= 46, GC=42%

## **2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2% ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR.**

- Χρειάζεται εξαιρετική προσοχή στο χειρισμό του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) γιατί είναι δυνητικά μεταλλαξιογόνο.

Με την πρώτη αυτή ηλεκτροφόρηση πιστοποιείται η σωστή λειτουργία της PCR διαδικασίας. Το πολυμερισμένα πλέον τμήματα των γενετικών υλικών εμφανίζονται ως μπάντα ορατή στη UV ακτινοβολία.

### **2.3.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.**

- Αγαρόζη ( GIBCO BRL)
- Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr, 10mg/ ml, Sigma)
- EDTA (MB: 372,24, Merck)
- Tris Base (MB:121,14, Merck)
- Οξικό οξύ (MB:60, Merck)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (BB) (FERAK)
- Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIORAD)
- Τροφοδοτικό (SIGMA-ALDRICH PS2001-2)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Φωτογραφική κάμερα (UV ακτινοβολία)

### **2.3.2 Διαλύματα εργασίας**

**Διάλυμα 0,5M EDTA(pH =8)**= 18,6 g EDTA διαλύονται σε 80 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8 και όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml.

**Διάλυμα 50X TAE** = 121 g Tris Base, 28,55 ml οξικού οξέος (100%) και 75 ml 0,5M EDTA pH =8, διαλύονται σε τελικό όγκο 500 ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Διάλυμα 1X TAE**= Σε 980 ml ddH<sub>2</sub>O προστίθονται 20 ml διαλύματος 50X TAE. Το διάλυμα φυλάσσεται ε θερμοκρασία δωματίου.

**Πήκτωμα αγαρόζης 1,8%**= 1,8 g αγαρόζης διαλύονται σε 100 ml 1X TAE.

**Χρωστική DNA**= Για την παρασκευή 35 ml χρωστικής, 3 ml διαλύματος γλυκερόλη87% 0,12 g BB και 2 ml 0,5M EDTA pH =8, διαλύονται σε 30 ml ddH<sub>2</sub>O.

### **2.3.3 Πειραματική διαδικασία.**

#### *α) Προετοιμασία Πηκτώματος Αγαρόζης.*

Το πήκτωμα τοθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται μέχρι την πλήρη ομογενοποίησή του. Το διάλυμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου και πολύ προσεκτικά προστίθενται 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου. Γίνεται ήπια ανάδευση και το διάλυμα αποχύνεται στη θέση τοποθέτησης του πηκτώματος. Αμέσως, εφαρμόζεται το χτενάκι 10 θέσεων και πριν αρχίσει να πήζει (σε ~ 15 min), απομακρύνονται οι φυσαλίδες που τυχόν δημιουργήθηκαν.

#### *β) Προετοιμασία των δειγμάτων.*

Η προετοιμασία των δειγμάτων μετά το PCR γίνεται ως εξής: Σε eppendorf τοποθετούνται 5 μl ddH<sub>2</sub>O, 5 μl χρωστικής και 5 μl κάθε δείγματος. Η ανάδευση γίνεται με πιπέτα.

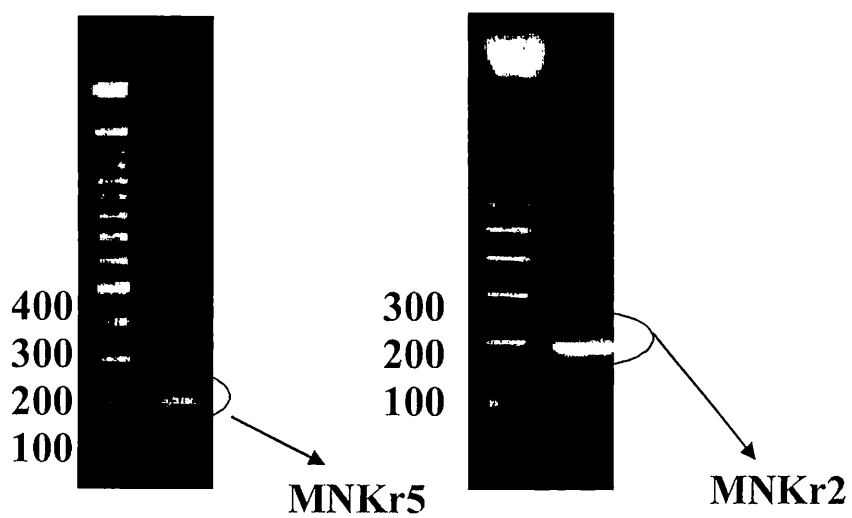
#### *γ) Τοποθέτηση δειγμάτων*

Μετά την πήξη, η αγαρόζη τοποθετείται στη θέση εκκίνησης της ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται διάλυμα 1 X TAE, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια του πηκτώματος. Απομακρύνεται το χτένι και σε κάθε θέση (πηγαδάκι) που έχει δημιουργηθεί τοποθετείται το δείγμα.

Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι τουλάχιστον 45 min υπό σταθερή τάση 120 Volts. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται κάτω από ακτινοβολία UV και φωτογραφίζεται σε σκοτεινό θάλαμο.

Όταν έχουμε το σωστό προϊόν της PCR, τότε κάθε δείγμα, καθώς και στο θετικό δείγμα ελέγχου (positive control) αντιστοιχεί μια έντονη μπάντα (πολυμερισμένο γενετικό υλικό) και μια μικρότερη μπάντα (primers). Στη περίπτωση που λάβουμε πολλές μπάντες, τότε δεν έχουμε σωστό προϊόν της PCR. Τέλος, το αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) πρέπει να δώσει μόνο μπάντα που να αντιστοιχεί στους εκκινητές, γιατί σε διαφορετική περίπτωση πρόκειται για επιμόλυνση του DNA.

Παράλληλα έγινε σύγκριση της ηλεκτροφόρησης του γονιδίου MNK15 με αυτή του γονιδίου MNK2. Το τελευταίο γονίδιο είναι σχεδόν ισοδύναμο σε μέγεθος με το MNK5 και έχει απομονωθεί και προσδιοριστεί η αλληλουχία του στο παρελθόν. Όπως αναμενόταν και οι δύο μπάντες των γονιδίων βρίσκονται στο ύψος της δεύτερης μπάντας (200 bp) του marker.



**Εικόνα 2:** Σύγκριση των ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της PCR MNKr5, και του γονιδίου MNKr2.

## **2.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ MNKr5 και MNKr(4-6) ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%.**

Μετά την ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 2% τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με βάση το πρωτόκολλο QIAquick Gel Extraction Kit Protocol της QIAGEN:

1) Αποκοπή των φθορίζων τμημάτων, που αντιστοιχούν στους γονιδιακούς στόχους, από την πηκτή αγαρόζης.

2) Ζύγιση των τμημάτων και προσθήκη 300μl από το ρυθμιστικό διάλυμα QC για κάθε 100mg πηκτής.

3) Επώαση στους 50°C για δέκα λεπτά (ή μέχρι τα τμήματα της πηκτής διαλυθούν εντελώς).

4) Το ρυθμιστικό διάλυμα QC περιέχει δείκτη pH ο οποίος χρωματίζει το διάλυμα κίτρινο όταν το  $pH \leq 5,5$  και πορτοκαλί όταν το pH παίρνει υψηλότερες τιμές. Η προσρόφηση των στόχων DNA από τις μεμβράνες QIAquick είναι ικανή μόνο όταν το  $pH \leq 5,5$ . Για τον λόγο αυτό μετά την πλήρη διάλυση των τμημάτων πηκτής, εξετάζεται το χρώμα του διαλύματος να είναι κίτρινο (παρόμοιο του διαλύματος QC). Σε περίπτωση που το χρώμα είναι πορτοκαλί ή μοβ το pH επανέρχεται στα επιθυμητά όρια με την προσθήκη διαλύματος οξικού νατρίου (3M,  $pH = 5$ ).

5) Για την αύξηση της απόδοσης των γονιδιακών στόχων προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία 100 μl ανά 100mg πηκτής.

6) Εφαρμογή της στήλης spin-QIAquick σε eppendorf των 2ml.

7) Για την δέσμευση των στόχων DNA τα δείγματα μεταφέρονται στις στήλες spin-QIAquick και φυγοκέντρουνται για 1 λεπτό.

8) Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέγεται από την στήλη spin-QIAquick,. Προστίθονται 0,5 ml διαλύματος QC στις στήλες spin-QIAquick και φυγοκέντρουνται για ένα λεπτό. Έπειτα προστίθονται 0,75 ml διαλύματος PE και φυγοκέντρουνται για ένα λεπτό. Τα διαλύματα εκπλύσεων απομακρύνονται.

9) Οι στήλες spin-QIAquick φυγοκεντρούνται άδειες για ένα λεπτό σε 13.000 rpm.

10) Για την εξαγωγή των DNA υλικών από τις μεμβράνες των στηλών spin-QIAquick προστίθονται 30 μl νερού στις στήλες και φυγοκεντρούνται για ένα λεπτό.

## **2.5 ΚΟΨΙΜΟ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ MNK<sub>r</sub>5 και MNK<sub>r</sub>(4-6) ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ.**

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για το κόψιμο των άκρων των γενετικών υλικών MNK<sub>r</sub>5 και MNK<sub>r</sub>(4-6) είναι τα NdeI και XhoI τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων στη διπλή έλικα DNA και διασπούν και τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας σε συγκεκριμένες θέσεις, όπως φαίνεται στο σχήμα 25.

### **2.5.1 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν**

- Περιοριστικό ένζυμο NdeI (Biolabs). Φυλάσσεται στους -20°C
- Περιοριστικό ένζυμο XhoI (Biolabs). Φυλάσσεται στους -20°C
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης BSA (Biolabs).
- Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 4 (Biolabs).

### **2.5.2 Πειραματική διαδικασία.**

Παρασκευάζεται το μίγμα αντίδρασης αναμειγνύοντας σε eppendorf τα αντιδραστήρια με την ακόλουθη σειρά:

ddH <sub>2</sub> O	= 7 μl
Buffer4	= 2 μl
NdeI	= 0,5 μl
XhoI	= 0,5 μl
BSA	= 0,2 μl

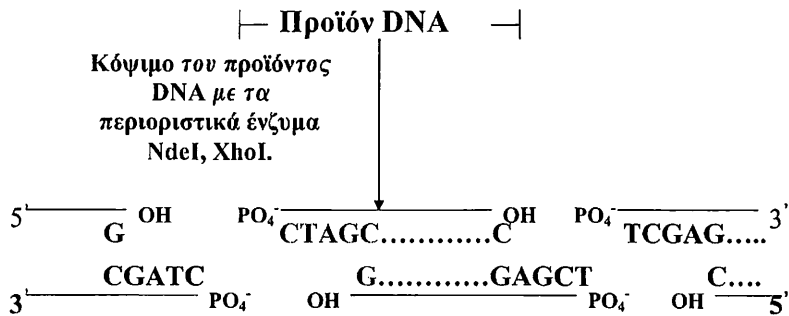
---

Συνολικός όγκος = 10μl

Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιούνται για ένα δείγμα και επομένως πολλαπλασιάζονται με το δύο που είναι ο αριθμός των δειγμάτων.

Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα, στο πρώτο μίγμα αντίδρασης (10 μl) προστίθενται 10 μl από το γενετικό υλικό MNK<sub>r</sub>5 ενώ στο δεύτερο 10 μl από το MNK<sub>r</sub>(4-6). Τελικά τα δύο δείγματα επωάζονται στους 37 °C για δώδεκα ώρες. Ακολουθεί έλεγχος της ποιότητας των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 2% και καθαρισμός των προϊόντων DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN). (Κεφ.4).

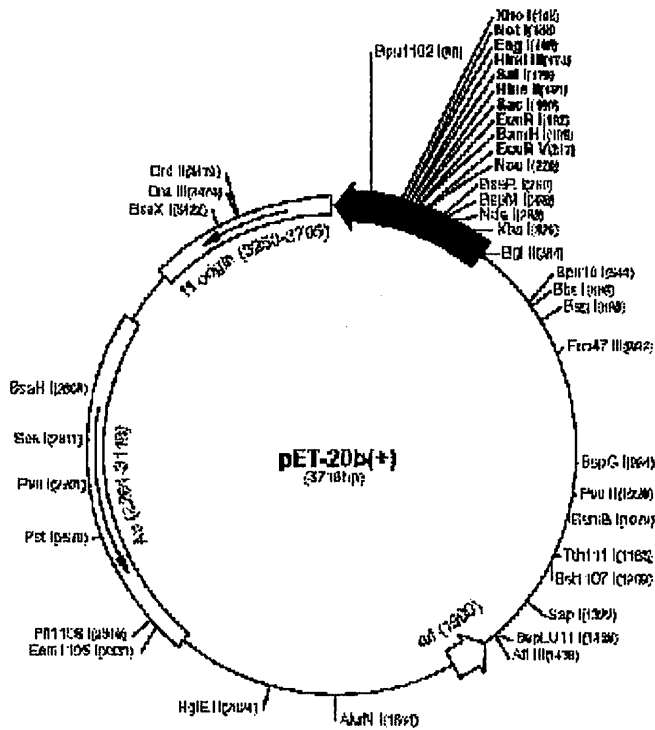




**Σχήμα 25:** Κόψιμο των άκρων των προϊόντων MNKr5 και MNKr(4-6) με την δράση των περιοριστικών ενζύμων.

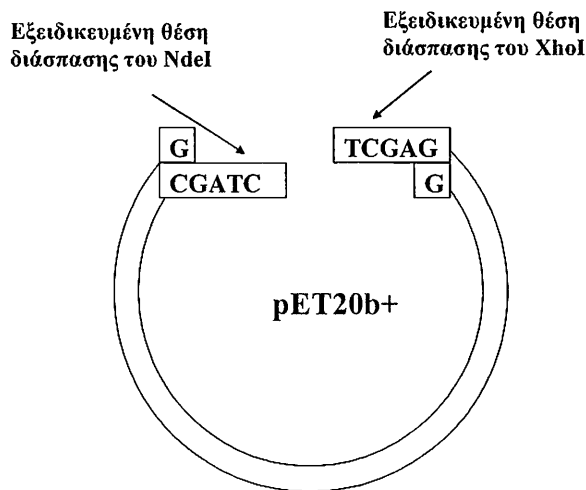
## 2.6 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ.

Ο πλασμιδιακός φορέας που επιλέχθηκε είναι το pET-20b(+). (Εικόνα 3) Περιέχει συνολικά 3716 βάσεις και μπορεί να διασπαστεί σε πολλές εξειδικευμένες θέσεις με την δράση διαφορετικών ενδονουκλεασών. (Οι θέσεις διάσπασης του από περιοριστικά ένζυμα αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα 2). Στο N-άκρο του πλασμιδίου βρίσκεται η περιοχή *peIB* (224-289) η οποία εξασφαλίζει περιπλασμικό εντοπισμό του ανασυνδυασμένου DNA στο κύτταρο ξενιστή. Στο C-άκρο υπάρχει η περιοχή His-Taq (140-157) η οποία κατά την έκφραση του γονιδίου στόχου κωδικοποιεί μια αλληλουχία από έξι ιστιδίνες στο C-άκρο. Η ιστιδινική ουρά είναι απαραίτητη στον καθαρισμό της πρωτεΐνης, με χρωματογραφία His-Trap. (Κεφ.2.16) Το pET-20b(+) περιέχει την περιοχή 353-369 που ονομάζεται T7 προαγωγέας και δεσμεύει ειδικά μόνο την T7 RNA πολυμεράση. Το σημείο έναρξης της μεταγραφής είναι η θέση 352 και η θέση τερματισμού είναι η περιοχή 26-72. Περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.



Εικόνα 3: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pET-20b(+).

Το πλασμίδιο διασπάστηκε στις εξειδικευμένες θέσεις των δυο περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI με τον ίδιο τρόπο που κόπηκαν και οι άκρες των δύο γενετικών υλικών MNK15 και MNK1(4-6).



Σχήμα 26: Η διάσπαση του πλασμιδιακού φορέα με τη δράση των περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI.

### 2.6.1 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

- Πλασμίδιο pET-20b(+) (Novagen). Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Περιοριστικό ένζυμο NdeI (Novagen). Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$
- Περιοριστικό ένζυμο XhoI (Novagen). Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης BSA (Novagen).
- Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 4 (Novagen).
- Διάλυμα Alkaline Phosphatase CIP (Novagen).

### 2.6.2 Πειραματική διαδικασία.

Παρασκευάζεται το μίγμα αντίδρασης αναμειγνύοντας σε eppendorf τα αντιδραστήρια με την ακόλουθη σειρά:

ddH <sub>2</sub> O	= 9 $\mu\text{l}$
Buffer4	= 5 $\mu\text{l}$
NdeI	= 1 $\mu\text{l}$
XhoI	= 1 $\mu\text{l}$
BSA	= 1 $\mu\text{l}$

---

Συνολικός όγκος = 17  $\mu\text{l}$

Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα, στο μίγμα αντίδρασης (10  $\mu\text{l}$ ) προστίθενται 3  $\mu\text{l}$  αραιωμένου πλασμιδίου pET-20b(+) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Το μίγμα της αντίδρασης επωάζει στους  $37^{\circ}\text{C}$  για δώδεκα ώρες. Έπειτα προστίθεται στο μίγμα 1  $\mu\text{l}$  CIP, 5  $\mu\text{l}$  Buffer3 και 4  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Αφήνεται το μίγμα να επωάσει στους  $37^{\circ}\text{C}$  για είκοσι λεπτά και τελικά μεταφέρεται σε υδρόλουτρο των  $55^{\circ}\text{C}$  για δεκαπέντε λεπτά. Το διασπασμένο πλασμίδιο φυλάσσετε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

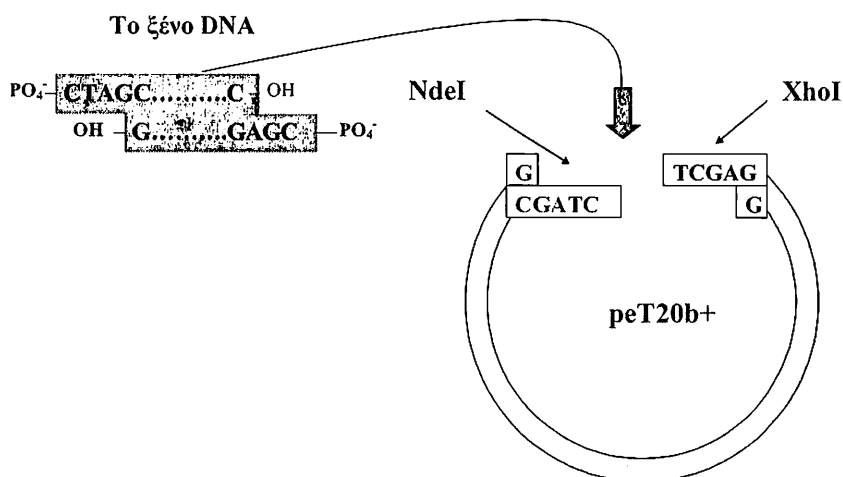
## 2.7 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ MNKr5 και MNKr(4-6) ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pET-20b(+).

Οι στόχοι DNA: MNKr5 και MNKr(4-6) και ο πλασμιδιακός φορέας έχουν διασπαστεί με την δράση των ίδιων περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI. Τα γενετικά υλικά ενώνονται ομοιοπολικά με τον φορέα DNA και σχηματίζονται δύο ανασυνδυασμένα μόρια DNA με ονομασία pCC1 και pCC2 αντίστοιχα. (Σχήμα 27) Οι ποσότητες των γενετικών υλικών MNKr5 και MNKr(4-6) που πρέπει να χρησιμοποιηθούν υπολογίστηκαν από την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$ng\ DNA = \frac{\{\text{αριθμός bp (PCR insert)}\} \times 20\ ng\ \text{πλασμιδίου}}{\{\text{αριθμός bp πλασμιδίου} + \text{αριθμός bp (PCR insert)}\}} \times 8$$

### 2.7.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.

- Κομμένο πλασμίδιο pET-20b(+) (Κεφ.6). Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Ένζυμο T4 DNA ligase (Novagen). Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και αποψύχεται από την χρήση του.
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer ligase). Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Θερμοκυκλοποιητής (BIORAD My Cycler<sup>TM</sup>, Thermal cycler).



Σχήμα 27: Κατασκευή του ανασυνδυασμένων μορίων pCC1 και pCC2.

### 2.7.2 Πειραματική διαδικασία.

Παρασκευάζεται το μίγμα αντίδρασης αναμειγνύοντας σε eppendorf τα αντιδραστήρια με την ακόλουθη σειρά:

ddH<sub>2</sub>O = 1  $\mu$ l

Buffer Ligase = 5  $\mu$ l

T4 DNA ligase = 1  $\mu$ l

pET-20b(+) = 1  $\mu$ l

---

Συνολικός όγκος = 8  $\mu$ l

Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιούνται για ένα δείγμα και επομένως πολλαπλασιάζονται με το δύο που είναι ο αριθμός των δειγμάτων.

Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα, στο πρώτο μίγμα αντίδρασης (8  $\mu$ l) προστίθενται 2  $\mu$ l αραιωμένου γενετικού υλικού MNK $\Gamma$ 5 ενώ στο δεύτερο 10  $\mu$ l MNK $\Gamma$ (4-6). Τα δύο δείγματα μεταφέρονται στα ειδικά eppendorf για PCR και τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή. Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή για την ενσωμάτωση είναι επώαση στους 14 °C για δώδεκα ώρες.

Στον θερμοκυκλοποιητή τοποθετείται και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου της ενσωμάτωσης (negative control). Κατά την παρασκευή του στο μίγμα αντίδρασης (8  $\mu$ l) δεν προστίθεται γενετικό υλικό αλλά 2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

## **2.8 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ pCC1 ΚΑΙ pCC2 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΞΕΝΙΣΤΕΣ E.coli DH5a.**

Μετά το σχηματισμό των ανασυνδυασμένων DNA θα πρέπει αυτοί οι συνδυασμοί να κλωνοποιηθούν δηλαδή να πολλαπλασιαστούν πολλές φορές, με την εισαγωγή τους στα κατάλληλα κύτταρα όπου αναπαράγονται χρησιμοποιώντας το μηχανισμό σύνθεσης του DNA του ξενιστή. Πολλά βακτηριακά και ευκαρυωτικά κύτταρα προσλαμβάνουν μόρια DNA από το υλικό καλλιέργειας. Η ικανότητα εισαγωγής είναι χαμηλή (περίπου 1 στα  $10^6$  μόρια DNA), αλλά ένα ικανοποιητικό ποσοστό κυττάρων μπορεί να μετασχηματισθεί κάτω από κατάλληλες πειραματικές συνθήκες. Συχνά χρησιμοποιούνται ως ξενιστές μεταλλαγμένα βακτήρια, που δεν καταστρέφουν ξένο DNA γρήγορα. [204} Στην φάση αυτή, η επιλογή του κύτταρου ξενιστή δεν στηρίζεται στην ικανότητα των γονιδίων να μεταγράφονται και να μεταφράζονται στο νέο τους περιβάλλον αλλά η δυνατότητα εξαγωγής των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδιακών στόχων MNK $\gamma$ 5 και MNK $\gamma$ (4-6). Ο ξενιστής που επιλέχτηκε είναι τα βακτηριακά κύτταρα DH5a της κυτταρικής σειράς *Escherichia Coli*.

### **2.8.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.**

- Κύτταρα DH5a (Life Technologies). Φυλάσσονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Τρυπτόνη (Sigma)
- Εκχύλισμα ζύμης(Sigma)
- NaCl (Sigma)
- αντιβιοτικό αμικικιλίνη (100mg/ml) Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Αερόλουτρο Shaker

### **2.8.2 Διαλύματα εργασίας**

- *Πλήρες Θρεπτικό υλικό για E.coli Luria Bertani LB*= 1g τρυπτόνη, 0,5g εκχύλισμα ζύμης και 1g NaCl διαλύονται σε 100ml ddH<sub>2</sub>O.
- *Πλήρες στερεό Θρεπτικό υλικό*= Προσθήκη στο LB 2% άγαρ.

Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται στους  $121^{\circ}\text{C}$  σε πίεση 1,2 atm, για είκοσι λεπτά.

- *Διάλυμα αμπικιλίνης*= Διαλύεται 1g αμπικιλίνης σε 1ml ddH<sub>2</sub>O.

### **2.8.3 Πειραματική διαδικασία.**

Αποψύχονται δύο erpendorf που περιέχουν 100 μl κύτταρα DH5a το κάθε ένα. Μετά από την απόψυξη τα κύτταρα δεν μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν. Στο πρώτο erpendorf προστίθονται 10 μl πλασμιδίου pCC1 ενώ στο δεύτερο 10 μl pCC2. Τα μίγματα αναδεύονται ήπια με πιπέτα και έπειτα μεταφέρονται σε πάγο και διατηρούνται εκεί για τριάντα λεπτά. Έπειτα μεταφέρονται σε υδρόλουτρο των 42 °C για 45 δευτερόλεπτα και τέλος σε πάγο για δύο λεπτά. Αφού προστεθούν σε κάθε δείγμα 900 μl LB (χωρίς αντιβιοτικό) τελικά επωάζουν σε αερόλουτρο σε 170rpm στους 37 °C για μία ώρα. Μετά το πέρασμα της μίας ώρας εμβολιάζονται τρυβλία άγαρ (με στερεό θρεπτικό υλικό μολυσμένο με αμπικιλίνη) με 200 μl από το κάθε δείγμα. Τα τρυβλία επωάζουν στους 37 °C για δώδεκα ώρες. Ο εμβολιασμός των τρυβλίων με αντιβιοτικό γίνεται για να σχηματιστούν μόνο αποικίες με πλασμίδια που φέρουν τους γονιδιακούς στόχους αφού μόνο αυτά παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

Και σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο να γίνει αρνητικός έλεγχος. Γι' αυτό το λόγο γίνεται μεταφορά στα κύτταρα DH5a 10 μl του αρνητικού δείγματος ελέγχου της ενσωμάτωσης (Υποκεφ.2.7.2) ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία. Το αρνητικό δείγμα ενσωμάτωσης περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς τους γονιδιακούς στόχους. Αν η συγχώνευση έγινε με επιτυχία στο προηγούμενο στάδιο δεν θα πρέπει να υπάρχουν αποικίες στο τρυβλίο του αρνητικού δείγματος ελέγχου και πολλές αποικίες στα τρυβλία των κυττάρων DH5a που περιέχουν τα πλασμίδια pCC1 και pCC2.

## **2.9 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ pCC1 ΚΑΙ pCC2 ΑΠΟ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ DH5a.**

Η εξαγωγή των ανασυνδυασμένων μορίων pCC1 και pCC2 από τα κύτταρα DH5a. έγινε με βάση το πρωτόκολλο QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits:

1. Εμβολιάζονται 2 ml LB (με 100μg/ml αμπικιλίνη) με κύτταρα μονής αποικίας από κάθε τρυβλίο άγαρ. Οι καλλιέργειες επωάζονται σε αερόλουτρο σε 200 rpm, στους 37 °C για οκτώ ώρες.

2. Οι προκαλλιέργειες εμβολιάζονται σε μεγαλύτερο όγκο θρεπτικού υλικού 200 ml LB (με 100μg/ml αμπικιλίνη) και επωάζουν για δώδεκα ώρες στους 37 °C σε αναδευτήρα με ταχύτητα 200 rpm.

3. Φυγοκεντρούνται οι καλλιέργειες σε ταχύτητα 6000 rpm (Beckman JA-10 rotor) για δεκαπέντε λεπτά στους 4 °C και απομακρύνεται το υπερκείμενο.

4. Επαναιωρούνται τα βακτηριακά κύτταρα σε 4 ml του Buffer P1 (QIAGEN).

5. Προστίθενται 4 ml Buffer P2 (QIAGEN), το μίγμα αναδεύεται ήπια και επωάζει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για πέντε λεπτά.

6. Προστίθενται 4 ml Buffer P3 (QIAGEN) το μίγμα αναδεύεται ήπια και επωάζει σε πάγο για δεκαπέντε λεπτά.

7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 20.000 rpm για τριάντα λεπτά στους 4 °C. Συλλογή του υπερκείμενου που περιέχει το πλασμίδιο.

8. Φυγοκέντρηση για δεύτερη φορά του υπερκείμενου στις 20.000 rpm για δεκαπέντε λεπτά στους 4 °C. Συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος.

9. Πλύσιμο της στήλης QIAGEN-tip 100 με 4 ml Buffer QBT (QIAGEN).

10. Προστίθεται στη στήλη το υπερκείμενο με το γενετικό υλικό από το βήμα 8

11. Πλένεται η στήλη δύο φορές από 10 ml Buffer QC (QIAGEN).

12. Συλλογή του DNA με έκπλυση της στήλης με 5 ml Buffer QF (QIAGEN).

13 Καθίζηση του DNA με προσθήκη 3,5 ml διάλυμα ισοπροπανόλης στο διάλυμα συλλογής. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 15.000 rpm για τριάντα λεπτά στους 4 °C.

14. Έκπλυση του DNA με 2 ml διαλύματος 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 15.000 rpm για δέκα λεπτά στους 4 °C

15. Επαναδιάλυση του DNA σε 30 μl ddH<sub>2</sub>O.



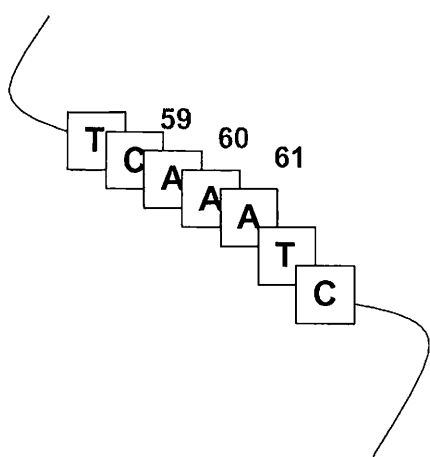
Με την παραπάνω διαδικασία τα γενετικά υλικά pCC1 και pCC2 διατηρούνται στους -20°C.

## 2.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ MNK<sub>r</sub>5 ΚΑΙ MNK<sub>r</sub>(4-6).

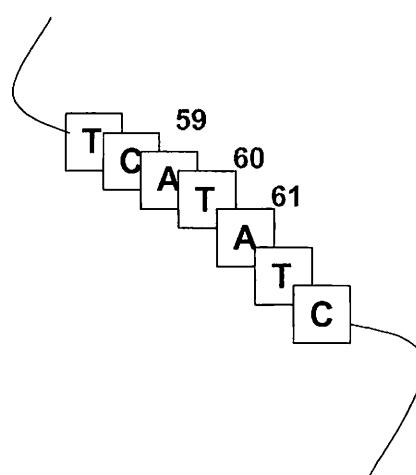
Η αλληλουχία των βάσεων του DNA μπορεί να βρεθεί με τη δημιουργία θραυσμάτων, που προκύπτουν με τη ρυθμιζόμενη διακοπή της ενζυματικής αντιγραφής του, μια μέθοδο που ανέπτυξε ο Frederick Sanger και οι συνεργάτες του. Πρόσφατα χρησιμοποιείται μια παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου. Συγκεκριμένα μια φθορίζουσα ουσία τοποθετείται στο αρχικό ολιγονουκλεοτίδιο με διαφορετικό χρώμα για το κάθε ένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια. Οι αντιδράσεις συνδυάζονται και ηλεκτροφορούνται μαζί. Οι διαφορετικές ζώνες DNA ανιχνεύονται από τον φθορισμό τους καθώς περνούν έξω από την άκρη του σωλήνα ηλεκτροφόρησης και η σειρά των χρωμάτων δίνει αμέσως τη σειρά των βάσεων. Η παραπάνω διαδικασία για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων MNK<sub>r</sub>5 και MNK<sub>r</sub>(4-6) έγινε από το ερευνητικό εργαστήριο της Primm (Μιλάνο Ιταλία).

### 2.10.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού αλληλουχίας.

Τα αποτελέσματα για το γονίδιο MNK<sub>r</sub>5 ήταν θετικά αφού δεν έδειξαν καμία μετάλλαξη στην αλληλουχία των βάσεων του. Αντιθέτως το γονίδιο MNK<sub>r</sub>(4-6) φέρει την μετάλλαξη T→A στην θέση 60. (Σχήμα 28)



Αποτελέσματα προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου MNK<sub>r</sub>(4-6).



Αλληλουχία βάσεων του άγριου τύπου του MNK<sub>r</sub>(4-6).

Σχήμα 28: Μετάλλαξη στη θέση εξήντα στο γονίδιο MNK<sub>r</sub>(4-6).

## **2.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΗΜΕΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MNK<sub>r</sub>(4-6) ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pCC2.**

Για να αποκτήσει το γονίδιο MNK<sub>r</sub>(4-6) την αλληλουχία του άγριου τύπου θα πρέπει να αντικατασταθεί η αδείνη στη θέση εξήντα από θυμίνη. Παρακάτω παραθέτονται τα τρία βασικά στάδια της μεθόδου σημειακής μετάλλαξης του γονιδιακού στόχου στο πλασμίδιο pCC2. (Σχήμα 29)

1) Σχεδιασμός δυο εκκινητών forward και reverse έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί του γονιδίου που θα γίνει η μετάλλαξη και να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη.

2) Μετουσιώνεται το πλασμίδιο και οι εκκινητές συνδέονται με τις μονόκλωνες αλυσίδες.

3) Παρουσία της DNA πολυμεράσης και της λιγάσης δημιουργείται η δίκλωνη μορφή του ανασυνδυασμένου DNA που περιέχει την κατευθυνόμενη μετάλλαξη.

4) Το δίκλωνο αυτό μόριο, που περιέχει την κατευθυνόμενη μετάλλαξη, εισάγεται σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* DH5a.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε σύμφωνα με τους παρακάτω κανόνες:

- Και οι δύο εκκινητές πρέπει να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη.
- Το μήκος τους πρέπει να είναι μεταξύ 25 και 45 βάσεις, ενώ η θερμοκρασία τήξης τους πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση των 78 °C.
- Η επιθυμητή μετάλλαξη θα πρέπει να είναι στη μέση (~10-15 βάσεις και από τις δύο πλευρές.)
- Το ποσοστό γουανίνης κυτοσίνης GC θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο του 40%.

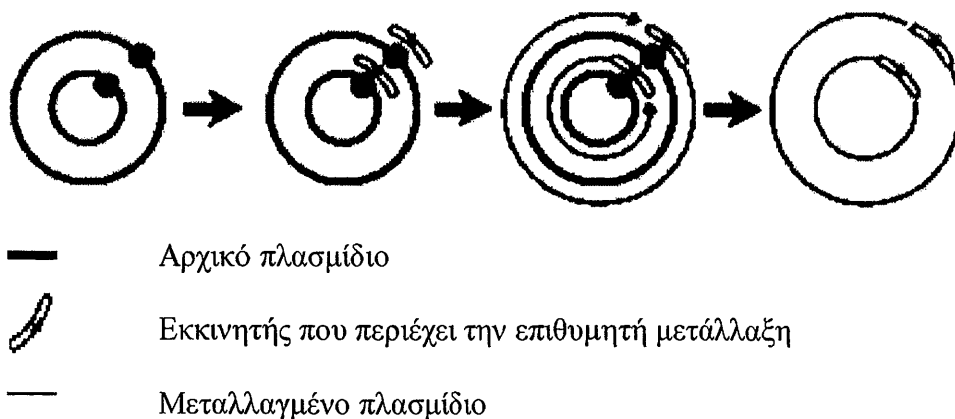
Τελικά οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου MNK<sub>r</sub>(4-6) στη θέση εξήντα είναι:

5'-GCAGTCTATTGAGGGTGTTCATATCAAAAAAGCCAGGTG-3'

T<sub>m</sub>>100 °C, Μήκος= 38, GC=44,7%

3'-CACCTGGCTTTTTTGATATGACCCCTCAATAGACTGC-5'

T<sub>m</sub>>100°C, Μήκος= 38, GC=44,7%



**Σχήμα 29:** Τα στάδια της σημειακής μετάλλαξης του γονιδίου MNK1(4-6) στο πλασμιδίον pCC2. .

### 2.11.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.

- Ζεύγος εκκινητών forward και reverse. Ο σχεδιασμός τους έγινε από τον ερευνητή της διατριβής αυτής και η προέλευσή τους ήταν από την Primm. (Milano Italy)
- Νουκλεοτίδια dATP, dGTP, dTTP, και dCTP (100mM το καθένα) και προέλευσης STRATAGENE.
- Pfu Turbo DNA πολυμεράση προέλευσης STRATAGENE. Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και αποψύχεται λίγο πριν τη χρήση της.
- Ρυθμιστικό διάλυμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR buffer) και προέλευσης STRATAGENE. Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Διάλυμα μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPmix) προέλευσης STRATAGENE. Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Θερμοκυκλοποιητής (BIORAD My Cycler™ Thermal Cycler).

### Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα εκκινητών* : Οι εκκινητές αραιώνονται σε ddH<sub>2</sub>O, ώστε η συγκέντρωσή τους (πριν την εισαγωγή τους στο μίγμα PCR) να είναι {50ng/ μl}. Φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.11.2 Πειραματική διαδικασία.

Παρασκευάζεται το μίγμα PCR σε eppendorf και τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται με την ακόλουθη σειρά:

ddH <sub>2</sub> O	= 35,5μl
Εκκινητής forward	= 2,5μl
Εκκινητής reverse	= 2,5μl
10xBuffer Taq	= 5μl
dNTPs (100mM)	= 1,5μl
Pfu Turbo DNA πολυμεράση	= 1μl
<hr/>	
Συνολικός όγκος	= 48 μl

Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα, το μίγμα PCR (48 μl), μεταφέρεται σε ειδικό eppendorf για PCR όπου προστίθενται 2 μl αραιωμένου (10ng/ μl) πλασμιδίου pCC2. Ακολουθεί νέα ανάδευση και το δείγμα μεταφέρεται στο θερμοκυκλοποιητή. Το πρόγραμμα της PCR για τη σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου MNK<sub>r</sub>(4-6) είναι: (Σχήμα 29)

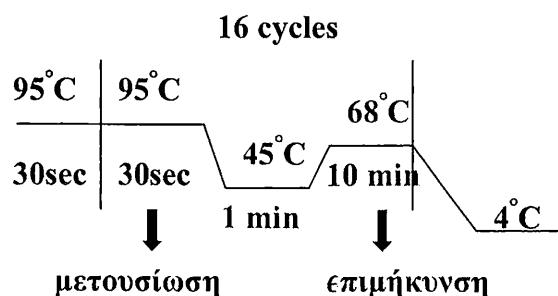
35 sec στους 95°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA)

1 min στους 55°C (σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA)

10 min στους 68°C (επιμήκυνση)

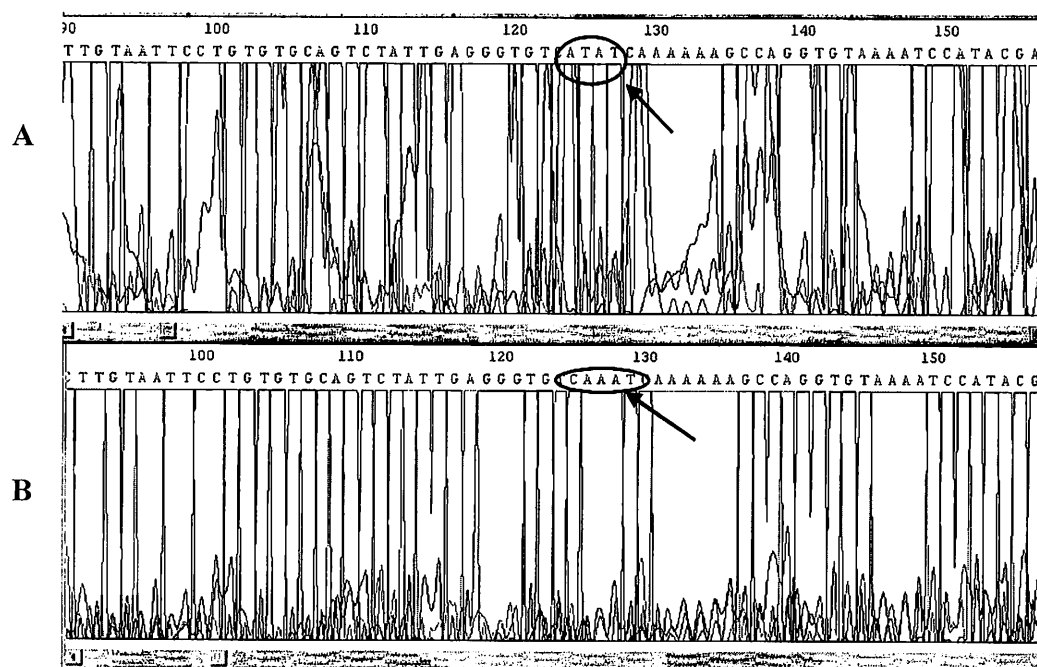
Οι κύκλοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση των παραπάνω σταδίων φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα. (Σχήμα 30)

Με το πέρασμα της αντίδρασης PCR το νέο πλασμίδιο pCC2 (*wild type*), μεταφέρεται στα βακτηριακά κύτταρα DH5a με την ίδια πειραματική πορεία που αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.8. Με βάση το πρωτόκολλο QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits (Κεφάλαιο 2.9) έγινε εξαγωγή του πλασμιδίου pCC2 (*wild type*) από τα κύτταρα DH5a σε υψηλή απόδοση και τελική συγκέντρωση ~150 ng/μl. Τελικά στο πλασμίδιο έγινε προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου MNK<sub>r</sub>(4-6) για επιβεβαίωση της αντικατάστασης της αδενίνης από την θυμίνη στη θέση εξήντα.



Σχήμα 30: Δεκαέξι κύκλοι στην αντίδραση PCR για την ολοκλήρωση της μετάλλαξης στο γονίδιο MNK $\gamma$ (4-6).

### 2.11.3 Αποτελέσματα του προσδιορισμού αλληλουχίας του μεταλλαγμένου γονιδίου MNK $\gamma$ (4-6).



Σχήμα 31: Σύγκριση της αλληλουχίας πριν (B) και μετά (A) από την σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο MNK $\gamma$ (4-6). Από τη σύγκριση των περιοχών που δείχνουν τα βέλη επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση της αδερίνης (B) από την θυμίνη (A).

## 2.12. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ pCC1 ΚΑΙ pCC2(wt) ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ E.Coli BL21(DE3)pLys.

### 2.12.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.

- Κύτταρα BL21(DE3)pLys (Novagen). Φυλάσσονται στους -80°C.
- Τρυπτόνη (Sigma)
- Εκχύλισμα ζύμης(Sigma)
- NaCl (Sigma)
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100mg/ml) Φυλάσσεται στους -20°C.
- Αντιβιοτικό chloramphenicol (34mg/ml) Φυλάσσεται στους -20°C.
- Αερόλουτρο Shaker

### 2.12.2 Διαλύματα εργασίας

- *Πλήρες Θρεπτικό υλικό για E.coli, Luria Bertani LB*= 1g τρυπτόνη, 0,5g εκχύλισμα ζύμης και 1g NaCl διαλύονται σε 100ml ddH<sub>2</sub>O.
- *Πλήρες στερεό Θρεπτικό υλικό*= Προσθήκη στο LB 2% άγαρ.  
Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται στους 121°C σε πίεση 1,2 atm, για είκοσι λεπτά.
- *Διάλυμα αμπικιλίνης*= Διαλύεται 1g αμπικιλίνης σε 1ml ddH<sub>2</sub>O.
- *Διάλυμα chloramphenicol* = Διαλύονται 1,02g chloramphenicol σε 30ml σε διάλυμα αιθανόλης 100%.

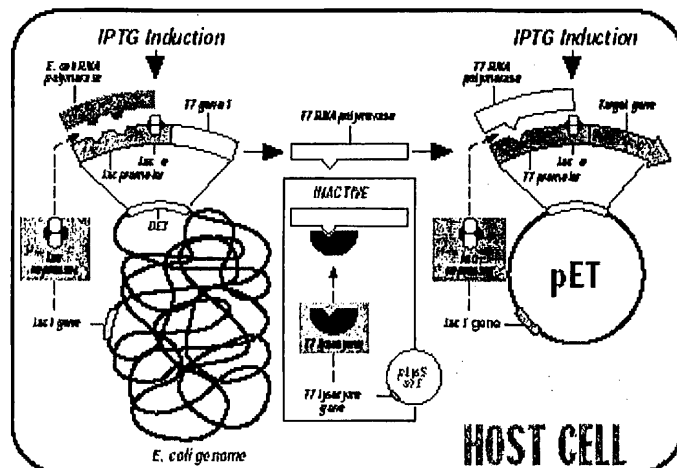
### 2.12.3 Πειραματική διαδικασία.

Αποψύχονται δύο erpendorf που περιέχουν 100 μl κύτταρα BL21(DE3)pLys. Μετά από την απόψυξη τα κύτταρα δεν μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν. Στο πρώτο erpendorf προστίθονται 10 μl πλασμιδίου pCC1 ενώ στο δεύτερο 10 μl pCC2(wt). Τα μίγματα αναδεύονται ήπια με πιπέτα και έπειτα μεταφέρονται σε πάγο και διατηρούνται εκεί για τριάντα λεπτά. Έπειτα μεταφέρονται σε υδρόλουτρο των 42 °C για 45 δευτερόλεπτα και τέλος σε πάγο για δύο λεπτά. Αφού προστεθούν σε κάθε δείγμα 900 μl LB (χωρίς αντιβιοτικό) τελικά επωάζουν σε αερόλουτρο σε 170rpm στους 37°C για μία ώρα. Μετά το πέρασμα της μίας ώρας εμβολιάζονται τρυβλία άγαρ (με στερεό θρεπτικό υλικό μολυσμένο με αμπικιλίνη και chloramphenicol) με 200 μl από το κάθε δείγμα. Τα τρυβλία επωάζουν στους 37°C για δώδεκα ώρες.

Και σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο να γίνει αρνητικός έλεγχος. Γι' αυτό το λόγο γίνεται μεταφορά στα κύτταρα BL21(DE3)pLys 10  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία. Αν η συγχώνευση έγινε με επιτυχία στο προηγούμενο στάδιο δεν θα πρέπει να υπάρχουν αποικίες στο τρυβλίο του αρνητικού δείγματος ελέγχου και πολλές αποικίες στα τρυβλία των κυττάρων BL21(DE3)pLys που περιέχουν τα πλασμίδια pCC2.

## 2.13 ΕΥΡΕΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6).

Η επιλογή των βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3)pLys για την έκφραση των γονιδίων MNKr5 και MNKr(4-6) δεν ήταν τυχαία. Ήταν απαραίτητο τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια να μεταφερθούν σε ένα σύστημα που να εξασφαλίζει ελεγχόμενη και υψηλή απόδοση έκφρασης. Τα παραπάνω βακτηριακά κύτταρα ξενιστές της σειράς *E. Coli* είναι γονιδιακά τροποποιημένα κύτταρα που είναι ικανά να εκφράσουν ανθρώπινες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης (T7 gene 1) το γονίδιο *lacI* και το προσαγωγέα *lacUV5* (Σχήμα 32) Ο προαγωγέας *lacUV5* δεσμεύει ειδικά την *E. Coli* RNA πολυμεράση η οποία μεταγράφει το γονίδιο T7 gene 1. Με την προσθήκη του IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) αρχίζει η μετάφραση της T7 RNA πολυμεράσης η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται στην μεταγραφή του γονιδιακού στόχου DNA στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. (Σχήμα 32)



**Σχήμα 32:** Το pET σύστημα έκφρασης που εφαρμόζεται στα βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3)pLys.

### 2.13.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.

- Τρυπτόνη (Sigma)
- Εκχύλισμα ζύμης(Sigma)
- NaCl (Sigma)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, (Sigma)
- HCl,  $\text{Fe}_2\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)
- Βιταμίνες: θειαμίνη, d-βιοτίνης πυριδοξίνη ριβοφλαβίνη
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100mg/ml) Φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ .
- Αντιβιοτικό chloramphenicol (34mg/ml) Φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ .
- IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (Sigma)
- Αερόλουτρο Shaker

### 2.13.2 Διαλύματα εργασίας

- **Πλήρες Θρεπτικό υλικό για *E.coli*, Luria Bertani LB=** 1g τρυπτόνη, 0,5g εκχύλισμα ζύμης και 1g NaCl διαλύονται σε 100ml ddH<sub>2</sub>O.
- **Ελάχιστο Θρεπτικό υλικό για *E.coli*, M9=**  
780 ml ddH<sub>2</sub>O+ 200 ml 5XM9+2 ml διαλύματος MgSO<sub>4</sub> 1M+ 2 ml διαλύματος Q+ 10 ml διαλύματος Vitamin mix + 20 ml διαλύματος γλυκόζης (4gr/lit) +NH<sub>4</sub>Cl ( 1,25gr σε 6,2 ml ddH<sub>2</sub>O).

Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται στους  $121^\circ\text{C}$  σε πίεση 1,2 atm, για είκοσι λεπτά.

- **Διάλυμα 5XM9=** Διαλύονται 15 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 64 gr  $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 gr NaCl σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O.
- **Διάλυμα Q=** Διαλύονται 8 ml HCl, 5 gr  $\text{Fe}_2\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 184mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 64mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 18mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 340mg  $\text{ZnCl}_2$ , 605mg  $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 40mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  σε 1 lt ddH<sub>2</sub>O.
- **Διάλυμα Vitamin mix=** Διαλύονται 50mg θειαμίνης, 10mg d-βιοτίνης, 10mg γλωριούχα γλωρίνης, 10mg φολικού οξέος, 10mg niacinamide, 10mg



παντοθενικού οξέος, 10mg πυριδοξίνης και 1mg ριβοφλαβίνης σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O.

- *Διάλυμα αμπικιλίνης*= Διαλύεται 1g αμπικιλίνης σε 1ml ddH<sub>2</sub>O.
- *Διάλυμα chloramphenicol* = Διαλύονται 1,02g chloramphenicol σε 30ml σε διάλυμα αιθανόλης 100%.

### 2.13.3 Πειραματική διαδικασία.

Για την ανάπτυξη υγρής προκαλλιέργειας πλήρως θρεπτικού υλικού LB (που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και 34 μg/ml chloramphenicol) εμβολιάστηκε ποσότητα 1 ml αυτού του υλικού με κύτταρα μονής αποικίας από στερεό θρεπτικό υλικό. Η προκαλλιέργεια επώαστηκε σε αερόλουτρο σε 180 rpm, στους 37<sup>0</sup>C για δώδεκα ώρες. Συνολικά ετοιμάστηκαν δύο προκαλλιέργειες μια με κύτταρα που εκφράζουν τη πρωτεΐνη MNK<sub>r</sub>5 και μία την πρωτεΐνη MNK<sub>r</sub>(4-6).

Για την ανάπτυξη των δύο υγρών καλλιιεργειών πλήρως θρεπτικού υλικού LB (που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και 34 μg/ml chloramphenicol) εμβολιάστηκαν 1 ml προκαλλιέργειας σε κωνική φιάλη των 0,5 lt που περιέχει 100 ml LB για κάθε μία καλλιέργεια. Τελικά τα κύτταρα επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες (180 rpm, 37<sup>0</sup>C) μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (OD=0,7). Τότε προστέθηκε στα κύτταρα 100 μl διαλύματος IPTG 1M. Μετά την προσθήκη του IPTG, ανά δύο ώρες συλλέγονταν δείγματα σε erpendorf από την κάθε καλλιέργεια και φυγοκεντρούταν στις 15.000 rpm για 1 λεπτό. Τα κυτταρικά δείγματα προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS. Από το gel ηλεκτροφόρησης σημειώθηκε ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση υπερεκφρασμένης μπάντας για κάθε πρωτεΐνη μετά την προσθήκη του IPTG.

Ταυτόχρονα έγινε, ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία, και ο προσδιορισμός του χρόνου έκφρασης της πρωτεΐνης MNK<sub>r</sub>(4-6) σε υγρή καλλιέργεια ελάχιστου θρεπτικού υλικού M9.

## **2.14 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ SDS.**

Τα συστήματα ηλεκτροφόρησης πηκτής με δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS) χρησιμοποιούνται για να διαχωρίσουν και να χαρακτηρίσουν τον αριθμό και το μέγεθος των πλευρικών αλύσεων των πρωτεϊνών ή των υπονομάδων τους από ένα δείγμα. Αρχικά το παρασκεύασμα της πρωτεΐνης αντιδρά με περίσσεια μιας διαλυτής θειόλης (R-SH) και SDS. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η περίσσεια R-SH ανάγει όλους τους δεσμούς S-S που υπάρχουν στις πρωτεΐνες και το απορρυπαντικό SDS ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης και αποκαλύπτει όλες τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ολική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων ώστε να προκύψουν ανιονικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων. Η ανιονική αποδιαταγμένη σε σύμπλοκο με μόρια SDS πρωτεΐνη, διαχωρίζεται τότε ηλεκτροφορητικά σε ένα περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος που έχει θειόλη και SDS συν μια υψηλή συγκέντρωση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η θειόλη και το SDS διατηρούν την πρωτεΐνη στην κατάλληλη διαμόρφωση. Το SDS που ενώνεται με τις πρωτεΐνες, δίνει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα για όλες τις πρωτεΐνες και τις αλυσίδες τους, ενώ η συγκέντρωση της πηκτής επιδρά σαν μοριακό κόσκινο, όπου το ιξώδες και το μέγεθος των πόρων της πηκτής καθορίζουν την κινητικότητα. Έτσι η σχετική κινητικότητα κάθε ανιονικής αποδιαταγμένης αλυσίδας πολυπεπτιδίου, είναι μια λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού του βάρους. [205]

### **2.14.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.**

- Ακρυλαμίδιο (Merck)
- Δι-ακρυλαμίδιο
- Tris Base (MB:121,14, Merck)
- Δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS)
- Διάλυμα 10%  $S_2O_6^{2-}$  (APS)
- Temed [N,N,N',N',-Tetra-methyl ethylenediamine] (Sigma)
- Χρωστική Coomassie blue

- Οξικό οξύ (MB:60, Merck)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (BB) (FERAK)
- DTT (Sigma)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης + Τροφοδοτικό
- Φυγόκεντρος πάγκου
- pHμετρο (Basic 20 pHmeter)

## 2.14.2 Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα A*= Διαλύονται 29,2 gr Acrilamide και 0,8 gr Bis-Acrlamide σε 100 ml dH<sub>2</sub>O.
- *Διάλυμα 4X B (Lower Tris)* = Διαλύονται 18,17 gr Tris Base και 0,4 gr SDS σε 100 ml dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,8 και το διάλυμα διατηρείται στους +4<sup>0</sup>C.
- *Διάλυμα 4X C (Upper Tris)* = Διαλύονται 6,06 gr Tris Base και 0,4 gr SDS σε 100 ml dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 6,8 και το διάλυμα διατηρείται στους +4<sup>0</sup>C.
- *Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X*= Διαλύονται 144 gr γλυκίνη και 30 gr Tris Base σε 1 λίτρο dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,3-8,6 και το διάλυμα διατηρείται στους +4<sup>0</sup>C.
- *Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X*= Σε 90 ml dH<sub>2</sub>O προστίθενται 10 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10X. Μετά την ρύθμιση του pH προστίθεται 0,1 gr SDS. Το διάλυμα διατηρείται στους +4<sup>0</sup>C.
- *Διάλυμα FSB 3X*= Διαλύονται 6 ml διαλύματος γλυκερόλης 1M (87%), 0.6 gr SDS, 1,2 ml διαλύματος Tris-HCl 1(M) και 0,018 gr μπλε της βρωμοφαινόλης.
- *Διάλυμα DTT 1M*= Διαλύεται 0,1542 gr DTT σε 1 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20<sup>0</sup>C.
- *Διάλυμα DYE για κύτταρα*= Σε 3 ml διαλύματος FSB 1X διαλύονται 510 μl διαλύματος DTT 1M.
- *Διάλυμα DYE για πρωτεΐνη*= Σε 3 ml διαλύματος FSB 1X διαλύονται 530 μl διαλύματος DTT 1M.
- *Διάλυμα Coomassie*= Σε 250 ml dH<sub>2</sub>O διαλύονται 250 ml διάλυμα αιθανόλης 1M, 50 ml οξικού οξέος 1M και 0,5 gr Coomassie blue.
- *Διάλυμα αποχρωστικής*= 50 ml αιθανόλης 1M + 75 ml οξικού οξέος + 875 ml dH<sub>2</sub>O.

- **Διάλυμα APS 10%**= Διαλύεται 1 gr APS σε 10 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται στους +4<sup>0</sup>C.
- **Running Gel (πηκτική) ηλεκτροφόρησης**= Διαλύονται 1,25 ml διαλύματος B, 1,8 ml διαλύματος A σε 1,95 ml dH<sub>2</sub>O. Την τελευταία στιγμή πριν μεταγγίσουμε το παραπάνω διάλυμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε 3 μl Temed και 20 μl διαλύματος APS 10% ώστε να γίνει ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και να σχηματιστεί το gel εντός της συσκευής.
- **Stacking Gel (πηκτική) ηλεκτροφόρησης**= Διαλύονται 0,624 ml διαλύματος C, 0,25 ml διαλύματος A σε 1,55 ml dH<sub>2</sub>O. Την τελευταία στιγμή πριν μεταγγίσουμε το παραπάνω διάλυμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε 3,75 μl Temed και 10 μl διαλύματος APS 10% ώστε να γίνει ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και να σχηματιστεί το gel εντός της συσκευής.

### 2.14.3 Ετοιμασία δειγμάτων

Για κύτταρα: Προστίθενται 100 μl διαλύματος DYE στα κύτταρα, βράζουν για τέσσερα λεπτά και μετά τοποθετούνται στους -20<sup>0</sup>C για ένα τέταρτο.

Για πρωτεΐνη: Σε erpendorf που περιέχει 14 μl διαλύματος πρωτεΐνης προστίθενται 7 μl διαλύματος DYE (για πρωτεΐνη). Τα δείγματα βράζουν δύο λεπτά και φυγοκεντρούνται.

### 2.14.4 Πειραματική διαδικασία

- 1) Προετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- 2) Τοποθετούμε εντός της συσκευής τις δύο λεπτές γυάλινες πλάκες που ανάμεσα τους θα τοποθετηθεί το gel ηλεκτροφόρησης, αφού προηγουμένως έχουν ξεπλυθεί με αιθανόλη
- 3) Πρώτα γεμίζουμε το διάκενο των γυάλινων πλακών με το *Running Gel (πηκτική) ηλεκτροφόρησης* μέχρι τα τρία τέταρτα του ύψους των πλακών. Το υπόλοιπο μέρος το γεμίζουμε με νερό. Περιμένουμε τριάντα λεπτά να πολυμεριστεί το gel και έπειτα απομακρύνεται το νερό με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού.
- 4) Στη θέση του νερού το διάκενο των γυάλινων πλακών γεμίζει με το *Stacking Gel (πηκτική) ηλεκτροφόρησης* και στο επάνω μέρος τοποθετείται το ειδικό χτενάκι (δέκα δειγμάτων). Περιμένουμε δεκαπέντε λεπτά να πολυμεριστεί το gel και έπειτα

απομακρύνεται προσεκτικά το χτενάκι και γεμίζουμε τις κυψέλες που έχουν δημιουργηθεί με dH<sub>2</sub>O.

5) Αφαιρούμε το dH<sub>2</sub>O από τις κυψέλες με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού.

6) Τοποθέτηση των δειγμάτων εντός των κυψελών.

7) Γεμίζουμε το χώρο της συσκευής με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X κλείνουμε τη συσκευή και συνδέουμε το τροφοδοτικό μηχανήμα.

8) Ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 200 V/20 mA για τέσσερις ώρες.

9) Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση παίρνουμε το gel αφού ανοίξουμε τις γυάλινες πλάκες και το τοποθετούμε σε μια λεκάνη που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής για μία ώρα.

10) Αποχύνουμε τη χρωστική, μετά προσθέτουμε το διάλυμα της αποχρωστικής και αφήνουμε για μισή ώρα.

11) Αποχύνουμε πάλι την αποχρωστική και προσθέτουμε νέα ποσότητα αποχρωστικής.

12) Φωτογραφίζουμε το gel με τις εμφανισθείσες μπάντες.

## **2.15 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6).**

### **2.15.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.**

- Τρυπτόνη (Sigma)
- Εκχύλισμα ζύμης(Sigma)
- NaCl (Sigma)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NaCl, (Sigma)
- HCl, Fe<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O (Sigma)
- Βιταμίνες: θειαμίνη, d-βιοτίνης πυριδοξίνη ριβοφλαβίνη
- Αντιβιοτικό αμικικιλίνη (100mg/ml) Φυλάσσεται στους -20°C.
- Αντιβιοτικό chloramphenicol (34mg/ml) Φυλάσσεται στους -20°C.
- IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (Sigma)
- Αερόλουτρο Shaker

### 2.15.2 Διαλύματα εργασίας

- **Πλήρες Θρεπτικό υλικό για *E.coli*, *Luria Bertani LB***= 1g τρυπτόνη, 0,5g εκχύλισμα ζύμης και 1g NaCl διαλύονται σε 100ml ddH<sub>2</sub>O.

- **Ελάχιστο Θρεπτικό υλικό για *E.coli*, *M9***=

780 ml ddH<sub>2</sub>O+ 200 ml 5XM9+2 ml διαλύματος MgSO<sub>4</sub> 1M+ 2 ml διαλύματος Q+ 10 ml διαλύματος Vitamin mix + 20 ml διαλύματος γλυκόζης (4gr/lit) +NH<sub>4</sub>Cl ( 1,25gr σε 6,2 ml ddH<sub>2</sub>O).

Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται στους 121<sup>0</sup>C σε πίεση 1,2 atm, για είκοσι λεπτά.

- **Buffer A**= Διαλύονται 3,56 gr Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 58,44gr NaCl και 0,34 gr ιμιδαζολίου σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8 και το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τα διαλύματα 5XM9, Q, Vitamin mix, αμπικιλίνης, και chloramphenicol προετοιμάστηκαν με τον ίδιο τρόπο με αυτόν που αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 2.13.2.

### 2.15..3 Πειραματική διαδικασία.

#### α) Έκφραση της δομικής περιοχής MNKr5

Για την ανάπτυξη υγρής προκαλλιέργειας πλήρως θρεπτικού υλικού LB (που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και 34 μg/ml chloramphenicol) εμβολιάστηκε ποσότητα 10 ml αυτού του υλικού με κύτταρα μονής αποικίας από στερεό θρεπτικό υλικό. Η προκαλλιέργεια επώαστηκε σε αερόλουτρο σε 180 rpm, στους 37<sup>0</sup>C για δώδεκα ώρες.

Για την ανάπτυξη υγρής προκαλλιέργειας πλήρως θρεπτικού υλικού LB (που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και 34 μg/ml chloramphenicol) εμβολιάστηκαν 10 ml προκαλλιέργειας σε κωνική φιάλη των 2 lt που περιέχει 1000 ml LB. Τα κύτταρα επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες (180 rpm, 37<sup>0</sup>C) μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (OD=0,7). Τότε προστέθηκε στην υγρή καλλιέργεια 1 ml διαλύματος IPTG 1M και τα κύτταρα επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες (180 rpm, 37<sup>0</sup>C) για τέσσερις ώρες.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 8000 rpm (4<sup>0</sup>C). Στη συνέχεια εκπλύθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα *Buffer A* και έγινε λύση των κυττάρων με υπέρηχους σε πάγο. Αμέσως μετά τα κύτταρα υπερφυγοκεντρήθηκαν για 40λεπτά στις 40000 rpm (4<sup>0</sup>C). Δείγματα από το υπερκείμενο διάλυμα αλλά και από το ίζημα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS. Τελικά στο gel

εμφανίστηκε υπερεκφρασμένη μπάντα της πρωτεϊνικής περιοχής MNKr5 στο δείγμα του υπερκείμενου διαλύματος.

#### β) Έκφραση της δομικής περιοχής MNKr(4-6).

Για την ανάπτυξη υγρής προκαλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού υλικού M9 (που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και 34 μg/ml chloramphenicol) εμβολιάστηκε ποσότητα 10 ml αυτού του υλικού με κύτταρα μονής αποικίας από στερεό θρεπτικό υλικό. Η προκαλλιέργεια επωάστηκε σε αερόλουτρο σε 180 rpm, στους 37<sup>0</sup>C για δώδεκα ώρες.

Για την ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού υλικού M9 (που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και 34 μg/ml chloramphenicol) εμβολιάστηκαν 10 ml προκαλλιέργειας σε κωνική φιάλη των 2 lt που περιέχει 1000 ml M9. Τα κύτταρα επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες (180 rpm, 37<sup>0</sup>C) μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (OD=0,7). Τότε προστέθηκε στην υγρή καλλιέργεια 1 ml διαλύματος IPTG 1M και τα κύτταρα επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες (180 rpm, 37<sup>0</sup>C) για δώδεκα ώρες.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 8000 rpm (4<sup>0</sup>C). Στη συνέχεια εκπλύθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer A και έγινε λύση των κυττάρων με υπέρηχους σε πάγο. Αμέσως μετά τα κύτταρα υπερφυγοκεντρήθηκαν για 40λεπτά στις 40000 rpm (4<sup>0</sup>C). Δείγματα από το υπερκείμενο διάλυμα αλλά και από το ίζημα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS. Τελικά στο gel εμφανίστηκε υπερεκφρασμένη μπάντα της πρωτεϊνικής περιοχής MNKr(4-6) στο δείγμα του υπερκείμενου διαλύματος.

## **2.16 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6).**

Οι δομικές περιοχές MNKr5 και MNKr(4-6) είναι πρωτεΐνες που έχουν στο C άκρο τους ουρά με έξι ιστιδίνες (His-Taq). Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών αυτών γίνεται γρήγορα και με υψηλή απόδοση με την χρωματογραφία HiTrap. Στη χρωματογραφία HiTrap χρησιμοποιείται η στήλη HiTrap Chelating HP που όταν φορτίζεται με ιόντα Zn<sup>+2</sup> έχει την ικανότητα να δεσμεύει πρωτεΐνες με ιστιδινική ουρά. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να γίνει γρήγορα διαχωρισμός ενός πρωτεϊνικού στόχου από μίγμα βακτηριακών πρωτεϊνών. Στην πραγματικότητα μετά τον καθαρισμό ο πρωτεϊνικός στόχος δεν είναι απόλυτα καθαρός αφού δεσμεύονται στη στήλη και ένας μικρός αριθμός βακτηριακών

πρωτεϊνών που έχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με το ιόν  $Zn^{+2}$ , λόγω ύπαρξης σημαντικού αριθμού ιστιδινικών καταλοίπων στην αλληλουχία τους. Για τον λόγο αυτό αποκόβεται η ιστιδινική ουρά από την επιθυμητή πρωτεΐνη με την δράση του ενζύμου Factor Xa και γίνεται δεύτερος καθαρισμός. Αυτή τη φορά δεσμεύονται από την ρητίνη της στήλης οι μη επιθυμητές βακτηριακές πρωτεΐνες ενώ η πρωτεΐνη στόχος συλλέγεται απόλυτα καθαρή.

### 2.16.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.

- $ZnSO_4$ , (Sigma)
- NaCl,  $NaH_2PO_4$ , ιμιδαζόλιο,  $NH_4Cl$ , EDTA (Sigma)
- HiTrap Chelating HP column 5x1 ml (Amersham Pharmacia Biotech)
- Ένζυμο Factor Xa (Novagen).

### 2.16.2 Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα  $ZnSO_4$  0,1M** = Διαλύονται 0,29 gr  $ZnSO_4$  σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O.
- **Buffer A** = Διαλύονται 3,56 gr  $NaH_2PO_4$ , 58,44gr NaCl και 0,34 gr ιμιδαζολίου σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- **Buffer B** = Διαλύονται 3,56 gr  $NaH_2PO_4$ , 58,44gr NaCl και 1,36 gr ιμιδαζολίου σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- **Buffer C** = Διαλύονται 3,56 gr  $NaH_2PO_4$ , 53,4gr  $NH_4Cl$  και 1,36 gr ιμιδαζολίου σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- **Buffer D** = Διαλύονται 3,56 gr  $NaH_2PO_4$ , 53,49gr NaCl και 1,36 gr ιμιδαζολίου 18,6 gr EDTA σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα του Factor Xa** = Διαλύονται 6,05 gr Tris Base, 5,8 gr NaCl και 147 mg  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$  σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### 2.16.3 Πειραματική διαδικασία.

Όλη η πειραματική διαδικασία καθαρισμού των πρωτεϊνικών στόχων έγινε σε αναερόβιες συνθήκες μέσα σε θάλαμο *glove box*.

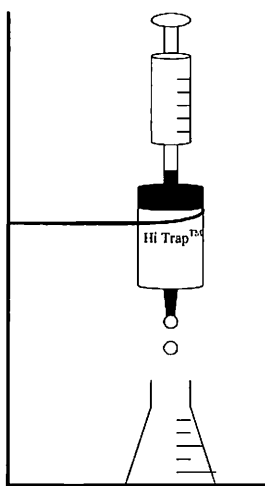


#### A) Προετοιμασία στήλης

1) Γεμίζεται σύριγγα (των 20 ml) με ddH<sub>2</sub>O. Προσαρμόζεται η σύριγγα στην επάνω υποδοχή της στήλης και καθαρίζεται η στήλη συνολικά με 25 ml ddH<sub>2</sub>O. Η σύριγγα θα πρέπει να πιέζεται με ελεγχόμενη δύναμη έτσι ώστε το νερό να εκλύεται από την έξοδο της στήλης στάγδην. (Σχήμα 33) **ΠΡΟΣΟΧΗ!** Κατά τη χρησιμοποίηση της στήλης δεν θα πρέπει να εισχωρήσει αέρας στο εσωτερικό της.

2) Χρησιμοποιώντας τη σύριγγα διοχετεύεται στο εσωτερικό της στήλης 3 ml από το διάλυμα ZnSO<sub>4</sub> 0,1M φορτώνοντας την με ιόντα Zn<sup>+2</sup>.

3) Με τον ίδιο τρόπο πλένεται η στήλη αρχικά με 25 ml dH<sub>2</sub>O και έπειτα με 25 ml Buffer A.



**Σχήμα 33:** Προετοιμασία στήλης HiTrap Chelating HP.

#### B) Καθαρισμός της πρωτεϊνικού στόχου MNKr5.

1) Χρησιμοποιώντας τη σύριγγα προστίθεται στο εσωτερικό της στήλης το μίγμα βακτηριακών πρωτεϊνών που περιέχει και τον πρωτεϊνικό στόχο MNKr5.

2) Πλένεται η στήλη αρχικά με 70 ml Buffer B και έπειτα με 50 ml Buffer C για την απομάκρυνση βακτηριακών πρωτεϊνών που δεν έχουν ιστιδινική ουρά.

3) Συλλέγεται ο πρωτεϊνικός στόχος με την προσθήκη στη στήλη 20 ml Buffer D.

4) Αλλαγή του πρωτεϊνικού διαλύματος από Buffer D σε ρυθμιστικό διάλυμα του Factor Xa με τη χρήση συμπυκνωτήρα Amicon και συμπύκνωση σε τελικό όγκο 2 ml.

4) Κόψιμο της ιστιδινικής ουράς του πρωτεϊνικού στόχου. Στο συμπυκνωμένο διάλυμα της πρωτεΐνης προστίθεται η πρωτεΐνάση Factor Xa σε αναλογία 20 μl ενζύμου για 20 mg πρωτεΐνης. Το διάλυμα επώαζει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για πέντε ώρες.

5) Δεύτερος καθαρισμός με HiTrap Chelating HP στήλη. Η ετοιμασία της στήλης έγινε με τον ίδιο τρόπο που αναγράφεται παραπάνω.

6) Χρησιμοποιώντας τη σύριγγα προστίθεται στο εσωτερικό της στήλης το διάλυμα που περιέχει τον πρωτεϊνικό στόχο MNKr5 στον οποίο απουσιάζει η ιστιδινική ουρά.

7) Με την προσθήκη 20 ml Buffer A. συλλέγεται ο πρωτεϊνικός στόχος, που αυτή τη φορά δεν δεσμεύεται από την στήλη.

8) Πλένεται η στήλη με 20 ml Buffer D.

#### Γ) Καθαρισμός της πρωτεϊνικού στόχου MNKr(4-6).

1) Χρησιμοποιώντας τη σύριγγα προστίθεται στο εσωτερικό της στήλης το μίγμα βακτηριακών πρωτεϊνών που περιέχει και τον πρωτεϊνικό στόχο MNKr(4-6).

2) Πλένεται η στήλη αρχικά με 100 ml Buffer B και έπειτα με 70 ml Buffer C για την απομάκρυνση βακτηριακών πρωτεϊνών που δεν έχουν ιστιδινική ουρά.

3) Συλλέγεται ο πρωτεϊνικός στόχος με την προσθήκη στη στήλη 20 ml Buffer D.

Ακολουθεί απομάκρυνση της ιστιδινικής ουράς του πρωτεϊνικού στόχου και δεύτερος καθαρισμός με στήλη HiTrap ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που αναγράφεται παραπάνω. Η επώαση της πρωτεΐνης με το ένζυμο Factor Xa έγινε για δώδεκα ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

## 2.17 ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ $^{13}\text{C}$ ΚΑΙ $^{15}\text{N}$ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6).

### 2.17.1 Αντιδραστήρια και όργανα. που χρησιμοποιήθηκαν.

- Πλήρης θρεπτικά υλικά:  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  Silantes Medium,  $^{15}\text{N}$  Silantes Medium
- $^{13}\text{C}$  γλυκόζη,  $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$
- NaCl (Sigma)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Na  $\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, (Sigma)
- HCl,  $\text{Fe}_2\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma)
- Βιταμίνες: θειαμίνη, d-βιοτίνης πυριδοξίνη ριβοφλαβίνη
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100mg/ml) Φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ .
- Αντιβιοτικό chloramphenicol (34mg/ml) Φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ .
- IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (Sigma)
- Αερόλουτρο Shaker

### 2.17.2 Διαλύματα εργασίας

- **Επισημασμένο ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) ελάχιστο Θρεπτικό υλικό για *E.coli*, M9=**  
780 ml ddH<sub>2</sub>O+ 200 ml 5XM9+2 ml διαλύματος  $\text{MgSO}_4$  1M+ 2 ml διαλύματος Q+ 10 ml διαλύματος Vitamin mix + 20 ml διαλύματος  $^{13}\text{C}$  γλυκόζης (4gr/lit) +  $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$  ( 1,25gr σε 6,2 ml ddH<sub>2</sub>O).
- **Επισημασμένο  $^{15}\text{N}$  ελάχιστο Θρεπτικό υλικό για *E.coli*, M9=**  
780 ml ddH<sub>2</sub>O+ 200 ml 5XM9+2 ml διαλύματος  $\text{MgSO}_4$  1M+ 2 ml διαλύματος Q+ 10 ml διαλύματος Vitamin mix + 20 ml διαλύματος γλυκόζης (4gr/lit) +  $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$  (1,25gr σε 6,2 ml ddH<sub>2</sub>O).

Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται στους  $121^\circ\text{C}$  σε πίεση 1,2 atm, για είκοσι λεπτά.

Τα διαλύματα 5XM9, Q, Vitamin mix, αμπικιλίνης, και chloramphenicol προετοιμάστηκαν με τον ίδιο τρόπο με αυτόν που αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 2.13.2.

### **2.17..3 Πειραματική διαδικασία.**

Η έκφραση της απλά ( $^{15}\text{N}$ ) και διπλά επισημασμένης ( $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ) πρωτεΐνης MNKr5 έγινε με την ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας πλήρους θρεπτικού υλικού  $^{15}\text{N}$  και  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$  Silantes Medium αντίστοιχα. Οι συνθήκες έκφρασης και η πειραματική διαδικασία είναι παρόμοιες με αυτές που εφαρμόστηκαν στην παραγωγή της μη επισημασμένης πρωτεΐνης MNKr5. (Κεφ.2.15)

Η έκφραση της απλά ( $^{15}\text{N}$ ) και διπλά επισημασμένης ( $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ) πρωτεΐνης MNKr(4-6) έγινε με την ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού υλικού  $^{15}\text{N}$ -M9 και ( $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ )-M9 αντίστοιχα. Οι συνθήκες έκφρασης και η πειραματική διαδικασία είναι παρόμοιες με αυτές που εφαρμόστηκαν στην παραγωγή της μη επισημασμένης πρωτεΐνης MNKr(4-6). (Κεφ.2.15)

## 2.18 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ.

### 2.18.1 Προετοιμασία των δειγμάτων αροMΝΚr5 ΚΑΙ αροMΝΚr(4-6).

Για τον προσδιορισμό της δομής ή της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρέπει η πρωτεΐνη να είναι διαλυτή, σταθερή και αναδιπλωμένη στο ρυθμιστικό διάλυμα NMR (NMR buffer). Συνήθως λόγω της υπερέκφρασης μιας πρωτεΐνης, του καθαρισμού της και της επισήμανσής της με  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  η πρωτεΐνη παρουσιάζει μικρή σταθερότητα στο ρυθμιστικό διάλυμα NMR και μετουσιώνεται. Η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο θα γίνουν τα πειράματα NMR πρέπει να εξασφαλίζει πέρα από τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και καλή ποιότητα φάσματος  $^{15}\text{N}$ -HSQC.

Όλα τα δείγματα NMR των πρωτεϊνικών περιοχών χωρίς χαλκό αροMΝΚr5 και αροMΝΚr(4-6) προετοιμάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 100mM ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=7). Τα δείγματα NMR ανάχθηκαν με περίσσια αναγωγικού μέσου dithiothreitol DTT και πλύθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα (100mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=7). Η τελική αναλογία DTT προς πρωτεΐνη ήταν 2-5. Σε όλα τα δείγματα η τελική συγκέντρωση των πρωτεϊνών ήταν ~1 mM και περιείχαν 10%(v/v)  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Όλη προετοιμασία των δειγμάτων NMR έγινε σε αναερόβιες συνθήκες μέσα σε θάλαμο *glove box* και τα NMR tube ασφαλίστηκαν αεροστεγές πριν βγουν από τον θάλαμο.

Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος (100mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=7) = Διαλύθηκαν 8,71 gr  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  και 6,80 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### 2.18.2 Τιτλοδότηση με Cu(I) των δειγμάτων αροMΝΚ5 και αροMΝΚ(4-6).

#### A) Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 50 mM Tris-Mes pH=8** = Διαλύονται 0.6 gr Tris Base σε 100 ml dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8 με την προσθήκη σταδιακά Mes, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- **Διάλυμα  $\text{CuSO}_4$  20 mM** = Διαλύονται 0,05 gr  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  σε 10 ml dH<sub>2</sub>O.

- *Διάλυμα [Cu(I)-(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> 10 mM σε CH<sub>3</sub>CN*= Διαλύονται 0,00372 gr [Cu(I)-(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> σε 1 ml CH<sub>3</sub>CN. Το διάλυμα διατηρείται σε αναερόβιες συνθήκες μέσα σε θάλαμο *glove box*.
- *Διάλυμα 100mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=7*= Διαλύθηκαν 8,71 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 6,80 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7, το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- *Διάλυμα DTT 1M*= Διαλύεται 0,1542 gr DTT σε 1 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

## **B) Πειραματική διαδικασία.**

### I) Τιτλοδότηση αποMNK5.

Γίνεται αλλαγή του πρωτεϊνικού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-Mes pH=8 με τη χρήση συμπυκνωτήρα Amicon. Αραιώνεται η πρωτεΐνη μέχρι τελικής συγκέντρωσης 60μM. Προστίθεται στο διάλυμα αναγωγικό DTT και η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα είναι 10 mM. Προστίθεται διάλυμα CuSO<sub>4</sub> 20 mM στο πρωτεϊνικό διάλυμα έτσι ώστε η αναλογία χαλκού πρωτεΐνης να είναι 2:1. Το διάλυμα αναδεύεται για δύο ώρες και έπειτα πλένεται δύο φορές στη συσκευή Amicon για να απομακρυνθεί ο χαλκός που δεν δεσμεύτηκε από την πρωτεΐνη. Τελικά γίνεται αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος από 50 mM (Tris-Mes pH=8) σε 100mM (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=7) το οποίο περιέχει 10 mM DTT. Το διάλυμα συμπυκνώνεται σε τελικό όγκο 500μl και προστίθεται 10%(v/v) <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι ~1 mM και η αναλογία δεσμευμένου χαλκού(I) /πρωτεΐνης 0,9:1,0.

Όλη η πειραματική διαδικασία τιτλοδότησης χαλκού έγινε σε αναερόβιες συνθήκες μέσα σε θάλαμο *glove box* κα το NMR tube ασφαρίζεται αεροστεγώς πριν βγει από τον θάλαμο.

### II) Τιτλοδότηση αποMNK(4-6).

Γίνεται αλλαγή του πρωτεϊνικού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-Mes pH=8 με τη χρήση συμπυκνωτήρα Amicon. Αραιώνεται η πρωτεΐνη μέχρι τελικής συγκέντρωσης 60μM. Προστίθεται στο διάλυμα αναγωγικό DTT και η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα είναι 10 mM. Προστίθεται το διάλυμα [Cu(I)-(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> 10 mM σε CH<sub>3</sub>CN, στο πρωτεϊνικό διάλυμα σε τρία στάδια στα οποία η αναλογία χαλκού/πρωτεΐνης είναι 1:1, 2:1 και 3:1 αντίστοιχα. Το διάλυμα αναδεύεται για δύο ώρες και έπειτα πλένεται δύο φορές στη συσκευή Amicon για να απομακρυνθεί

ο χαλκός που δεν δεσμεύτηκε από την πρωτεΐνη. Τελικά γίνεται αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος από 50 mM (Tris-Mes pH=8) σε 100mM ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$  pH=7) το οποίο περιέχει 10 mM DTT. Το διάλυμα συμπυκνώνεται σε τελικό όγκο 500μl και προστίθεται 10%(v/v)  $^2H_2O$ . Όλη η πειραματική διαδικασία τιτλοδότησης χαλκού έγινε σε αναερόβιες συνθήκες μέσα σε θάλαμο *glove box*.

### 2.18.3 Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων (2D) $^1H$ - $^{15}N$ HSQC. (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Η όλη πορεία μαγνητικών επιδράσεων για ένα πείραμα 2D NMR περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

- α) Προετοιμασία των αυτοστροφορμών (preparation)
- β) Ανάπτυξη των αυτοστροφορμών και μαγνήτιση (evolution t1)
- γ) Ανάμιξη των αυτοστροφορμών (Mixing)
- δ) Ανίχνευση του σήματος (Detection)

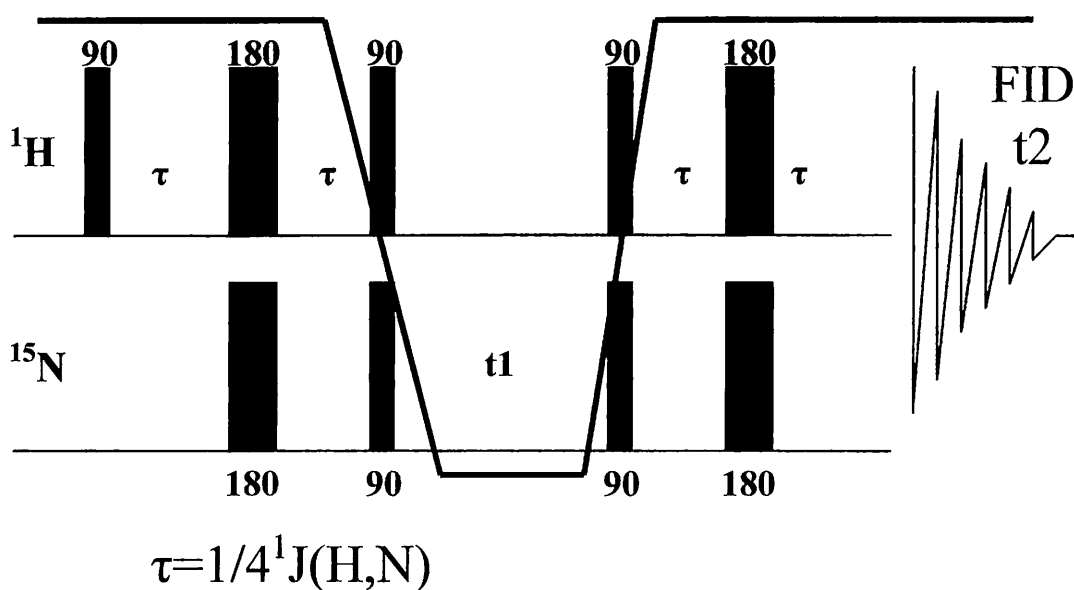
α) Προετοιμασία. Στο στάδιο της προετοιμασίας οι πυρήνες του μορίου ευρίσκονται εντός μαγνητικού πεδίου σε μια κατάσταση ισορροπίας που καθορίζεται από την στατική κατά Boltzmann. Σε αυτή τη κατάσταση οι διάφορες αυτοστροφορμές έχουν τη φυσική τους μαγνήτιση, όπου για ένα τύπο πυρήνα μπορεί να υπάρχουν τυχαίοι προσανατολισμοί αυτοστροφορμών, ενώ για άλλο τύπο πυρήνα του ίδιου μορίου υπάρχει θερμική ισορροπία δηλαδή μικρή περίσσεια αυτοστροφορμών στην βασική κατάσταση έναντι της διεγερμένης στον άξονα Z. Στην αρχή της περιόδου προετοιμασίας των αυτοστροφορμών, στην οποία υπάρχει διέγερση, με μια σειρά πειραμάτων, όλοι οι πυρήνες αποκτούν μια θερμική ισορροπία και ένα βαθμό μαγνήτισης. Στο τελικό στάδιο της περιόδου προετοιμασίας με τη εφαρμογή της καταλλήλου μαγνητικής επίδρασης τα ανύσματα μαγνητίσεων M των διαφορετικών πυρήνων τοποθετούνται στην σωστή τους θέση σε σχέση με την διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου  $B_0$ .

β) Ανάπτυξη: Το διάστημα της ανάπτυξης της μαγνήτισης είναι προς το τέλος του χρονικού διαστήματος t1 που μεσολαβεί μεταξύ δυο μαγνητικών επιδράσεων. Η επιφερόμενη μαγνήτιση M για ένα πυρήνα αναπτύσσεται σε ένα καθορισμένο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον του πυρήνα και για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα t1.

γ) Ανάμιξη: Στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης με εφαρμογή μιας δεύτερης μαγνητικής επίδρασης υπάρχει μια ανακατανομή των πυρηνικών αυτοστροφορμών. Στη περίοδο ανάμιξης και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα λαμβάνει χώρα επικοινωνία αυτοστροφορμών.

Δ) Ανίχνευση σήματος: Η ανίχνευση του σήματος γίνεται μετά τη συλλογή της FID από το δέκτη ( $t_2$ ).

Η ακολουθία παλμών για το ετεροπυρηνικό πείραμα δύο διαστάσεων  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC παρουσιάζεται παρακάτω:



Σχήμα 46: Ακολουθία παλμών για το ετεροπυρηνικό πείραμα δύο διαστάσεων  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC.

Σε αυτό το πείραμα υπάρχουν δύο σειρές παλμών μία για το πρωτόνιο  $^1\text{H}$  και μία για το άζωτο  $^{15}\text{N}$ . Μετά την εφαρμογή του πρώτου παλμού  $\pi/2$  το άνυσμα μαγνήτισης του πρωτονίου φέρεται στο επίπεδο  $xy$ . Η ακολουθία παλμών:  $\tau$ - $180^\circ$  (και για τους δύο πυρήνες  $^1\text{H}$  και  $^{15}\text{N}$ )  $-\tau$ , χρησιμοποιείται για την μεταφορά της μαγνήτισης από την αυτοστροφορμή του πρωτονίου στο spin  $^{15}\text{N}$  μέσω της σταθεράς σύζευξης  $^1J$ . Η διαδικασία αυτή ονομάζεται INEPT (Insensitive Nuclei Excitation Polarization Transfer). Ο λόγος που χρησιμοποιείται η INEPT μεταφορά είναι ότι ο πυρήνας  $^{15}\text{N}$  είναι δέκα φορές λιγότερο ευαίσθητος από το πυρήνα  $^1\text{H}$  και έτσι το σήμα του  $^{15}\text{N}$ , από ένα απλό παλμό στο πυρήνα αζώτου, είναι δέκα φορές πιο ασθενές σε σύγκριση με αυτού του πρωτονίου  $^1\text{H}$ . Με την μεταφορά της ισχυρότερης μαγνήτισης



από το  $^1\text{H}$  στο  $^{15}\text{N}$ , το σήμα ισχυροποιείται. Μετά την εφαρμογή του παλμού  $\pi/2$  στον πυρήνα του αζώτου  $^{15}\text{N}$  ακολουθεί ο συνηθισμένος χρόνος ανάπτυξης  $t_1$  για τις χημικές μετατοπίσεις  $^{15}\text{N}$  και τελικά η μαγνήτιση μεταφέρεται πίσω στο πρωτόνιο με την INEPT μεταφορά. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται με τη συλλογή της PID από το δέκτη ( $t_2$ ). [209]

Στο 2D φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC εμφανίζεται μία κορυφή (cross peak) για κάθε σύζευξη του αζώτου με το αμιδικό υδρογόνο του πεπτιδικού δεσμού με αποτέλεσμα κάθε αμινοξύ (εκτός της προλίνης) να δίνει από μία κορυφή στο φάσμα.

## **2.19 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ.**

Για τα πειράματα χημικής επισήμανσης επώαστηκαν 400 pmol apo-MNK(4-6) μόνη της ή παρουσία της Cu(I)-HAH1 με περίσσια (~50 φορές) του φθορίζοντος κυστεϊνικά κατευθυνόμενου αντιδραστηρίου CPM (Sigma) για 2.5 λεπτά σε αναερόβιες συνθήκες έλλειψη φωτός. Η αντίδραση επισήμανσης σταμάτησε με την προσθήκη περίσσιας (~10 φορές περισσότερο από το CPM) β-μερκαπτοαιθανόλης. Έπειτα η πρωτεΐνη apo-MNK(4-6) πρωτεόλυθηκε με την προσθήκη τρυψίνης σε αναλογία 1:200 (w/w) για τρεις ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πρωτεόλυση τερματώθηκε με την προσθήκη αναστολέα 2mM φαινυλικό αιθυλικό σουλφονυλικό φθόριο (PMFS). Τα πεπτιδικά κομμάτια της πρωτεόλυσης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 20% με δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS). Τα CPM επισημασμένα πεπτιδικά κομμάτια φωτογραφήθηκαν κάτω από UV φως με τη βοήθεια *Gel-Doc System*. Έπειτα το gel χρωματίστηκε σε χρωστική Coomassie R250 και φωτογραφήθηκαν οι εμφανισθείσες μπάντες.

**3) ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ  
ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5 ΚΑΙ MNKr(4-6).**

### 3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η γνώση των τρισδιάστατων δομών των μέταλλο-πρωτεϊνών είναι βασική προϋπόθεση για την κατανόηση των λειτουργιών τους σε βιοανόργανα συστήματα. Σήμερα υπάρχουν δυο τεχνικές: η φασματοσκοπία NMR και η ανάλυση με ακτίνες X που μπορούν να προσδιορίσουν με υψηλή ακρίβεια την δομή των πρωτεϊνών. Παρόλο αυτά υπάρχουν περιπτώσεις πειραματικά προσδιοριζόμενων δομών που περιέχουν σημαντικά λάθη καθώς και περιπτώσεις που οι παραπάνω τεχνικές να αδυνατούν να προσδιορίσουν τρισδιάστατη δομή μιας μη αναδιπλωμένης μέταλλο-πρωτεΐνης. [206] Πλέον για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων γίνεται χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων που είναι σε θέση να προβλέψουν την ποιότητα της αναδίπλωσης ενός πρωτεϊνικού στόχου καθώς και να υπολογίσουν κατά πόσο ενεργειακά σταθερή είναι.

Σε αυτή την ερευνητική δουλειά υπολογίστηκε η κατανομή ανά κατάλοιπο, της ολικής ενέργειας ενός δομικού μοντέλου της περιοχής MNK<sub>r</sub>5 με το πρόγραμμα PROSA II (PROtein Structure Analysis) ενώ στην τριπλή περιοχή MNK<sub>r</sub>(4-6) με την χρήση του προγράμματος PoPMSC ( Prediction of Protein Mutation Stability Changes) έγινε πρόβλεψη των ενεργειακών μεταβολών που φέρει μια σημειακή μετάλλαξη στην αλληλουχία και συγκεκριμένα η αντικατάσταση I21K που εμφανίστηκε κατά την απομόνωση του γονιδίου. (Κεφ. 2.10.1)

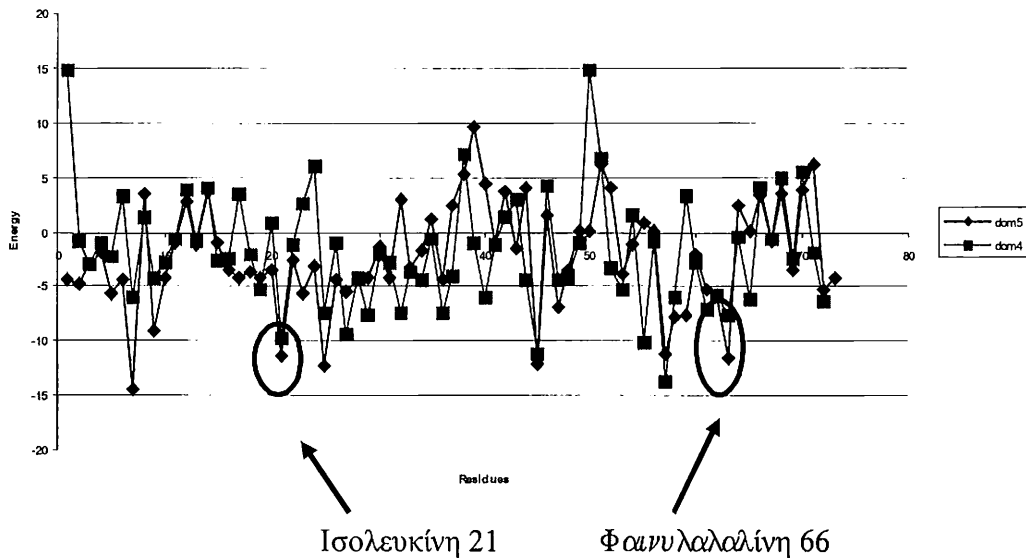
### 3.2 Αποτελέσματα των υπολογισμών PROSA II και PoPMSC.

#### A) PROSA II

Το πρόγραμμα αυτό βασισμένο στην αρχή Boltzman εξάγει ενεργειακά πεδία από βάσεις δεδομένων γνωστών τρισδιάστατων δομών με τη μορφή δυναμικών.[207] Το ενεργειακό πεδίο μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης γνωστής ή άγνωστης δομής κατανέμεται ανά κατάλοιπο. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της ενεργειακής απεικόνισης είναι ότι μπορεί να γίνει διαχωρισμός μίας φυσικά αναδιπλωμένης περιοχής από μία μη αναδιπλωμένη.

Η αλληλουχία της περιοχής MNK<sub>r</sub>5, που είναι ένας από τους πρωτεϊνικούς στόχους στη διατριβή αυτή, είναι σε υψηλή ομολογία με τις αλληλουχίες των περιοχών MNK<sub>r</sub>2 και MNK<sub>r</sub>4. Οι τρισδιάστατες δομές των δυο τελευταίων περιοχών είναι γνωστές και καταχωρημένες στη βάση δεδομένων (Protein Data Bank). Με τη σύγκριση του ενεργειακού γραφήματος PROSA II ενός δομικού μοντέλου για την

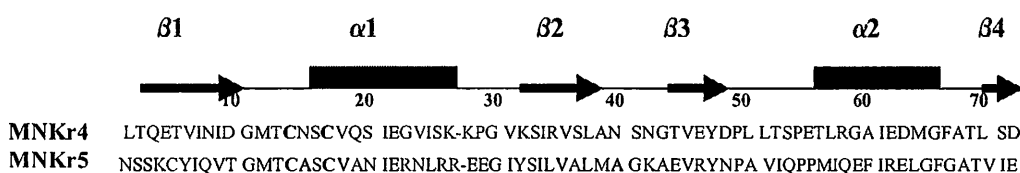
περιοχή MNKr5 με το ενεργειακό γράφημα της πειραματικά υπολογιζόμενης δομής της περιοχής MNKr4 μπορεί να γίνει πρόβλεψη της ποιότητας της αναδίπλωσης κατά μήκος της αλληλουχίας του πρωτεϊνικού στόχου πριν ακόμα ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία έκφρασης του.



**Σχήμα 34:** Σύγκριση των ενεργειακών κατανομών των περιοχών MNKr5/ MNKr4.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 34 η ενεργειακή κατανομή των δυο περιοχών είναι ομοιόμορφη. Η δευτεροταγής δομή της περιοχής MNKr4, όπως προκύπτει από την τρισδιάστατη δομή της (Κωδ= 1aw0 στο pdb) αποτελείται από τέσσερα β πτυχωτά φύλα ( $\beta_1=3-10$ ,  $\beta_2= 31-37$ ,  $\beta_3= 42-47$ ,  $\beta_4= 67-70$ ) και δύο α έλικες ( $\alpha_1= 16-26$ ,  $\alpha_2= 54-64$ ). [207] Θα πρέπει να περιμένουμε μια παρόμοια διευσθέτηση  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$  της δευτεροταγής δομής του πρωτεϊνικού στόχου MNKr5. Ο βρόχος που βρίσκεται ανάμεσα από το  $\beta_1$  πτυχωτό φύλο και την  $\alpha_1$  έλικα στην δομική περιοχή MNKr4 αποτελεί την περιοχή ένταξης του μεταλλικού ιόντος αφού εκεί είναι εντοπισμένες οι κυστεΐνες 14 και 17 πριν και στην αρχή της  $\alpha_1$  έλικας αντίστοιχά. Σταθεροποιητικός παράγοντας σε αυτό τον βρόγχο είναι δύο υδρόφοβα κατάλοιπα ισολευκίνη 21 και η φαινυλαλαλίνη 66 τα οποία εμφανίζουν, όπως ήταν αναμενόμενο, σημαντικά αρνητικές τιμές ενεργειακών δυναμικών. (Σχήμα 34) [207] Το ίδιο συμβαίνει και με τις ενεργειακές τιμές των αμινοξέων ισολευκίνη 21 και η φαινυλαλαλίνη 66 του πρωτεϊνικού στόχου MNKr5.

Μπορεί να δοθεί ένα ενεργειακά σταθερό μοντέλο του πρωτεϊνικού στόχου όπου η θέση ένταξης βρίσκεται στο βρόγχο ανάμεσα από το β1 πτυχωτό φύλο και την α1 έλικα με τις δύο κυστεΐνες να βρίσκονται πριν ή και πάνω στην α1 έλικα. Οι ακριβείς θέσεις των δυο κυστεϊνικών καταλοίπων δεν είναι ικανό να δοθούν με ακρίβεια αλλά αναμένεται η τριτοταγής δομή της πρωτεϊνικής αλυσίδας να επιτρέπει την αλληλεπίδραση τους με τα υδρόφοβα κατάλοιπα Ile 21 και Phe66 σταθεροποιώντας την ένταξη του μεταλλικού ιόντος Cu(I).



**Σχήμα 35:** Ομολογιακή μοντελοποίηση της δευτεροταγής δομής του πρωτεϊνικού στόχου MNKr5.

### B) PoPMSC

Με το πρόγραμμα αυτό είναι δυνατόν να υπολογιστούν οι πιο ενεργειακά συμφέρουσες μεταλλάξεις στην αλληλουχία μίας πρωτεϊνικής περιοχής. Με την βοήθεια ενός εργαλείου βιοπληροφορικής στο διαδίκτυο με ηλεκτρονική διεύθυνση <http://swissmodel.expasy.org/> μπορεί να δοθεί ένα δομικό μοντέλο της τριπλής περιοχής MNKr(4-6) με την μορφή αρχείου pdb. Το αρχείο αυτό επεξεργάζεται από το πρόγραμμα PoPMSC που είναι διαθέσιμο ελεύθερα στο διαδίκτυο με ηλεκτρονική διεύθυνση <http://babylone.ulb.ac.be/popmusic/formulaire.html>. Με το πέρασμα της αυτόματης επεξεργασίας των δεδομένων, το πρόγραμμα εξάγει πληροφορίες με τη μορφή γραφήματος. Στον οριζόντιο άξονα του γραφήματος βρίσκονται τα αμινοξέα που αποτελούν την αλυσίδα του πρωτεϊνικού στόχου. Σε κάθε αμινοξύ γίνεται αυτόματα αντικατάσταση του από κάποιο άλλο και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η ενεργειακή μεταβολή  $\Delta\Delta G$  που φέρει η σημειακή μετάλλαξη. Σημειακές μεταλλάξεις που είναι ενεργειακά συμφέρουσες έχουν αρνητικές τιμές  $\Delta\Delta G$ .

Ο επόμενος πίνακας περιέχει λίστα από τις πιο ενεργειακά συμφέρουσες μεταλλάξεις στην αλληλουχία των πρώτων πενήντα αμινοξέων της MNKr(4-6). Οι στήλες 1 και 2 περιέχουν τα wt και μεταλλαγμένα αμινοξέα αντίστοιχα. Η στήλη 3 την θέση τους στην αλληλουχία, η στήλη 4 την δευτεροταγή δομή προσδιορισμένη με την μέθοδο DSSP [208] (Kabsch, W. & Sander, C.,1983, Biopolymers,22,2577-2637), η

στήλη 5 τις περιοχές  $\{\phi, \psi, \omega\}$ , η στήλη 6 την διαλυτότητα προσδιορισμένη με την μέθοδο DSSP και η στήλη 7 τις προβλεπόμενες τιμές  $\Delta\Delta G$ .

**Πίνακας 13:** Ενεργειακά συμφέρουσες μεταλλάξεις στην αλληλουχία των πρώτων πενήντα αμινοξέων της MNK1(4-6).

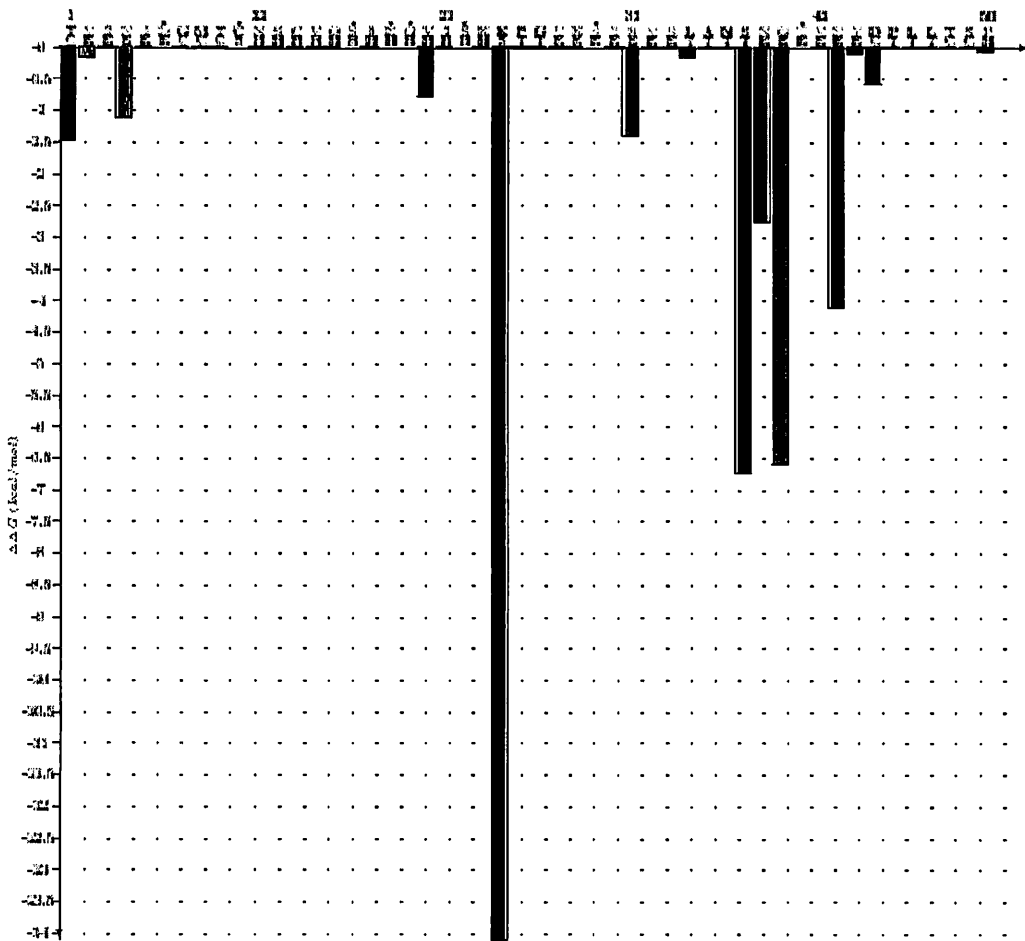
Residues	wt	mut	Pos.	Sec. Str.	Conf. ( $\phi, \psi, \omega$ )	Acc. (%)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Residues	wt	mut	Pos.	Sec. Str.	Conf. ( $\phi, \psi, \omega$ )	Acc. (%)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
S	G	37	T	G		34	-2.40	S	W	37	T	G		34	-0.38
G	I	39	E	B		1	-2.22	E	W	42	E	B		60	-0.38
K	L	24	S	P		34	-1.81	G	D	55	H	A		20	-0.37
G	V	39	E	B		1	-1.53	R	V	31	E	B		76	-0.36
K	C	24	S	P		34	-1.47	K	H	24	S	P		34	-0.36
K	I	24	S	P		34	-1.34	V	A	20	H	A		33	-0.33
K	A	24	S	P		34	-1.34	R	I	54	H	A		30	-0.30
K	V	24	S	P		34	-1.31	R	I	31	E	B		76	-0.30
K	M	24	S	P		34	-1.22	G	F	39	E	B		1	-0.28
L	C	66	E	P		34	-1.13	N	L	38	E	B		7	-0.27
G	C	39	E	B		1	-1.10	T	Y	1	C	X		23	-0.25
G	A	55	H	A		20	-0.99	K	Q	24	S	P		34	-0.25
K	W	24	S	P		34	-0.97	V	L	20	H	A		33	-0.22
K	F	24	S	P		34	-0.97	M	L	60	H	A		30	-0.21
G	K	55	H	A		20	-0.96	S	K	37	T	G		34	-0.21
N	I	38	E	B		7	-0.93	G	W	55	H	A		20	-0.19
G	R	55	H	A		20	-0.92	R	Y	31	E	B		76	-0.18
S	H	37	T	G		34	-0.89	R	C	31	E	B		76	-0.18
G	E	55	H	A		20	-0.88	E	H	42	E	B		60	-0.18
K	G	24	S	P		34	-0.86	G	L	55	H	A		20	-0.17
D	P	63	E	P		59	-0.79	R	F	31	E	B		76	-0.17
N	C	38	E	B		7	-0.78	A	Y	64	E	B		3	-0.17
G	Y	39	E	B		1	-0.77	T	I	1	C	X		23	-0.16
K	T	24	S	P		34	-0.76	E	L	42	E	B		60	-0.16
N	V	38	E	B		7	-0.76	E	M	42	E	B		60	-0.16
R	A	54	H	A		30	-0.73	L	C	34	T	A		31	-0.16
G	Q	55	H	A		20	-0.72	V	M	20	H	A		33	-0.15
S	Y	37	T	G		34	-0.71	D	V	44	C	B		33	-0.15
K	S	24	S	P		34	-0.70	V	C	2	E	B		26	-0.14
S	N	37	T	G		34	-0.70	D	A	59	H	A		87	-0.13
K	Y	24	S	P		34	-0.69	E	S	42	E	B		60	-0.13
G	L	39	E	B		1	-0.68	D	M	59	H	A		87	-0.12
E	V	42	E	B		60	-0.65	S	E	67	C	A		52	-0.11
N	C	4	E	P		37	-0.61	R	T	31	E	B		76	-0.11
E	I	42	E	B		60	-0.59	D	W	63	E	P		59	-0.11
T	V	1	C	X		23	-0.55	R	V	54	H	A		30	-0.10
T	C	1	C	X		23	-0.49	S	R	37	T	G		34	-0.10
G	M	55	H	A		20	-0.49	Y	C	43	E	B		23	-0.10
R	M	54	H	A		30	-0.48	L	Y	66	E	P		34	-0.09
E	Y	42	E	B		60	-0.47	R	W	31	E	B		76	-0.09
E	C	42	E	B		60	-0.47	A	I	64	E	B		3	-0.07
S	F	37	T	G		34	-0.46	D	E	59	H	A		87	-0.07
E	F	42	E	B		60	-0.46	P	W	50	H	A		22	-0.06
S	M	37	T	G		34	-0.44	V	W	20	H	A		33	-0.06
R	L	54	H	A		30	-0.44	N	T	4	E	P		37	-0.06
S	C	37	T	G		34	-0.43	D	V	63	E	P		59	-0.05
D	C	44	C	B		33	-0.41	M	F	60	H	A		30	-0.04
L	P	66	E	P		34	-0.41	D	C	63	E	P		59	-0.04
E	T	42	E	B		60	-0.40	E	R	42	E	B		60	-0.04
N	P	4	E	P		37	-0.40	M	I	60	H	A		30	-0.04

*Mutations sorted by increasing  $\Delta\Delta G$*

*Mutations sorted by increasing  $\Delta\Delta G$*

Στο επόμενο διάγραμμα φαίνεται το άθροισμα των τιμών  $\Delta\Delta G$  των ενεργειακά συμφέρουσων μεταλλάξεων για κάθε θέση της αλληλουχίας των πρώτων πενήντα

καταλοίπων της MNKr(4-6). Από πάνω από κάθε αμινοξύ αποδίδεται η δευτεροταγής δομή με τους εξής κωδικούς στα χρώματα: κόκκινο για α-έλικα, μπλε για β πτυχωτό φύλλο και μαύρο για βρόγχο.



**Σχήμα 36:** Το άθροισμα των τιμών της  $\Delta\Delta G$  των μεταλλάξεων για κάθε θέση. Το σύμβολο (•) δηλώνει ότι στην αντίστοιχη θέση δεν υπολογίστηκε η  $\Delta\Delta G$ .

Η παραπάνω βιοπληροφορική μελέτη με το εργαλείο RoPMSC δεν κατατάσσει την αντικατάσταση I21K που εμφανίστηκε τυχαία κατά την απομόνωση του γονιδίου MNKr(4-6) (Κεφ. 2.10.1) στην κατηγορία των ενεργειακά συμφέρουσων μεταλλάξεων. Όπως συμβαίνει στην μεμονωμένη περιοχή MNKr4, [207] έτσι και στην τριπλή περιοχή MNKr(4-6) η ισολευκίνη 21 θα πρέπει να δρα ως σταθεροποιητικός παράγοντας κάνοντας μη συμφέρουσα την αντικατάσταση του από κάποιο άλλο.

#### **4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

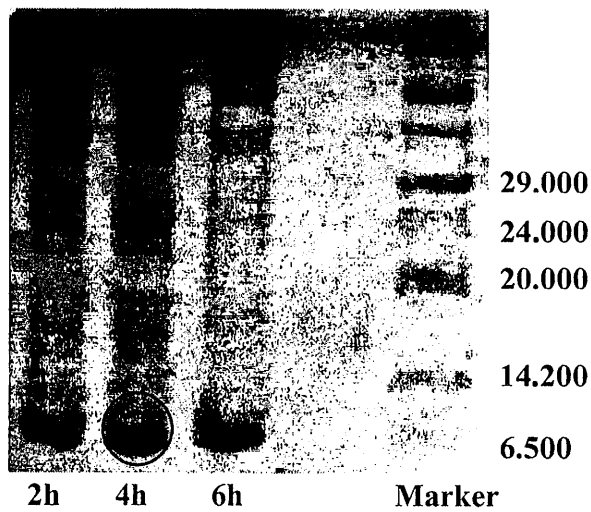


## 4.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ MNKr5. ΚΑΙ MNKr(4-6).

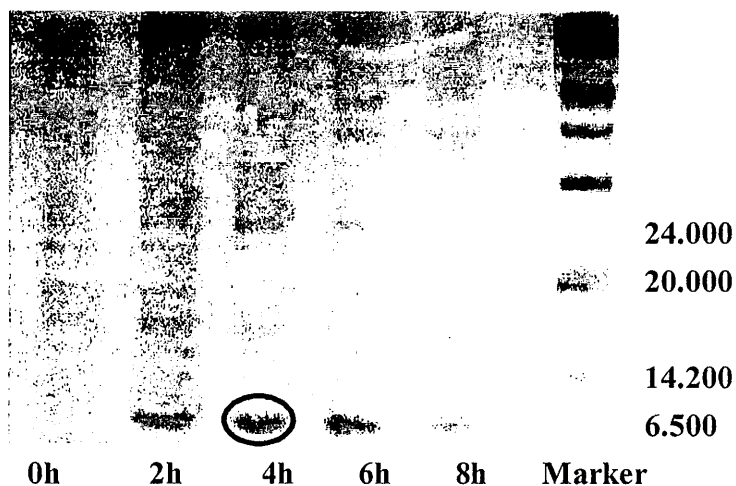
### 4.1.1 Τεστ έκφρασης της περιοχής MNKr5.

Στα πειράματα έκφρασης της δομικής περιοχής MNKr5 (Κεφ.2.13) εμφανίζεται στο gel πολυακρυλαμιδίου υπερεκφρασμένη μπάντα τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη του IPTG στην καλλιέργεια κυττάρων. (Σχήμα 37)

A) MNKr5



## B) MNKr2



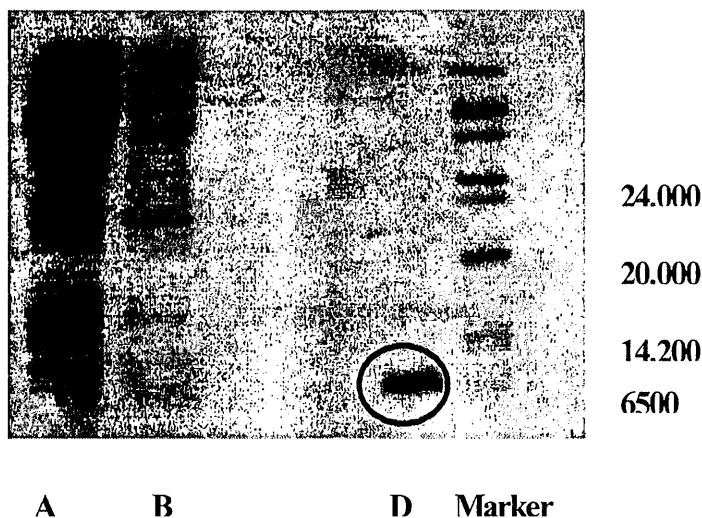
**Σχήμα 37:** Τεστ έκφρασης της δομικής περιοχής MNKr5 και σύγκριση με το αντίστοιχο τεστ της περιοχής MNKr2.

Οι δομικές περιοχές MNKr5 και MNKr2 έχουν παρόμοιο μοριακό βάρος 7249,5 και 7350. Όπως αναμένονταν οι υπερεκφρασμένες μπάντες που αντιστοιχούν στις παραπάνω δομικές περιοχές βρίσκονται λίγο πιο πάνω από την πρώτη μπάντα (6.500) του Marker.

### 4.1.2. Καθαρισμός πρωτεϊνικού στόχου MNKr5.

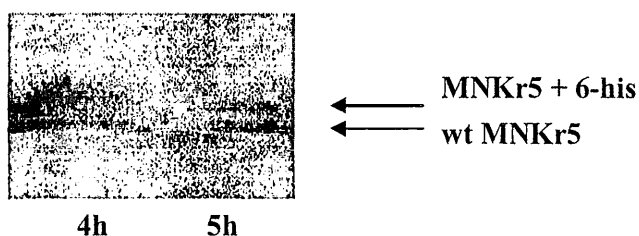
Ο καθαρισμός του πρωτεϊνικού στόχου έγινε με χρωματογραφία HiTrap, η οποία αποτελείται από δύο στάδια καθαρισμού με στήλη HiTrap Chelating HP. (Κεφ. 2.16) Στον πρώτο καθαρισμό ο πρωτεϊνικός στόχος MNKr5, που έχει ιστιδινική ουρά, δεσμεύεται από την στήλη και έτσι διαχωρίζεται από τις άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες που δεν έχουν ιστιδινική ουρά. Το μίγμα των βακτηριακών πρωτεϊνών δίνει μια σειρά από πολλές μπάντες διαφόρου μοριακού βάρους στο gel ηλεκτροφόρησης ( Α σειρά από μπάντες στο σχήμα 38). Μετά την πρώτη πλύση της στήλης με το Buffer B (Κεφ. 2.16) απομακρύνονται και άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες οι οποίες δίνουν τις μπάντες της στήλης B στο σχήμα 38. Στο τέλος συλλέγεται ο πρωτεϊνικός στόχος με την έκπλυση της στήλης με το Buffer D αλλά δεν είναι τελείως καθαρός αφού παρουσιάστηκαν και άλλες μπάντες υψηλού μοριακού βάρους στο gel ηλεκτροφόρησης. ( Στήλη D σχήμα 38 ) Αυτές οι μπάντες αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες

που έχουν δεσμευτεί μαζί με τον πρωτεϊνικό στόχο στα ιόντα  $Zn^{+2}$  της στήλης, λόγω ύπαρξης σημαντικού αριθμού ιστιδινικών καταλοίπων στην αλληλουχία τους.



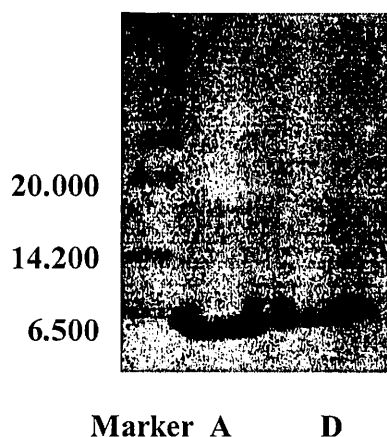
**Σχήμα 38:** Έλεγχος της ποιότητας του πρώτου καθαρισμού της πρωτεΐνης MNKr5 με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου SDS

Για να επιτευχθεί υψηλή απόδοση καθαρισμού αποκόβεται η ιστιδινική ουρά από την επιθυμητή πρωτεΐνη με την δράση του ενζύμου Factor Xa και γίνεται δεύτερος καθαρισμός. Η αποκοπή έγινε με επώαση του πρωτεϊνικού διαλύματος με το ένζυμο Factor Xa για πέντε ώρες. Ανά μια ώρα γίνονταν λήψη δείγματος από το πρωτεϊνικό διάλυμα και ηλεκτροφορούνταν. Ένδειξη ότι η ιστιδινική ουρά αποκόβεται είναι ότι η υπερεκφρασμένη μπάντα που αντιστοιχεί στο πρωτεϊνικό στόχο διευρύνεται και τελικά χωρίζεται στα δύο. Η κατώτερη από τις δυο μπάντες αντιστοιχεί στο wt (*wild type*) του πρωτεϊνικού στόχου που είναι μικρότερου μοριακού βάρους αφού έχουν απομακρυνθεί οι έξι ιστιδίνες. (Σχήμα 39).



**Σχήμα 39:** Μετά από τέσσερις ώρες επώασης του πρωτεϊνικού μίγματος με το ένζυμο Factor Xa είναι εμφανής ο διαχωρισμός της υπερεκφρασμένης μπάντας της πρωτεΐνης MNKr5.

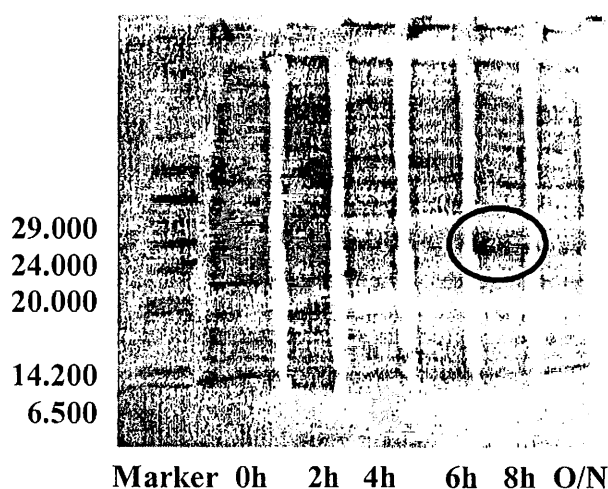
Κατά τον δεύτερο καθαρισμό με την στήλη HiTrap Chelating HP δεσμεύονται από την ρητίνη της στήλης οι μη επιθυμητές βακτηριακές πρωτεΐνες του πρώτου καθαρισμού και το μικρό ποσοστό του πρωτεϊνικού στόχου από το οποίο δεν έχει αποκοπεί η ιστιδινική ουρά ενώ η πρωτεΐνη wt MNKr5 συλλέγεται απόλυτα καθαρή. (Στήλη A Σχήμα 40)



**Σχήμα 40:** Διαχωρισμός με στήλη HiTrap της wt MNKr5 (A) από την MNKr5 με ιστιδινική ουρά (D).

#### 4.1.3 Τεστ έκφρασης της πρωτεΐνης MNKr(4-6).

Στα πειράματα έκφρασης της δομικής περιοχής MNKr(4-6) εμφανίζεται στο gel πολυακρυλαμιδίου υπερεκφρασμένη μπάντα οκτώ ώρες μετά την προσθήκη του IPTG στην καλλιέργεια κυττάρων. (Σχήμα 41)

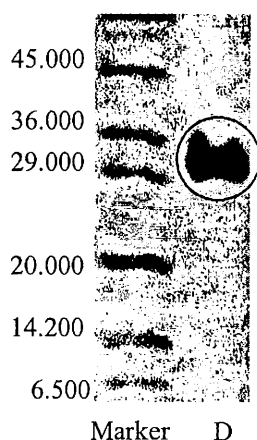


**Σχήμα 41:** Τεστ έκφρασης της τριπλής περιοχής MNKr(4-6).

Η πρωτεΐνη MNK $\Gamma$ (4-6) αποτελείται από τρεις περιοχές την MNK $\Gamma$ 4, MNK $\Gamma$ 5 και MNK $\Gamma$ 6 και το μοριακό της βάρος είναι 2.8621. Η υπερεκφρασμένη μπάντα που εμφανίζεται στο gel βρίσκεται στο ύψος της μπάντας 29.000 του Marker γεγονός που συμφωνεί με το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού στόχου.

#### 4.1.4 Καθαρισμός του πρωτεϊνικού στόχου MNK $\Gamma$ (4-6).

Ο καθαρισμός του πρωτεϊνικού στόχου έγινε με χρωματογραφία HiTrap η οποία αποτελείται από δύο στάδια καθαρισμού με στήλη HiTrap Chelating HP. (Κεφ. 2.16) Στον πρώτο καθαρισμό, μόνο ο πρωτεϊνικός στόχος MNK $\Gamma$ (4-6) που έχει ιστιδινική ουρά δεσμεύεται από την στήλη ενώ οι μη επιθυμητές βακτηριακές πρωτεΐνες απομακρύνονται. Το μίγμα των βακτηριακών πρωτεϊνών δίνει μια σειρά από πολλές μπάντες διαφόρου μοριακού βάρους στο gel ηλεκτροφόρησης ( Α σειρά από μπάντες στο σχήμα 42). Μετά τις εκπλήσσεις της στήλης με το Buffer B και το Buffer C (Κεφ. 2.16) απομακρύνονται και άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες. Τελικά συλλέγεται ο πρωτεϊνικός στόχος με έκπλυση της στήλης με το Buffer D. Και σε αυτή την περίπτωση υπάρχουν πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί μαζί με τον πρωτεϊνικό στόχο στα ιόντα Zn<sup>+2</sup> της στήλης, λόγω ύπαρξης σημαντικού αριθμού ιστιδινικών καταλοίπων στην αλληλουχία τους. Αυτό αποδεικνύεται από την εμφάνιση στο gel ηλεκτροφόρησης, μιας σειράς από νέες μπάντες πολύ υψηλού μοριακού βάρους. ( Στήλη D σχήμα 42 ) Ο διαχωρισμός των μη επιθυμητών πρωτεϊνών από την πρωτεΐνη στόχος γίνεται με αποκοπή της ιστιδινικής ουράς από την τελευταία και δεύτερο καθαρισμό με την στήλη HiTrap.

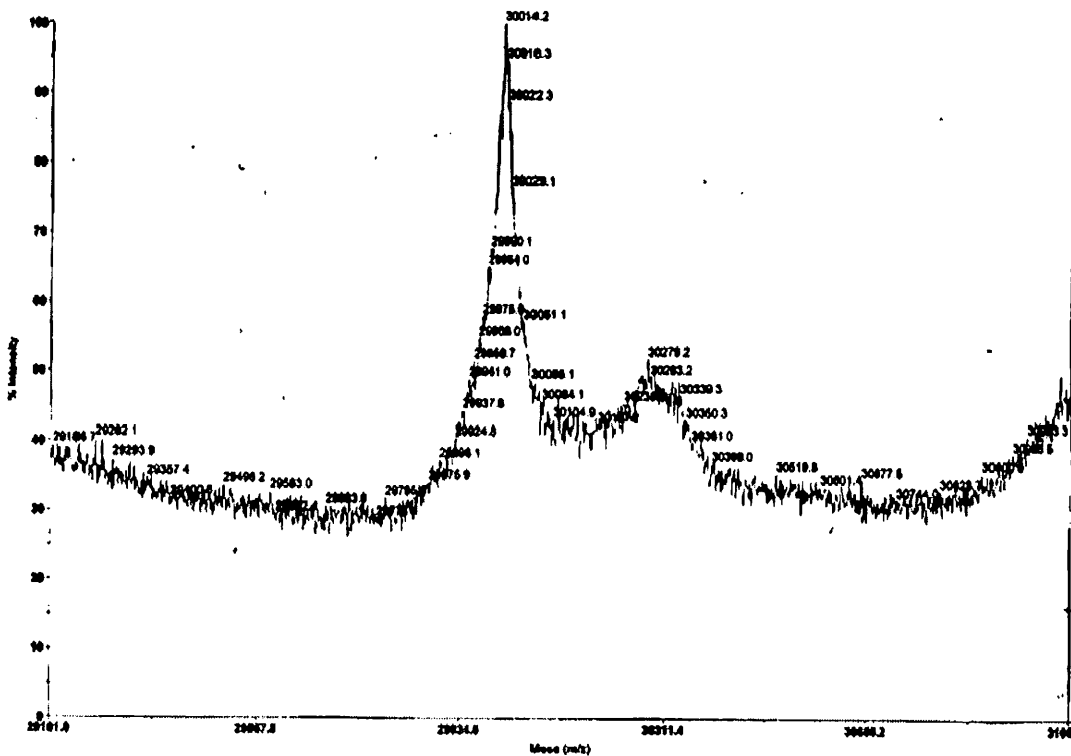


**Σχήμα 42:** Έλεγχος της ποιότητας του πρώτου καθαρισμού της πρωτεΐνης MNK $\Gamma$ (4-6) με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου SDS

## 4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

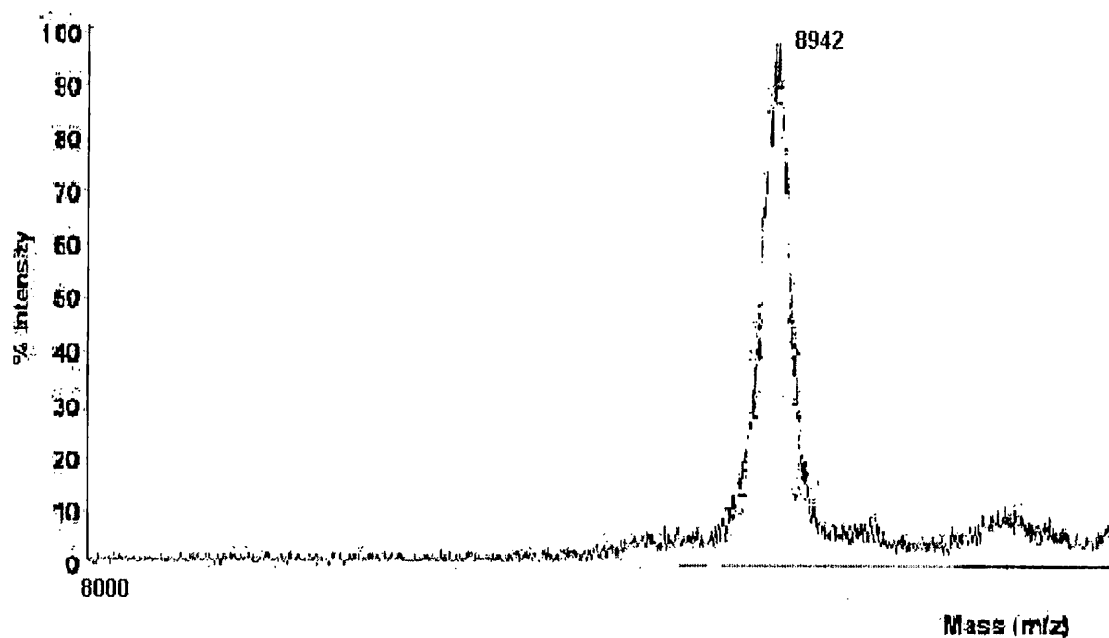
### 4.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ.

Το μοριακό βάρος της τριπλής περιοχής {MNK $\kappa$ (4-6)+6 His} επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία μάζας. Η πειραματική τιμή που προέκυψε για το μοριακό βάρος της επισημασμένης πρωτεΐνης  $^{15}\text{N}$ -MNK $\kappa$ (4-6) είναι 30.000 Da. (Σχήμα 43) Η τιμή αυτή είναι πολύ κοντά στην θεωρητική τιμή 29.998 Da. Η πρωτεΐνη συμπεριλαμβάνει τέσσερα επιπλέον αμινοξέα στο C-άκρο που είναι η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο Factor Xa.



Σχήμα 43α: Φάσμα μαζών της τριπλής περιοχής {MNK $\kappa$ (4-6)+6 His}.

Το μοριακό βάρος της δομικής περιοχής MNKr5 επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία μάζας. Η πειραματική τιμή που προέκυψε για το μοριακό βάρος της ταυτίζεται πλήρως με την θεωρητική (Σχήμα 43β). Η πρωτεΐνη συμπεριλαμβάνει τέσσερα επιπλέον αμινοξέα στο C-άκρο που είναι η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο Factor Xa.



Σχήμα 43β: Φάσμα μαζών της δομικής περιοχής MNKr5.

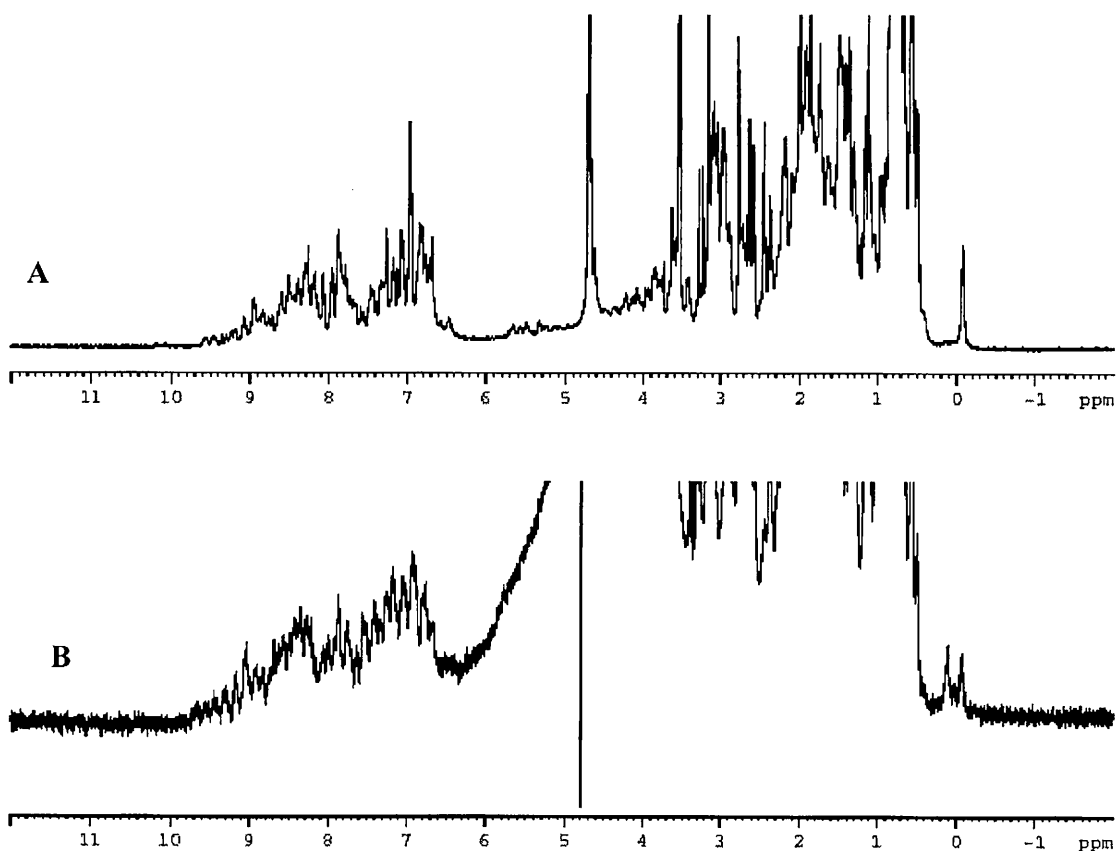
## 4.2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΣΜΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ.

Τα δείγματα από MNK<sub>r</sub>5, Cu(I)-MNK<sub>r</sub>5 και από MNK(4-6) με συγκέντρωση ~1mM και ~0,5mM αντίστοιχα είναι σταθερά για αρκετές εβδομάδες, επιτρέποντας την λήψη 1D <sup>1</sup>H-NMR και <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C ετεροπυρηνικών φασμάτων δύο και τριών διαστάσεων.

### 4.2.2.1 Φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR

#### A) από MNK<sub>r</sub>5 και Cu(I)-MNK<sub>r</sub>5

Στα σχήματα 44A και 44B παρουσιάζονται τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR των πρωτεϊνών από MNK<sub>r</sub>5 και Cu(I)-MNK<sub>r</sub>5 αντίστοιχα.



**Σχήμα 44:** Φάσματα <sup>1</sup>H-NMR στα 600 MHz (στους 298K και pH= 7) των πρωτεϊνών από MNK<sub>r</sub>5 (A) και Cu(I)-MNK<sub>r</sub>5 (B). Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών είναι 1,5 και 1 mM αντίστοιχα.

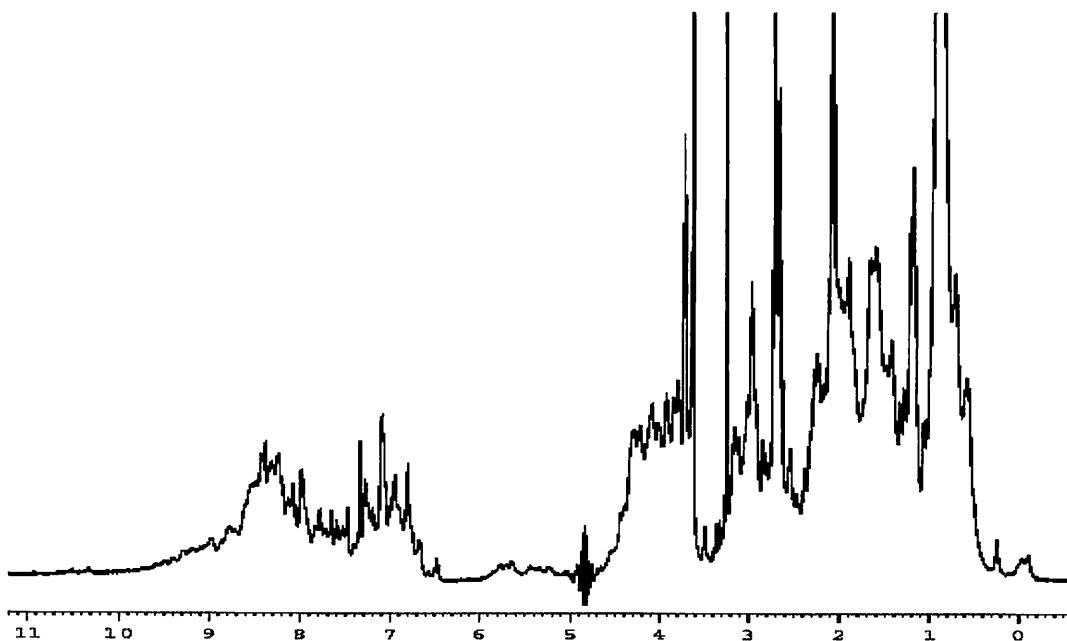
Οι απορροφήσεις στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR σε όλο το φάσμα τιμών δ (ppm) αποτελεί ένδειξη ότι οι πρωτεΐνες είναι πλήρως αναδιπλωμένες. Οι απορροφήσεις στην



περιοχή  $\delta=0,43-3,88$  ppm οφείλονται στα αλειφατικά πρωτόνια  $\text{CH}_3$ - και  $-\text{CH}_2$ - ενώ οι απορροφήσεις στην περιοχή  $\delta=3,7-6$  ppm στα πρωτόνια  $\alpha\text{H}$ . Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων  $\alpha\text{H}$  εξαρτώνται από την δευτεροταγή διαμόρφωση των αμινοξέων που ανήκουν. Συγκεκριμένα όταν ένα αμινοξύ βρίσκεται σε διαμόρφωση  $\beta$ -πτυχωτού φύλλου τα πρωτόνια  $\alpha\text{H}$  συντονίζονται στην περιοχή  $\delta=5-6$  ppm ενώ όταν βρίσκεται σε  $\alpha$ -έλικα τα πρωτόνια συντονίζονται σε χαμηλότερες τιμές  $\delta= 3,7-5$  ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις στην περιοχή  $7,3-8$  ppm οφείλονται στον συντονισμό των αρωματικών υδρογόνων. Τα αμιδικά πρωτόνια της κύριας αλυσίδας συντονίζονται στην περιοχή  $8-10$  ppm. Οι απορροφήσεις στα  $\sim 10$  ppm αντιστοιχούν σε αμιδικά πρωτόνια που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι μετατοπίζουν τα σήματα τους σε υψηλότερες τιμές.

#### B) από MNKr(4-6)

Στο παρακάτω σχήμα 45 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της τριπλής περιοχής MNKr(4-6). Και σε αυτή την περίπτωση το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  εμφανίζει απορροφήσεις σε όλο το φάσμα τιμών  $\delta$  (ppm) και αποτελεί ένδειξη ότι η πρωτεΐνη MNKr(4-6) είναι αναδιπλωμένη.



**Σχήμα 45:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  στα 600 MHz (στους 298K και  $\text{pH}= 7$ ) της πρωτεΐνης από MNKr(4-6). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι και 1,5 mM.

#### 4.2.2.2 Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων (2D) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC. (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Στο 2D φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC εμφανίζεται μία κορυφή (cross peak) για κάθε σύζευξη του αζώτου με το αμιδικό υδρογόνο του πεπτιδικού δεσμού με αποτέλεσμα κάθε αμινοξύ (εκτός της προλίνης) να δίνει από μία κορυφή στο φάσμα.

##### A) apo MNKr5

Στο φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC της πρωτεΐνης apo-MNKr5 (Σχήμα 46) δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν τα σήματα που οφείλονται στο συντονισμό των αμιδικών αζώτων της κύριας αλυσίδας στα κατάλοιπα γλυκίνη 15 και σερίνη 16. Η απουσία σήματος της γλυκίνης οφείλεται πιθανώς στην γρήγορη εναλλαγή πρωτονίου με το διαλύτη. Η απουσία σήματος της σερίνης 16 μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση οι οποίες να είναι πιο σημαντικές στην apo μορφή από ότι στην Cu(I)-MNKr5. Το ίδιο φαινόμενο και με πρωταγωνιστές τα ίδια κατάλοιπα (γλυκίνη 1 και σερίνη 16) εμφανίστηκε στο φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC της apo-MNKr2.[208]

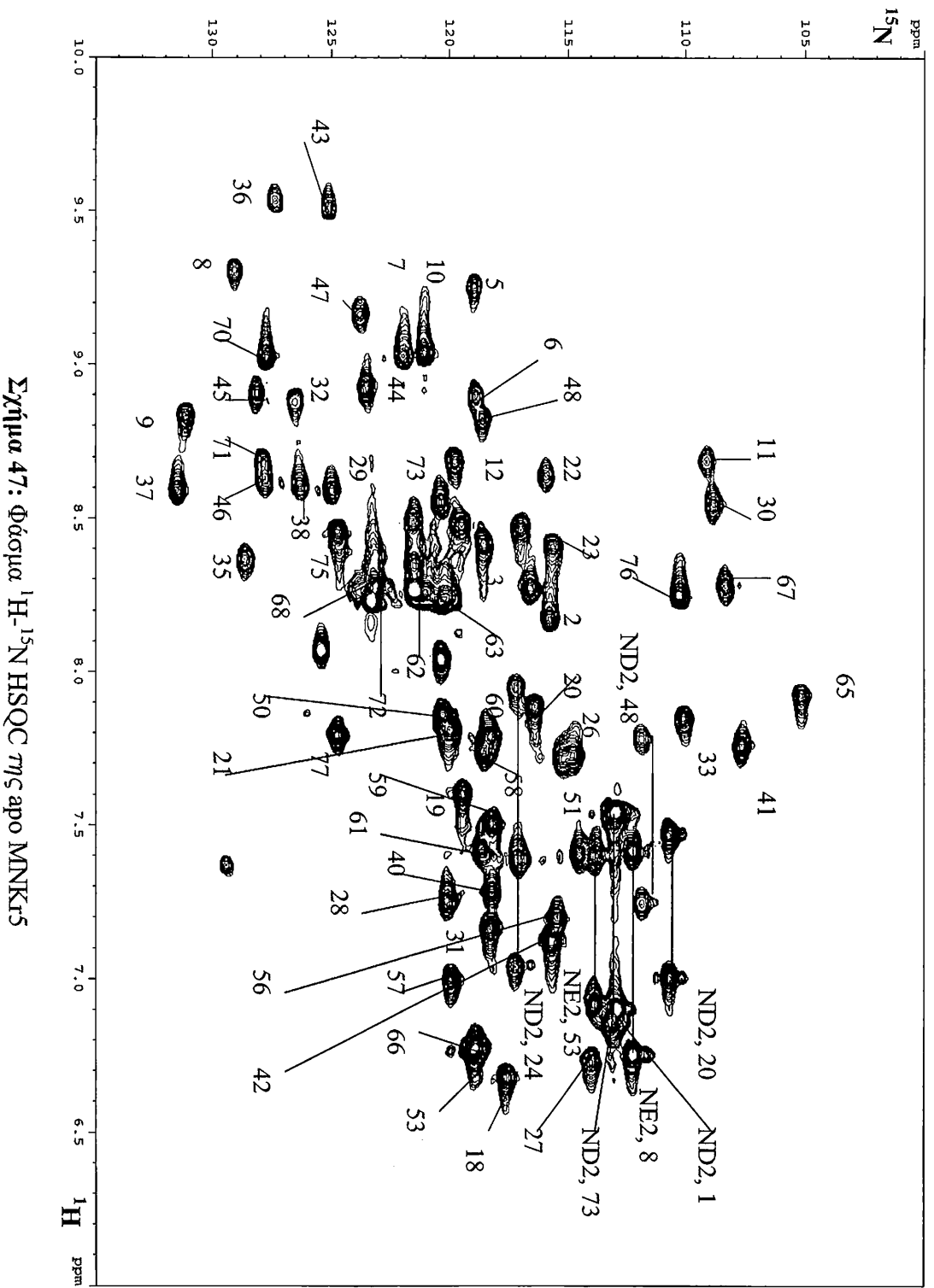
Το σήμα συντονισμού της κυστεΐνης 14, που βρίσκεται στο βρόγχο ένταξης του μεταλλικού ιόντος, είναι πολύ ασθενές και κάνει αδύνατη την ταυτοποίηση του. Το ίδιο συμβαίνει με την αντίστοιχη κυστεΐνη 20 στην apo μορφή της πρωτεΐνης MNKr2. [209] Στην περίπτωση της πρωτεΐνης Cu(I)-MNKr2 το σήμα ισχυροποιείται με την ένταξη του χαλκού.

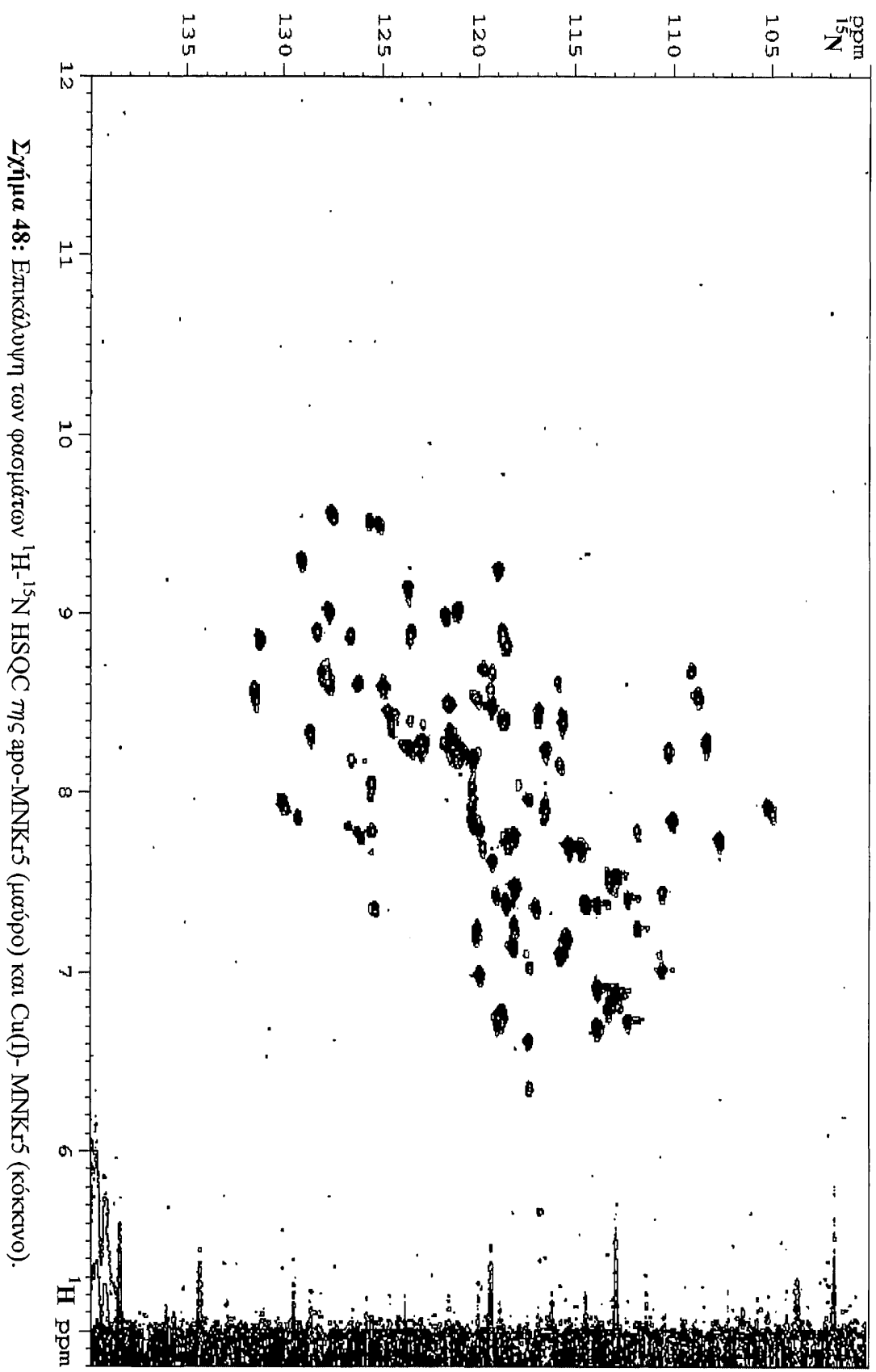
##### B) Cu(I)-MNKr5

Κατά τη τιτλοδότηση της πρωτεΐνης με Cu(I) το φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές. Στο σχήμα 47 γίνεται επικάλυψη του φάσματος  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC της apo μορφής με το φάσμα της *holo* μορφής. Από τη σύγκριση των δύο φασμάτων προκύπτει ότι μόνο τέσσερα κατάλοιπα η μεθειονίνη 12, η κυστεΐνη 17, η βαλίνη 18 και η γλυκίνη 65 παρουσίασαν αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  και  $^{15}\text{N}$  καθώς και αλλαγές στο σχήμα και πλάτος των σημάτων τους κατά την τιτλοδότηση με Cu(I). Η μετατόπιση του σήματος της κυστεΐνης 17 οφείλεται στην ένταξη του χαλκού (I) ενώ η μετατόπιση στα κατάλοιπα 12 και 18 στην θέση τους που είναι πολύ κοντινή στις δύο δραστικές κυστεΐνες 14 και 17.

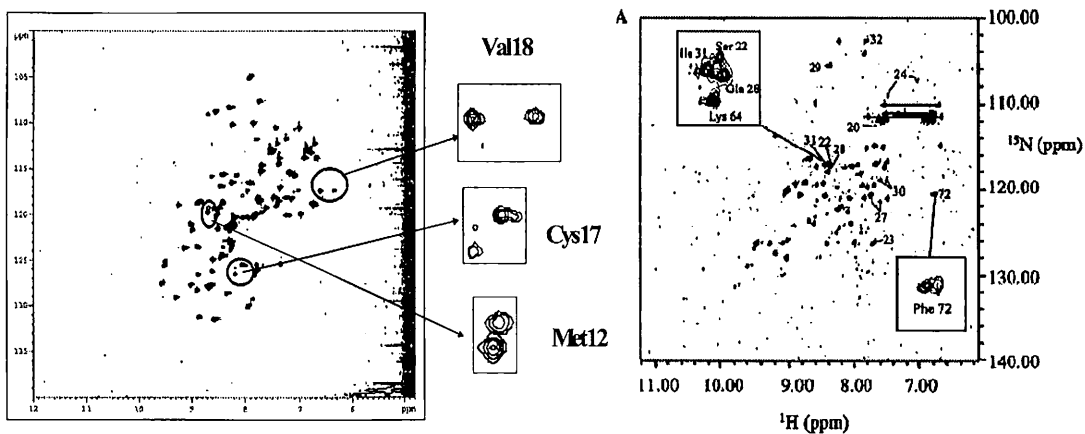
Κατά την τιτλοδότηση της πρωτεΐνης apo-MNKr2 με Cu(I) προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα. [210] Αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού πρωτονίου παρουσίασαν μόνο τα κατάλοιπα από την κυστεΐνη 20 μέχρι και στην

λυσίνη 30 τα οποία είναι κοντά στο βρόγχο ένταξης του μεταλλικού ιόντος. (Σχήμα 48). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι κατά την τιτλοδότηση της apo-MNKr2 με χαλκό (I) παρουσιάστηκαν και αλλαγές στα σήματα των φαινυλαλανίνων 71 και 75 ενώ κατά την τιτλοδότηση της apo-MNKr5 δε παρουσιάστηκε καμία αλλαγή στα σήματα των αντίστοιχων φαινυλαλανίνων 60 και 66.





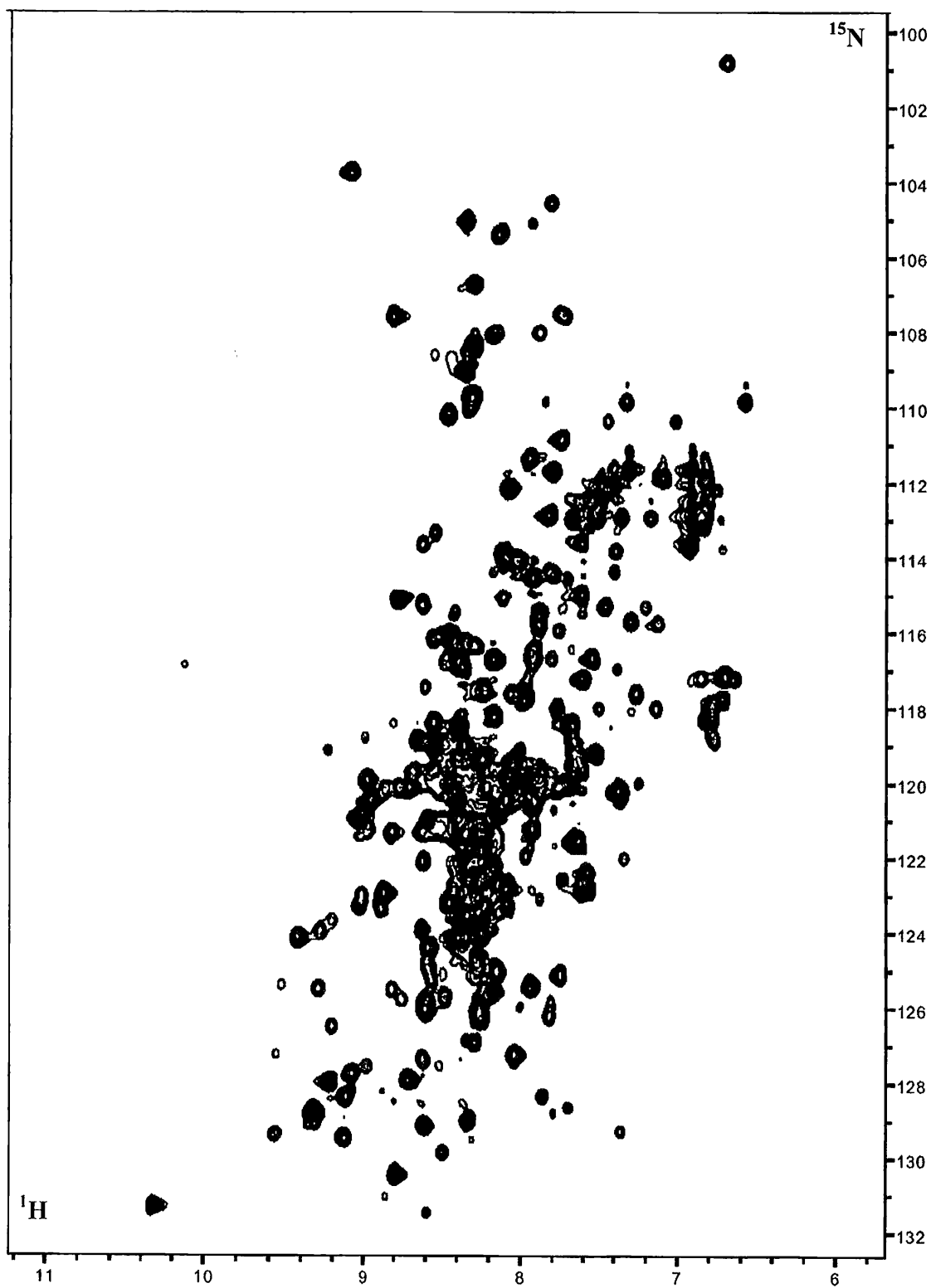
Σχήμα 48: Επικάλυψη των φασμάτων  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC της απο-MNKr5 (μαύρο) και Cu(I)- MNKr5 (κόκκινο).



**Σχήμα 49:** Σύγκριση των μεταβολών στις χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC που προκαλούνται από την τιτλοδότηση  $\text{Cu(I)}$  στην apo-MNKR5 (αριστερά) και στην apo-MNKR2 δεξιά.

### Γ) apo MNKR(4-6)

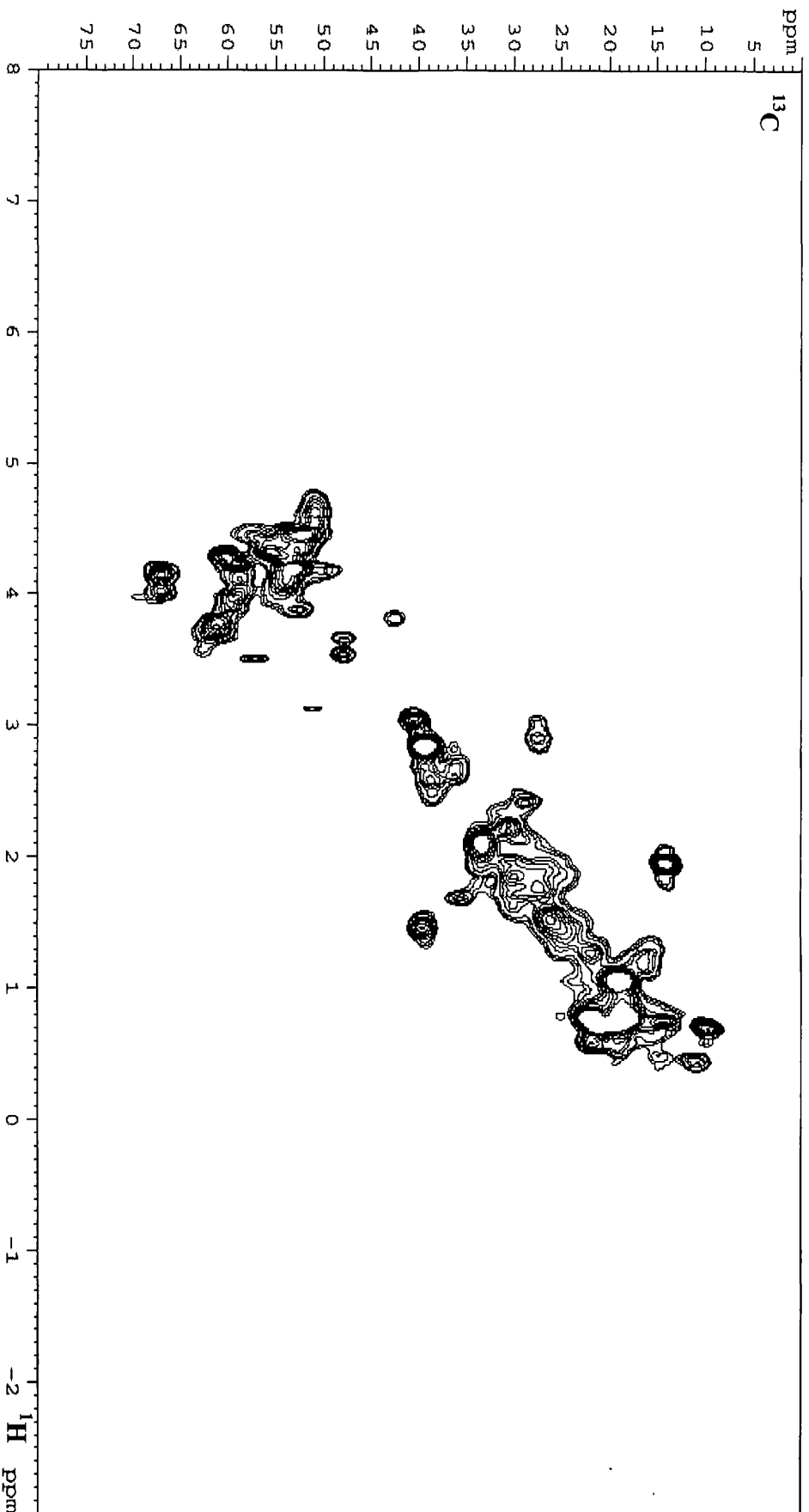
Η ποιότητα της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης MNKR(4-6) εξετάστηκε με τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC και  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC στα οποία βρέθηκαν περιοχές με αλληλεπικάλλυπτόμενες κορυφές κάνοντας δυνατό την ταυτοποίηση του 80% των σημάτων στο φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC. (Σχήματα 49, 50 και 51 αντίστοιχα). Αυτό οφείλεται στο υψηλό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που έχει σαν αποτέλεσμα να παρουσιάζει υψηλό σχετικό χρόνο περιστροφής  $\tau_c$  (correlation time) και χαμηλό χρόνο αποκατάστασης T2 (transverse relaxation) των πυρήνων. Η υψηλή τιμή  $\tau_c$  οδηγεί στην εξασθένηση των σημάτων ενώ η χαμηλή τιμή T2 στην διαπλάτυση του σήματος σύμφωνα με την σχέση  $\Delta\nu=1/\pi T2$ . [211]



Σχήμα 50: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC στα 800 MHz (στους 298K και pH= 7) της απο MNK1(4-6).



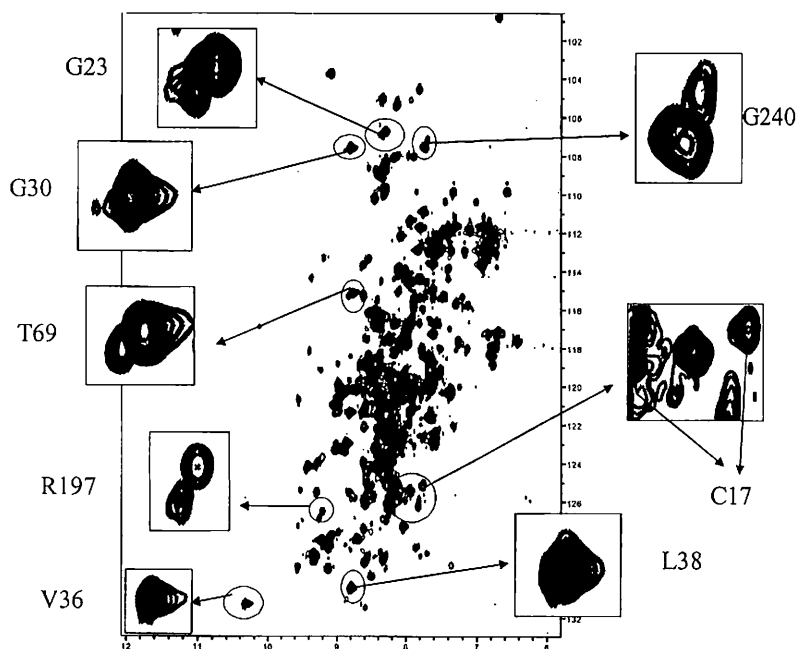




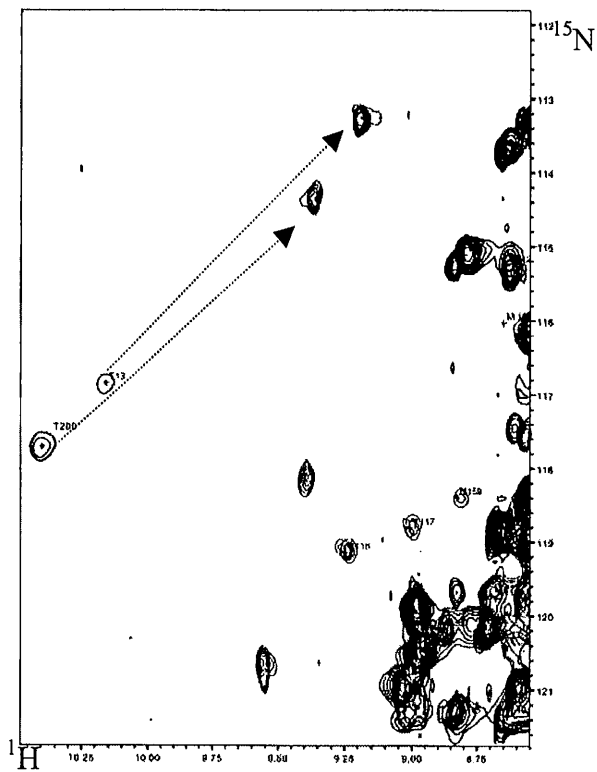
Σχήμα 52: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC στα 600 MHz (στον 298K και pH=7) της από ΜΝΚr(4-6)

#### 4) Cu(I)-MNK(4-6)

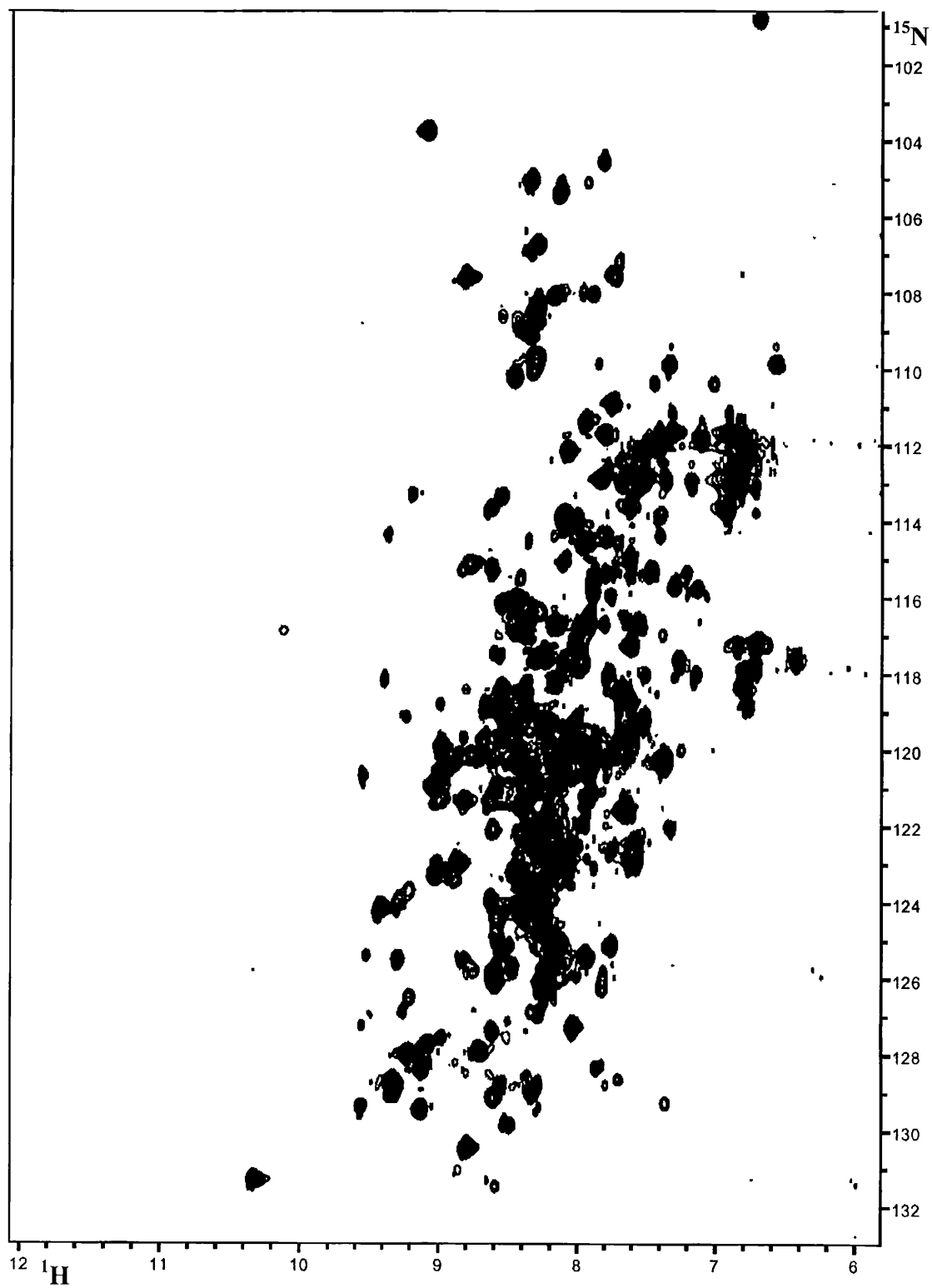
Κατά τη τιτλοδότηση της πρωτεΐνης MNK(4-6) με Cu(I) το φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC παρουσίασε σημαντικές αλλαγές. Η τιτλοδότηση συνεχίστηκε μέχρι η αναλογία Cu(I)/πρωτεΐνη να γίνει 3:1. Στο σχήμα 53 γίνεται επικάλυψη του φάσματος  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC της apo μορφής με το φάσμα της holo μορφής. Από τη σύγκριση των δύο φασμάτων προκύπτει ότι αρκετά κατάλοιπα παρουσίασαν αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  και  $^{15}\text{N}$  καθώς και αλλαγές στο σχήμα και πλάτος των σημάτων τους κατά την τιτλοδότηση με Cu(I). Από αυτά σημαντικότερες αλλαγές στην χημική μετατόπιση του αμιδικού υδρογόνου παρουσίασαν κατάλοιπα από την τέταρτη δομική περιοχή (ασπαρτικό οξύ 10, θρεονίνη 13, γλυκίνη 23, γλυκίνη 30, βαλίνη 36, λευκίνη 38, αλανίνη 68 και θρεονίνη 69) και την έκτη (αργινίνη 197, θρεονίνη 200, αλανίνη 224, γλυκίνη 240). Κατά την τιτλοδότηση του χαλκού οι απορροφήσεις του αμιδικού υδρογόνου  $^1\text{H}$  και του αμιδικού αζώτου  $^{15}\text{N}$  του σήματος της κυστεΐνης 17 που ανήκει στην τέταρτη δομική περιοχή μετατοπίστηκαν σε υψηλότερες τιμές δ(ppm). Αυτό οφείλεται στην ένταξη του χαλκού (I) από τις δύο κυστεΐνες 14, 17 της τέταρτης δομικής περιοχής. (Σχήμα 53) Στην περίσσια χαλκού χάθηκαν σχεδόν όλα τα σήματα της δομικής περιοχής MNK5.



**Σχήμα 53:** Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των σημάτων της apo-MNK(4-6) (μπλε) κατά την τιτλοδότηση με Cu(I) (κόκκινο) στο φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC.



**Σχήμα 54:** Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις στα κατάλοιπα θρεονίνη 13 (περιοχή 4) και 200 (περιοχή 6) της apo-MNKG(4-6) (μπλε) κατά την τιτλοδότηση με Cu(I) (κόκκινο) στο φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC.



Σχήμα 55: Επικάλυψη των φασμάτων  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC της αφο-MNK(4-6) (μπλέ) και Cu(I)- MNK(4-6) (κόκκινο).

#### 4.2.2.3. Πειράματα $^{15}\text{N}$ αποκατάστασης *Relaxation* στην πρωτεΐνη αρο και $\text{Cu(I)-MnKr(4-6)}$ .

Η διατάραξη των πληθυσμών των αυτοστροφορμών των ενεργειακών καταστάσεων του πυρήνα  $^{15}\text{N}$  επέρχεται με το κορεσμό της αντίστοιχης απορρόφησης, δηλαδή την ακτινοβολία της, έτσι ώστε να μην υπάρχει περίσσεια πυρήνων στη βασική κατάσταση. Σε αυτή τη περίπτωση το όλο σύστημα επιχειρεί να επανέλθει σε μια κατάσταση θερμικής ισορροπίας και η διαδικασία ονομάζεται αποκατάσταση.

Ο  $^{15}\text{N}$  μαγνητισμός επανέρχεται σε ισορροπία κατά τη φορά του εξωτερικού πεδίου με παράλληλο χρόνο αποκατάστασης  $T_1$  (τιμή  $R_1$ ) ή κάθετα στο εξωτερικό πεδίο με εγκάρσιο χρόνο αποκατάστασης  $T_2$  (τιμή  $R_2$ ). Υπάρχει και τρίτη παράμετρος αποκατάστασης που ονομάζεται πυρηνικό φαινόμενο Overhauser NOE. Το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης δύο αυτοστροφορμών μέσω του χώρου και συγκεκριμένα μελετείται η αποκατάσταση του πυρήνα  $^{15}\text{N}$  όταν γίνεται κορεσμός του πυρήνα  $^1\text{H}$ .

Οι τρεις παράμετροι αποκατάστασης εκφράζονται με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$R_1 = T_1^{-1} = \{ \mu_0 \gamma_H \gamma_N \hbar / 4\pi 2r_{\text{NH}}^3 \}^2 [ J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N) ] + \{ \Delta\omega_N / 3 \}^2 3J(\omega_N)$$

$$R_2 = T_2^{-1} = \{ \mu_0 \gamma_H \gamma_N \hbar / 4\pi 2r_{\text{NH}}^3 \}^2 [ 2J(0) + 3/2J(\omega_H - \omega_N) + 3/2J(\omega_N) + 3J(\omega_H) + 3J(\omega_H + \omega_N) ] + \{ \Delta\omega_N / 3 \}^2 [ 2J(0) + 3/2J(\omega_N) ]$$

$$\text{NOE} = \{ \mu_0 \gamma_H \gamma_N \hbar / 4\pi 2r_{\text{NH}}^3 \}^2 [ 6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N) ]$$

όπου  $\gamma_H$  και  $\gamma_N$  είναι οι γυρομαγνητικοί λόγοι των πυρήνων  $^1\text{H}$  και  $^{15}\text{N}$  αντίστοιχα,  $\omega_H$  και  $\omega_N$  οι συχνότητες Larmor των πυρήνων  $^1\text{H}$  και  $^{15}\text{N}$ ,  $r_{\text{NH}}$  το μήκος δεσμού N-H και  $J(\omega)$  παράγοντας που εκφράζει τη φασματική πυκνότητα ( spectral density) και βρίσκεται σε συνάρτηση με την γωνιακή συχνότητα  $\omega$ . [211]

Ο λόγος  $^{15}\text{N}$   $T_1 / T_2$  είναι ανεξάρτητος από γρήγορες ενδομοριακές κινήσεις και από την μαγνητική ανισοτροπία των χημικών μετατοπίσεων. Στην περίπτωση ισοτροπικής περιστροφής του μορίου μπορεί να υπολογιστεί ο γενικός σχετικός χρόνος περιστροφής του μορίου (correlation time  $\tau_c$ ) σύμφωνα με την παρακάτω σχέση.

$$\tau_c = 1/2 \gamma_N B_0 ( 6T_1/T_2 - 7 )^{-1/2} \{ T_1/T_2 = R_2/R_1 \} \quad [211]$$

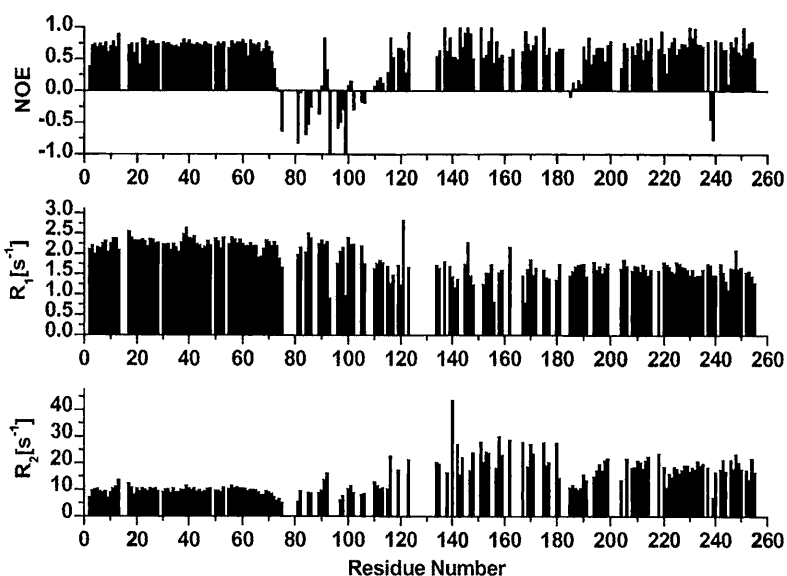
Ο σχετικός χρόνος περιστροφής του μορίου είναι ο χρόνος που απαιτείται για την περιστροφή του μορίου κατά μια μονάδα ακτίνας (1 radian). Ο χρόνος  $\tau_c$  εξαρτάται από το ιξώδες του διαλύτη και την ακτίνα του μορίου, τούτου θεωρούμενο σφαιρικού, και δίνεται από τη σχέση:

$\tau_c = 4\pi n^2 / 3KT$  (όπου  $n =$  ιξώδες διαλύτη και  $a =$  ακτίνα του σφαιρικού μορίου).

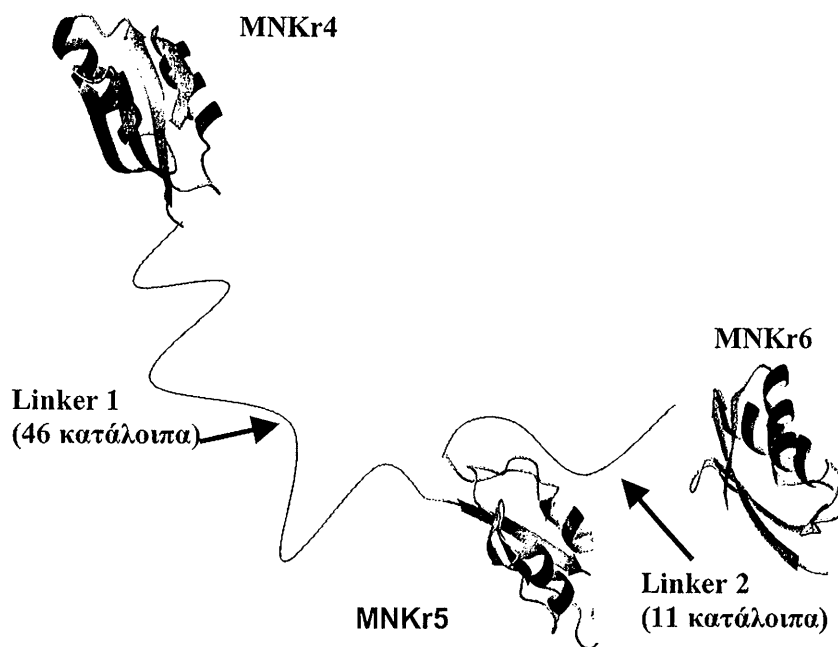
Μικρά μόρια περιστρέφονται ταχύτερα και αυτό σημαίνει μικρό  $\tau_c$  και κατά συνέπεια μεγαλύτερους χρόνους αποκατάστασης  $T_1$ . Μεγάλα μόρια (α μεγάλο) περιστρέφονται βραδύτερα και αυτό σημαίνει μεγάλο  $\tau_c$  και κατά συνέπεια μικρότερους χρόνους αποκατάστασης  $T_1$ .

Στα πειράματα αποκατάστασης  $^{15}\text{N}$ , που έγιναν στην πρωτεΐνη MNK(4-6), βρέθηκε διαφορετική δυναμική συμπεριφορά στις διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης. (Διάγραμμα 1) Η τέταρτη περιοχή MNK4, περιστρέφεται στο διάλυμα πιο ελεύθερα από τις άλλες δυο όπως φαίνεται από τις υψηλές τιμές  $R_2$  και χαμηλές  $R_1$ . (διάγραμμα 1) Ο χρόνος περιστροφής της MNK4 όπως υπολογίστηκε από τον λόγο  $R_2 / R_1$  είναι αρκετά πιο χαμηλός από τον αντίστοιχο της περιοχής MNK5 και MNK6 :  $7.1 \pm 0.3$ ,  $12.8 \pm 1.3$  και  $10.8 \pm 1.3$  ns για τις περιοχές 4, 5 και 6 αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό ευνοείται από το ότι οι τρεις δομικές περιοχές δεν ισαπέχουν μεταξύ τους. Όπως έχει βρεθεί από ομολογιακή μοντελοποίηση της πρωτεΐνης Μένκες [212] η τέταρτη δομική περιοχή MNK4 απέχει κατά 44 αμινοξέα από την πέμπτη MNK5 και αυτή με τη σειρά της μόνο έντεκα αμινοξέα από την έκτη περιοχή MNK6. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η τέταρτη δομική περιοχή να παρουσιάζει μεγαλύτερη ελευθερία περιστροφής σε σχέση με τις άλλες δύο 5-6 οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοιο χρόνο περιστροφής.

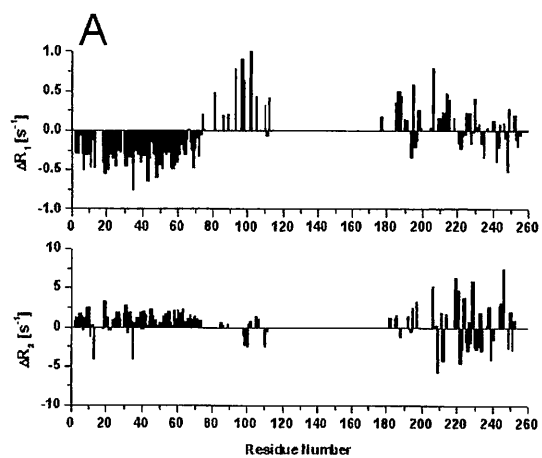
Η τιτλοδότηση της apo MNK(4-6) με χαλκό (I) (αναλογία 1:3) μειώνει την ελευθερία περιστροφής της περιοχής MNK4 όπως φαίνεται από την αύξηση του αντιστοίχου χρόνου περιστροφής από  $7.1 \pm 0.3$  σε  $8.3 \pm 0.6$  ns. (Διάγραμμα 2) Αντίθετα η έκτη δομική περιοχή παραμένει σχεδόν ανηπερέστη κατά την τιτλοδότηση με χαλκό (I) ενώ ο περιορισμένος αριθμός σημάτων για την πέμπτη περιοχή στο φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC της Cu(I)- MNK(4-6) κάνει σχεδόν αδύνατον τον υπολογισμό του χρόνου περιστροφής για την MNK5.



**Διάγραμμα 1:** Τιμές NOEs και μετρήσεις των τιμών  $R_2$  και  $R_1$  σε πειράματα  $^{15}\text{N}$  αποκατάστασης της από MNK(4-6).



**Σχήμα 56:** Μοντέλο της τριπλής περιοχής από MNKr(4-6). Η τέταρτη δομική περιοχή είναι πιο απομακρυσμένη από τις άλλες δύο κατά 46 κατάλοιπα.

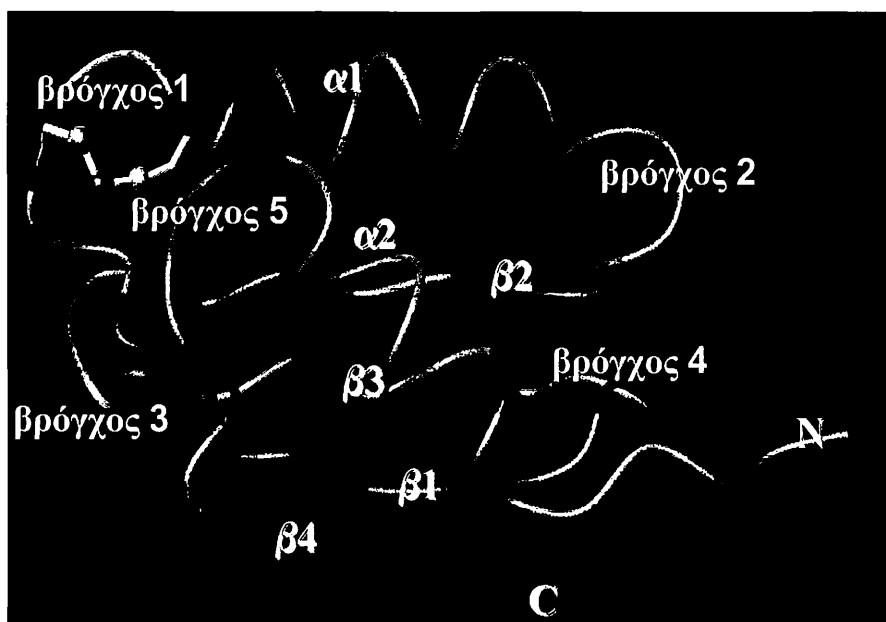


**Διάγραμμα 2:** Μεταβολές των τιμών  $\Delta R_2$  και  $\Delta R_1$  μεταξύ  $Cu_3MNK456$  και apo-MNK456.



### 4.3 ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ apo-MNKR5 ΚΑΙ Cu(I)-MNKR5.

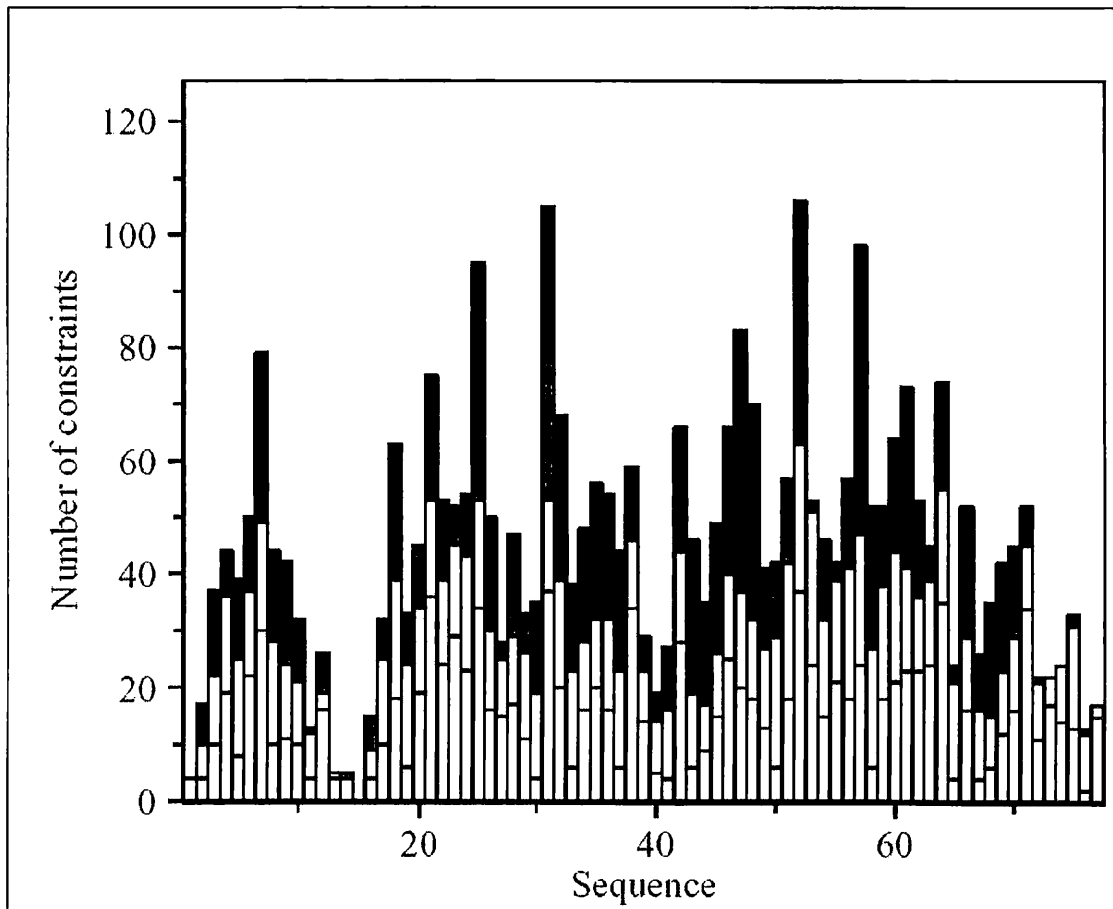
Οι δομές των apo MNKR5 και Cu(I) MNKR5 υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη MNKR5 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του χαλκού με κοινή δευτεροταγή δομή  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ . (Σχήμα 47) Στην οικογένεια αυτή ανήκουν : οι δομικές περιοχές MNKR2 [208], MNKR4 [206] της πρωτεΐνης Μένκες, η πρώτη περιοχή της πρωτεΐνης Ccc2p [199], η δομική περιοχή της BsCopA [213] και δομικές περιοχές στους ευκαρυωτικούς και ανθρώπινους μεταφορείς χαλκού Atx1 και HAH1 αντίστοιχα.[214].



Σχήμα 57: Η κοινή δευτεροταγή δομή  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$  των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ομοιόσταση χαλκού.

Στην πρωτεΐνη apo MNKR5 παρατηρήθηκαν NOE φαινόμενα  $\alpha N(i,i+3)$ ,  $\alpha N(i,i+4)$ ,  $NN(i,i+1)$  και  $\alpha\beta(i,i+3)$  που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη δύο  $\alpha$  ελίκων. Η πρώτη έλικα αποτελείται από τα κατάλοιπα 18-25 ενώ η δεύτερη από τα κατάλοιπα 57-62. Επίσης παρατηρήθηκαν δυνατά NOE φαινόμενα  $\alpha N(i+1)$  και ασθενείς  $NN(i+1)$  τα οποία οφείλονται σε τέσσερα αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα. Το  $\beta_1$  αποτελείται από τα κατάλοιπα 3-9, το  $\beta_2$  (31-33),  $\beta_3$  (43-47) και το  $\beta_4$  (68-70). Στο βρόγχο 1 μεταξύ της πρώτης  $\alpha$  έλικας και του πρώτου  $\beta$  πτυχωτού φύλλου βρίσκεται το μοτίβο CASC, (C=κυστεΐνη, A=αλανίνη και S=σερίνη), από το οποίο εντάσσεται ο χαλκός (I) μέσω των δύο κυστεϊνών. Η περιοχή αυτή εμφανίζει μικρό αριθμό NOESY αποστάσεις

γεγονός που υποδηλώνει ότι ο βρόγχος 1 παρουσιάζει ευκαμψία. Επίσης τα C και N-άκρα της περιοχής από MNK<sub>r</sub>5 παρουσιάζουν μικρό αριθμό NOEs. Τα αμινοξέα των άκρων αποτελούν τους συνδέσμους οι οποίοι ενώνουν τις γειτονικές δομικές περιοχές. Οι σύνδεσμοι αυτοί βρίσκονται σε μεγάλη ευελιξία με αποτέλεσμα τα αμινοξέα να παρουσιάζουν γρήγορες εναλλαγές στην διαμόρφωση. Ο συνολικός αριθμός των NOEs ανά κατάλοιπο φαίνεται στο σχήμα 58.

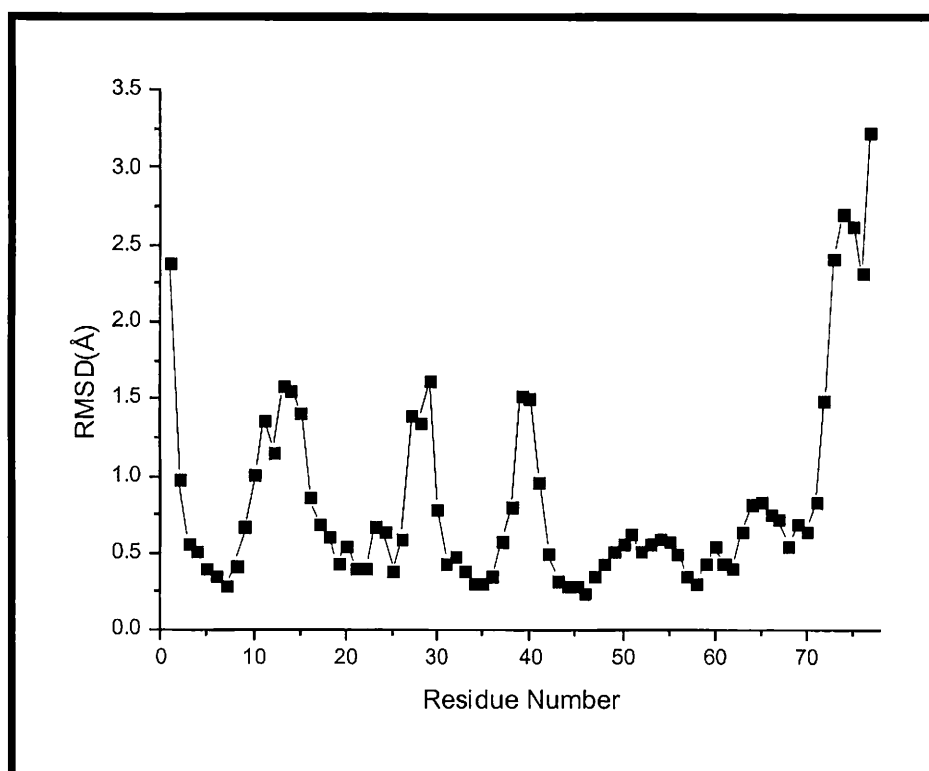


**Σχήμα 58:** Συνολικός αριθμός NOEs ανά κατάλοιπο για την πρωτεΐνη από MNK<sub>r</sub>5. Μαύρο= NOEs μεταξύ αμινοξέων σε μεσαίες και μεγάλες αποστάσεις, γκρι= NOEs μεταξύ γειτονικών αμινοξέων, άσπρο= ενδομοριακά φαινόμενα NOE.

Η τρισδιάστατη δομή της περιοχής από MNK<sub>r</sub>5 ( Σχήμα 59) έχει προσδιοριστεί με υψηλή ακρίβεια. Ο συντελεστής απόκλισης RMSD (Root Mean Square Deviation) για την κύρια αλυσίδα στους βρόγχους 1, 2 και 3 που είναι λιγότερο καλά προσδιορισμένοι δομικά, λόγω της υψηλής κινητικότητάς τους, δεν ξεπερνάει την τιμή 1,566 Å. Στις περιοχές της α1 και α2 έλικας ο συντελεστής απόκλισης είναι πολύ πιο χαμηλός και δεν ξεπερνάει τη τιμή 0,6 Å. ( Σχήμα 60)

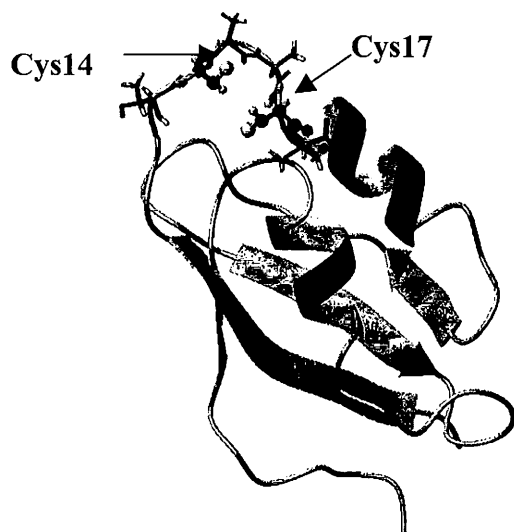


**Σχήμα 59:** Είκοσι πιο ενεργειακά σταθερές δομές για την apo MNKr5 (αριστερά), μια αντιπροσωπευτική δομή (δεξιά).



**Σχήμα 60:** Συντελεστής απόκλισης RMSD ανά κατάλοιπο, της δομής apo MNKr5, για την κύρια αλυσίδα.

Στην αμορφή της περιοχής MNK<sub>r</sub>5 οι δύο κυστεΐνες, από τις οποίες εντάσσεται ο χαλκός (I), βρίσκονται στον βρόγχο 1 μεταξύ της α1 έλικας και του β1 πτυχωτού φύλου. Η δεύτερη κυστεΐνη 17 βρίσκεται στην αρχή της α1 έλικας αλλά όχι πάνω σε αυτή όπως συμβαίνει στην δομική περιοχή MNK<sub>r</sub>4. [206] Στην πρώτη θέση της α έλικας βρίσκεται το γειτονικό κατάλοιπο η βαλίνη 18. Η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων θείου είναι  $5,5 \pm 1 \text{ \AA}$ . Η απόσταση αυτή δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ακρίβεια λόγω των περιορισμένων αριθμό NOEs στο βρόγχο αυτό.

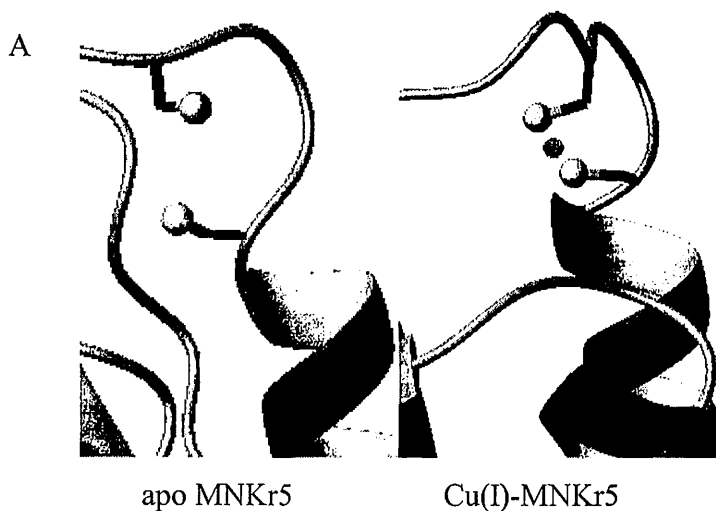


**Σχήμα 61:** Ο βρόγχος 1 στην αμορφή MNK<sub>r</sub>5 φέρει τα δύο κυστεϊνικά κατάλοιπα από τα οποία εντάσσεται ο χαλκός (I).

Η ένταξη του χαλκού δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης MNKr5. (Σχήμα 62). Το μήκος του δεσμού Cu(I)-S όπως προκύπτει από κρυσταλλικές δομές παρόμοιων ολοπρωτεϊνών (Cu(I)-MNKr2 [215], Cu(I)-HAH1 [214]) είναι 2,24 Å επομένως τα άτομα θείου των δύο κυστεϊνών μετακινούνται για να γίνει η ένταξη του χαλκού (I). (Σχήμα 63)



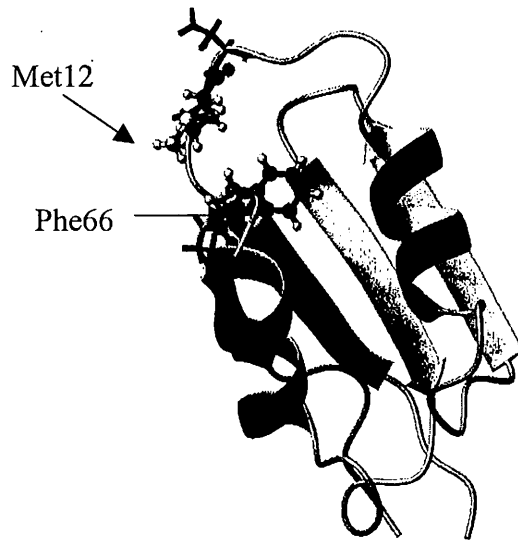
**Σχήμα 62:** Σύγκριση των τρισδιάστατων δομών της apo MNKr5 (A) και Cu(I)-MNKr5 (B). Ο χαλκός (I) παριστάνεται με τη μορφή σφαίρας.



**Σχήμα 63:** Τα άτομα θείου των δύο κυστεϊνών στον βρόγχο 1 πλησιάζουν για να γίνει η ένταξη του χαλκού.

Η γωνία του δεσμού S-Cu(I)-S δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί επειδή το σήμα συντονισμού της κυστεϊνης 14 στα φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC της Cu(I)-MNKr5 δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί. Ο βρόγχος 1 που περιέχει τις κυστεϊνες από τις οποίες εντάσσεται ο χαλκός (I) παρουσιάζει μικρό αριθμό NOEs. Αυτό σημαίνει ότι ο η περιοχή ένταξης παρουσιάζει μεγάλη ευκαμψία γεγονός που δεν συμφωνεί με γραμμική γεωμετρία ένταξης. Στις άλλες περιοχές ένταξης μεταλλικού ιόντος της πρωτεΐνης Μένκες MNKr2, MNKr4, [208,206] αλλά και σε περιοχές της πρωτεΐνης Ccc2 [198] που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την περιοχή MNKr5 η γωνία του δεσμού S-Cu(I)-S δεν είναι γραμμική :  $140\pm 40^\circ$  και  $119\pm 29^\circ$  αντίστοιχα. Είναι πιθανό ο χαλκός (I) στην πρωτεΐνη Cu(I)-MNKr5 να είναι τριενταγμένος και το τρίτο άτομο θείου να προσφέρεται από το αναγωγικό DTT  $\{\text{SHCH}_2(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})\text{SH}\}$ , που προστίθεται στα δείγματα NMR, για να διατηρείται η πρωτεΐνη στην ανηγμένη μορφή της.

Κατά την τιτλοδότηση χαλκού (I) στην apo MNKr5, από τα τέσσερα κατάλοιπα (Met12, Val18, Cys17 και Gly65) που παρουσίασαν αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  και  $^{15}\text{N}$  στο φάσμα HSQC, (Κεφ. 3.2.2.2) η μεθειονίνη 12 παρουσίασε την μεγαλύτερη διαφορά στη χημική μετατόπιση του αμιδικού πρωτονίου. Αυτό οφείλεται στο ότι στην τριτοταγή δομή της Cu(I)-MNKr5, η μεθειονίνη 12 που βρίσκεται στον βρόγχο 1 πλησιάζει τον αρωματικό δακτύλιο της φαινυλαλανίνης 66 στον βρόγχο 5 με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ισχυρές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. (Σχήμα 64)



**Σχήμα 64:** Υδροφοβική αλληλεπίδραση της μεθειονίνης 12 με τον αρωματικό δακτύλιο της φαινυλαλανίνης 66.

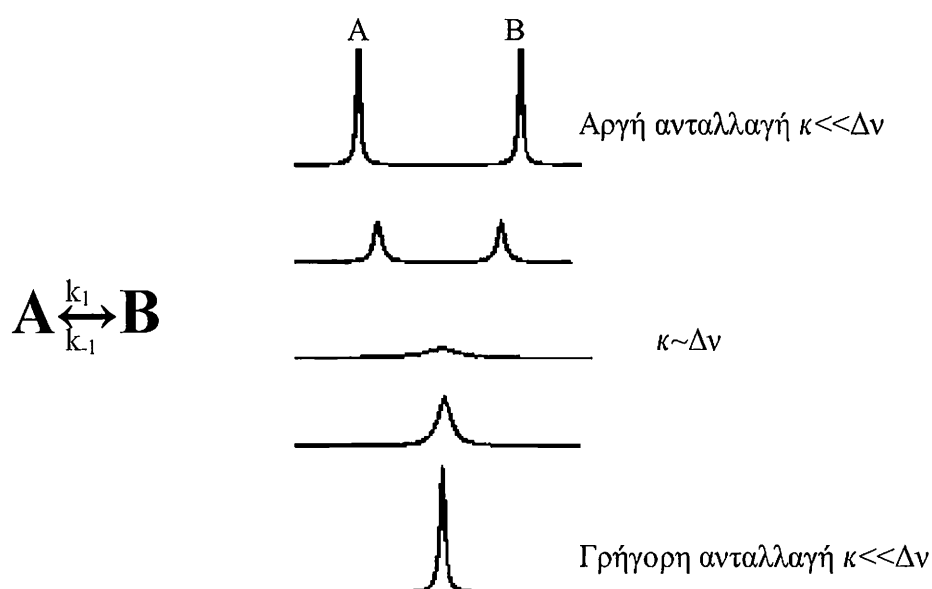
Η μεθειονίνη 12 στον βρόγχο 1, που είναι ο βρόγχος ένταξης του χαλκού (I), καθώς και η φαινυλαλανίνη 66 στον βρόγχο 5 είναι δυο κατάλοιπα που παρουσιάζονται ακριβώς στις ίδιες θέσεις σε όλες τις περιοχές ένταξης μεταλλικών ιόντων στο N-άκρο των πρωτεϊνών ATPάσε, στα βακτηρία, στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά και στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία των δύο αυτών καταλοίπων στα παραπάνω συστήματα διατηρεί μια ευνοϊκή διαμόρφωση του βρόγχου 1, για την ένταξη του μεταλλικού ιόντος από τις δύο δραστικές κυστεΐνες. [198]

#### 4.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HAH1 ΜΕ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΚΑΙ ΠΕΜΠΤΗ ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΝΤΑΞΗΣ ΧΑΛΚΟΥ (I) ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕΝΚΕΣ.

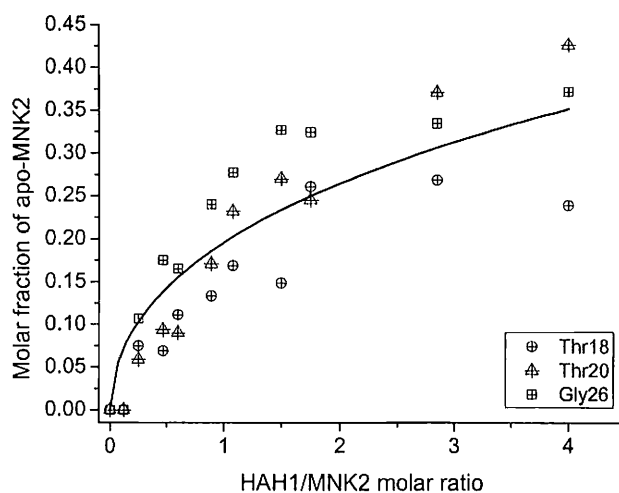
##### A) Αλληλεπίδραση της Cu(I)-MNK<sub>r</sub>2 με την apo-HAH1.

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της MNK<sub>r</sub>2 με την HAH1, τιτλοδοτήθηκε η επισημασμένη πρωτεΐνη <sup>15</sup>N Cu(I)-MNK<sub>r</sub>2 με την επισημασμένη <sup>15</sup>N apo-HAH1. Οι συγκεντρώσεις και των δύο πρωτεϊνών ήταν ~ 0,3 mM και η τιτλοδότηση συνεχίστηκε μέχρι η αναλογία τους να γίνει 4:1. Σε κανένα στάδιο της τιτλοδότησης δεν παρουσιάστηκαν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις στα αμιδικά σήματα στο φάσμα <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H HSQC. Αντίθετα τα σήματα της Cu(I)-MNK<sub>r</sub>2 εξασθενούσαν με την σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της HAH1. Ανάλογα τα σήματα που αντιστοιχούν στην apo MNK<sub>r</sub>2 εμφανίστηκαν και γίνονταν όλο και πιο έντονα κατά την διάρκεια της τιτλοδότησης. (Σχήμα 74) Σε κανένα στάδιο της τιτλοδότησης δεν εμφανίστηκαν καινούργιες χημικές μετατοπίσεις γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν σχηματίζεται κάποιο ενδιάμεσο προϊόν μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία. Η μεταφορά του χαλκού μεταξύ της MNK<sub>r</sub>2 και της HAH1 είναι αργή στην χρονική κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων με αποτέλεσμα κάθε πυρήνας (<sup>1</sup>H ή <sup>15</sup>N) να βρίσκεται και στις δύο χημικές καταστάσεις της apo και holο μορφής των πρωτεϊνών και να εμφανίζονται δυο σήματα ταυτόχρονα αντί του ενός που αντιστοιχεί σε ενδιάμεση χημική μετατόπιση. (Σχήμα 65) Από τον λόγο MNK<sub>r</sub>2: HAH1, που προκύπτει από την ολοκλήρωση των αντίστοιχων κορυφών, υπολογίζεται ότι η τιμή της σταθεράς ισορροπίας K<sub>eq</sub> βρίσκεται μεταξύ των τιμών 5 και 10.





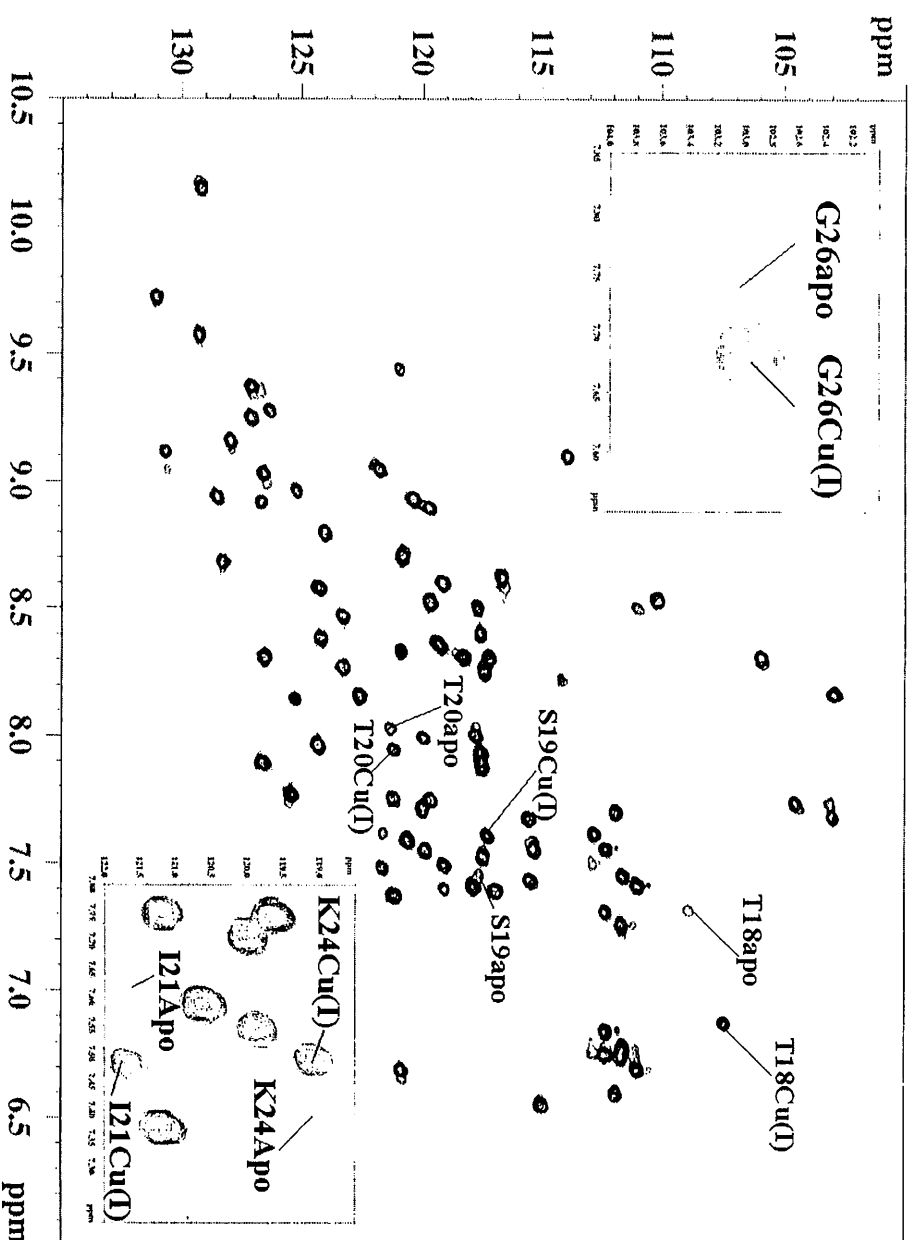
**Σχήμα 65:** Ανταλλαγή πρωτονίου μεταξύ δυο χημικών καταστάσεων A και B στην χρονική κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων. [216]



**Σχήμα 66:** Μοριακό κλάσμα της apo-MNKr2 σε συνάρτηση με τον λόγο HAH1:MNK2 στην ισορροπία  $Cu(I)-MNK2 + HAH1 \leftrightarrow MNK2 + Cu(I)-HAH1$ . Έχουν επιλεγεί τα σήματα των αμινοξέων 18, 20 και 26 για τον υπολογισμό του μοριακού κλάσματος.

B) Αλληλεπίδραση της MNK5 με την Cu(I)-HAH1.

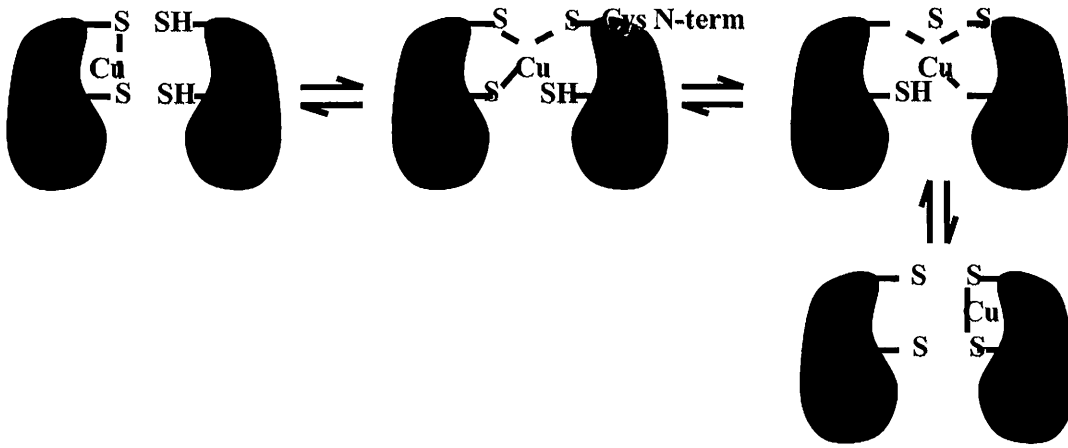
Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της MNK5 με την HAH1, τιτλοδοτήθηκε η επισημασμένη πρωτεΐνη  $^{15}\text{N}$  apo-MNK5 στην επισημασμένη  $^{15}\text{N}$  Cu(I)-HAH1. Όπως παρατηρήθηκε και για την MNK2, κατά την αλληλεπίδραση της MNK5 με την HAH1 δεν σχηματίζεται κάποιο ενδιάμεσο προϊόν μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία και η μεταφορά του χαλκού μεταξύ των δυο πρωτεϊνών είναι αργή στη χρονική κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων. Από την πρώτη προσθήκη της apo-MNK5 (αναλογία MNK5:HAH1=1:5) εμφανίστηκαν σήματα που αντιστοιχούν στην Cu(I)-MNK5 τα οποία ήταν πιο έντονα από αυτά που αντιστοιχούν στην άπο μορφή της πρωτεΐνης. Όταν επιτεύχθηκε περίσσια της apo-MNK5 σε σχέση με την Cu(I)-HAH1 εμφανίστηκαν σήματα της apo-MNK5 τα οποία έγιναν πιο έντονα στην επόμενη προσθήκη. Παράλληλα κατά την διάρκεια της τιτλοδότησης τα σήματα της Cu(I)-HAH1 στο φάσμα HSQC εξασθενούσαν σταθερά και τελικά εμφανίσθηκαν τα σήματα της apo-HAH1.



Σχήμα 67: HSQC φάσμα της Cu(D)-MNK2 (μπλέ) κατά την παρουσία της apo HAH1 σε αναλογία 1:3 (κόκκινο). Υπάρχει ταυτόχρονη παρουσία των σημάτων που αντιστοιγούν στην Cu(D)-και apo-MNK2.

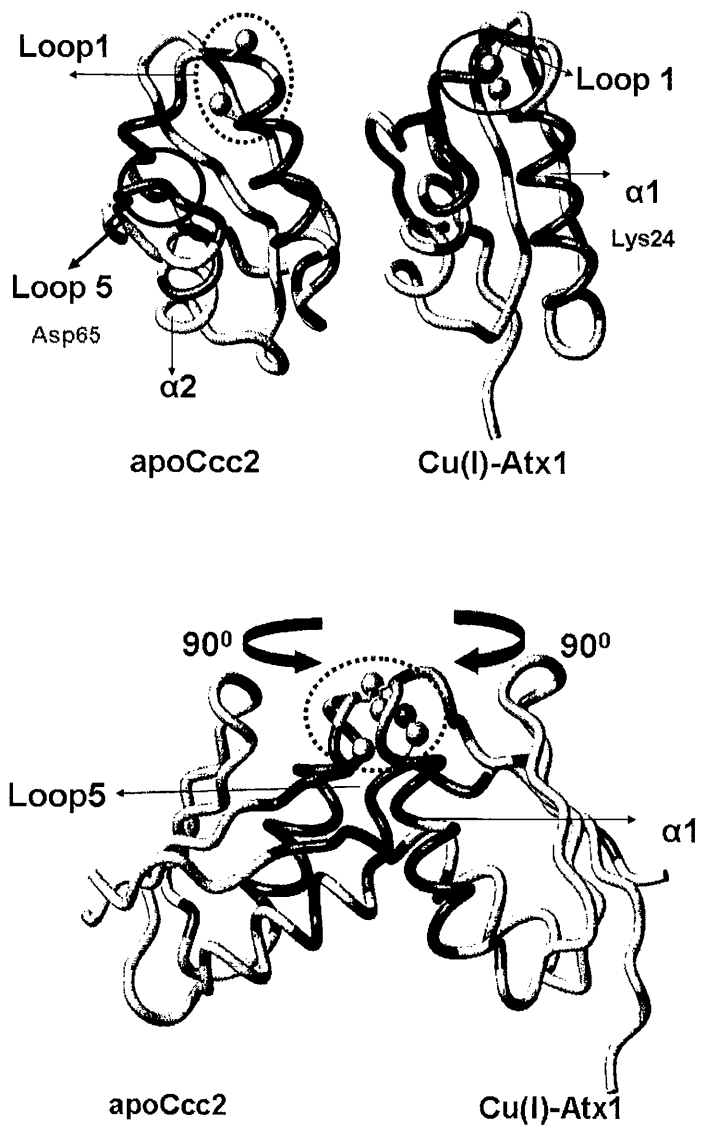
Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ανθρώπινων πρωτεϊνών: HAH1 με MNKr2 και MNKr5 είναι τελείως διαφορετική από αυτή που παρατηρήθηκε για τις ευκαρυωτικές ομόλογες πρωτεΐνες Ccc2 και Cu(I)-Atx1 [36, 199] καθώς και τις βακτηριακές copA cop Z [217]. Στην περίπτωση των ανθρώπινων πρωτεϊνών όπως προκύπτει από τα παραπάνω πειράματα οι πρωτεΐνες MNKr2 και MNKr5 αποτελούν καλύτεροι υποκατάστατες για τον Cu(I) από ότι η HAH1. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με πειράματα θερμιδομετρίας με ισοθερμική τιτλοδότηση μεταξύ της WND2 (δεύτερη περιοχή ένταξης μεταλλικού ιόντος στην πρωτεΐνη Γουίλσον) και την HAH1 [218]. Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι η WND2 έχει μεγαλύτερη συγγένεια σε χαλκό (I) από την HAH1. Η σταθερά ένταξης για μία συγκεκριμένη περιοχή της Γουίλσον όταν βρίσκεται μεμονωμένη διαφέρει μέχρι και δέκα φορές από όταν βρίσκεται και με τις έξι περιοχές. [218] Αν τα παραπάνω δεδομένα ισχύουν και για την ομόλογη πρωτεΐνη Μένκες τότε η συγγένεια της κάθε περιοχής σε χαλκό (I) εξαρτάται από την θέση που είναι εντοπισμένη. Εξαιτίας των μακριών συνδέσμων που ενώνουν τις δομικές περιοχές (έκτος από τις δύο τελευταίες περιοχές MNKr5 και MNKr6 όπου ο μεταξύ τους σύνδεσμος αποτελείται μόνο από έντεκα αμινοξέα) εμφανίζονται μεταξύ τους, μεγάλης ακτίνας αλληλεπιδράσεις. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διαφοροποιούν την συγγένεια για χαλκό (I) μιας μεμονωμένης περιοχής από μιας πολλαπλής.

Κατά την αλληλεπίδραση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών η μεταφορά του χαλκού από την Atx1 στον πρωτεϊνικό στόχο Ccc2 γίνεται μέσω μια σειράς ενδιάμεσων καταστάσεων στις οποίες ο χαλκός είναι τριενταγμένος από τα άτομα θείου των κυστεϊνών της Atx1 και της Ccc2. (Σχήμα 68)



**Σχήμα 68:** Προτεινόμενος μηχανισμός μεταφοράς χαλκού από την Cu(I)-Atx1 στην Ccc2. [36]

Έχει προταθεί ότι στην αλληλεπίδραση των δύο ευκαρυωτικών πρωτεϊνών σπουδαίο ρόλο παίζουν οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που εμφανίζονται μεταξύ τους. [199] Έχει δοθεί δομικό μοντέλο του συμπλόκου Atx1-Cu(I)-Ccc2 στηριζόμενο σε πειραματικά δεδομένα. (Σχήμα 69). Η κοινή επιφάνεια αλληλεπίδρασης περιέχει το μοτίβο ένταξης του μεταλλικού ιόντος C-x-x-C (C = κυστεΐνη). Στο μοντέλο Atx1-Cu(I)-Ccc2 ο βρόγχος 1 και η N-άκρη της α1 έλικας της Atx1 βρίσκονται σε επαφή με το βρόγχο 5 και το C-άκρο της α2 έλικας της Ccc2 και οι δύο έλικες α1 στρέφονται κατά  $45^{\circ}$  επιτρέποντας έτσι την στενή επαφή των δύο περιοχών ένταξης χαλκού των δύο πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο τα δύο ζεύγη κυστεϊνών έρχονται ακριβώς απέναντι διευκολύνοντας την μεταφορά του χαλκού (I) από την μία πρωτεΐνη στην άλλη, μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων καταστάσεων όπου ο χαλκός είναι τριενταγμένος. Η κοινή επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών περιέχει κατάλοιπα με αντίθετο φορτίο όπως η θετικά φορτισμένη λυσίνη 24 (α1 έλικα) της Atx1 και το αρνητικά φορτισμένο ασπαρτικό οξύ 65 (βρόγχος 5) της Ccc2. Και τα δύο αμινοξέα υπάρχουν στις ίδιες ακριβώς θέσεις σε όλες τις ευκαρυωτικές και ανθρώπινες πρωτεΐνες ATPάσε με υψηλή ομολογία και σίγουρα θα αποτελούν κατάλοιπα «κλειδιά» στην αλληλεπίδραση αντίστοιχων πρωτεϊνών.



Σχήμα 69: Δομικό μοντέλο του συμπλόκου Atx1-Cu(I)-Ccc2. [199]

## 4.5. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΗΑΗ1 ΜΕ ΤΙΣ ΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΝΤΑΞΗΣ ΧΑΛΚΟΥ (I) ΜΝΚ(4-6) ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕΝΚΕΣ.

### 4.5.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης με φασματοσκοπία $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ HSQC.

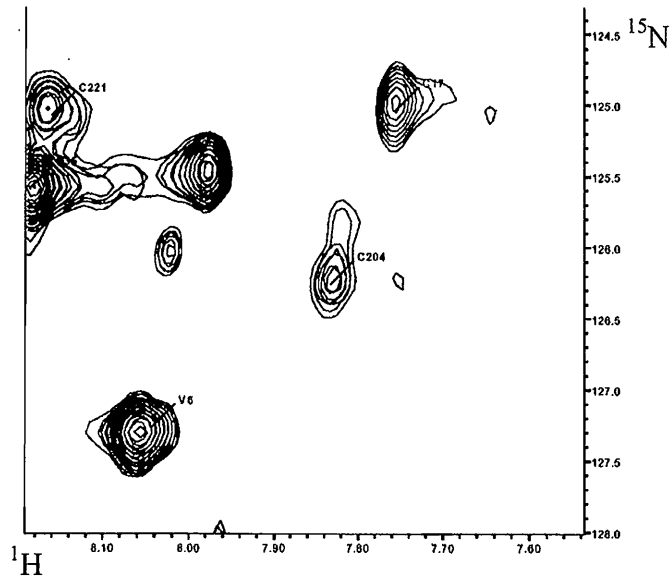
Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της apo-MNK(4-6) με την Cu(I)-HAH1, τιτλοδοτήθηκε η μη επισημασμένη Cu(I)-HAH1 στην επισημασμένη  $^{15}\text{N}$  MNK(4-6). Οι συγκεντρώσεις και των δύο πρωτεϊνών ήταν  $\sim 0,3$  mM και η τιτλοδότηση συνεχίστηκε μέχρι η αναλογία τους να γίνει 4:1.

Κατά την προσθήκη της μη επισημασμένης Cu(I)-HAH1 στην επισημασμένη πρωτεΐνη  $^{15}\text{N}$  apo-MNK(4-6) σε αναλογία 1:1 παρουσιάστηκαν λίγες διαφοροποιήσεις στο φάσμα  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC της MNK(4-6) σε σύγκριση με το φάσμα της apo μορφής της. Το σήμα της κυστεΐνης 17 της τέταρτης δομικής περιοχής εξαφανίστηκε. (σχήμα 70) Τα σήματα του ασπαρτικού οξέος 10, της γλυκίνης 56 και της αλανίνης 68, που είναι κατάλοιπα της τέταρτης δομικής περιοχής, παρουσίασαν διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις  $^{15}\text{N}$  και  $^1\text{H}$  αλλά και στο σχήμα τους. (Κεφ. 4.2.2.2) Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι σε αναλογία 1:1 {Cu(I)-HAH1/MNK(4-6)} ο χαλκός (I) που απελευθερώνεται από την συνοδό HAH1 δεσμεύεται μόνο από την τέταρτη δομική περιοχή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορές στο σήμα της ενός από τις δυο κυστεΐνες (14 και 17) από τις οποίες εντάσσεται ο χαλκός (I) και στα σήματα των αμινοξέων 65 και 68 που βρίσκονται στον βρόγχο 5 που είναι ακριβώς απέναντι από τον βρόγχο 1 ένταξης του μεταλλικού ιόντος στη τρισδιάστατη δομή της MNK4 [206] Η κοντινή θέση των δύο παραπάνω καταλοίπων καθώς και του ασπαρτικού οξέος 10 ως προς στις δύο δραστικές κυστεΐνες (14, 17) οδηγεί σε αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις  $^{15}\text{N}$  και  $^1\text{H}$  του αμιδικού δεσμού τους. Κατά την συνέχεια της τιτλοδότησης και σε αναλογία 2:1 {Cu(I)-HAH1/MNK(4-6)} καμία επιπλέον αλλαγή δεν παρατηρείτε στο φάσμα  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC της MNK(4-6) εκτός από την μεγαλύτερη μετατόπιση του σήματος της αλανίνης 68. (Σχήμα 71) Τελικά σε αναλογία 3:1 το σήμα της αλανίνης 68 παρουσιάζει μεγάλη διαφορά στην χημική μετατόπιση του πυρήνα  $^{15}\text{N}$  ενώ το σήμα τις αντίστοιχής αλανίνης 255 (σχήμα 72) στον βρόγχο 5 της δομικής περιοχής έξι παραμένει αμετάβλητο γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκτη περιοχή δεν αλληλεπιδρά με την HAH1 ούτε και στην αναλογία 3 προς 1 των δυο πρωτεϊνών. Η ίδια εικόνα επικρατεί και με τα σήματα των γλυκίνων 65 (τέταρτη περιοχή), 176 (πέμπτη

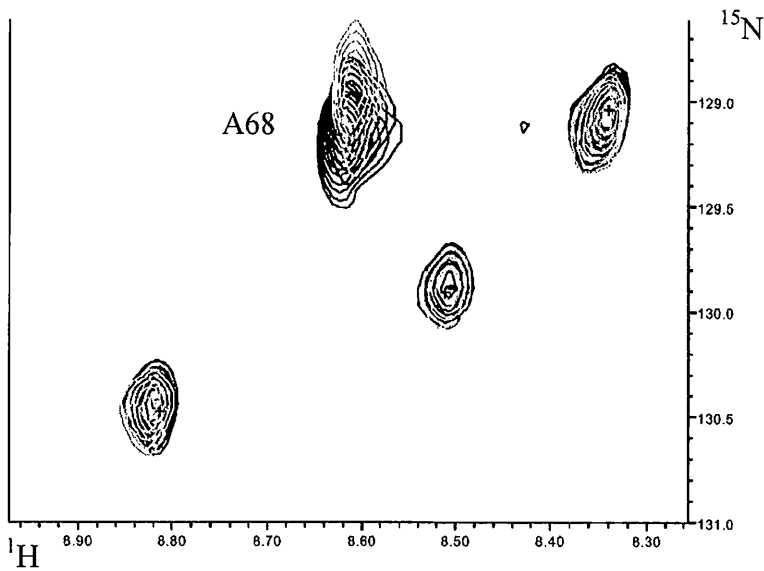
περιοχή) και 252 (έκτη περιοχή). Στο φάσμα HSQC της MNK(4-6) το σήμα της γλυκίνης 65 μετατοπίστηκε κατά την παρουσία της Cu(I)-HAH1 σε αναλογία 1:1 ενώ τα άλλα δυο παραμένουν σχεδόν αμετάβλητα σε όλα τα στάδια της τιτλοδότησης. (Σχήμα 73)

Τα παραπάνω αποτελέσματα NMR αποτελούν ένδειξη ότι κατά την αλληλεπίδραση των δυο ανθρώπινων πρωτεϊνών Cu(I)-HAH1 και MNK(4-6) ο χαλκός (I) δεν δεσμεύεται τυχαία στις τρεις δομικές περιοχές της MNK(4-6) όπως συμβαίνει με την τιτλοδότηση της πρωτεΐνης Μένκες με χαλκό (I). (Κεφ. 4.2.2.2) Από τα φάσματα HSQC της MNK(4-6) είναι εμφανές ότι οι τρεις δομικές περιοχές έχουν διαφορετική συγγένεια για χαλκό (I) και από αυτές η τέταρτη περιοχή προσλαμβάνει πρώτη το μεταλλικό ιόν όταν αυτό απελευθερώνεται από τον μεταφορέα HAH1. Από την σύγκριση των σημάτων της αλανίνης 68 στα φάσματα HSQC της apo-MNK(4-6), Cu(I)-MNK(4-6) και MNK(4-6) παρουσία Cu(I)-HAH1 σε αναλογία 1:3 καθώς και των σημάτων του ασπαρτικού οξέος 10 προκύπτει ότι πρόκειται κάθε φορά για τρία σήματα με διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις  $^{15}\text{N}$  και  $^1\text{H}$ . (Σχήμα 74) Τα σήματα των δύο καταλοίπων 10 και 68 της MNK(4-6) κατά την αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών δεν αντιστοιχούν στην apo ή την *holo* μορφή της πρωτεΐνης Μένκες αλλά έχουν εντελώς καινούργιες χημικές μετατοπίσεις και υποδηλώνουν την δημιουργία ενδιάμεσου προϊόντος MNK(4-6)-Cu(I)-HAH1. Αυτό σημαίνει ότι κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ της Cu(I)-HAH1 και της MNK(4-6) η μεταφορά του χαλκού μέσω της τέταρτης δομικής περιοχής είναι γρήγορη στη χρονική κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων δηλαδή ακριβώς αντίθετη με αυτή που παρατηρήθηκε στις αλληλεπιδράσεις HAH1/MNK2 και HAH1/MNK5.

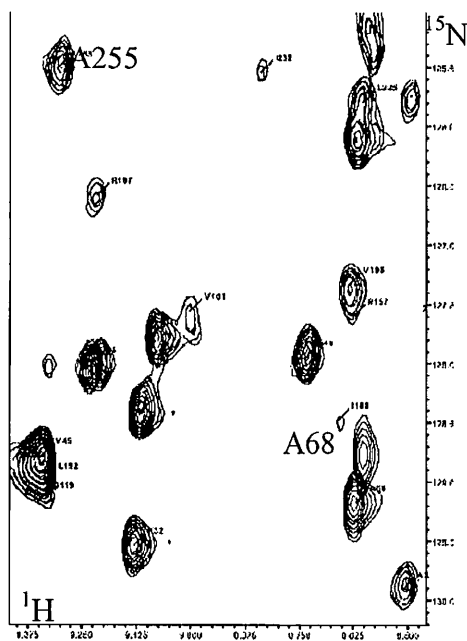




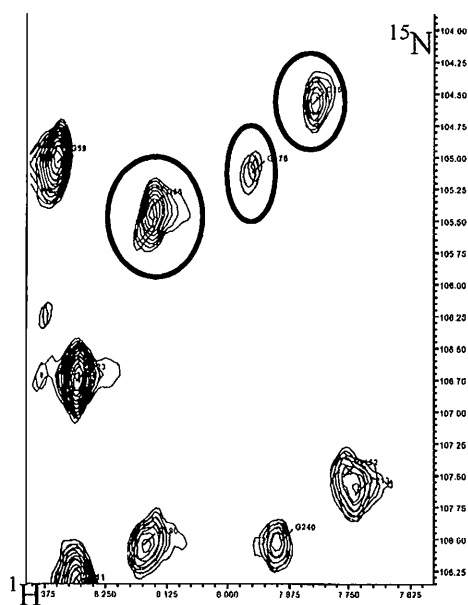
**Σχήμα 70:** Το σήμα της κυστεΐνης 17 της  $^{15}\text{N}$  apo-MNK(4-6) (κόκκινο) εξαφανίζεται κατά την παρουσία της μη επισημασμένης Cu(I)-HAH1 σε αναλογία 1:1 (μπλε).



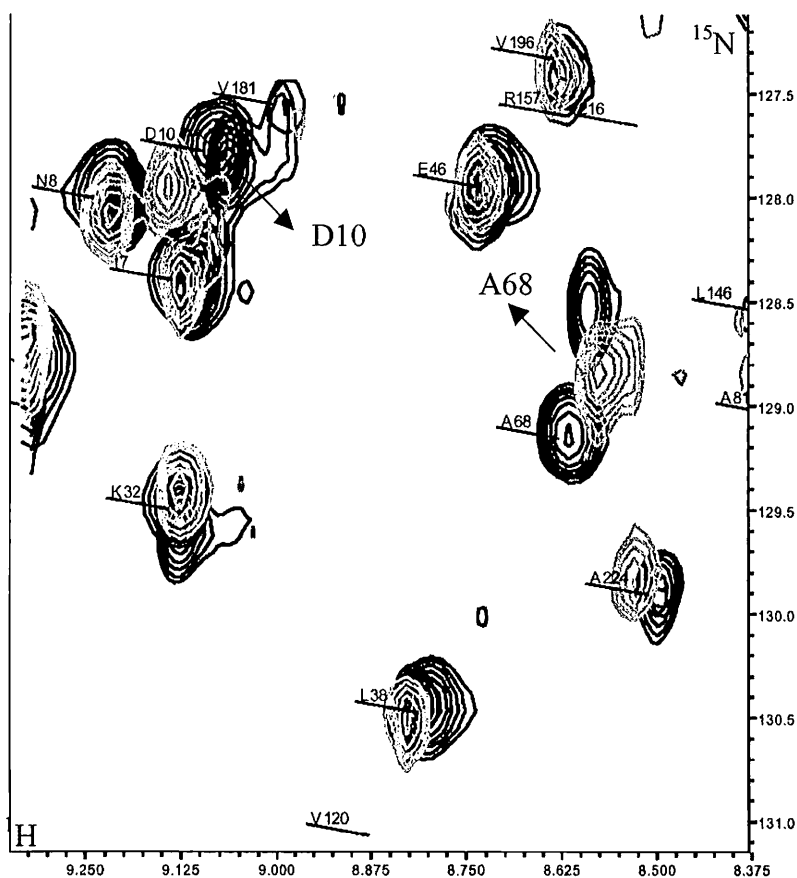
**Σχήμα 71 :** Αλλαγές στις χημικές μετατόψεις  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  και στο σχήμα του σήματος αλανίνη 68 της  $^{15}\text{N}$  apo-MNK(4-6) (κόκκινο) κατά την παρουσία της μη επισημασμένης Cu(I)-HAH1 σε αναλογία 1:1(μπλε) και 1:2 (πράσινο).



Σχήμα 73 : Το σήμα της αλανίνης 68 παρουσιάζει μεγάλη διαφορά στην χημική μετατόπιση του πυρήνα  $^{15}\text{N}$  ενώ το σήμα της αλανίνης 255 (σχήμα 72) στον βρόγχο 5 της δομικής περιοχής έξι παραμένει αμετάβλητο σε αναλογία Cu(I)-HAH1/MNK(4-6) =3:1.

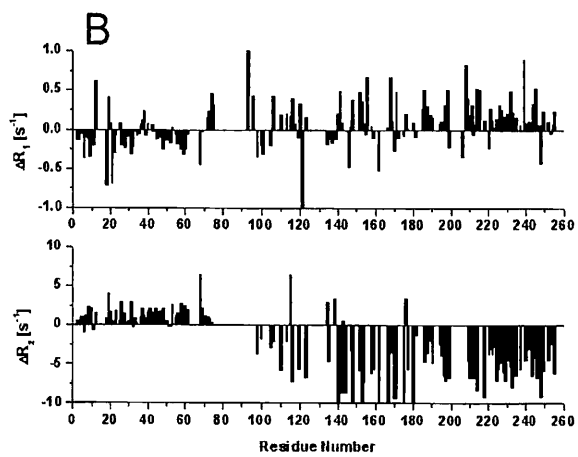


Σχήμα 73 : Τα σήματα στο φάσμα HSQC των γλυκίνων 65 (τέταρτη περιοχή), 176 (πέμπτη περιοχή) και 252 (έκτη περιοχή) της apo-MNK(4-6) (κόκκινο) και κατά την παρουσία της μη επισημασμένης Cu(I)-HAH1 σε αναλογία 1:3 (μπλε).



**Σχήμα 74 :** Τα κατάλοιπα ασπαρτικό οξύ 10 και αλανίνη 68 της apo-MNK(4-6) εμφανίζουν τρία διαφορετικά σήματα στο φάσμα HSQC της apo-MNK(4-6) (κόκκινο), Cu(I)-MNK(4-6) (πράσινο) και παρουσία της Cu(I)-HAH1 σε αναλογία 1:3 (μπλέ).

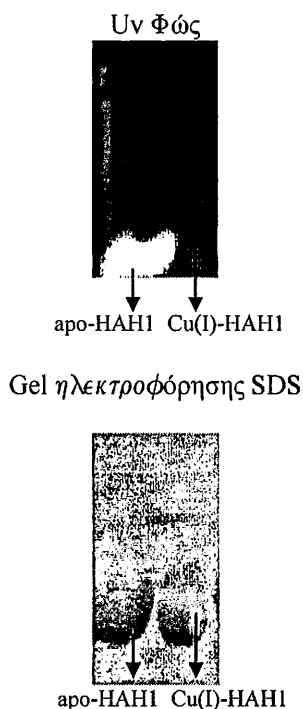
Από τα πειράματα  $^{15}\text{N}$  αποκατάστασης προκύπτει ότι η παρουσία της Cu(I)-HAH1 επηρεάζει και την δυναμική της πρωτεΐνης apo-MNK(4-6) (διάγραμμα 3) μειώνοντας τον σχετικό χρόνο περιστροφής της τέταρτης περιοχής αλλά όχι τόσο πολύ όσο παρατηρήθηκε κατά την τιτλοδότηση με χαλκό (I). (κεφ. 4.2.2.3 διάγραμμα 2) Αντίθετα οι περιοχές MNK5 και MNK6 κατά την παρουσία της Cu(I)-HAH1 περιστρέφονται πιο γρήγορα όπως παρατηρείται από την μείωση των σχετικών χρόνων περιστροφής τους που είναι  $1.4 \pm 2.4$  και  $1.0 \pm 1.9$  ns αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 3:** Μεταβολές των τιμών  $\Delta R_2$  και  $\Delta R_1$  μεταξύ apo-MNK456 παρουσία της Cu(I)-HAH1 και apo-MNK456.

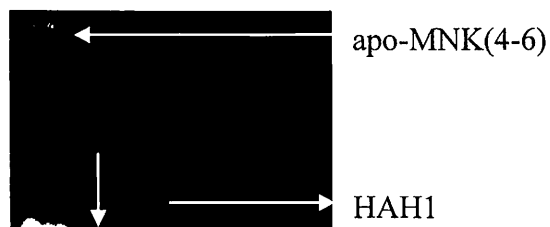
#### 4.5.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης με φθορισμομετρία.

Με τα πειράματα χημικής επισήμανσης της πρωτεΐνης MNK(4-6) επισημαίνονται με το φθορίζον αντιδραστήριο CPM μόνο τα ανοιγμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα που δεν δεσμεύονται από μέταλλο. Από τα πειράματα φθορισμομετρίας προκύπτει ότι ο συνοδός Cu(I)-HAH1 μεταφέρει το μέταλλο στην τριπλή περιοχή MNK(5-6) αφού δίνει μπάντα ορατή στο UV φώς. Σε ξεχωριστό πείραμα χημικής επισήμανσης με CPM παρατηρήθηκε ότι η Cu(I)-HAH1 δεν αντιδρά με το αντιδραστήριο CPM λόγω έλλειψης ελεύθερων κυστεϊνών και δεν δίνει ορατή μπάντα.



**Εικόνα 3:** Η apo-HAH1 δίνει φθορίζων μπάντα στο UV φώς κατά την επισήμανση της με CPM.

Κατά την περίσσια Cu(I)-HAH1 μία από τις μπάντες που προέκυψαν από την πρωτεόλυση της MNK(4-6) εξαφανίζεται (εικόνα 4) υποδηλώνοντας ότι υπάρχει επιλεκτική προστασία από το φθορίζον αντιδραστήριο CPM λόγω της μεταφοράς του χαλκού (I) και ένταξης του στις ελεύθερες κυστεϊνες. Το μοριακό βάρος της μπάντας που εξαφανίστηκε είναι γύρω στα 8,000Da γεγονός που υποδεικνύει ότι αντιστοιχεί σε μια δομική περιοχή.

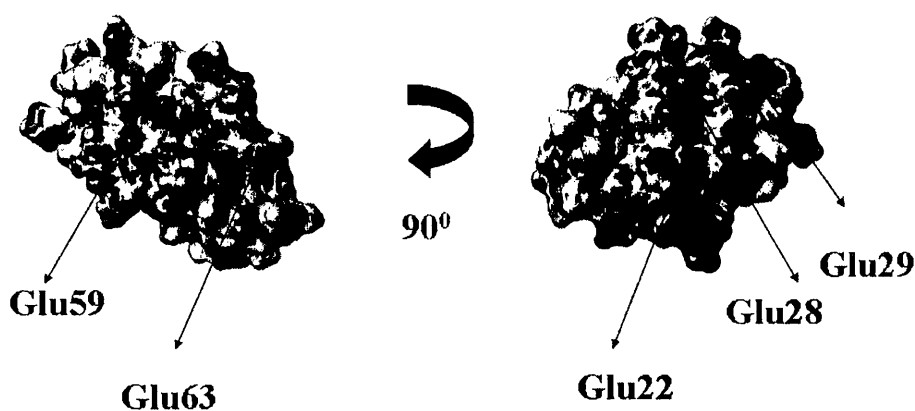


Πεπτιδικά κομμάτια  
πρωτεόλυσης της apo-MNK(4-6)

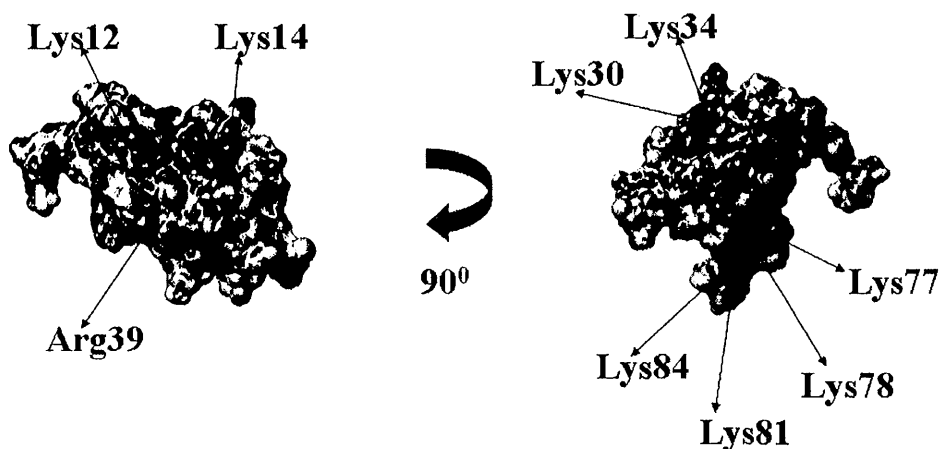
**Εικόνα 4:** Αλληλεπίδραση της MNK(4-6) με την Cu(I)-HAH1 όπως προκύπτει από την χημική επισήμανση των ελεύθερων κυστεϊνών με το φθορίζον αντιδραστήριο CPM. Από αριστερά προς δεξιά: 1<sup>η</sup> σειρά, apo-MNK(4-6); 2<sup>η</sup> σειρά, apo-MNK(4-6) πρωτεολυμένη με τρυψίνη; 3<sup>η</sup>-5<sup>η</sup> σειρά apo-MNK(4-6) επωασμένη με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση Cu(I)-HAH1 (MNK456:HAH1 αναλογία 1:1, 3:1 και 3:1 αντίστοιχα).

#### 4.6 ΗΛΕΚΤΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΗΣ Cu(I)-MNK<sub>r</sub>5.

Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης MNK<sub>r</sub>5 είναι  $pI = 6,4$ . Στην ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης υπάρχουν αρκετά κατάλοιπα με αρνητικό φορτίο όπως οι γλουταμίνες 22,28,29,59,63. (Σχήμα 75) Αντίθετα, το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης MNK<sub>r</sub>2 είναι υψηλότερο  $pI = 8,7$  και στην επιφάνεια της (Σχήμα 76) υπάρχουν πολλά κατάλοιπα λυσίνης τα οποία δημιουργούν περίσσεια θετικού φορτίου.

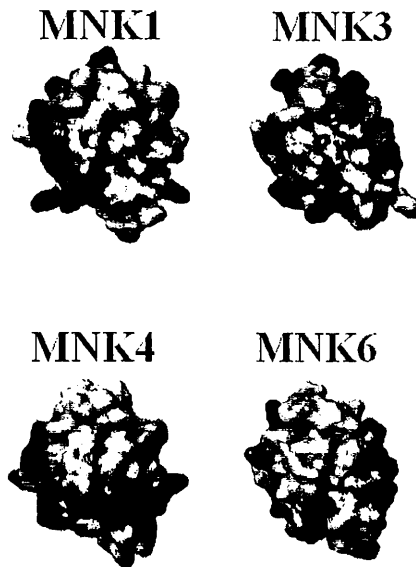


Σχήμα 75 : Ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης MNK<sub>r</sub>5.



Σχήμα 76 : Ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης MNK<sub>r</sub>2. Τα θετικά, αρνητικά και ουδέτερα φορτισμένα αμινοξέα απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και άσπρο αντίστοιχα.

Από ομολογιακή μοντελοποίηση των υπόλοιπων τεσσάρων περιοχών ένταξης μεταλλικού ιόντος MNK<sub>r</sub>1, MNK<sub>r</sub>3, MNK<sub>r</sub>4, MNK<sub>r</sub>6 προκύπτει ότι οι επιφάνειες παρουσιάζουν εντελώς διαφορετική κατανομή ηλεκτροστατικού φορτίου. (Σχήμα 79)



**Σχήμα 77:** Σύγκριση του ηλεκτροστατικού φορτίου στις επιφάνειες των δομικών περιοχών MNK<sub>r</sub>1, MNK<sub>r</sub>3, MNK<sub>r</sub>4 και MNK<sub>r</sub>6.

*In vivo* μελέτες απέδειξαν ότι ο συνοδός χαλκού HAH1 αλληλεπιδρά με μερικές, αλλά όχι με όλες τις περιοχές ένταξης του μεταλλικού ιόντος στο N άκρο των πρωτεϊνών Μένκες. [75,76] Ίδιες μελέτες αποκαλύπτουν ότι αρχικά το ιόν του χαλκού παραδίδεται από την HAH1 σε κάποια από τις τρεις τελευταίες περιοχές (MNK<sub>r</sub>4, MNK<sub>r</sub>5 και MNK<sub>r</sub>6) και έπειτα μεταφέρεται μεταξύ αυτών με τελικό προορισμό στο κανάλι ιόντων της κυτταρικής μεμβράνης για την απομάκρυνση του. Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης HAH1 (Σχήμα 78) είναι pI= 6,4 δηλαδή παρόμοιο με το ισοηλεκτρικό σημείο της MNK<sub>r</sub>5 και κατά δύο μονάδες μικρότερο από το pI της MNK<sub>r</sub>2. Και στις δύο πρωτεΐνες MNK<sub>r</sub>2 και MNK<sub>r</sub>5, το ηλεκτροστατικό φορτίο των επιφανειών τους δεν είναι αρκετά συμπληρωματικό με αυτό της πρωτεΐνης HAH1 όπως συμβαίνει στο σύστημα Atx1-Ccc2 [199] κάνοντας απίθανο τον σχηματισμό ενδιάμεσου προϊόντος MNK-Cu(1)-HAH1. Έτσι από τα σήματα NMR, κατά την διάρκεια της τιτλοδότησης, παρατηρείται μόνο μεταφορά χαλκού από τη μία πρωτεΐνη στην άλλη.





Atx1



HAH1

Σχήμα 78: Ηλεκτροστατική επιφάνεια της ανθρώπινης πρωτεΐνης HAH1 και της ευκαρυωτικής Atx1.

## **5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

1) Οι αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες MNK $\gamma$ 5 και MNK $\gamma$ (4-6), που αντιστοιχούν στα αμινοξέα 490-555, 379-631 της πρωτεΐνης ATP7a, απομονώθηκαν με την τεχνική PCR και κλωνοπήθηκαν στο πλασμιδιακό φορέα pet20b(+) μεταξύ των περιοχών των περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI. Με αυτό τον τρόπο οι εκφρασμένοι πρωτεϊνικοί στόχοι περιείχαν επιπλέον την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο Factor Xa και έξι ιστιδίνες στο C-άκρο. Στο τέλος και στους δύο πρωτεϊνικούς στόχους η ιστιδινική ουρά απομακρύνθηκε.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCC1 και pCC2 μεταφέρθηκαν στα βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3)pLysS της σειράς *Escherichia coli* για έκφραση των πρωτεϊνικών στόχων. Η καλλιέργεια των κυττάρων για τον πρωτεϊνικό στόχο MNK $\gamma$ 5 έγινε στους 37<sup>0</sup>C σε πλήρης θρεπτικό υλικό <sup>15</sup>N-Silantes και <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-Silantes ενώ για την τριπλή περιοχή MNK $\gamma$ (4-6) στους 37<sup>0</sup>C σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό <sup>15</sup>N M9 και <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C M9. Και στις δύο περιπτώσεις στα θρεπτικά υλικά προστέθηκαν αντιβιοτικά αμικικιλίνη (100 $\mu$ g/ml) και chloramphenicol (34 $\mu$ g/ml). Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες (180 rpm, 37<sup>0</sup>C) μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (OD=0,7). Τότε προστέθηκε στην υγρή καλλιέργεια 1 ml διαλύματος IPTG 1M και τα κύτταρα επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες (180 rpm, 37<sup>0</sup>C) για τέσσερις ώρες (MNK $\gamma$ 5) και δώδεκα ώρες {MNK $\gamma$ (4-6)}.

Ο καθαρισμός και των δύο πρωτεϊνικών στόχων έγινε με χρωματογραφία HiTrap. Χρησιμοποιήθηκε στήλη HiTrap Chelating HP φορτισμένη με ιόντα Zn<sup>+2</sup>. Μετά τον καθαρισμό η ιστιδινική ουρά απομακρύνθηκε με επώαση των πρωτεϊνών MNK $\gamma$ 5 και MNK $\gamma$ (4-6) με το ένζυμο Factor Xa για 5 και δώδεκα ώρες αντίστοιχα. Τελικά οι πρωτεϊνικοί στόχοι χωρίς ιστιδινική ουρά καθαρίστηκαν με δεύτερη χρωματογραφία HiTrap.

2) Η δευτεροταγή δομή του πρωτεϊνικού στόχου MNK $\gamma$ 5 είναι πανομοιότυπη με αυτή που παρουσιάζουν οι άλλες δομικές περιοχές ένταξης μεταλλικού ιόντος της πρωτεΐνης Μένκες, MNK $\gamma$ 2 και MNK $\gamma$ 4 [208,206], καθώς η πρώτη περιοχή της πρωτεΐνης Ccc2p [199], η δομική περιοχή της BsCopA [213] και οι δομικές περιοχές στους ευκαρυωτικούς και ανθρώπινους μεταφορείς χαλκού Atx1 και HAH1 αντίστοιχα. [214]. (Σχήμα 79) Η διευθέτηση της δευτεροταγής δομής είναι  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ . Στην τριτοταγή δομή της περιοχής MNK $\gamma$ 5 οι δύο κυστεΐνες, από τις οποίες εντάσσεται ο χαλκός (I), βρίσκονται στον βρόγχο 1 μεταξύ της  $\alpha_1$  έλικας και του  $\beta_1$  πτυχωτού

φύλου. Η δεύτερη κυστεΐνη 17 βρίσκεται στην αρχή της α1 έλικας αλλά όχι πάνω σε αυτή όπως συμβαίνει στην δομική περιοχή MNKr4. [206]



Cu(I)-MNKr2



Ag(I)-MNKr4



Cu(I)-MNKr5

**Σχήμα 79:** Σύγκριση των δόμων τριών δομικών περιοχών της πρωτεΐνης Μένκες.

Κατά τη τιτλοδότηση της πρωτεΐνης apoMNKr5 με Cu(I) το φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές. Από τη σύγκριση των δύο φασμάτων προκύπτει ότι μόνο τέσσερα κατάλοιπα η μεθειονίνη 12, η κυστεΐνη 17, η βαλίνη 18 και η γλυκίνη 65 παρουσίασαν αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  και  $^{15}\text{N}$  καθώς και αλλαγές στο σχήμα και πλάτος των σημάτων τους κατά την τιτλοδότηση με Cu(I). Η μετατόπιση του σήματος της κυστεΐνης 17 οφείλεται στην ένταξη του χαλκού (I) ενώ στα κατάλοιπα 12 και 18 στην θέση τους που είναι πολύ κοντινή στις δύο δραστικές κυστεΐνες 14 και 17. Από αυτά η μεθειονίνη 12 παρουσίασε την μεγαλύτερη χημική μετατόπιση στο πρωτόνιο Ha. Αυτό οφείλεται στο ότι στην τριτοταγή δομή της Cu(I)-MNKr5, το περιβάλλον γύρω από τη μεθειονίνη 12 αλλάζει. Συγκεκριμένα το αμινοξύ αυτό βρίσκεται στον βρόγχο 1 και κατά την ένταξη του χαλκού πλησιάζει τον αρωματικό δακτύλιο της φαινυλαλανίνης 66 στον βρόγχο 5 με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ισχυρές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους.

Η γωνία του δεσμού S-Cu(I)-S δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί επειδή ο βρόγχος 1 που περιέχει τις κυστεΐνες από τις οποίες εντάσσεται ο χαλκός (I) παρουσιάζει μικρό αριθμό NOEs. Αυτό σημαίνει ότι ο η περιοχή ένταξης παρουσιάζει μεγάλη ευκαμψία γεγονός που δεν συμφωνεί με γραμμική γεωμετρία ένταξης. Παράλληλα στις άλλες περιοχές ένταξης μεταλλικού ιόντος της πρωτεΐνης Μένκες MNKr2, MNKr4, [208,206] αλλά και σε περιοχές της πρωτεΐνης Ccc2 [198] που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την περιοχή MNKr5 η γωνία του δεσμού S-Cu(I)-S

δεν είναι γραμμική :  $140 \pm 40^0$  και  $119 \pm 29^0$  αντίστοιχα. Είναι πιθανό ο χαλκός (I) στην πρωτεΐνη Cu(I)-MNK<sub>r</sub>5 να είναι τριενταγμένος, όπως ακριβώς συμβαίνει στην περίπτωση της ομόλογης βακτηριακής πρωτεΐνης Cu(I)-CopZ, [219] στην οποία το τρίτο άτομο θείου προσφέρεται από το αναγωγικό DTT {SHCH<sub>2</sub>(OH)CH<sub>2</sub>(OH)SH}, που προστίθεται στα δείγματα NMR, για να διατηρείται η πρωτεΐνη στην ανηγμένη μορφή της. Στην περίπτωση του ανθρώπινου οργανισμού μπορεί να συμβαίνει το ίδιο με αναγωγικό μέσο την γλουταθειόνη που βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος. [219]

Κατά τη τιτλοδότηση της τριπλής περιοχής MNK(4-6) με Cu(I) αρκετά κατάλοιπα παρουσίασαν αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>H και <sup>15</sup>N καθώς και αλλαγές στο σχήμα και πλάτος των σημάτων τους όπως προκύπτει από τη φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC. Από αυτά, σημαντικότερες αλλαγές στην χημική μετατόπιση του αμιδικού υδρογόνου παρουσίασαν κατάλοιπα από την τέταρτη δομική περιοχή (ασπαρτικό οξύ 10, θρεονίνη 13, γλυκίνη 23, γλυκίνη 30, βαλίνη 36, λευκίνη 38, αλανίνη 68 και θρεονίνη 69) και την έκτη (αργινίνη 197, θρεονίνη 200, αλανίνη 224, γλυκίνη 240). Οι απορροφήσεις του αμιδικού υδρογόνου <sup>1</sup>H και του αμιδικού αζώτου <sup>15</sup>N του σήματος της κυστεΐνης 17 που ανήκει στην τέταρτη δομική περιοχή μετατοπίστηκαν σε υψηλότερες τιμές δ(ppm). (Σχήμα 53) Αυτό οφείλεται στην ένταξη του χαλκού (I) από τις δύο κυστεΐνες 14, 17 της τέταρτης δομικής περιοχής.

3) Σε αυτήν την εργασία έγινε για πρώτη φορά στην παγκόσμια ερευνητική κοινότητα η αλληλεπίδραση των δομικών περιοχών MNK2, MNK5 και MNK(4-6) της ανθρώπινης πρωτεΐνης Μένκες με τον ανθρώπινο μεταφορέα χαλκού HAH1, καθώς και η μελέτη της με φασματοσκοπία HSQC για την άντληση πληροφοριών του τρόπου μεταφοράς χαλκού (I) στον πρωτεϊνικό στόχο Μένκες.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ανθρώπινων πρωτεϊνών: HAH1 με MNK<sub>r</sub>2 και MNK<sub>r</sub>5 είναι τελείως διαφορετική από αυτή που παρατηρήθηκε για τις ευκαρυωτικές ομόλογες πρωτεΐνες Ccc2 και Cu(I)-Atx1 [36, 199] καθώς και τις βακτηριακές copA cop Z [217]. Στην περίπτωση των ανθρώπινων πρωτεϊνών όπως προκύπτει από πειράματα NMR οι πρωτεΐνες MNK<sub>r</sub>2 και MNK<sub>r</sub>5 αποτελούν καλύτεροι υποκατάστατες για τον Cu(I) από ότι η HAH1. Σε κανένα στάδιο των τιτλοδοτήσεων δεν εμφανίστηκαν επιπλέον σήματα εκτός από αυτά που αντιστοιχούν στις *apo* και *holo* μορφές των πρωτεϊνών, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν σχηματίζεται κάποιο

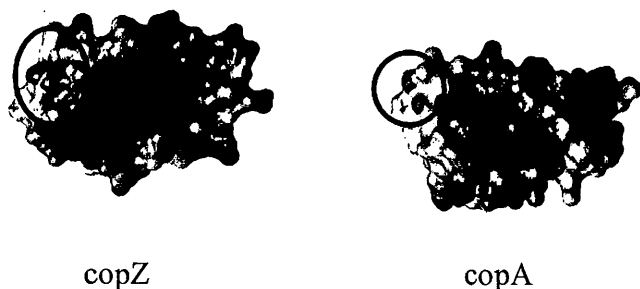
ενδιάμεσο προϊόν μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία. Παρόλο αυτά η μεταφορά του χαλκού μεταξύ των HAH1 και MNK2/MNK5 είναι ξεκάθαρη υποδεικνύοντας ότι γίνεται αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών. Είναι πιθανό και στην περίπτωση των ανθρώπινων πρωτεϊνών να σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο προϊόν με τον χαλκό (I) να εντάσσεται από την μία ή και τις δύο κυστεΐνες και των δύο πρωτεϊνών (όπως συμβαίνει στις βακτηριακές και ευκαρυωτικές πρωτεΐνες) εξυπηρετώντας τη μεταφορά του χαλκού. Όμως το προϊόν αυτό διαχωρίζεται αμέσως μετά την μεταφορά χαλκού λόγω της χαμηλής ενεργειακά αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να μην γίνεται αντιληπτό στα πειράματα NMR.

Από την μελέτη της αλληλεπίδρασης των δυο ανθρώπινων πρωτεϊνών Cu(I)-HAH1 και MNK(4-6) με φασματοσκοπία HSQC προκύπτει ότι ο χαλκός (I) δεν δεσμεύεται τυχαία στις τρεις δομικές περιοχές της MNK(4-6) όπως συμβαίνει με την τιτλοδότηση της πρωτεΐνης Μένκες με χαλκό (I). (Κεφ. 4.2.2.2) Ακόμα και στο στάδιο της τιτλοδότησης όπου η αναλογία Cu(I)-HAH1/MNK(4-6) είναι 3:1 είναι εμφανές ότι οι τρεις δομικές περιοχές έχουν διαφορετική συγγένεια για χαλκό (I) και από αυτές η τέταρτη περιοχή δεσμεύει το μεταλλικό ιόν όταν αυτό απελευθερώνεται από τον μεταφορέα HAH1. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε και από τα πειράματα χημικής επισήμανσης με το φθορίζον CPM στο πρωτεϊνικό μίγμα: Cu(I)-HAH1 και της πρωτεολυμένης MNK(4-6) με τρυψίνη. (Κεφ. 4.5.2) Μια από τις μπάντες της πρωτεολυμένης MNK(4-6) εξαφανίζεται υποδηλώνοντας ότι υπάρχει επιλεκτική μεταφορά χαλκού από την HAH1 στην MNK(4-6).

Από την σύγκριση των σημάτων της αλανίνης 68 στα φάσματα HSQC της apo-MNK(4-6), Cu(I)-MNK(4-6) και MNK(4-6) παρουσία Cu(I)-HAH1 σε αναλογία 1:3 καθώς και των σημάτων του ασπαρτικού οξέος 10 προκύπτει ότι (Σχήμα 74) τα σήματα των δύο καταλοίπων 10 και 68 κατά την αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών δεν αντιστοιχούν στην apo ή την *holo* μορφή της πρωτεΐνης Μένκες αλλά έχουν εντελώς καινούργιες χημικές μετατοπίσεις υποδηλώνοντας την δημιουργία ενδιάμεσου προϊόντος MNK(4-6)-Cu(I)-HAH1. Αυτό σημαίνει ότι κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ της Cu(I)-HAH1 και της τριπλής περιοχής MNK(4-6) η μεταφορά του χαλκού μέσω της τέταρτης δομικής περιοχής είναι γρήγορη στη χρονική κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων δηλαδή ακριβώς αντίθετη με αυτή που παρατηρήθηκε στις αλληλεπιδράσεις HAH1/Cu(I)-MNK2 και Cu(I)-HAH1/MNK5.

4) Και στις δύο πρωτεΐνες MNK<sub>r</sub>2 και MNK<sub>r</sub>5, το ηλεκτροστατικό φορτίο των επιφανειών τους δεν είναι αρκετά συμπληρωματικό με αυτό της πρωτεΐνης HAH1 όπως συμβαίνει στο σύστημα Atx1-Ccc2 [199] κάνοντας απίθανο τον σχηματισμό ενδιάμεσου προϊόντος MNK-Cu(I) HAH1. Έτσι από τα σήματα NMR, κατά την διάρκεια της τιτλοδότησης, παρατηρείται μόνο μεταφορά χαλκού από τη μία πρωτεΐνη στην άλλη. Στην ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης MNK<sub>r</sub>5 (pI= 6,4) (Σχήμα 75) πλεονάζει το αρνητικό φορτίο λόγω της ύπαρξης πολλών κατάλοιπων γλουταμινικού οξέος σε αντίθεση με την επιφάνεια της MNK<sub>r</sub>2 (pI= 8,7) (Σχήμα 76) όπου πλεονάζει το θετικό φορτίο. Από ομολογιακή μοντελοποίηση των υπόλοιπων τεσσάρων περιοχών ένταξης μεταλλικού ιόντος MNK<sub>r</sub>1, MNK<sub>r</sub>3, MNK<sub>r</sub>4, MNK<sub>r</sub>6 της πρωτεΐνης Μένκες προκύπτει ότι οι επιφάνειες παρουσιάζουν εντελώς διαφορετική κατανομή ηλεκτροστατικού φορτίου (Σχήμα 77) και ίσως η διασύνδεση τους με το ένζυμο Cu(I)-HAH1 να διαφοροποιείται για κάθε περιοχή. Η περιοχή MNK<sub>r</sub>4 έχει ισοηλεκτρικό σημείο παραπλήσιο με αυτό που έχουν οι δύο δομικές περιοχές της πρωτεΐνης Ccc2 (4.0-4.5). [199] Το ηλεκτροστατικό φορτίο της επιφάνειας της τέταρτης δομικής περιοχής μπορεί να επιτρέπει την διασύνδεση της με την συνοδό HAH1 και αυτός να είναι ο λόγος που παρατηρείται στα πειράματα NMR επιλεκτική μεταφορά χαλκού (I) στην MNK<sub>r</sub>4 περιοχή. Αξιοσημείωτο είναι ότι πρόσφατα έχει δημοσιευτεί ότι και στην ανθρώπινη πρωτεΐνη Γουίλσον (που είναι σε υψηλή ομολογία με την Μένκες) οι περιοχές που αλληλεπιδράν επιλεκτικά με την HAH1 είναι η δεύτερη και η τέταρτη. [220,221]

Η παραπάνω εικόνα των ηλεκτροστατικών επιφανειών έρχεται σε αντίθεση με αυτήν που παρατηρείται στα βακτήρια. [213] Στην επιφάνεια του μεταφορέα χαλκού CopZ ( Σχήμα 82) γύρω από την περιοχή ένταξης του χαλκού(I) επικρατεί αρνητικό φορτίο σε αντίθεση με το ανθρώπινο ένζυμο HAH1. Στην πρωτεΐνη CopA, στην οποία μεταφέρεται ο χαλκός από την CopZ, (αντίστοιχη της ανθρώπινης πρωτεΐνης Μένκες) υπάρχουν αρκετά κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης στην θέση ένταξης που δημιουργούν περίσσεια θετικού φορτίου.



**Σχήμα 80:** Ηλεκτροστατικά φορτία στις επιφάνειες του συνοδού χαλκού (I) copZ και στην ATPάσε CopA στα βακτήρια. Τα θετικά, αρνητικά και ουδέτερα φορτισμένα αμινοξέα απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και άσπρο αντίστοιχα.

5) Στα πειράματα αποκατάστασης  $^{15}\text{N}$ , που έγιναν στην πρωτεΐνη MNK(4-6), βρέθηκε διαφορετική δυναμική συμπεριφορά στις διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης. Η τέταρτη περιοχή MNK4, περιστρέφεται στο διάλυμα πιο ελεύθερα από τις άλλες δυο όπως φαίνεται από τις υψηλές τιμές  $R_2$  και χαμηλές  $R_1$ . Ο χρόνος περιστροφής της MNK4 όπως υπολογίστηκε από τον λόγο  $R_2/R_1$  είναι αρκετά πιο χαμηλός από τον αντίστοιχο της περιοχής MNK5 και MNK6 :  $7.1 \pm 0.3$ ,  $12.8 \pm 1.3$  και  $10.8 \pm 1.3$  ns για τις περιοχές 4, 5 και 6 αντίστοιχα. Η τιτλοδότηση της από MNK(4-6) με χαλκό (I) (αναλογία 1:3) μειώνει την ελευθερία περιστροφής της περιοχής MNK4 όπως φαίνεται από την αύξηση του αντιστοίχου χρόνου περιστροφής από  $7.1 \pm 0.3$  σε  $8.3 \pm 0.6$  ns. Αντίθετα η έκκτη δομική περιοχή παραμένει σχεδόν ανηπερέαστη κατά την τιτλοδότηση με χαλκό (I) ενώ ο περιορισμένος αριθμός σημάτων για την πέμπτη περιοχή στο φάσμα  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC της Cu(I)- MNK(4-6) κάνει σχεδόν αδύνατον τον υπολογισμό του χρόνου περιστροφής για την MNK5. Κατά την παρουσία της Cu(I)-HAH1 μειώνεται ο σχετικός χρόνος περιστροφής της τέταρτης περιοχής αλλά όχι τόσο πολύ όσο παρατηρήθηκε κατά την τιτλοδότηση με χαλκό (I). Αντίθετα οι περιοχές MNK5 και MNK6 κατά την παρουσία της Cu(I)-HAH1 περιστρέφονται πιο γρήγορα όπως παρατηρείται από την μείωση των σχετικών χρόνων περιστροφής τους που είναι  $1.4 \pm 2.4$  και  $1.0 \pm 1.9$  ns αντίστοιχα.





## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Linder, M.C. *Biochemistry of Copper* Plenum N.Y 1991
- [2] Λογοθέτη Ιωάννη ΝΕΥΡΩΛΟΓΙΑ Κεφ34 σελ.617-618
- [3] Olivares, M. and Uauy, R. *Am. J. Clin Nutr.* 63 791S-796 .1996
- [4] Robert W. Hay «ΒΙΟ-ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ» Μετάφραση Ε.Μανέση –Ζουπα Ράπτης Κεφ 1 σελ.13 1987
- [5] Νικόλαος Χατζηλιάδης ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ II κεφ.2 σελ.41-43 1999
- [6] DiDonato, M., and Sarkar, B. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1360(1), 3-16.
- [7] ΜΙΧΑΗΛ. ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗΣ «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ» Κεφ 22 σελ.327 1993
- [8] F. Franks (ed) *Protein Biotechnology*, Humana Press. Inc. 1993
- [9] α) Νικόλαος Χατζηλιάδης ΧΗΜΕΙΑ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ κεφ.3 σελ.135-140 1999
- β) Νικόλαος Χατζηλιάδης ΧΗΜΕΙΑ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ κεφ.3 σελ.148-149 1999
- [10] Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze and Lomeli, N. (1998) *Suppl. Am. J. Clin. Nutr.* 67, 965S-971S
- [11] Copper, *National Environmental Health Forum Monographs Metal Series No.3* Report of an International Meeting 1996 Brisbane p10
- [12] Lu, Z.H., Dameron, C.T., and Solioz, M. *Biometals* 16, 137-143 2003
- [13] Wimmer, R., Dameron, C.T., and Solioz, M. *Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology*, pp.527-542 2002
- [14] Cobine, P.A., George, G.N., Jones, C.E., Wickramasinghe, W.A., Solioz *Biochemistry* 41, 5822-5829 2002
- [15] Solioz, M., and Stoyanov, J.V. *FEMS Microbiol. Rev* 27, 183-195 2003
- [16] J. Camakaris, I. Voskoboinik and J.F. Mercer *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 225-232 1999
- [17] Linder, M.C., and Hazegh Azam, M. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797S-811S 1996
- [18] Harris, E.D. *Prog. Clin. Biol Res* 380, 163-179 1993
- [19] Knight, S.A., Labbe, S., Kwon, L.F., Kosman, *Genes Dev.* 10 1917-1929 1996
- [20] Dancis, A., Haile D., Yuan, D.S. and Klausner, R.D. *J. Biol. Chem.* 269 25660-25667 1994

- [21] Zhou, B. and Gitschier, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 7481-7486 1997
- [22] Yamaguchi, I. Y., Serpe, M., Haile, D., Yang, W., Kosman, D. J., Klausner, R. D. and Dancis *J. Biol. Chem* 272 17711-17718 1997
- [23] Lin, S. J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V., and Culota, V. C. *J. Biol. Chem* 272 9215-9220 1997
- [24] Linder, M. C., and Goode C. A. *Biochemistry of Copper Biochemistry of elements* Plenum Press 1991
- [25] Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L. and Beyereuther *Science* 271 1406-1409 1996
- [26] Brown D. R., Qin, K., Hems, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome *Nature* 390 684-687 1997
- [27] Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. *Biochemistry* 37, 7185-7193 1998
- [28] Prince, R. C. and Gunson, D. E. *TIBS* 23, 197-198 1998
- [29] Brown D. R., Schmidt, B., and Kretschmar, H. A. *J. Neurochem*, 70, 1686-1693 1998
- [30] Wadsworth, J. D. F., Hill, A. F., Joiner, S., Jackson, G. S., Clarke, A. R. and Collinge, J. *Nature Cell Biol.* 1, 55-59 1999
- [31] Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L. and Beyereuther K. *Biochem. Pharmacol.* 54 533-539 1997
- [32] Kretschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Strubbebine, W. H., Prusiner, S. B., and DeArmond S. J. *DNA* 5 315-324 1986
- [33] Hornshaw, M. P., McDermott, J. R., Candy, J. M., and Lakey, J. H. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 214, 993-999 1995
- [34] Freedman, J. H. and Pesisach. *J. Biochem. Biophys. Res Commun.* 164, 134-140 1989
- [35] Presta, A., and Stillman, M. J. *Chirality* 6, 521-530 1994
- [36] Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P., Cizewski, Culota, V., Penner-Hahn, J. E. and O'Halloran, T. V. *Science* 278, 853-856 1997
- [37] Srinivasan, C., Posewits, M. C., George, G. N., and Winge, D. R. *Biochemistry* 37 7572-7577 1998
- [38] Portnoy, M. E., Rosenzweig, A. C., Rae, T., Huffman, D. L., O'Halloran, T. V. and Cizewski Culota V. *J. Biol. Chem.* 271, 15041-15045 1999
- [39] Lin, S. J. and Culota V. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 3784-3788 1995

- [40] Klomp, L. W., Lin, S. J., Yuan, D. S., Klausner, R. D., Culotta, V. C. and Gitlin, J. D. *J. Biol. Chem.* 272 9221-9226 **1997**
- [41] Rosenzweig, A. C., Huffman, D. L., Hou, M. Y., Wernimont, A. K., Pufahl, R. A. and O'Halloran, T. V. *Structure in press* **1999**
- [42] Yuan, D. S., Dancis, A. and Klausner, R. D. *J. Biol. Chem.* 272.25787-25793 **1997**
- [43] Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A. *J. Biol. Chem.* 271, 14504-14509 **1996**
- [44] Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A. *J. Biol. Chem.* 271, 20531-20535 **1996**
- [45] Culotta V., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krens B. and Gitlin, J. D. *J. Biol. Chem.* 272, 23469-23472 **1997**
- [46] Casareno, R. L., Waggoner, D., and Gitlin, J. D. *J. Biol. Chem.* 273, 23625-23628 **1998**
- [47] Corson, L. B., Strain, J. J., Culotta, V. C., and Cleveland, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 6361-6366 **1998**
- [48] Petris, M. J., J. F. Mercer, J. C. Culvenor, P. Lockhart, P. A. Gleeson, J. Camakaris *EMBO J.* 15, 6084-6095 **1996**
- [49] Schaefer, M. et al. *Gastrointest. Liver. Physiol.* 39, G639-G646 **1999**
- [50] Julian, F. B., Mercer *TRENDS in Molecular Medicine* Vol. 7 No 2 **2001**
- [51] Solioz, Marc and Christopher Vulpe *TIBS* 21 237-241 **1996**
- [52] a) Pedersen, P. L. and Carafoli, E. *Trends Biochem. Sci.* 12, 186-189 **1987**  
 b) Pedersen, P. L. and Carafoli, E. *Trends Biochem. Sci.* 12, 146-150 **1987**
- [53] Tsai, K. L., Yon, K. P. and Lynn, A. R. *J. Bacteriol.* 174, 116-121 **1992**
- [54] Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R., and Solioz, M. *Ann. New York Acad. Sci.* 671, 484-486 **1992**
- [55] Inesi, G., and Kirtly, M., R. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 271-283 **1992**
- [56] Fagan, M., J., and Saier, M. H., Jr. *J. Mol. Evol.* 38, 57-99 **1994**
- [57] Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. *Biochemistry* 34 15607-15613 **1995**
- [58] C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura, H. Ogawa, *Nature* 405 647 **2000**
- [59] G. A. Scarborough, *J. Exp. Biol.* 203 147 **2000**
- [60] N. Fateni, B. Sarkar *Inorganica Chimica Acta.* 339 179-187 **2002**
- [61] A. Odermatt, H. Suter, R. Krapf, M. Solioz *J. Biol. Chem.* 268 12775 **1993**
- [62] D. Fu, T. J. Beeler, T. M. Dunn, *Yeast* 11 283 **1995**
- [63] K. Tabata, S. Kashiwagi, H. Mori, C. Ueguchi, T. Mizuno, *Biochim. Biophys. Acta* 1326 1 **1997**

- [64] Y.Sambongi,T.Wakabayashi,T.Yoshimizu.H.Omote,T.Oka,M. Futai,J.Biochem 121 1169 1997
- [65] M.D.Adams, S.E. Celniker,R.A., Holt, C.A Evans,I.D.Gocayne,P.G.Amanatides *Science* 287 2185 2000
- [66] J.Wu, J.R.Forbes,H.S.Chen, D.W.Cox, *Nat.Genet* 7 541 1994
- [67] S.Lutsenko, K.Petrukhin,,M.J. Cooper,C.T.Gillian,J.H.Kaplan, *J.Biol.Chem.*272 18939 1997
- [68] M.DiDonato S.Narinndrasorasak,J.R. Forbes D.W.Cox,B. Sarkar *J.Biol.Chem.* 272 33279 1997
- [69] M.DiDonato,J.Zhang,L.Que,Jr.,B.Sakar, *J.Biol.Chem* 31 2002
- [70] M.Ralle,M.J.Cooper,S.Lutsenko,N.J. Blackburn, *J.Am.Chem.Soc.*120 13525 1998
- [71] M.DiDonato H.F.,Hsu S.Narindrasorasak ,L. Que. Jr., B. Sarkar *Biochem* 39 1890 2000
- [72] R.Tsivkovskii,B.C.MacArthur,S.Lutsenko, *J.Biol.Chem* 276 2234 2001
- [73] J.R.Forbes,G,Hsi,D.W Cox *J.Biol.Chem* 274 12408 1999
- [74] D.Strausak,S.La Fontaine,J.Hill,S.D.Firth,P.J.Lockhart, J.F.Mercer, *J.Biol.Chem* 274 11170 1999
- [75] D.Larin ,C.Mekios,K.Das B.Ross, A.S.Yang,T.C.Gilliam, *J.Biol.Chem* 274 28497 1999
- [76] I.Hamza,M.Scafer,L.W. Klomp,J.D Gitlin,Proc.Natl.Acad.Sci. 96 13363 1999
- [77] Solioz, M., and Odermatt,A. *J.Biol.Chem* 270 9217-9221 1995
- [78] Wyler Dunda,P., and Silioz,M.*FEBS Lett.*399, 143-146 1996
- [79] Yuan,D.S., Stearman,R., Dancis,A.,Dunn,T.,Beeler,T., and Klausner,R.D. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92,2632-9636 1995
- [80] Payne A.S., and Gitlin, J.D. *J.Biol.Chem.*273, 3765-3770 1998
- [81] Forbes,J.R., and Cox D.W. *Am. J. Hum. Genet.* 63 1663-1674 1998
- [82] Iida M. Terada,K., Sambongi, Y., Wakabayashi,T., Miura,N. Koyama K.Futai,M., and Sugiyama,T. *FEBS Lett.*428 281-185 1998
- [83] Borjigin,J., Payne,A.S., Deng,J., Li,X., Wang,M.M., Ovodenko,B., Gitlin,J.D., and Synder,S.H. *J.Neurosci* 19 1018-1026 1999
- [84] Voskoboink,I., Brooks,H.,Smith,S., Shen,P., and J.Camakaris *FEBS Lett.*435, 178-182 1998

- [85] Carafoli,E.*Physiol. Rev.* 71,129-153 1991
- [86] MacLennan,D.H.,Rice ,W.J., and Green,N.M. *J.Biol.Chem* 272, 28815-28818 1997
- [87] Toyoshima,C.,Naasako,M.,Nomura,H., and Ogawa,H. *Nature* 405, 647-655 2000
- [88] Voskoboinik,I Jasmine Mar, Daniel Strausak and J.Camakaris *J.Biol.Chem* 276, 28620-28627 2001
- [89] a)Voskoboinik,I, Daniel StrausakD. Greenough, M., Brooks, H., Pertis M., Smith,S.Mercer,J.F., and J.Camakaris *J.Biol.Chem.* 274, 22008-22012 1999
- [90] La Fontaine, S.D., Firth P.J., .Lockhart, Brooks, H., Camakaris J., and Mercer.J.F Humm.*Mol.Gen.*8,1069-1075 1999
- [91] Tumer,Z., Lund,C., Tolshave,J., Vural.B., Tonnesen,T., and Horn.N. *Am.J.Hum.Genet.*60 63-71, 1997
- [92] Herman A.Dierick, Loreta Ambrosini James Spencer, Thomas Thomas W.Glover, and Julian F.B.Mercer *Genomics* 28, 462-469 1995
- [93] Fisher,H.D., Dodgson, J.B Hughes,S., Engel, J.D *Natl. Acad. Sci.* 604-606 1984
- [94] Petrukhin, K., Lutsenko,S., Chernov,I., Ross, B.M., Kaplan, J.H., and Gilliam.T.C.*Hum.Mol.Genet.*3: 1647-1656 1994
- [95] Kaler, S.G., Gallo, L.K.,Proud, V.K., Percy,A.K., Mark,Y.,Segal,N.A., Goldstein,D.A., Holmes,C.S., and Gahl,W.A. *Nature Genet*,8: 195-202 1994
- [96] Das,S. Levinson,B., Whitney, S., Vulpe,C., Packman ,S., and Gitchier,J *Am.J.Hum.Genet.*55:883-889 1994
- [97] Voskoboinik,I J.Mar and J.Camakaris *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 488-494 2003
- [98] F.M. Gribble,G.Loussouarn, S.J. Tucker,D.Zhao,G.C.Nichols,F.M.Ashcroft *J.Biol.Chem.* 275, 30046-30049 2000
- [99] A.S.Payne,E.J., Kelly,J.D.Gitlin ,*Proc.Natl.Acad.Sci.*95 10854-10859 1998
- [100] R.A. Farley, E.Elquaza, J.Muller-Ehmsen, D.J.Kane, A.K.Nagy,V.N.Kasho,L.D., Faller, *Biochemistry* 40 6361-6370 2001
- [101] R.A. Farley, E.Elquaza, J.Muller-Ehmsen, D.J.Kane, A.K.Nagy,V.N.Kasho,L.D., Faller, *Biochemistry* 36 941-951 1997
- [102] V.N.Kasho, M.Stengelin, I.N.Smirnova, L.D.Faller, *Biochemistry* 36 8045-8052 1997
- [103] F.Portillo,*Biochim.Biophys.Acta* 1468 99-106 2000

- [104] J.V.Moller,B.Juul,M.Ie Maire, *Biochim.Biophys.Acta* 1286 1-51 **1996**
- [105] M.J. Petris, I.Voskoboinik M. Cater,K. Smith B.E.Kim, R.M. Lianos, d.Strausak, J.Camakaris, and J.F.Mercer., *J.Biol.Chem* 277, 46736-46742 **2002**
- [106]L.B.Moller,Z.Tumer,C.Lund,C.Petersen,T.Cole,R.Hanusch,J.Seidel,L.R.Jensen,N. Horn, *Am.J.Hum.Genet.*66 1211-1660 **2000**
- [107] Menkes, J.H., Alter, M., Steigleder,G.K., Weakly,D.R.and Sung, J.H. *Pediatrics* 29,764-779 **1962**
- [108] Danks, D.M., Cambell,P.E.,Stevens, B.J., Mayne, V. and Cartwright,E. *Pediatrics* 50,188-201 **1972**
- [109] Danks, D.M., *Inorg.Perspect.Biol.Med.* 1,73-100 **1977**
- [110] Danks, D.M. Stevens, B.J., Cambell,P.E, Gillespie, J.M., Walker-Smith, J., Blomfield,J. and Turner,B. *Lancet* 1, 1100-1102 **1972**
- [111] Danks, D.M., Cartwright,E. Stevens, B.J., and Townley,R.R.W. *Science* 179, 1140-1142 **1973**
- [112]Herd, S.M., Camakaris, J., Christofferson, R. and Wookey, P. *Biochem.J.*247,341-347 **1987**
- [113]Goka, T.J., Stevenson,R.E., Hefferan, P.M. and Howell,R.R. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*73, 604-606 **1976**
- [114] Cham,W.Y.,Garnica,A.D. and Rennert,O.M. *Clin.Chim.Acta* 88,495-507 **1978**
- [115] Beratis, N.G., Price, P., Labadie,G. and and Hirschhorn, K. *Pediatr.Res.* 12, 699-702 **1978**
- [116] Onishi, T., Inubushi,H. Tokugawa,S., Muramatsu, M., Nishiwaka,K., Suzuki,Y. and Miyao, M. *Eur.J.Pediatr.*134, 205-210 **1980**
- [117] Riordan,J.R., and Joliceur-Paquet, L. *J.Biol.Chem.*257, 4639-4645 **1982**
- [118] Kodama,H., Okabe,I., Yanagisawa,M. and Kodama, Y. *J.Inher.Metab.Dis.* 12,326-334 **1989**
- [119] Menkes, J.H. *Brain.Dev.*10, 70-77 **1988**
- [120] Danks, D.M. *Disorders of Copper Transport in Metabolic Basis of Inherited Disease* pp.2211-2235 **1995**
- [121] Kuivaniemi, H., Peltonen ,L., Palotie, A. Kaitila,I. and Kivirikko, K.I. *J Clin. Invest.* 6, 730-733 **1982**

- [122] Peltonen, L., Kuivanieni, H., Palotie, A., Horn, N., Kaitila, I. and Kivirikko, K.L. *Biochemistry* 22, 6156-6163 **1983**
- [123] Bankier, A. *J. Med. Genet.* 32, 213-215 **1995**
- [124] Phillips, M., Camakaris, J. and Danks, D.M. *Biochem. J.* 238, 177-183 **1986**
- [125] Tumer, Z., Chelly, J., Tommeryp, N., Ishikawa-Brush, Y., Tonnesen, T., Monaco, A.P. and Horn, N. *Hum. Mol. Genet.* 1 483-489 **1992**
- [126] Tumer, Z., Tommerup, N., Tonneson, T., Kreuder, J., Craig, I.W. and Horn, N. *Hum. Genet* 88, 668-672 **1992**
- [127] Chelly, J., Tumer, Z., Tonneson, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N. and Monaco, A.P. *Nat. Genet.* 3, 14-19 **1993**
- [128] Mercer, J.F.B., Livingston, J., Hall, B., Paynter, J.A., Begy, C., Chandrasekharappa, S., Lockhart, P., Grimew, A., Bhave, M., Siemieniak, D. and Glover, T.W. *Nat. Genet.* 3, 20-25 **1993**
- [129] Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S. and Gitshier, J. *Nat. Genet.* 3, 7-13 **1993**
- [130] Das S., Levinson, B., Whitney, S., Vulpe, C., Packman, S. and Gitshier, J. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 883-889 **1994**
- [131] Kaler, S.G., Gallo, L.K., Proud, V.K., Percy, A.K., Mark, Y., Segal, N.A., Goldstein, D.S., Holmes, C.S., Gahl, W.A. *Nat. Genet.* 8, 195-202 **1994**
- [132] Das S., Levinson, B., Vulpe, C., Packman, S. and Gitshier, J. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 570-576 **1995**
- [133] Byers, P.H., Signel, R.C., Holbrook, K.A., Narayanan, S., Bornstein, P. and Hall, J.G. *New Eng. J. Med.* 303, 61-65 **1980**
- [134] Garnica, A.D. *Eur. J. Pediatr.* 142, 98-102 **1984**
- [135] Sarkar, B. In (IUPAC) *Coordination Chemistry-20*, Pergamon Press, Oxford and New York, p191-200 **1980**
- [136] Sarkar, B. and Kruck, T. *Copper Amino Acid Complexes in Human Serum in Biochemistry of Copper* Academic press, pp.183-196 **1966**
- [137] Mas, A. and Sarkar, B. *Biochim. Biophys. Acta* 1135, 123-128 **1992**
- [138] Katz, B.M. and Barnea, A. *J. Biol. Chem.* 265, 2017-2021 **1990**
- [139] Orena, S.J., Goode, C.A. and Linder, M.C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 822-829 **1986**



- [140] Banesa,A, and Katz, B.M. *J.Inorg.Biochem.*40, 81-93 **1990**
- [141] Sherwood,G., Sarkar,B. and Sass-Kortsak, A. *J.Inher.Metab.Dis.*12, 393-396 **1989**
- [142] Sarkar,B., Lingertat-Walsh,K. and Clarke, J.T.R. *J.Pediatr.* 123,828-832 **1993**
- [143] Kreuder,J., Otten, A., Fuder,H., Tumer,Z., Tonneson, T., Horn, N. and Dralle, D. *Eur.J.Pediatr.* 152, 828-832 **1993**
- [144] Tumer,Z, Horn, N., Tonneson, T Christodoulou,J., Clarke,J.T.R and Sarkar, B. *Nat.Genet.*12 11-13 **1996**
- [145] Royce, P.M., Camakaris, J., Mann, J.R. and Danks,D.M. *Biochem. J.* 202,369-371 **1982**
- [146] Hunt,D.M. *Nature* 249,852-854 **1974**
- [147] Danks, D.M. *J.Med.Genet.* 23, 99-106 **1986**
- [148] Mercer J.F.B., Grimes,A., Ambrosini,L., Lockhart,P., Paynter,J.A., Dierick,H. and Glover, T.W. *Nat.Genet.* 6,375-378 **1994**
- [149] Wilson, S.A.K. *Brain* 34,295-509 **1912**
- [150] Scheinberg, I.H., and Stenilieb,I. *Wilson Disease*, Philadelphia, Saunders **1984**
- [151] Owen, C.A.Jr. *Physiological Aspects of Copper, Copper in Organs and Systems* **1982**
- [152] Goode C.A. *Cooper and Disease in Biochemistey of Copper*.M.C. Linder, Plenum Press, NY. PP331-366 **1991**
- [153] Mowat,A.P. *Liver Disorders in Childhood* Butterworth-Heinemann, **1994**
- [154] Dobyns,W.B., Goldstein,N.P., Gordon, H. Mayo *Clin.Proc.*54, 35-42 **1979**
- [155] Huziker,P.E. and Sternlieb, I. *Eur.J.Clin.Invest.* 21, 466-471 **1991**
- [156] Sarkar, B. *Copper in Handbook of Metals in Clinical and Analytical Chemistry* pp 339-347 **1995**
- [157] Strickland, G.T., Frommer,D., Leu, M-L., Pollard, R., Sherlock, S. and Cumings,J.N., *J.Med.New Series* XLII 619-638 **1973**
- [158] Strickland, G.T., and Leu, M-L., *Medicine*, 54, 113-137 **1975**
- [159] Walshe,J.M. *Quart.J.Med.New.Series.*70, 253-263 **1989**
- [160] Barow, L., and Yanner M.S. *Eur.J.Clin.Invest.* 18 555-560 **1988**
- [161] Sato,M.and Gitlin, J.D. *J.Biol.Chem.*266,5128-5134 **1991**
- [162] Marceau,N. and Aspin, N. *Biochim.Biophys. Acta* 328,338-350 **1973**

- [163] Hilton, M., Spenser,D.C., Ross, P., Ransey, A. and McArdle, H.J. *Biochim.Biophys. Acta* 1245,153-160 1995
- [164] Rosser,h.p., Lee,G.R., Nacht,S.a nd Cartwright,G.E. *J.Clin.Invest.* 49, 2408-2416
- [165] Frieden,E. *Clin.Physiol.Biochem.*4,11-19 1986 \
- [166] Harris,Z.L.,Takahashi,Y., Miyajima,H., Serizawa,M., MacGillivary,R.T.A. and Gitlin,J.D. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 92, 2539-2543 1995
- [167] Denny-Brown,D. and Porter,H. *New.Eng.J.Med.* 245,917-925 1951
- [168] Cartwright,G.E., Hodges,R.E., Gubler,C.J., Mahoney, J.P., Daum, K., Wintrobe,M.M. and Beam,W.B. *J.Clin Nutr.*34, 1670-75 1954
- [169] Washe,J.M. *Am.J.Med.*21, 487-495 1956
- [170] Sass-Kortsak,A. *Ped.Clin.N.Am.* 22,963-984 1975
- [171] Sass-Kortsak,A *Hepatolenticular Degeneration in Handbuch der inneren Medizin*, Berlin pp 627-665 1974
- [172] Scheinberg,ICH. *Postgrad.Med.J ,Suppl.*pp11-14 1968
- [173] Glass,J.D., Reich,S.G., Mahlon,R. and DeLong,M.R. *Arch.NEUROL.* 47,595-596 1990
- [174] Brewer,G.J., Turkay,A. and Yuzbasiyan-Gurkan,V. *Arch.Neurol.* 47, 304-305 1994
- [175] Washe,J.M. *Lancet* 1,643-647 1982
- [176] Scheinberg,I.H. Jaffe,M.E.a nd Sternlieb,I. *N.Eng.J.Med.* 317,209-213 1987
- [177] Alexiou ,D., Hatsis,T. and Koutselelinis,A. *Arch.Fr.Pediatr.*42, 447-449 1985
- [178] Caillie-Betrend,M.V., Gegenhert,H.J., Visser,H.K.A., Sinaasapel,M. and Bouquet, J. *Arch Dis.Childh.* 60,656-659 1985
- [179] Hoogenraad,T.U., Van-denHamer,C.J., Koevoet,R. and Korver,E.G. *Lancet* 2, 1262 1978
- [180] Hoogenraad,T.U., Koevoet,R. and Korver,E.G *Eur.Neurol.*18, 205-211 1979
- [181] Davesa,R., Alvarez,A., se las Heras, G. and de Miguel, J.R. *J.Pediatr.Gastro.Nutr.* 20,102-103 1995
- [182] Yuzbasiyan-Gurkan,V., Grider,A., Nostrant,T., Cousins R.J. amd Brewer ,G.J. *Lab.Clin.Med.* 120 380-286 1992
- [183] Lipsky,M.A. and Gollan,J.L. *Hepatology* 7 593-595 1987
- [184] Schilsky,M.L., Scheinberg,I.H. and Sternlieb,I. *Hepatology* 16 50a 1992

- [185] Lazzof S.F.,Rybak, JJ,Perker BR,Luzzati L Birth Defects Orig Artic Ser11:71-74  
**1975**
- [186] Tsukahara M, Imaizumi K, Kawai S, Kajji *Clin Genet* 45:32-35 **1994**
- [187] Moller LB., Tymer Z, Lund C, Petersen C, Cole T, Hanusch R, Seidel J, Jensen LR,Horn *Am J Hum Genet* 66:1211-1220 **2000**
- [188] Levinson B, Conant R, Schnur R, Das S, Packman S., Gitschier *Hum.Mol.Genet.* 5: 1737-1742 **1996**
- [189] Ronce N, MorizardMP, Robb L,Toutain A, Villard L, Moraine *Am J Hum Genet* 61: 233-238 **1997**
- [190] Qi M, Byers PH *Hum.Mol.Genet.* 7: 465-469 **1997**
- [191] Gu YH,Kodam H, Murata Y, Mochizuki D, Yanagawa Y, Ushijima H, Shiba *Am.J.Med.Genet.* 99 217-222 **2001**
- [192] Susan L.Dagenais, Ayla N. Adam, Jeffrey W. Innis and Thomas W. Glover *Am J Hum Genet* 69:420-427 **2001**
- [193] Fleischmann,R.D, Adams,M.D, WhiteO., Clayton,R.A., Kirkness,E.F., Kerlavage,A.R., Bult,C.J., Tomb, J.F *Science* 269,496-512 **1995**
- [194] Marti-Renom,M.A., Stuart, A.C., Fiser, A., Sanchez,R., Melo,F., Sali A. *Annu.Rev.biophys.biomol.Sruct.*, 29, 291-325 **2000**
- [195] Vitkup,D., Melannud, Moulton, J. Sander,C. *Nat.Struct.Biol.*, 8,559-556 **2001**
- [197] ThomasV O Halloran and Valeria Cizewski Culota *Journal of Biological Chemistry* Vol.2175, No 33, pp. 2057-25060, **2000**
- [198] Lucia Banci, Ivano Bertini, Simone Ciofi-Banffoni, David L, Huffman and Thomas V.O Halloran *Journal of Biological Chemistry* Vol.276, No11, pp 8415-8426 **2001**
- [199] Fabio Arnesano, Lucia Banci, Ivano Bertini,Francesca Cantini, Simone Ciofi-Baffoni, David L, Huffman and Thomas V.O Halloran *Journal of Biological Chemistry* Vol 276 pp 41365-41376, **2001**
- [200] Wernimont,A.K., Huffman,D.L Lamb, A.L. Pufahl, O Halloran,T.V and R.A. Rosenzweig,A.C *Nat.Stuct.Biol.* 7, 766-771 **2000**
- [201] Mullis,K. and Faloona,F. *In methods in enzymology*, Vol 155, p.335 Academic Press, New York and London **1987**

- [202] Kleppe,K., Ohstuka, E.,Kleppe,R., Molineux,L.,Khorana,H.G. *Journal of Molecular Biology*, 56,341 1971
- [203] Panet, A. and Khorana,H.G. *Journal of Biological Chemistry* 249, 5213-21,1974
- [204] Lubert Stryer *BIOXHMEIA I* Κεφ 6 σελ 129 1997
- [205] ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ *BIOXHMEIA* John M. Clark, Jr and Robert L.Switzer σελ. 46-47 1992.
- [206] Jane Gitschier, Barbara Moffat, Dorothea Reilly, William. I. Wood and Wayne J.Fairbrother *Nature Structural Biology* Vol 5 number 1 1998
- [207] Manfred J.Sipl *PROTEINS Structure, Function and Genetics* 17:355-362 1993
- [208] Lucia Banci, Ivano Bertini, Rebecca Del Conte, Mariapina D'Onorfio and Antonio Rosato *Biochemistry* 43, 3396-3403 2004.
- [209] Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στη Βιοανόργανη Χημεία  
Υπεύθυνος Καθ. Νικόλαος Χατζηλιάδης κεφ. 1.4.2 σελ. 42-45 Ιωάννινα 2002
- [210] Christopher E.Jones, Norelle L.Daily, Paul A.Cobine, David J.Craik, and Charles T. Dameron *Journal of Structural Biology* 143 209-218 2003.
- [211] Michael Sattler, *Structural & Computational Biology EMBL Heideberg* p.9 2001
- [212] Fabio Arnesano, Lucia Banci, Ivano Bertini, Simone Ciofi-Baffoni, Elena Molteni, David Huffman, and Thomas V. O' Halloran *Genome Research* 12: 255-271 2002.
- [213] Lucia Banci, Ivano Bertini, Simone Ciofi-Baffoni, Mariapina D'Onofrio, Leonardo Coneli, Frutos Carlos Marhuenda Egea and Francisco Javier Ruiz-Duenas *J.Mol.Biol.* 317, 415-429 2002
- [214] Martina Ralle, Svetlana Lutsenko and Ninian J.Blackburn *Journal Of Biological Chemistry* Vol278, N025, pp23163-23170 2003.
- [215] Cobine, P.A., George, G.N., Winzor, D.J., Harrison, M.D., Mpgahaddas,S., Dameron,C.T., *Biochemistry* 39,6857-6863 2000.
- [216] α) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ Ι.Π.Γεροθανάση Ιωάννινα 1998
- β) Michael Sattler, *Structural & Computational Biology EMBL Heideberg* p.12 2001
- [217] Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S,Del Conte R, Gonnelli L. *Biochemistry* 42 (7): 1939-1949 2003

- [218] Walker JM, HusterD, Ralle, M,Morgan CT,Blackburn NJ,Lutsenko S. *J.Biol.Chem.* 279 (13) :12269-12276 **2004**
- [219] Banci L., Bertini I., Del Conte R, Markey,J. And Ruiz-Duenas, F.J. *Biochemistry* 40 : 15660 15668 **2001**
- [220] Walker, J.M., Huster, D., Ralle,M., Morgan, C.T., Blackburn, N.J. and Lutsenko, S. *J.Biol.Chem.* 279, 15376-15384 (**2004**)
- [221] Van Dongen, E.M. Klomp, L.W., and Mekx, M. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 323, 789-795 (**2004**)

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕΝΚΕΣ. (Κωδ.= NM\_000052.1)

TGCTGCCGCCGCCGAGCCGCAGCTACTGTGACTTCTCCGATTGTGTGAGCTTTGTTGG  
AGCCTGCGTACGTGGATTTATCGCTGCCACGGTCTGCGTAGCTCCAGAGGTTTAACCAT  
AGGATAGAGAAACCAGGAATGTAATGAGGAAATCAAAATGGATCCAAGTATGGGTGTGA  
ATTCTGTTACCATTTCTGTTGAGGGTATGACTTGCAATTCCTGTGTTTGGACCATTGAG  
CAGCAGATTGGAAAAGTGAATGGTGTGCATCACATTAAGGTATCACTGGAAGAAAAAAA  
TGCAACTATTATTTATGACCCTAACTACAGACTCCAAAGACCCTACAGGAAGCTATTG  
ATGACATGGGCTTTGATGCTGTTATCCATAATCCTGACCCTCTCCCTGTTTTAACTGAC  
ACCTTGTTTCTGACTGTTACGGCGTCACTGACTTTGCCATGGGACCATATCCAAAGCAC  
ATTGCTGAAGACCAAGGGTGTGACAGACATTAATAATTTACCCTCAGAAAAGAAGCTGTAG  
CAGTGACAATAATCCCTTCTATAGTGAATGCCAATCAGATAAAAGAGCTGGTTCCAGAA  
CTCAGTTTAGATACTGGGACACTGGAGAAAAAGTCAGGAGCTTGTGAAGATCATAGTAT  
GGCTCAAGCTGGTGAAGTCGTGCTGAAGATGAAAGTGGAAGGGATGACCTGCCATTCA  
GTACTAGCACTATTGAAGGAAAAATTGGGAAACTGCAAGGTGTTTCAGCGAATTAAGTC  
TCCCTGGACAATCAAGAAGCTACTATTGTTTATCAACCTCATCTTATCTCAGTAGAGGA  
AATGAAAAAGCAGATTGAAGCTATGGGCTTTCCAGCATTGTCAAAAAGCAGCCCAAGT  
ACCTCAAATTGGGAGCTATTGATGTAGAACGTCTAAAGAACACACCAGTTAAATCCTCA  
GAAGGGTCACAGCAAAGGAGTCCATCATATACCAATGATTCAACAGCCACTTTTCATCAT  
TGATGGCATGCATTGTAAATCATGTGTGTCAAATATTGAAAGTACTTTATCTGCACTCC  
AATATGTAAGCAGCATAGTAGTTTCTTTAGAGAATAGGTCTGCCATTGTGAAGTATAA  
TGCAAGCTCAGTCACTCCAGAATCCCTGAGAAAAGCAATAGAGGCTGTATCACCGGGGC  
TATATAGAGTTAGTATCACAAGTGAAGTTGAGAGTACCTCAAACCTCTCCCTCCAGCTCA  
TCTCTTCAGAAGATTCCTTTGAATGTAGTTAGCCAGCCTCTGACACAAGAACTGTGAT  
AAACATTGATGGCATGACTTGTAATTCCTGTGTGCAGTCTATTGAGGGTGTGCATATCAA  
AAAAGCCAGGTGTAATAATCCATACGAGTCTCCCTTGCAAATAGCAATGGGACTGTTGAG  
TATGATCCTCTACTAACCTCTCCAGAAACGTTGAGAGGAGCAATAGAAGACATGGGATT  
TGATGCTACCTTGTGACACGAATGAGCCGTTGGTAGTAATAGCTCAGCCTTCATCGG  
AAATGCCGCTTTTGACTTCAACTAATGAATTTTATACTAAAGGGATGACACCAGTTCAA  
GACAAGGAGGAAGGAAAGAATTCATCTAAGTGTTACATACAGGTCCTGGCATGACTTG  
CGCTTCTGTGTAGCAAACATTGAACGGAAATTAAGGCGGGAAGAAGGAATATATTCTA  
TACTTGTGGCCCTGATGGCTGGCAAGGCAGAAGTAAGGTATAATCCTGCTGTTATACAA  
CCCCAATGATAGCAGAGTTCATCCGAGAACTTGGATTTGGAGCCACTGTGATAGAAAA  
TGCTGATGAAGGAGATGGTGTTTTGGAACTTGTGTGAGGGGAATGACGTGTGCCTCCT  
GCGTACATAAAAATAGAGTCTAGTCTCACAAAACACAGAGGGATCCTATACTGCTCCGTG  
GCCCTGGCAACCAACAAAGCACATATTAATAATGACCCAGAAATTATTGGTCCTAGAGA  
TATTATCCATACAATTGAAAGCTTAGGTTTTGAAGCTTCTTTGGTCAAGAAGGATCGGT  
CAGCAAGTCACTTAGATCATAAACGAGAAATAAGACAATGGAGACGGTCTTTTCTTGTG  
AGTCTGTTTTTCTGTATTCTGTAATGGGGCTGATGATATATATGATGGTTATGGACCA  
CCACTTTGCAACTCTTACCATAATCAAAACATGAGTAAAGAAGAAATGATCAACCTT  
CATTCTTCTATGTTTCTGAGCGCCAGATTCTTCCAGGATTGTCTGTTATGAATTTGCT  
GTCCTTTTTTATTGTGTGTACCTGTACAGTTTTTTCGGAGGCTGGTACTTCTACATTGAGG  
CTTATAAAGCACTGAAGCATAAGACAGCAAATATGGACGTAAGTATTGTGCTGGCAACC  
ACCATTGCATTTGCCTACTCTTTGATTATTCTTCTAGTTGCAATGTATGAGAGAGCCAA  
AGTGAACCCTATTACTTTCTTTGACACACCCCCTATGCTGTTTGTGTTTATTGCACTAG  
GCCGATGGCTGGAACATATAGCAAAGGGCAAAACATCAGAGGCTCTTGCAAAGTTAATT  
TCACTACAAGCTACAGAAGCAACTATTGTAACCTTGATTCTGATAATATCCTCCTCAG  
TGAAGAACAAGTGGATGTGGAACCTGTACAACGTGGAGATATCATTAAGTAGTTCCAG

GAGGCAAATTTCCAGTGGATGGTCGTGTTATTGAAGGACATTCTATGGTAGATGAGTCC  
CTCATCACAGGGGAGGCAATGCCTGTGGCTAAGAAACCTGGCAGCACAGTGATTGCTGG  
TTCCATTAACCAGAACGGGGTCACTGCTTATCTGCGCAACACATGTTGGAGCAGACACAA  
CCCTTTCTCAAATTTGTCAAACCTTGTGGAAGAGGCACAAACATCAAAGGCTCCTATCCAG  
CAGTTTGCAGACAAACTCAGTGGCTATTTTGTTCCTTTTATTGTTTTTGTTCATTGC  
CACCTCTTGGTATGGATTGTAATTGGATTTCTGAATTTTCAAATTGTGGAAACCTACT  
TTCCTGGCTACAATAGAAGTATCTCCCGAACAGAAACGATAATACGATTTGCTTTCCAA  
GCCTCTATCACAGTTCTGTGTATTGCATGTCCCTGTTCACTGGGACTGGCCACTCCAAC  
TGCTGTGATGGTGGGTACAGGAGTAGGTGCTCAAAATGGCATACTAATAAAAGGTGGAG  
AGCCATTGGAGATGGCTCATAAGGTAAAGGTAGTGGTATTTGATAAGACTGGAACCATT  
ACTCACGGAACCCAGTGGTGAATCAAGTAAAGGTTCTAACTGAAAGTAACAGAATAT  
CACACCATAAAATCTTGGCCATTGTGGGAACTGCTGAAAGTAACAGTGAACACCCTCTA  
GGAACAGCCATAACCAAATATTGCAAACAGGAGCTGGACACTGAAACCTTGGGTACCTG  
CATAGATTTCCAGTTGTGCCAGGCTGTGGTATTAGCTGTAAAGTCACCAATATTGAAG  
GCTTGCTACATAAGAATAACTGGAATATAGAGGACAATAATATTAATAATGCATCCCTG  
GTTCAAATTTGATGCCAGTAATGAACAGTCATCAACTTCGTCTTCCATGATTATTGATGC  
CCAGATCTCAAATGCTCTTAATGCTCAGCAGTATAAAGTCCTCATTGGTAACCGGGAGT  
GGATGATTAGAAATGGTCTTGTCAATTAATAACGATGTAAATGATTTTCATGACTGAACAT  
GAGAGAAAAGGTCGGACTGCTGTATTAGTAGCAGTTGATGATGAGCTGTGTGGCTTGT  
AGCCATTGCAGACACAGTGAAGCCTGAAGCAGAACTGGCTATCCATATTCTGAAATCTA  
TGGGCTTAGAAGTAGTTCTGATGACTGGAGACAAACAGTAAACAGCTAGATCTATTGCT  
TCTCAGGTTGGCATTACTAAGGTGTTTGCTGAAGTTCTACCTTCTCACAAGGTTGCTAA  
AGTGAAGCAACTTCAAGAGGAGGGGAAACCGGTTAGCAATGCTGGGAGATGGAATCAATG  
ACTCCCAGCTCTGGCAATGGCTAATGTGGGAATTGCTATTGGCACAGGCACAGATGTA  
GCCATTGAAGCAGCTGATGTGGTTTTGATAAGGAATGATCTTCTGGATGTAGTGGCAAG  
TATTGACTTATCAAGAAAGACAGTCAAGAGGATTCGGATAAAATTTTGTCTTTGCTCTAA  
TTTATAATCTGGTTGGAATTCCCATAGCTGCTGGAGTTTTTATGCCATTGGTTTTGTT  
TTGCAGCCCTGGATGGGATCTGCAGCAATGGCTGCTTCATCTGTTTCTGTAGTACTTTC  
TTCTCTTCTCCTTAAACTTTACAGGAAACCAACTTACGAGAGTTATGAACTGCCTGCC  
GGAGCCAGATAGGACAGAAGAGTCCCTCAGAAATCAGCGTTCATGTTGGAATAGATGA  
TACCTCAAGGAATTCTCCTAAACTGGGTTTTGCTGGACCGGATTGTTAATTATAGCAGAG  
CCTCTATAAACTCACTACTGTCTGATAAACGCTCCCTAAACAGTGTGTGTTACCAGTGAA  
CCTGACAAGCACTCACTCCTGGTGGGAGACTTCAGGGAAGATGATGACACTGCATTATA  
AAAGGCCATGGAGAGTGCTGCCAGTTTAACTTGTGCATGCACTGACACAGCATTTCATGAT  
GTTACCTTCACTTTTCAAATATTGTAGAAGGATTTTTCTCATGCTCTTATATTAGGGA  
TTCTATTTGAGTTGCGTTTATCTGTTGGCAAAAATATCTTTTTCAAGGCATCAGCTCTG  
AACCTAGCTTTATTTAAACTGAATTTCCAGTATATTTTTGTTTTCACTAACAACAGATA  
AGGTAGAGCAGTGAGGTTTACAACAAGCCCTACAATTAGAGATTGCTGAACTGCTGCTA  
AAGTGATTTTTTTTTTTATTTGACCAAAAAAAAAAAGGCCCAAGAAGAAGAAAATGAAA  
ATTTGAAGATTTGAGAGCATGAAGATATTGCTTTTGAACCTCAAATATTGAAGATA  
CTCTCAAGCCTGTATCCCTGCCACTGGGGAGCAATGACTTTCAAAGCACTGTGTATAA  
AACATCTAGTTTTAGAAAGGAAACAGTTGAAACTGTTTAAAAATAGATGTGCCTTATTT  
ATTGCAGGCTTTCTTTCCCCATTCTCCCTGCATCCTTGTCTTGCAGGTGCTTTTTTA  
GATGCTCCAATATGTCTTCTTTGTTATTTTCTTTTCGAGCTAACCGTTTAGGGTGGTT  
TTTCATTGATTAATAAATAACTGACAAC'TGTTCTAATATTTTGCTCCTTTTTAAATTTG  
TAGCTCAAAGACCTTAAAGGTCTGTAGGGTTCCCTGCCTCCCATCTTTCCACTGTTGT  
AAAAAGTATATCAAATATTCTTCAAGTTTCCCTAGCTCTGTGCTCAGTTTCAGTTCAT  
CCTGCCAAGTTGGACTCTAAGTTATTCTTCATGTAGTCTGCTGATCTCAGTCTGGAAAC  
TTAACATTATGAGCCTTTTCTGCTCAAAAAATTTTCAAAGATTAAACTATTATACATA

TACAGGTCATATAAAAATTACCTGGATTCACTAAATTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTT  
GTTGTTGTTGTTGAGACAGAGTCTTGTTTTTGCAGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACCA  
TCTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTACCGGATTCAAGGAATTCTCCCTGCCTCAGCCTC  
CTGAGTAGCTAGGATTACAGGTGCCTGCCACCACACCCGGCTAATTTTCATATTTTCA  
GTAGAGACGGGGTTTCGCCATGTTGGCTAGCCTGGTCTTAAACTCCTAACCTCAGGTGA  
TCCACCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCTCCATGCCCAGC  
CTAAATTTGTATTTTTTGAATTGAGTATAACACTTTGCTAGTATAATAATTTAATAGA  
TTTTATTTATCTTTTAGTGTTCAGATAACCTCTCAAAAAGACTTTAAAAAATGCTAT  
TACACAAAGCTGCATTTACCAAAAAATACAGTAAAATCATAATACAGAACTAAAATTT  
CCCTAGGTTATGACGCTTTTTAGCTAAATATATACTCTTCTCTAGTTTAAAACATTTGA  
ACTTGCCTAGTTAGTGTGGTTGGCAAATTTAGGAGCTTGTCCCATTGCCAAATGGATT  
TAGAAATTCCTTGTGAGTGCCTGGTAGCTAATACACTGGTCAGAGATCTGGTACTTGT  
AAGACTATTTAAATTTCTTTGTTAGTTGCAAGATGGATTTTCATATGCAGAATATGTAAA  
TGAAGAGGACTCATAAGTAAATTCCTAACATTTTGTCCCATTACCAGAAGCAAAGCTG  
CTGCTAACCCAACATCTGGCACATAGGATTTGACTCGGTAAATGTTAGTTCTTTTCTC  
CCCTTGAGGTCAGTAATAAATACAAAAAATCATTFTTCTAGAGCAGAGTCTTAAAATC  
AGGTGGGGGTAGGGGATGGAGTTCTTCCCTTCCCTACCCCTTTTCTCTTTTATCCTTTCA  
TATATACACATGCAAAGTTTACAACCTTATCCATGCTGTCTTTCAGATTTAGAAAAGA  
TCTAATTTCTGTCTCAGCTGTCTTAAAGAGAGAACTGAAGCTTTTGATGAAGGTGCTAT  
TAATCTAGAAAGGCAAACCCATTTCACTGAAATATCAATGGGTTTGCATATCTAGGCC  
TTTTTTTAGACCAATGCCTATGCCATCCTCCATGCTTTCAGTTTGAGTTTTATTATTTA  
TTATTTTAATTCAGTGGCCATCTTATAATACAACCTTGTTCCTTAGAAGACAGAGC  
TGATAGGGTAAATGTTGAAAAAAGAAGCATGCCTCCTTCTCCCTCCCACCCACCTCAAG  
CAGTTGAACACAGCCAGTTATTCTTCCATTATTATGTGTACCTTGGAGTCATCCTCTTG  
GTCTTGTATTTCATATTGTGGGACAGTGGGAATAGCAGCTTGTAGTATTGAAATAATCAA  
AGAGATAATTTAGCTCTTACAACAAGAACAGAAAACATGCTAATTAGAAAAGTCTCTG  
CTTTAAGTAATATGTAGCCACATTTGAATCCTCTACCACAAGTCTTTTTTGCAATCTTG  
AACTTTCATTAGCTTCAAAGAGAAGCTGTATTTACAGGAGAAAGAGGTTGATTATGGAGG  
GAATCAAAAATACTGCTTTCAGTTAGTAGCTAGCTTTAAGTCAGGAGTTAGTAATGAGA  
AATTTTATAAATGTGTATTTCTGTGTATTACATACATATATATATACACACATATATA  
TGTACATACACATACATACATATTACCATACTGAAGGGAAATGGATTTATATTTGAATT  
TGATATTTGAATATTTGAAGTTCTCTATTTTATATTTTCAATTTATCACTCTTCTGTATTCA  
CTCAGCAACCATGCCCTTAGTCTGAAGATAACAAGGATACTTTAATATCCAGTGCCGGT  
TCAGACTCACCTATGTGGCACCTTAAACTTAAATATCCAAAGATGCCTTTTGAATTTCA  
AAGATTTAAACACAGCTAGAGTAGTAGTATTGTAGTCTCAAGATGTATGGTGTGTCATT  
TGTGAAAATAGAAACGTTATTTTTTCTAGTTTLAGTATCAACATTTTLAGAATGTCAAATT  
TGATGCCTTGTGAACAAGTAATTTTATATTGTGCTTTAATTTTTTAAAAAGTATTCTTT  
ATTCATATGTATAGAATGCTTAAATAGCACTGTAGACAAGATGTTTCCAAAACCTTTAA  
GTGCGCATATCTTTTCTGTATACAGCTTAAATCAAAAATGTATGTTAAGAGAATTTTT  
TCTATTACTTATGGATCATGCTTTAAAATGATTTTTTCTTGATATTTATTTTACTCCATT  
TTGTTTTTTTTCTCTGGGTGAGGCATCTGGTTACTGGTTATTTTAAAAAGAATAAAGACA  
TTCCTGG



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Οι θέσεις διάσπασης του πλασμιδιακού φορέα pET 20b(+) από περιοριστικά ένζυμα.

Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations		
AccI	2	180 1208	DdeI	10	80 101 136 544 706 1246 1713 2122 2288 2828	RsaI	2	1244 2811		
AccIII	5	847 1088 1390 2630 3314	DpnI	19		SacI	1	190		
AccI	49		DraI	3	2197 2216 2908	Sall	1	179		
AflIII	1	1438	DraIII	1	3474	SapI	1	1322		
AluI	18		DrdI	3	1131 1546 3429	Sau96I	10	53 402 444 723 910 2373 2452 2469 2691 3465		
AluI	13		DrdII	1	3479	Sau3AI	19			
Alu21I	7	159 190 432 1256 1756 2917 3032	DsaI	2	220 410	Scal	1	2811		
Alu4AI	3	1252 1752 2998	EaeI	4	166 223 407 2719	ScrFI	11			
Alu5AI	1	1854	EagI	1	166	SfaNI	13			
Apal	3	192 3276 3287	Eam1105I	1	2331	SfiI	5	352 1703 1894 2572 3693		
AvatI	2	158 388	EatI	2	1322 3126	SspI	2	3135 3266		
AvatII	5	402 444 723 2469 2691	Ecil	3	1512 1658 2486	SlyI	7	159 180 190 381 1538 2982 3507		
BamHI	1	198	Eco47III	1	692	TaqI	6	1340 2679 2864 3017 3034 3378		
BamI	2	2279 3511	Eco57I	2	1986 2998	TfiI	3	488 992 1413		
BamII	2	190 3549	EcoO109I	3	53 402 444	ThaI	16			
BbsI	1	556	EcoRI	1	192	TseI	26			
BbvI	26		EcoRII	4	404 1464 1585 1598	Tsp45I	6	877 1080 1185 2587 2798 3647		
BbvI	6	227 2369 2492 2779 3464 3481	EcoRV	1	217	Tsp509I	11			
Bce83I	5	21 1529 1827 2068 2936	FauI	8	368 453 734 920 1141 1151 3611 3680	Tth111I	1	1183		
BceII	2	1940 3500	foKI	8	657 719 797 983 1124 2207 2478 2765	Tth111II	4	899 2028 2035 2067		
BcgI	6	160 194 1015 1049 2836 2870	FspI	2	419 2553	UbaJI	12			
Bfal	7	70 327 452 1933 2186 2521 3625	GdiII	2	166 2719	VspI	3	207 367 2503		
BglI	2	237 2451	HaeI	5	225 409 1453 1464 1916	XbaI	1	326		
BglII	1	384	HaeII	6	611 694 1316 1686 3625 3633	XhoI	1	158		
BpmI	2	965 2401	HaeIII	14		XmnI	3	208 996 2930		
Bpu10I	1	544	HgaI	6	974 1131 1549 2127 2857 3691	Enzymes that do not cut pET-20b(+):				
Bpu1102I	1	80	HgiEII	1	2024	AatII	AflII	AgeI	ApaI	ApaBI
BsaI	2	351 2392	HhaI	23		AscI	AvrII	BaeI	BclI	BngI
BsaAI	2	1190 3474	HinAI	2	2330 2404	BamI	BsrGI	BssHII	BstEII	BstXI
BsaBI	2	383 636	HincII	1	181	Bsu36I	Clal	LcoNI	FseI	HpaI
BsaFI	1	2868	HindIII	1	173	KpnI	MluI	MunI	NarI	NheI
BsaJI	4	57 220 410 1598	HinFI	9	359 488 992 1338 1413 1809 2326 3401 3423	NruI	NsiI	NspV	PacI	PfMML
BsaVI	5	2 627 1644 1791 2622	HphI	9	483 1058 1067 2174 2401 2817 3023 3058 3475	PmeI	PmlI	PstAI	RlcAI	RsaII
BsaXI	1	3422	MaeII	12		SacII	SexAI	SfiI	SglI	SgrAI
BbsI	2	1154 3381	MaeIII	15		SmaI	SnaBI	SpeI	SplII	SrfI
BbsCI	10	44 414 799 1132 1765 2111 2332 2356 2878 3568	MbolI	8	556 1309 2100 2171 2926 3004 3113 3614	Sse8387I	StuI	SunI	SwaI	XcmI
BbsRI	1	260	MmaI	3	1653 1837 3451					
BbsI	1	598	MnlI	20						
BbsI	2	1611 2595	MscI	2	225 409					
BbsEI	6	169 271 1354 1778 2701 2850	MsaI	23						
BbsI	12		MscII	6	425 620 1011 2583 2742 3101					
BbsmAI	4	351 1079 2382 3168	MspI	18						
BbsmBI	1	1079	MspA11	7	84 267 1029 1148 1780 2025 2966					
BbsmFI	2	709 3689	MwoI	19						
BbsrI	38		NciI	7	448 776 1082 1117 1818 2514 2865					
Bsp24I	4	1931 1963 2109 2141	NcoI	1	220					
Bsp1208I	8	159 190 432 1256 1756 2917 3032 3549	NdeI	1	288					
BspI	2	2 627	NgnAI	2	231 3575					
BspGI	1	864	NhaII	15						
BspI.U111I	1	1438	NhaIV	15						
BspMHI	1	268	NruI	1	166					
BsrI	14		NspI	3	783 1075 1442					
BsrBI	3	1371 3172 3618	PHI108I	1	2349					
BsrDI	2	2392 2566	PleI	6	367 1332 1817 2320 3409 3417					
BsrFI	3	231 2411 3575	Psp5H	2	402 444					
Bst1107I	1	1209	Psp1406I	4	763 2557 2930 3250					
BstVI	10	132 198 384 630 2079 2090 2176 2188 2956 2973	PstI	1	2576					
Cae8I	16		PvuI	1	2701					
CjeI	10	1451 1484 1925 1958 2003 2806 2036 2039 2103 2136	PvuII	1	1029					
CjePI	10	1925 1957 1958 1990 2103 2136 2136 2223 2256 2695 2728	RcaI	2	2158 3166					
CviJI	57									
CviRI	13									

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

### Α. Χημικές μετατοπίσεις (ppm) της ανθρώπινης από ΜΝΚ5

aa	N (HN)	CO	CA (HA)	CB (HB)	Others
N-1	- (-)	172.0	50.4 (4.69)	36.1 (2.74 , 2.65)	ND2 112.6 (7.50 , 6.84)
S-2	- (8.12)	171.0	54.4 (4.74)	62.6 (3.58 , 3.51)	
S-3	118.5 (8.36)	168.9	54.7 (4.60)	62.6 (3.38 , 2.60)	
K-4	121.4 (8.39)	173.3	52.1 (5.62)	33.5 (1.46)	CD 26.7 (1.44) CE 38.7 (2.70) CG 21.5 (1.09 , 0.91)
C-5	118.8 (9.20)	168.15	52.1 (5.11)	28.9 (3.03 , 2.95)	
Y-6	118.8 (8.85)	172.3	53.6 (5.43)	38.7 (2.68 , 2.60)	CD - (6.93) CE - (6.70)
I-7	121.6 (8.95)	172.6	55.5 (4.66)	39.4 (1.45)	CD1 10.3 (0.45) CG1 25.3 (1.21 , 0.90) CG2 15.5 (0.60)
Q-8	129.0 (9.24)	172.9	52.7 (4.62)	26.4 (1.90)	CG 31.0 (2.12 , 2.03) NE2 - (-)
V-9	131.2 (8.98)	174.3	58.1 (5.03)	31.2 (1.47)	CG1 18.7 (0.68) CG2 - (0.68) HG (0.66)
T-10	121.1 (8.96)	172.1	57.5 (4.65)	67.8 (4.11)	CG2 18.5 (1.04)
G-11	109.0 (8.62)	173.4	41.7 (4.65 , 3.64)		
M-12	119.7 (8.61)	174.9	53.6 (4.77)	32.0 (2.20 , 1.45)	CE - (-) CG - (2.18 , 1.99)
T-13	- (-)	-	59.6 (4.44)	68.6 (4.18)	CG2 - (1.06)
C-14	- (-)	-	54.4 (4.93)	28.2 (3.25 , 3.05)	
A-15	- (-)	-	- (-)	- (-)	
S-16	- (-)	-	58.9 (4.23)	59.6 (4.00 , 3.88)	
C-17		174.9	60.4 (4.10)	26.0 (3.16 , 2.88)	
V-18	117.4 (6.59)	174.9	63.3 (3.05)	29.0 (2.16)	CG1 20.0 (0.90) CG2 18.5 (0.80)
A-19	119.4 (7.57)	177.5	51.4 (4.08)	14.8 (1.37)	
N-20	116.6 (7.85)	175.6	52.9 (4.34)	35.7 (3.02 , 2.98)	ND2 110.7 (7.40 , 6.96)
I-21	120.0 (7.74)	175.2	63.3 (3.38)	35.7 (1.55)	CD1 10.3 (- 0.11) CG1 27.5 (1.62 , 0.39) CG2 14.8 (0.50)
E-22	116.9 (8.41)	176.0	57.4 (3.55)	26.7 (1.99 , 1.81)	CG 34.2 (2.41 , 1.86)

R-23	115.7 (8.32)	176.4	56.6 (3.80)	27.4 (1.87 , 1.74)	CD 40.8 (3.08) CG 24.5 (1.55 , 1.52)
N-24	114.6 (7.35)	174.8	53.6 (4.31)	36.5 (2.63 , 2.58)	ND2 117.1 (7.90 , 6.98)
L-25	121.1 (8.19)	176.1	54.4 (3.83)	37.9 (1.74 , 1.25)	CD1 21.5 (0.68) CD2 21.5 (0.63) CG 26.7 (1.48)
R-26	114.6 (7.67)	174.3	55.9 (3.73)	27.5 (1.72)	CD 40.9 (3.01) CG 25.4 (1.65 , 1.54)
R-27	114.0 (6.67)	174.3	52.9 (4.11)	27.9 (1.76)	CD 40.2 (3.07) CG 23.9 (1.60 , 1.54)
E-28	120.0 (7.18)	174.4	52.1 (4.01)	26.5 (1.60)	CG 31.2 (1.81 , 1.23)
E-29	125.0 (8.49)	174.6	55.1 (3.84)	26.1 (1.82)	CG 33.2 (2.16)
G-30	108.7 (8.48)	170.2	41.7 (3.89 , 3.36)		
I-31	118.3 (7.11)	173.4	56.6 (3.93)	33.5 (2.03)	CD1 8.8 (0.54) CG1 23.8 (1.31 , 0.82) CG2 14.1 (0.46)
Y-32	126.4 (8.82)	174.3	55.9 (4.58)	36.5 (3.03 , 2.34)	CD - (6.79) CE - (6.66)
S-33	110.1 (7.79)	169.3	54.4 (4.49)	61.8 (3.74)	
I-34	119.4 (8.42)	169.1	56.3 (4.93)	37.2 (1.57)	CD1 12.8 (0.52) CG1 - (-) CG2 13.4 (0.81)
L-35	128.7 (8.31)	173.8	50.8 (4.73)	42.4 (1.45)	CD1 21.9 (0.79) CD2 21.8 (0.76) CG 24.7 (1.38)
V-36	127.3 (9.47)	171.0	58.9 (4.33)	29.6 (1.98)	CG1 19.1 (0.67) CG2 19.5 (0.56)
A-37	131.5 (8.52)	174.3	46.9 (4.58)	17.0 (1.32)	
L-38	126.1 (8.53)	176.0	55.9 (3.64)	38.7 (1.63 , 1.37)	CD1 22.8 (0.62) CD2 20.0 (0.54) CG 23.9 (1.28)
M-39	115.7 (8.55)	175.5	55.1 (4.08)	27.9 (1.94)	CE - (-) CG 29.7 (2.55 , 2.42)
A-40	118.3 (7.20)	175.7	49.1 (4.22)	17.0 (1.27)	
G-41	107.6 (7.70)	170.8	43.2 (3.91 , 3.37)		
K-42	115.7 (7.06)	171.8	52.1 (5.22)	34.2 (1.58 , 1.45)	CD - (-) CE 38.7 (2.69) CG

					21.5 (1.26 , 1.14)
A-43	125.3 (9.46)	172.4	46.9 (5.20)	18.5 (0.93)	
E-44	123.6 (8.85)	173.3	51.9 (4.61)	28.9 (1.91)	CG 33.5 (1.68)
V-45	128.1 (8.85)	172.3	58.1 (4.75)	31.2 (2.00)	CG1 19.3 (0.86) CG2 17.8 (0.51)
R-46	127.6 (8.55)	173.8	52.1 (5.54)	28.9 (1.86 , 1.79)	CD 40.2 (2.95) CG 25.3 (1.58 , 1.35)
Y-47	123.6 (9.11)	169.1	52.9 (5.30)	38.7 (2.64 , 2.34)	CD - (6.74) CE - (6.44)
N-48	118.5 (8.80)	169.0	45.4 (5.10)	35.7 (2.92 , 2.58)	ND2 111.8 (7.73 , 7.18)
P-49	-	174.9	60.4 (5.30)	29.7 (2.20 , 2.06)	CD 47.7 (3.82 , 3.61) CG 23.8 (1.81)
A-50	120.2 (7.80)	175.7	50.6 (4.17)	15.5 (1.33)	
V-51	115.2 (7.65)	171.8	59.6 (4.03)	32.0 (1.87)	CG1 18.4 (0.76) CG2 18.4 (0.73)
I-52	121.4 (8.29)	168.1	57.4 (4.44)	39.4 (1.60)	CD1 11.8 (0.72) CG1 26.7 (1.53 , 1.00) CG2 14.0 (0.64)
Q-53	118.8 (6.73)	172.4	49.9 (4.86)	27.8 (2.13 , 1.68)	CG 30.5 (2.32) NE2 113.8 (7.34 , 6.87)
P-54	-	-	64.1 (3.72)	27.5 (2.02)	CD 47.7 (3.56) CG 24.5 (2.17 , 1.36)
P-55	-	177.1	63.3 (4.04)	28.2 (2.26 , 1.69)	CD 46.9 (3.61 , 3.16) CG 25.8 (2.00 , 1.85)
M-56	115.4 (7.14)	175.0	54.4 (3.95)	29.9 (1.90)	CE - (-) CG 29.0 (2.41 , 2.21)
I-57	120.0 (6.95)	175.1	62.6 (3.22)	34.2 (1.63)	CD1 9.6 (- 0.12) CG1 - (0.37) CG2 15.3 (0.49)
A-58	118.5 (7.67)	176.4	52.1 (3.58)	14.1 (1.11)	
E-59	118.3 (7.43)	176.0	56.6 (3.81)	26.0 (1.94 , 1.91)	CG 32.7 (2.14)
F-60	118.3 (7.71)	176.7	56.6 (4.33)	35.7 (3.06 , 3.10)	CD - (7.06) CE - (6.95) CZ - (-)
I-61	118.5 (7.36)	175.7	63.3 (3.53)	35.0 (1.77)	CD1 10.3 (0.45) CG1 27.5 (0.55) CG2 16.2 (0.77)

R-62	121.1 (8.20)	179.7	55.9 (4.94)	27.2 (1.79)	CD 40.9 (3.28) CG 25.8 (1.90 , 1.72)
E-63	120.2 (8.15)	175.6	55.9 (3.92)	26.0 (2.07 , 2.00)	CG 33.5 (2.39 , 2.24)
L-64	117.1 (7.33)	174.4	52.1 (4.16)	38.7 (2.25 , 1.68)	CD1 24.5 (0.80) CD2 19.3 (0.70) CG 23.0 (1.91)
G-65	105.0 (7.88)	170.8	41.7 (3.86 , 3.39)		
F-66	119.1 (6.71)	173.4	54.1 (4.68)	37.9 (3.52 , 2.23)	CD - (7.16) CE - (7.02) CZ - (-)
G-67	108.1 (8.22)	171.4	41.7 (4.19 , 3.54)		
A-68	123.0 (8.23)	173.6	48.4 (5.47)	20.0 (1.11)	
T-69	116.6 (8.21)	170.7	57.4 (4.42)	69.3 (3.81)	CG2 18.5 (1.08)
V-70	127.6 (8.96)	173.5	61.1 (3.81)	29.1 (1.89)	CG1 19.4 (0.62) CG2 18.6 (0.79)
I-71	127.8 (8.62)	173.2	58.1 (4.17)	35.7 (1.75)	CD1 10.6 (0.69) CG1 24.4 (1.42 , 0.97) CG2 14.9 (0.76)
E-72	123.6 (8.20)	-	52.9 (4.32)	- (1.92 , 1.83)	CG - (2.11)
N-73	120.0 (8.46)	-	- (4.66)	36.5 (2.67 , 2.47)	ND2 112.9 (7.48 , 6.80)
I-74	- (-)	173.6	58.3 (4.08)	36.2 (1.72)	CD1 10.4 (0.69) CG1 24.5 (1.27 , 1.00) CG2 14.8 (0.74)
E-75	124.5 (8.38)	174.6	54.2 (4.21)	27.4 (1.93 , 1.84)	CG 33.3 (2.15)
G-76	110.1 (8.18)	170.9	42.8 (3.81)		
R-77	126.1 (7.70)	178.6	54.4 (4.07)	28.6 (1.72 , 1.57)	CD 40.6 (3.04) CG 24.3 (1.44) CZ - NE - (-)

B. Χημικές μετατοπίσεις (ppm) της ανθρώπινης Cu(I)-MNK5.

aa	N (HN)	CO	CA (HA)	CB (HB)	Others
N-1	- (-)	172.1	50.3 (4.78)	36.1 (2.78 , 2.68)	ND2 112.6 (7.50 , 6.84)
S-2	115.4 (7.54)	171.0	54.9 (4.78)	62.3 (3.61 , 3.55)	
S-3	118.5 (8.41)	169.0	54.6 (4.69)	62.7 (3.44 , 2.63)	
K-4	121.6 (8.49)	173.4	51.8 (5.66)	33.1 (1.51)	CD 26.7 (1.47) CE 39.0 (2.74) CG 22.0 (1.13 , 0.95)
C-5	118.8 (9.28)	168.2	52.6 (5.15)	28.8 (3.09 , 3.00)	
Y-6	118.8 (8.90)	172.3	53.5 (5.48)	38.8 (2.74 , 2.65)	CD - (6.99) CE - (6.76)
I-7	121.6 (9.02)	172.8	55.3 (4.71)	39.1 (1.48)	CD1 10.1 (0.50) CG1 25.3 (1.26 , 0.95) CG2 15.3 (0.63)
Q-8	128.9 (9.29)	172.9	52.5 (4.69)	26.5 (1.93)	CG 31.0 (2.21 , 2.14) NE2 112.0 (7.42 , 6.74)
V-9	131.2 (8.88)	174.3	57.9 (5.08)	31.4 (1.52)	CG1 18.5 (0.73) CG2 - (0.73) HG (0.74)
T-10	121.0 (9.05)	172.1	57.4 (4.72)	67.6 (4.15)	CG2 18.6 (1.11)
G-11	109.2 (8.68)	173.1	42.2 (4.71 , 3.67)		
M-12	119.3 (8.65)	174.9	54.3 (4.77)	32.0 (2.29 , 1.45 , 1.47)	CE - (-) CG - (1.77 , 2.04)
T-13	- (-)	-	- (-)	68.4 (4.20)	CG2 - (1.07)
C-14	- (-)	-	- (-)	- (-)	
A-15	- (-)	-	51.9 (4.06)	15.7 (1.46)	
S-16	- (-)		59.0 (4.25)	59.4 (4.02 , 3.88)	
C-17		174.6	60.8 (4.12)	26.1 (3.18 , 2.89)	
V-18	117.1 (6.43)	174.8	63.5 (3.08)	28.8 (2.18)	CG1 20.5 (0.94) CG2 18.3 (0.82)
A-19	119.0 (7.42)	177.3	51.9 (4.11)	15.3 (1.40)	
N-20	116.5	175.5	53.2 (4.36)	35.8 (3.05 , 3.07)	ND2 110.7

	(8.02)				(7.40 , 6.96)
I-21	119.6 (7.71)	175.2	63.1 (3.42)	35.5 (1.58)	CD1 11.6 (-0.05) CG1 - (1.67) CG2 14.9 (0.55)
E-22	116.8 (8.47)	176.0	57.9 (3.59)	26.8 (1.97 , 1.85)	CG 34.7 (2.46 , 1.89)
R-23	115.9 (8.50)	176.6	56.4 (3.82)	27.3 (1.96 , 1.77)	CD 40.5 (3.09) CG 24.7 (1.61 , 1.55)
N-24	114.2 (7.38)	174.9	53.9 (4.35)	36.7 (2.71 , 2.59)	ND2 117.1 (7.90 , 6.98)
L-25	121.0 (8.30)	176.2	54.5 (3.88)	37.7 (1.79 , 1.29)	CD1 21.7 (0.72) CD2 21.7 (0.66) CG 27.3 (1.52)
R-26	114.5 (7.72)	174.4	55.6 (3.79)	26.9 (1.76)	CD 40.8 (3.10) CG 25.8 (1.67 , 1.59)
R-27	113.7 (6.73)	174.4	53.4 (4.16)	27.9 (1.79)	CD 40.7 (3.11) CG 23.9 (1.65 , 1.58)
E-28	119.9 (7.21)	174.3	52.3 (4.07)	26.5 (1.65)	CG 31.7 (1.88 , 1.29)
E-29	125.0 (8.60)	174.6	54.9 (3.88)	26.1 (1.86)	CG 32.9 (2.22)
G-30	108.6 (8.55)	170.2	42.2 (3.94 , 3.40)		
I-31	118.2 (8.89)	173.4	56.8 (3.98)	33.2 (2.11)	CD1 8.6 (0.57) CG1 23.9 (1.36 , 0.89) CG2 13.8 (0.50)
Y-32	126.4 (8.89)	174.3	55.6 (4.63)	36.6 (3.08 , 2.39)	CD - (6.84) CE - (-)
S-33	110.0 (7.86)	169.4	54.6 (4.54)	62.0 (3.78)	
I-34	119.3 (8.51)	169.2	56.0 (4.99)	37.7 (1.62)	CD1 13.1 (0.57) CG1 26.5 (1.26 , 0.83) CG2 13.4 (0.84)
L-35	128.6 (8.37)	173.7	50.8 (4.75)	42.6 (1.50)	CD1 21.7 (0.82) CD2 21.7 (0.80) CG 24.3 (1.42)
V-36	127.5	171.0	58.6 (4.39)	29.1 (2.02)	CG1 19.1

	(9.54)				(0.71) CG2 19.4 (0.61)
A-37	131.2 (8.56)	174.4	47.4 (4.62)	17.2 (1.36)	
L-38	126.1 (8.63)	176.0	55.6 (3.69)	39.2 (1.66 , 1.41)	CD1 22.8 (0.65) CD2 20.5 (0.57) CG 23.9 (1.31)
M-39	115.6 (8.62)	175.5	54.9 (4.11)	27.8 (2.01)	CE - (-) CG 29.5 (2.59 , 2.46)
A-40	117.9 (7.24)	175.6	48.9 (4.27)	16.8 (1.32)	
G-41	107.5 (7.76)	170.9	43.7 (3.96 , 3.43)		
K-42	115.6 (7.12)	171.8	51.9 (5.28)	34.7 (1.62 , 1.49)	CD - (-) CE 38.8 (2.75) CG 22.0 (1.30 , 1.18)
A-43	125.2 (9.51)	172.5	46.7 (5.24)	18.7 (0.97)	
E-44	123.6 (8.93)	173.3	51.8 (4.65)	28.9 (1.91)	CG - (1.75)
V-45	128.1 (8.92)	172.3	58.0 (4.77)	31.4 (2.05)	CG1 19.8 (0.90) CG2 17.6 (0.55)
R-46	127.5 (8.62)	173.8	51.9 (5.58)	28.9 (1.90 , 1.82)	CD 40.0 (2.99) CG 25.8 (1.62 , 1.39)
Y-47	123.6 (9.17)	169.2	52.7 (5.34)	38.8 (2.71 , 2.39)	CD - (6.80) CE - (6.50)
N-48	118.5 (8.85)	172.8	45.9 (5.15)	35.9 (2.98 , 2.63)	ND2 111.7 (7.81 , 7.24)
P-49	-	174.9	60.5 (5.34)	29.5 (2.26 , 2.10)	CD 48.2 (3.87, 3.66) CG 23.5 (1.86)
A-50	120.2 (7.86)	175.7	50.4 (4.22)	16.1 (1.38)	
V-51	115.1 (7.73)	171.9	59.7 (4.07)	32.5 (1.92)	CG1 18.4 (0.83) CG2 18.2 (0.77)
I-52	121.3 (8.37)	168.2	57.5 (4.48)	39.2 (1.65)	CD1 11.6 (0.76) CG1 26.9 (1.57 , 1.04) CG2 13.8 (0.67)
Q-53	118.8 (6.79)	172.5	50.0 (4.91)	27.6 (2.18 , 1.73)	CG 31.0 (2.37) NE2 113.7 (7.42 , 6.92)
P-54	-	-	64.2 (3.76)	- (2.07)	CD 47.8



					(3.60) CG 25.0 (2.21 , 1.41)
P-55	-	177.1	63.5 (4.08)	28.0 (2.31 , 1.74)	CD 47.4 (3.65 , 3.20) CG 25.7 (2.02 , 1.90)
M-56	115.4 (7.21)	175.0	54.5 (3.98)	29.9 (1.94)	CE - (-) CG 29.1 (2.45 , 2.24)
I-57	119.9 (7.03)	175.1	62.7 (3.26)	34.4 (1.67)	CD1 10.1 (-0.07) CG1 25.4 (1.39 , 0.41) CG2 14.9 (0.56)
A-58	118.2 (7.73)	176.5	52.7 (3.63)	14.2 (1.15)	
E-59	118.2 (7.51)	176.1	56.8 (3.86)	26.1 (1.99 , 1.92)	CD - CG 32.5 (2.21)
F-60	118.2 (7.78)	176.7	56.4 (4.38)	35.9 (3.15 , 3.09)	CD - (-) CE - (6.99) CZ - (-)
I-61	118.5 (7.41)	175.8	63.5 (3.56)	35.1 (1.83)	CD1 10.5 (0.49) CG1 27.6 (1.99 , 0.59) CG2 16.1 (0.83)
R-62	120.7 (8.23)	179.6	55.6 (4.99)	26.9 (1.83)	CD 41.1 (3.32 , 3.16) CG 25.8 (1.93 , 1.75)
E-63	120.4 (8.22)	175.7	55.6 (3.97)	26.5 (2.13 , 2.02)	CG 33.6 (2.45 , 2.27)
L-64	116.8 (7.39)	174.3	51.9 (4.17)	39.2 (2.29 , 1.72)	CD1 24.3 (0.86) CD2 19.1 (0.72) CG 23.2 (1.94)
G-65	104.4 (7.87)	170.8	41.8 (3.90 , 3.41)		
F-66	118.8 (6.75)	173.4	54.2 (4.72)	38.1 (3.57 , 2.28)	CD - (7.07) CE - (-) CZ - (-)
G-67	108.0 (8.33)	171.4	41.8 (4.24 , 3.58)		
A-68	123.0 (8.29)	173.7	48.9 (5.50)	19.8 (1.17)	
T-69	116.5 (8.29)	170.7	57.9 (4.44)	69.1 (3.85)	CG2 18.7 (1.14)
V-70	127.8 (9.04)	173.5	61.2 (3.85)	28.8 (1.92)	CG1 19.1 (0.67) CG2 18.7 (0.84)

I-71	127.8 (8.69)	173.2	58.6 (4.21)	36.2 (1.79)	CD1 10.5 (0.74) CG1 24.3 (1.46 , 0.98) CG2 14.6 (0.82)
E-72	123.6 (8.27)	173.2	53.8 (4.37)	28.3 (1.98 , 1.88)	CG 32.5 (2.21 , 2.12)
N-73	120.2 (8.52)	-	50.2 (4.75)	37.0 (2.71 , 2.51)	ND2 112.8 (7.53 , 6.86)
I-74	- (-)	173.6	58.3 (4.13)	36.2 (1.75)	CD1 10.2 (0.71) CG1 24.7 (1.30 , 1.03) CG2 14.9 (0.77)
E-75	124.7 (8.45)	174.7	53.7 (4.21)	27.8 (1.95 , 1.88)	CG 33.2 (2.12)
G-76	110.0 (8.23)	170.9	42.9 (3.81)		
R-77	120.2 (8.01)	178.6	53.3 (4.27)	28.3 (1.74 , 1.64)	CD 40.5 (3.09) CG 23.9 (1.50)

**Table S1.** NMR frequency assignments for apo-MNK456. Data are given in ppm.

aa	N (HN)	CO	CA	CB
L-1			54.4	42.5
T-2	112.9 (7.84)	170.7	60.2	71.3
Q-3	119.1 (8.36)	170.0	53.7	32.7
E-4	118.6 (8.39)	173.8	54.5	33.3
T-5	119.9 (8.98)	167.9	60.6	69.9
V-6	127.3 (8.04)	172.2	61.5	32.9
I-7	128.4 (9.12)	172.9	59.7	41.3
N-8	128.0 (9.22)	172.0	53.9	38.4
I-9	124.0 (8.24)	171.3	61.0	41.4
D-10	127.7 (9.08)	173.2	53.2	43.2
G-11	108.4 (8.30)	173.3	45.0	
M-12	120.6 (9.04)	174.5	57.1	33.2
T-13	116.8 (10.12)		62.6	
C-14				
N-15				
S-16			63.0	
C-17	125.1 (7.75)	174.4	63.4	28.6
V-18	117.8 (6.72)	174.8	66.4	31.6
Q-19	115.5 (7.87)	177.3	58.6	28.3
S-20	116.7 (8.18)	173.6	61.6	62.7
I-21	121.2 (7.94)	175.5	66.0	38.8
E-22	116.7 (8.40)	177.2	60.4	28.9
G-23	106.8 (8.30)	172.8	47.2	
V-24	120.1 (7.68)	177.0	66.0	32.7
I-25	118.4 (8.55)	175.4	61.1	33.8
S-26	111.4 (7.95)	171.9	61.7	63.1
K-27	117.2 (6.71)	174.7	55.5	32.9
K-28	121.6 (7.64)	171.8	53.7	29.6
P-29			63.9	31.7
G-30	107.6 (8.81)	171.0	46.5	
V-31	120.2 (7.38)	172.9	64.8	31.3
K-32	129.5 (9.13)	173.9	56.1	32.2
S-33	110.9 (7.75)	169.2	57.7	65.3
I-34	119.0 (8.55)	169.1	58.8	40.2
R-35	125.6 (8.17)	173.1	54.0	32.1
V-36	131.2 (10.33)	171.2	61.7	32
S-37	121.0 (9.03)	172.4	55.1	64.2
L-38	130.4 (8.80)	177.3	57.8	41.9
A-39	120.5 (8.39)	176.7	54.9	18.2
N-40	111.8 (7.79)	170.6	52.2	37.7
S-41	115.1 (7.62)	-	58.2	
N-42	113.9 (8.07)	170.6	51.9	40.0
G-43	103.8 (9.08)	172.6	45.7	
T-44	121.0 (8.59)	171.7	62.3	69.8
V-45	128.8 (9.33)	171.7	60.3	34.5
E-46	127.9 (8.72)	173.3	54.6	30.6
Y-47	124.1 (9.42)	168.6	55.0	41.2
D-48	120.4 (8.95)	173.5	49.8	
P-49			63.5	32.6
L-50	118.9 (8.66)	175.8	56.1	40.6
L-51	117.2 (7.60)	173.4	54.7	46.5
T-52	114.6 (7.94)	168.7	60.3	67.3
S-53	112.1 (8.08)	169.2	55.1	
P-54			66.4	32.3
E-55	116.1 (8.46)	176.2	58.8	28.3

T-56	118.4 (7.68)	174.5	66.3	68.6
L-57	122.5 (7.58)	174.5	57.6	41.6
R-58	120.1 (8.71)	176.2	60.2	29.2
G-59	105.1 (8.33)	172.4	47.2	
A-60	122.8 (7.57)	177.3	54.6	17.6
I-61	119.2 (7.52)	175.7	65.8	37.9
E-62	123.4 (8.27)	178.7	58.8	28.7
D-63	120.0 (8.45)	175.0	56.7	40.3
M-64	116.7 (7.55)	173.3	57.3	33.8
G-65	105.4 (8.16)	170.5	44.8	
F-66	118.3 (6.80)	171.2	57.0	41.4
D-67	119.9 (7.96)	-	53.9	40.9
A-68	129.1 (8.61)	173.7	50.3	22.3
T-69	115.2 (8.80)	170.6	60.0	72.6
L-70	122.9 (8.87)	174.5	55.1	41.7
S-71	116.9 (8.37)	171.9	58.6	64.0
D-72	123.2 (8.46)	173.7	54.3	41.0
T-73	113.9 (8.12)	171.7	61.9	69.7
N-74	121.0 (8.39)	172.0	53.3	39.3
E-75	122.5 (8.24)	171.6	54.4	
P-76				
L-77				
V-78				
V-79				
I-80			60.6	38.5
A-81	129.0 (8.32)	174.4	52.2	19.3
Q-82	120.9 (8.31)	-	53.5	28.7
P-83			63.3	32.1
S-84	116.2 (8.42)	172.1	58.4	63.9
S-85	115.1 (8.13)	-	62.0	69.7
E-86	123.3 (8.09)	172.9	56.9	32.6
M-87				
P-88			57.1	30.0
L-89	119.9 (8.09)	172.9	58.2	39.4
L-90	120.5 (7.92)	173.2	58.0	38.9
T-91	115.6 (7.89)	171.6	61.8	69.9
S-92	117.6 (8.25)	172.1	58.4	64.0
T-93	117.6 (8.32)	171.6	58.6	63.9
N-94	122.1 (8.26)	-	-	-
E-95	-	-	63.0	31.9
F-96	122.7 (8.26)	174.6	55.2	42.5
Y-97	123.3 (8.23)	174.7	55.0	42.4
T-98	114.1 (8.02)	171.8	61.7	69.9
K-99	123.1 (7.89)	-	57.0	32.8
G-100	109.8 (8.31)	171.3	45.3	
M-101	119.6 (8.05)	173.4	55.3	32.8
T-102	118.2 (8.17)	169.9	60.1	69.8
P-103				
V-104				
Q-105				
D-106				
K-107				
E-108				
E-109			56.4	30.6
G-110	110.2 (8.46)	171.2	45.3	
K-111	120.5 (8.10)	173.4	56.1	30.6
N-112	123.5 (8.34)	174.5	55.1	42.3
S-113	121.3 (8.32)	171.3		
S-114			57.5	
K-115	121.2 (8.52)	173.5	54.6	35.7

C-116	119.1 (9.23)		55.3	31.5
Y-117	118.8 (8.99)		56.3	
I-118				
Q-119	129.1 (9.33)		55.5	
V-120	131.0 (8.86)		61.0	
T-121	120.8 (9.05)		60.5	
G-122	109.0 (8.69)		45.0	
M-123	120.2 (8.79)	174.6	56.7	
T-124				
C-125				
A-126				
S-127				
C-128				
V-129				
A-130				
N-131				
I-132				
E-133				
R-134	115.5 (8.42)		59.1	
N-135	114.4 (7.41)		56.8	
L-136				
R-137	114.6 (7.71)		58.6	
R-138	113.8 (6.72)		56.3	
E-139	120.1 (7.25)		55.3	
E-140	125.0 (8.60)	174.2	57.8	
G-141	108.6 (8.54)		45.0	
I-142	118.1 (7.15)		59.9	
Y-143	126.5 (8.89)	173.8	58.8	
S-144	109.8 (7.86)	169.0	57.6	65.1
I-145	119.1 (8.46)	168.0	59.0	
L-146	128.5 (8.37)	173.3	53.7	
V-147	127.2 (9.55)	170.6	61.6	
A-148	131.5 (8.59)	173.6	50.1	
L-149				
M-150	116.0 (8.66)	175.0	58.0	
A-151	118.1 (7.30)	172.3	52.2	
G-152	107.5 (7.76)	170.0	46.5	
K-153	115.8 (7.14)	171.3	54.9	
A-154	125.4 (9.52)	172.0	49.6	
E-155	123.4 (8.89)	172.8	54.9	
V-156	128.2 (8.89)	171.8	61.1	
R-157	127.8 (8.62)	173.3	54.9	
Y-158	123.7 (9.21)	168.7	55.4	
N-159	118.4 (8.80)		48.8	
P-160				
A-161		175.2	52.5	18.5
V-162	115.3 (7.74)		62.5	32.6
I-163				
Q-164	118.7 (6.78)		53.0	
P-165				
P-166			66.5	
M-167	115.4 (7.21)	174.7	57.4	
I-168	119.9 (7.01)		65.6	
A-169	118.4 (7.73)	176.0	55.3	16.9
E-170	118.0 (7.51)		59.7	27.7
F-171	118.1 (7.78)		59.5	
I-172	118.6 (7.43)		66.3	40.9
R-173				
E-174				
L-175	116.9 (7.38)		55.0	

G-176	105.1 (7.94)		44.6	
F-177	118.8 (6.77)		57.1	
G-178				
A-179		173.1		
T-180	116.4 (8.28)	171.1	60.5	
V-181	127.5 (8.98)	173.0	64.4	
I-182	128.4 (8.64)		60.9	
E-183				
N-184			53.1	38.9
A-185	124.6 (8.29)	174.4	52.6	19.3
D-186	119.4 (8.24)		54.4	41.3
E-187	121.6 (8.24)	174.1	56.7	30.0
G-188	109.1 (8.36)	171.0	45.2	
D-189	119.5 (8.05)	174.1	54.3	41.1
G-190	108.1 (8.17)	170.2	45.3	
V-191	120.1 (7.76)		61.4	
L-192	129.0 (9.31)		53.8	39.8
E-193	125.0 (8.57)	172.2	54.8	
L-194	121.4 (8.64)		52.7	
V-195	121.3 (8.82)	172.8	61.8	
V-196	127.3 (8.62)		60.8	
R-197	126.5 (9.21)	173.3	55.1	
G-198	108.7 (8.44)		44.8	
M-199	119.6 (8.69)	174.6	57.2	
T-200	118.7 (10.67)		62.0	
C-201				
A-202				
S-203			62.5	
C-204	126.2 (7.82)	181.0	64.0	
V-205	117.2 (6.65)	175.0	66.5	
H-206	116.8 (7.80)	175.7	59.2	28.4
K-207				
I-208	118.9 (7.66)		66.2	38.2
E-209	117.4 (8.61)		60.9	
S-210	113.4 (8.56)		61.4	63.1
S-211	115.8 (7.31)		61.9	63.6
L-212	120.2 (8.22)		58.3	41.3
T-213	107.6 (7.72)		65.0	58.8
K-214	117.2 (6.85)	173.7	56.6	32.3
H-215	121.6 (7.67)	173.2	53.7	29.2
R-216				
G-217				
I-218	119.5 (7.63)		60.1	
L-219	128.5 (8.81)	174.4	55.6	42.6
Y-220	117.9 (7.77)	170.7	57.7	42.0
C-221	125.1 (8.15)	168.6	57.5	28.5
S-222	122.1 (8.62)	170.9	56.3	65.6
V-223	129.3 (9.57)	170.5	61.1	29.1
A-224	129.9 (8.50)	173.7	50.1	20.0
L-225	125.8 (8.59)	176.2	57.6	42.2
A-226	116.2 (8.56)	176.4	55.0	18.7
T-227	100.9 (6.70)		60.1	69.9
N-228	116.0 (7.76)	169.9	55.4	37.2
K-229	115.4 (7.47)	173.0	55.2	30.3
A-230	123.3 (9.04)		49.8	21.9
H-231	123.0 (9.02)	171.5	55.8	30.4
I-232	125.5 (8.83)	171.9	59.5	
K-233	125.9 (8.77)	172.9	54.4	35.3
Y-234	124.0 (9.28)		55.2	42.1

D-235	120.2 (8.86)		49.9	
P-236	-		63.5	32.7
E-237	116.3 (8.34)	174.4	57.6	29.3
I-238	116.8 (7.92)		61.6	
I-239	121.1 (8.32)		60.2	43.1
G-240	108.0 (7.89)	170.1	43.9	
P-241			65.8	32.1
R-242	115.3 (8.63)	176.0	59.4	28.5
D-243	117.6 (7.27)	176.3	56.9	41.1
I-244	122.1 (7.35)	174.6	66.0	
I-245	120.0 (8.13)	174.9	66.5	
H-246	117.6 (8.07)	175.5	59.3	28.1
T-247	117.6 (7.99)	172.5	67.4	
I-248	122.6 (7.75)	175.2	66.7	
E-249	119.8 (8.59)	179.2	58.8	
S-250	117.5 (8.22)		61.5	
L-251	120.5 (7.37)	173.5	54.9	
G-252	104.6 (7.81)	170.5	44.5	
F-253	118.0 (6.80)		56.3	
E-254	117.9 (7.98)		55.0	
A-255	125.5 (9.29)	172.8	50.7	23.4
S-256	113.7 (8.64)	170.1	56.9	65.9
L-257	123.9 (8.64)		56.0	
V-258	122.8 (8.10)		62.3	32.6
K-259	126.3 (8.25)	172.9	60.6	

**Table S2.** NMR frequency assignments for Cu<sub>3</sub>MNK456. Data are given in ppm.

aa	N (HN)	CO	CA	CB
L-1	-	-	-	
T-2	112.7 (7.79)	170.7	60.2	71.3
Q-3	119.0 (8.36)	170.0	53.7	32.7
E-4	118.6 (8.38)	173.8	54.5	33.8
T-5	119.8 (8.98)	167.9	60.6	69.9
V-6	127.3 (8.04)	172.2	61.5	32.9
I-7	128.4 (9.13)	172.9	59.7	41.2
N-8	128.1 (9.22)	172.0	53.9	38.4
I-9	124.0 (8.26)	171.3	61.0	41.4
D-10	127.9 (9.14)	173.2	53.2	43.2
G-11	108.4 (8.28)	173.3	45.0	
M-12	120.1 (8.98)	174.5	57.1	35.2
T-13	113.3 (9.19)		62.6	71.5
C-14	117.2 (8.05)		57.4	
N-15			56.1	38.7
S-16	120.6 (9.56)		63.0	
C-17	126.2 (8.19)	174.4	63.4	28.6
V-18	117.7 (6.43)	174.8	66.4	31.6
Q-19	115.4 (7.81)	177.3	58.6	28.3
S-20	116.7 (8.16)	173.6	61.6	62.7
I-21	121.2 (7.89)	175.5	66.0	38.8
E-22	116.7 (8.36)	177.2	60.4	28.9
G-23	106.9 (8.34)	172.8	47.2	
V-24	120.2 (7.79)	177.0	66.0	32.8
I-25	118.5 (8.57)	175.4	61.1	33.9
S-26	111.4 (7.93)	171.9	61.7	63.2
K-27	117.3 (6.73)	174.7	55.5	32.9
K-28	121.6 (7.65)	171.8	53.7	
P-29			63.9	31.7
G-30	107.6 (8.83)	171.0	46.5	
V-31	120.3 (7.38)	172.9	64.8	31.3
K-32	129.4 (9.12)	173.9	56.1	
S-33	110.9 (7.76)	169.2	57.7	65.3
I-34	119.0 (8.50)	169.1	58.8	40.2
R-35	125.6 (8.21)	173.1	54.0	32.1
V-36	131.3 (10.34)	171.2	61.7	32
S-37	121.0 (9.03)	172.4	55.1	64.2
L-38	130.5 (8.82)	177.3	57.8	41.9
A-39	120.3 (8.38)	176.7	54.9	18.2
N-40	111.7 (7.79)	170.6	52.2	37.7
S-41	114.9 (7.62)		58.2	
N-42	113.9 (8.07)	170.6	51.9	40.0
G-43	103.8 (9.09)	172.6	45.7	
T-44	121.0 (8.61)	171.7	62.3	69.8
V-45	128.7 (9.33)	171.7	60.3	34.5
E-46	127.9 (8.73)	173.3	54.6	30.6
Y-47	124.2 (9.44)	168.6	55.0	41.2
D-48	120.5 (8.97)	173.5	49.8	
P-49			63.3	32.6
L-50	118.9 (8.69)	175.8	56.1	40.6
L-51	117.2 (7.62)	173.4	54.7	46.5
T-52	114.6 (7.96)	168.7	60.3	67.3
S-53	112.2 (8.09)	169.2	55.1	
P-54			66.2	32.3
E-55	116.1 (8.47)	176.2	58.8	28.3



T-56	118.4 (7.67)	174.5	66.3	68.6
L-57	122.4 (7.57)	174.5	57.6	41.6
R-58	120.1 (8.72)	176.2	60.2	29.2
G-59	105.0 (8.36)	172.4	47.2	
A-60	122.9 (7.56)	177.3	54.6	17.8
I-61	119.2 (7.52)	175.7	65.8	
E-62	123.5 (8.25)	178.7	58.8	28.7
D-63	120.1 (8.45)	175.0	56.7	40.3
M-64	116.7 (7.57)	173.3	57.3	33.8
G-65	105.2 (8.14)	170.5	44.8	
F-66	118.3 (6.79)	171.2	57.0	
D-67	120.1 (7.97)	-	53.9	40.9
A-68	128.8 (8.58)	173.7	50.3	22.3
T-69	115.3 (8.83)	170.6	60.0	
L-70	123.0 (8.86)	174.5	55.1	
S-71	116.9 (8.37)	171.9	58.6	64.0
D-72	123.2 (8.44)	173.7	54.3	41.1
T-73	113.8 (8.12)	171.7	61.9	69.7
N-74	120.9 (8.38)	172.0	53.3	39.3
E-75	122.5 (8.22)	171.6	54.4	
P-76				
L-77				
V-78				
V-79				
I-80			52.2	38.5
A-81	128.8 (8.30)	174.4	52.2	
Q-82	121.0 (8.28)	-	53.5	28.7
P-83	-	-	63.3	32.1
S-84	116.2 (8.40)	172.1	58.4	63.9
S-85	115.0 (8.10)	-	62.0	69.7
E-86	123.1 (8.07)	172.9	56.9	
M-87	-	-	-	
P-88	-	-	57.1	30.0
L-89	119.8 (8.08)	172.9	58.2	
L-90	120.2 (7.90)	173.2	58.0	38.9
T-91	115.4 (7.88)	171.6	61.8	
S-92	117.6 (8.23)	172.1	58.4	
T-93	117.6 (8.30)	171.6	58.6	63.9
N-94	122.1 (8.26)	-	-	
E-95	-	-	63.0	
F-96	122.6 (8.25)	174.6	55.2	
Y-97	123.1 (8.19)	174.7	55.0	42.4
T-98	114.0 (8.01)	171.8	61.7	69.9
K-99	123.1 (7.89)	-	-	32.8
G-100	109.8 (8.30)	171.3	45.3	
M-101	119.5 (8.04)	173.4	55.3	32.8
T-102	118.0 (8.14)	169.9	60.1	
P-103				
V-104			62.7	32.6
Q-105	124.1 (8.38)	172.8	55.8	29.6
D-106	122.3 (8.33)	173.2	55.6	
K-107				
E-108				
E-109			56.5	30.6
G-110	110.1 (8.46)	171.2	45.3	
K-111	120.5 (8.09)	173.4	56.1	30.6
N-112	123.5 (8.33)	174.5	55.1	42.3
S-113	121.3 (8.32)	171.3		
S-114				
K-115				

C-116	119.1 (9.23)			
Y-117	118.8 (8.99)			
I-118				
Q-119				
V-120				
T-121				
G-122				
M-123				
T-124				
C-125				
A-126				
S-127				
C-128				
V-129				
A-130				
N-131				
I-132				
E-133				
R-134				
N-135				
L-136				
R-137				
R-138				
E-139				
E-140				
G-141				
I-142	118.2 (7.17)			
Y-143				
S-144	109.8 (7.86)			
I-145				
L-146				
V-147				
A-148				
L-149				
M-150				
A-151				
G-152	107.4 (7.76)			
K-153	115.8 (7.12)			
A-154				
E-155				
V-156				
R-157				
Y-158				
N-159				
P-160				
A-161				
V-162				
I-163				
Q-164				
P-165				
P-166				
M-167	115.4 (7.22)			
I-168	120.0 (7.03)			
A-169				
E-170	118.0 (7.53)			
F-171				
I-172				
R-173				
E-174				
L-175				

G-176				
F-177				
G-178				
A-179				
T-180				
V-181				
I-182				
E-183				
N-184				
A-185	124.6 (8.28)	174.4	52.6	19.3
D-186	119.4 (8.23)	-	54.4	41.3
E-187	121.6 (8.23)	174.1	56.7	30.0
G-188	108.9 (8.36)	171.0	45.2	
D-189	119.5 (8.05)	174.1	54.3	
G-190	108.0 (8.15)	170.2	45.3	
V-191	120.1 (7.75)		61.4	
L-192	129.0 (9.31)		53.8	39.9
E-193	125.2 (8.57)	172.2	54.8	
L-194	121.5 (8.66)		52.7	
V-195	121.3 (8.84)	172.8	61.8	32.8
V-196	127.4 (8.64)		60.8	33.8
R-197	126.8 (9.25)	173.3	55.1	
G-198	108.8 (8.41)		44.8	
M-199	119.7 (8.83)	174.6	57.2	
T-200	114.3 (9.36)		62.0	
C-201				
A-202			55.1	
S-203	118.1 (9.39)		62.5	
C-204				
V-205	117.7 (6.44)		66.6	
H-206	116.6 (7.65)	175.7	59.2	28.4
K-207	-		-	
I-208	118.8 (7.61)		66.2	38.2
E-209	117.6 (8.57)		60.9	
S-210	113.3 (8.58)		61.4	63.1
S-211	115.6 (7.30)		61.9	
L-212	120.2 (8.22)		58.3	
T-213	107.1 (7.71)		65.0	
K-214	117.4 (6.86)	173.7	56.6	
H-215	121.5 (7.67)	173.2	53.7	
R-216				
G-217				
I-218	119.6 (7.63)		60.1	
L-219				
Y-220	117.9 (7.79)	170.7	57.7	42.0
C-221	125.1 (8.12)	168.6	57.5	28.5
S-222	122.1 (8.62)	170.9	56.3	65.6
V-223	129.5 (9.57)	170.5	61.1	
A-224	129.8 (8.53)	173.7	50.1	
L-225	125.8 (8.61)	176.2	57.6	
A-226	116.2 (8.55)	176.4	55.0	
T-227	100.7 (6.70)		60.1	
N-228	116.0 (7.76)	169.9	55.4	
K-229	115.4 (7.48)	173.0	55.2	
A-230	123.3 (9.04)		49.8	
H-231	123.0 (9.02)	171.5	55.8	
I-232	125.5 (8.84)	171.9	59.5	
K-233	125.9 (8.80)	172.9	54.4	
Y-234	124.3 (9.29)		55.2	
D-235	120.2 (8.88)		49.9	

P-236		63.3		
E-237	116.3 (8.38)	174.4	57.6	
I-238	116.8 (7.92)		61.6	
I-239	121.1 (8.30)		60.2	
G-240	108.0 (7.96)	170.1	43.9	
P-241				
R-242	115.3 (8.63)	176.0	59.4	
D-243	117.7 (7.26)	176.3	56.9	
I-244	122.1 (7.31)	174.6	66.0	
I-245	120.0 (8.15)	174.9	66.5	
H-246	117.6 (8.11)	175.5	59.3	
T-247	117.7 (7.98)	172.5	67.4	
I-248	122.7 (7.77)	175.2	66.7	
E-249	119.8 (8.58)	179.2	58.8	
S-250	117.5 (8.22)		61.5	
L-251	120.5 (7.37)	173.5	54.9	
G-252	104.4 (7.81)	170.5	44.5	
F-253	118.0 (6.80)		56.3	
E-254	117.9 (7.98)		55.0	
A-255	125.5 (9.29)	172.8	50.7	
S-256	113.7 (8.66)	170.1	56.9	
L-257	124.0 (8.63)		56.0	
V-258	122.5 (8.06)		62.3	
K-259	126.1 (8.20)	172.9	60.6	

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά που προέκυψαν από το έργο της παρούσας διατριβής:

- 1) **L. Banci, I. Bertini, S.C.Bafoni, C.T.Chasapis, N. Hadjiliadis, A.Rosato:** *An NMR study of the interaction between the human copper(I) chaperone and the second and fifth metal-binding domains of the Menkes protein. FEBS Journal Vol 272, Issue 3, page 865 2005 (I.F= 3,609)*
- 2) **L. Banci, I. Bertini, F.Cantini, C.T.Chasapis, N. Hadjiliadis, A.Rosato:** *A NMR study of the interaction of a three-domain construct of ATP7a with copper(I) and copper(I)-HAH1: the interplay of domains. Journal Of Biological Chemistry. In press (Manuscript M506219200 ) 2005 (I.F= 6,482)*

# An NMR study of the interaction between the human copper(I) chaperone and the second and fifth metal-binding domains of the Menkes protein

Lucia Banci<sup>1,2</sup>, Ivano Bertini<sup>1,2</sup>, Simone Ciofi-Baffoni<sup>1,2</sup>, Christos T Chasapis<sup>1,3</sup>, Nick Hadjiladis<sup>3</sup> and Antonio Rosato<sup>1,2</sup>

1 Magnetic Resonance Center (CERM), University of Florence, Italy

2 Department of Chemistry, University of Florence, Italy

3 Section of Inorganic and Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, Greece

## Keywords

copper(I); metal homeostasis; metallochaperone; protein–protein interaction

## Correspondence

I. Bertini, Magnetic Resonance Center, University of Florence, Via L. Sacconi, 6, 50019 Sesto Fiorentino, Italy  
Fax: +39 055-457-4271  
Tel: +39 055-457-4272  
E-mail: ivanobertini@cerm.unifi.it

(Received 30 September 2004, revised 30 November 2004, accepted 13 December 2004)

doi:10.1111/j.1742-4658.2004.04526.x

The interaction between the human copper(I) chaperone, HAH1, and one of its two physiological partners, the Menkes disease protein (ATP7A), was investigated in solution using heteronuclear NMR. The study was carried out through titrations involving HAH1 and either the second or the fifth soluble domains of ATP7A (MNK2 and MNK5, respectively), in the presence of copper(I). The copper-transfer properties of MNK2 and MNK5 are similar, and differ significantly from those previously observed for the yeast homologous system. In particular, no stable adduct is formed between either of the MNK domains and HAH1. The copper(I) transfer reaction is slow on the time scale of the NMR chemical shift, and the equilibrium is significantly shifted towards the formation of copper(I)–MNK2/MNK5. The solution structures of both apo- and copper(I)–MNK5, which were not available, are also reported. The results are discussed in comparison with the data available in the literature for the interaction between HAH1 and its partners from other spectroscopic techniques.

Copper, an essential trace metal, is utilized as a cofactor in a variety of redox and hydrolytic proteins, which, in eukaryotes, are found in various cellular locations [1]. However, the amount of copper is presumably strictly controlled and a complex machinery of proteins that bind the metal ion strictly controls the uptake, transport, sequestration and efflux of copper *in vivo* [2–4]. In particular, so-called metallochaperones deliver copper to specific intracellular targets, acting like enzymes to lower the activation barrier for copper transfer to their specific partners [5]. A fast kinetics of metal transfer may circumvent the significant thermodynamic overcapacity for copper chelation of cytoplasm components [6].

One of the pathways of copper transfer present in humans involves HAH1 (also known as Atox1), a small soluble metallochaperone [7,8], which is capable of delivering copper(I) both to the Menkes and the Wilson disease proteins (ATP7A and ATP7B, respectively; EC 3.6.3.4) [2–4]. The latter two proteins are membrane-bound P-type ATPases that translocate copper in the *trans*-Golgi network or across the plasma membrane [2–4], depending on environmental conditions [9]. In fact, both proteins experience copper-regulated trafficking between the Golgi and plasma membranes [9]. ATP7A and ATP7B have a long N-terminal cytosolic tail containing six putative metal-binding domains. Homologues of HAH1 and

## Abbreviations

HSQC, heteronuclear single quantum coherence; MNK2, second metal binding domain of the human Menkes protein (ATP7A); MNK5, fifth metal binding domain of the human Menkes protein (ATP7A); RMSD, root mean square deviation.

ATP7A/ATP7B are found in a large number of prokaryotic and eukaryotic organisms. The number of metal-binding domains in ATP7A/ATP7B homologues is variable, ranging from one to six, with proteins from higher eukaryotic organisms, e.g. mammals, having a higher number of such domains than prokaryotic (typically one or two) or yeast (two) homologues [10,11]. The reasons why higher organisms have as many as six metal-binding domains are still unclear. Available studies on ATP7A or ATP7B trying to address this matter indicate some functional differentiation between the first four (counting from the N-terminus) and the last two domains, and suggest that the last two domains are sufficient for function [12–14]. In addition, the mechanism of copper(I) transfer from HAH1 to either human ATPase is not completely elucidated. In this respect, it is noteworthy that homology modelling of the ATP7A metal-binding domains shows significant variations among the various domains in the electrostatic surface implicated in partner recognition, potentially making it possible for them to interact with one another [11].

At present, high-resolution data mapping the regions of interaction between an HAH1 homologue and a soluble metal-binding domain from an ATPase are available only for the yeast [15] and the *Bacillus subtilis* [16] systems. The data obtained on the yeast proteins have been used to determine a three-dimensional structure for the protein adduct [17]. Even though the sequence similarity between yeast Atx1 and HAH1, as well as between the domains of yeast Ccc2 and human ATP7A/ATP7B, is remarkable, there are several well-documented structural differences that warrant direct investigation of the human proteins. In particular, human HAH1 has been shown to bind copper(I) in a linear bidentate fashion [18,19], whereas in Atx1 the copper(I) ion is tricoordinate [20], with two ligands provided by the protein and a third by a reductant molecule recruited from the solution. Also the extent of structural variation upon copper(I) binding observed in Atx1 is different and significantly larger than for HAH1 [19]. The electrostatic potential at the surface of Atx1 and HAH1 is quite similar, but that of the metal binding domains of Ccc2 is somewhat different from ATP7A/ATP7B [11]. In addition, although the two metal-binding domains of Ccc2 are very similar as far as electrostatic features are concerned, the six domains of ATP7A/ATP7B differ widely in this same respect, even showing charge reversals. There seems also to be some differentiation among the ATP7A domains with respect to the structural and dynamic effects of copper(I) binding [21].

In this study we investigated using high-resolution NMR the interaction between HAH1 and two different soluble domains of ATP7A: the second (MNK2 hereafter) and the fifth (MNK5 hereafter). The solution structure of both the apo- and copper(I)-form of MNK2 was already available [21]. No NMR assignment or structural data were instead available for MNK5, which has been expressed in *Escherichia coli*, and structurally characterized by NMR in this study. Particular interest in the study of the interaction between HAH1 and MNK2 is due to the recent proposition that the second soluble domain of ATP7B, which has a *pI* quite close to that of MNK2, is the first entry point for delivery of copper(I) ions by HAH1 to the ATPase [22].

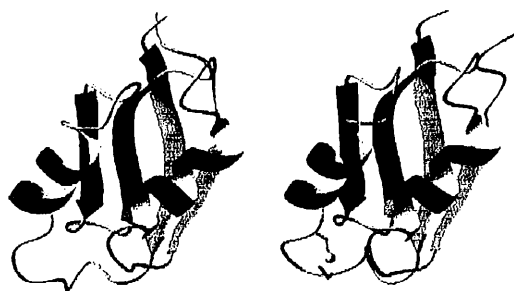
## Results

### NMR spectra assignment and structural calculations

Backbone assignments for MNK5 were obtained using standard strategies based on triple resonance experiments [23]. In  $^{15}\text{N}$ -heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra the resonances of the backbone amide moieties of residues 13–17 were not detectable nor were those of the residues in the C-terminal tag. As in the case of MNK2, where only two residues escaped detection [21], the lack of signals from residues in the metal-binding loop is likely to originate from conformational exchange processes. Variations in the chemical shifts between apo- and copper(I)-MNK5 are observed for residues close (in sequence) to the binding loop, as reported previously for similar systems [21,24,25], and, to a small extent, for residue 65. NMR assignments have been deposited in the BMRB.

One thousand two hundred and twenty-seven and 1121 meaningful upper distance limits were used for structure calculations of apo-MNK5 and copper(I)-MNK5, respectively. In addition, 37  $\phi$  and 37  $\psi$  torsion angles were constrained in each protein form. The structures obtained and the constraints used for calculations have been deposited in the PDB (codes 1Y3K and 1Y3J). The final (after REM refinement) apo-MNK5 and copper(I)-MNK5 families have an average total target function of  $\approx 0.30 \text{ \AA}^2$  (CYANA units), and an average backbone root mean square deviation (RMSD) values (over residues 2–73) of  $\approx 0.70 \text{ \AA}$ ; the all heavy atoms RMSD value instead was instead  $\approx 1.20 \text{ \AA}$ .

Figure 1 shows a comparison of the structures of apo-MNK5 and copper(I)-MNK5, highlighting the metal site structure in the latter. Both structures adopt



**Fig. 1.** Comparison of the solution structures of apo-MNK5 (left) and copper(I)-MNK5 (right). The side chains of Cys14 and Cys17 are shown as sticks; the copper(I) ion is shown as a sphere. This figure was prepared with MO-MO\_ [31].

the ferredoxin-like  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  fold. The RMSD between the backbone atoms for the mean structures of the two families of conformers, excluding the metal-binding loop region and the poorly defined C-terminal tail is  $\approx 1.1$  Å.

#### Interaction between MNK2 and HAH1

To investigate the interaction of MNK2 with HAH1, we titrated  $^{15}\text{N}$ -enriched copper(I)-MNK2 with unlabelled apo-HAH1, and followed the process via  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra. No variation in the chemical shifts of the amide signals in copper(I)-MNK2 could be observed at any stage of the titration. Instead, the intensities of signals decreased with increasing HAH1 concentration. Concomitantly, signals corresponding to apo-MNK2 appeared and increased in intensities along the titration (Fig. 2). No additional signals from a possible (transiently populated) intermediate could be detected at any point of the titration.

The above data thus indicate that an adduct between MNK2 and HAH1 does not form at detectable concentration, even if an interaction between the two proteins does occur, resulting in copper(I) transfer. The latter process is slow on the chemical shift time scale, setting an upper limit for the equilibration rate of  $\approx 10^2$ – $10^3$  s $^{-1}$  (determined by the smallest chemical shift difference between apo-MNK2 and copper(I)-MNK2 that can be detected, i.e.  $\approx 0.1$  p.p.m.). The profiles of signal intensity as a function of the MNK2/HAH1 molar ratio can be fitted with an equilibrium constant for the transfer of copper(I) from HAH1 to MNK2 between 5.0 and 10 (Fig. 3). The relatively high spread of the data in Fig. 3 is due to the fact that during the titration some broadening of the signals occurs, to a different extent at different HAH1/MNK2 ratios. This contributes to scattering the values of the signal integrals.

#### Interaction between MNK5 and HAH1

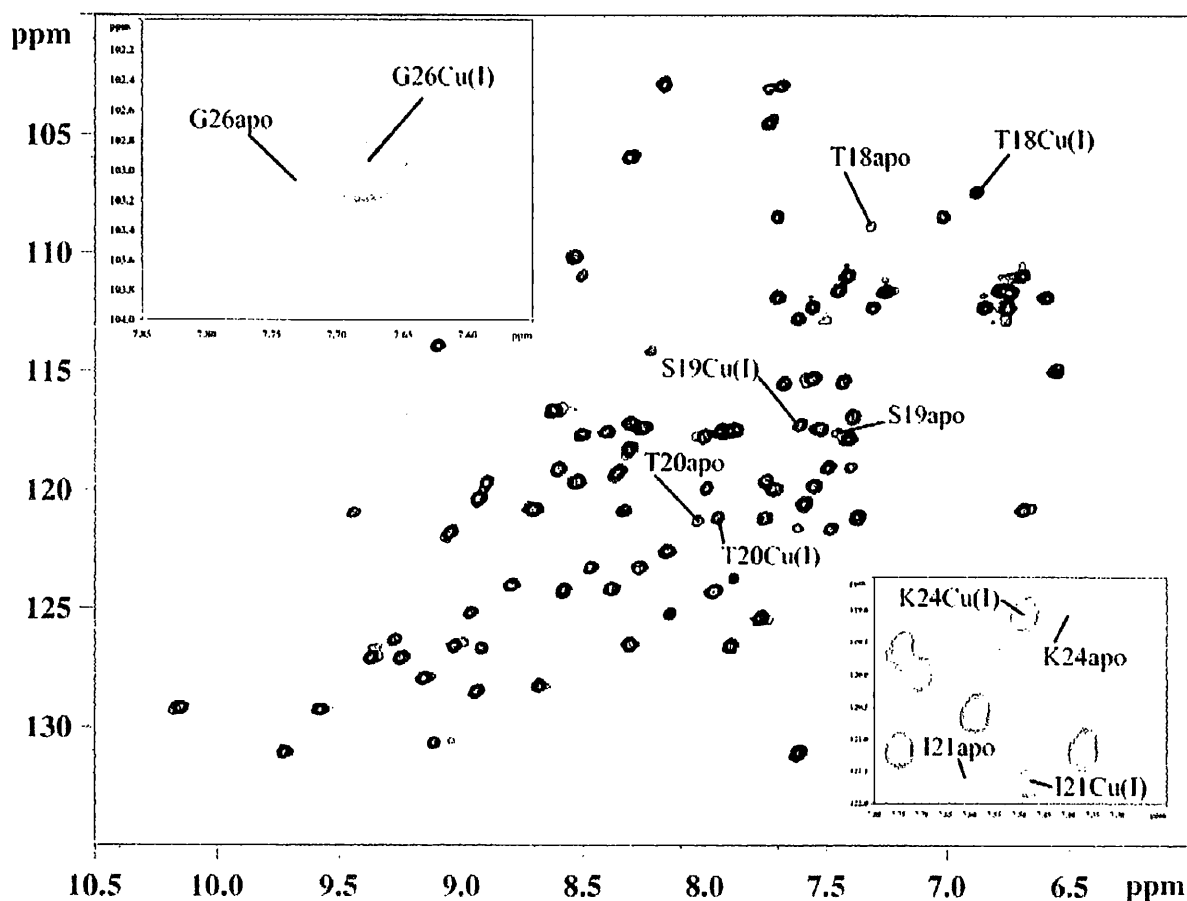
The interaction of MNK5 and HAH1 was studied by titrating  $^{15}\text{N}$ -enriched apo-MNK5 into  $^{15}\text{N}$ -enriched copper(I)-HAH1. As observed for MNK2, there is no detectable formation of a protein/protein adduct, and the copper(I) transfer equilibrium is slow on the chemical shift time scales. Already at the first addition of apo MNK5 (MNK5/HAH1 ratio  $\approx 1 : 5$ ), signals due to copper(I)-MNK5 appeared, with an intensity significantly higher than those of apo-MNK5. Only after an excess of apo-MNK5 with respect to copper(I)-HAH1 is reached, was a steady increase of the intensities of apo-MNK5 signals observed, although the signals of copper(I)-MNK5 did not increase significantly. These data are consistent with the copper(I) transfer process favouring the formation of copper(I)-MNK5. The titration data can be fit to an equilibrium constant similar to that observed in the case of HAH1. In parallel, the intensity of the signals of copper(I)-HAH1 in the HSQC spectra decreased steadily along all the titration, and apo(I)-HAH1 was formed.

#### Discussion

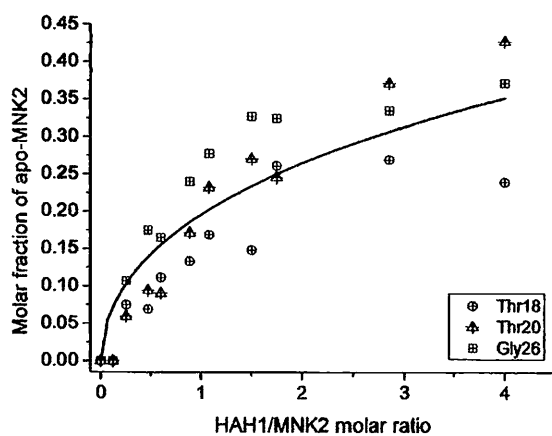
As expected, in solution MNK5 adopts the classical  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  ferredoxin fold regardless of the presence of the metal ion. As observed for other proteins of this class [26,27], in copper(I)-MNK5 the copper ion is close to the protein surface and solvent exposed. Chemical shift variations observed between apo-MNK5 and copper(I)-MNK5 indicate that perturbations due to copper(I) binding affect mainly the Cys-containing loop (loop 1). Indeed, the comparison of the two structures highlights that this is the region where structural rearrangement occurs upon metal binding, while the remainder of the polypeptide chain does not experience significant conformational changes (Fig. 1). For the two copper(I)-binding cysteines, it is difficult to appreciate the extent of conformational rearrangement as their conformation in the two families is not very precisely defined. Overall, the behaviour of MNK5 upon copper(I) binding is similar to what observed for MNK2 [21].

The behaviour observed for the interaction of HAH1 with MNK2 and MNK5 is somewhat different from that observed for the yeast homologues [15], and from that observed for *Bacillus subtilis* CopZ and CopA [16]. In the latter two systems an adduct is formed in fast (with respect to the time scale of NMR chemical shifts) equilibrium with the two separate proteins. This was evident from the fact that in a mixture of two partners in the presence of only one equivalent





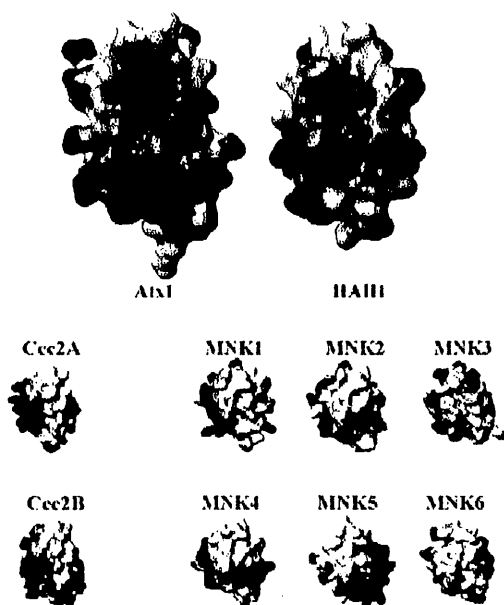
**Fig. 2.** HSQC spectra of copper(I)-MNK2 (blue) and copper(I)-MNK2 in the presence of apo-HAH1 at a 1 : 3 molar ratio (red), showing the simultaneous presence of signals of copper(I)-MNK2 and apo-MNK2.



**Fig. 3.** Fit of the molar fraction of apo-MNK2 as a function of the HAH1/MNK2 molar ratio to the equilibrium  $\text{Cu(I)-MNK2} + \text{HAH1} \rightleftharpoons \text{MNK2} + \text{Cu(I)-HAH1}$ . The signals of residues 18, 20 and 26 have been selected to independently evaluate the molar fraction.

of copper, only a single set of signals from each protein was detected, as a result of fast averaging between the apo- and copper(I)-loaded forms [15,16]. Formation of an adduct in solution was apparent from the measurement of protein tumbling rates in solution [15,16]. Instead, in the present case of the interaction of HAH1 with MNK2 and MNK5 a slow equilibrium is observed. The absence of additional signals, besides those of the apo- and copper(I)-loaded proteins, indicates that there is no accumulation of a protein/protein adduct in solution. However, copper(I) transfer between HAH1 and MNK2/MNK5 is clearly observed, indicating that an interaction does occur. Indeed, formation of an adduct can be detected through surface plasmon resonance measurements, with a  $k_{\text{on}}$  for formation of the adduct of the order of  $10^2\text{--}10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [28].

HAH1 has a distribution of electrostatic charges at the protein surface in the region of putative



**Fig. 4.** Electrostatic potential at the surface in the putative intermolecular interaction region of yeast Atx1 and human HAH1 (upper), and of the various metal binding domains of yeast Ccc2 and human ATP7A (lower). Positively charged areas are blue, negatively charged areas are in red. This figure was generated with *MO\_VO\_1311*.

interaction with the partner that is quite similar to that of yeast Atx1, in spite of its lower *pI* (6.7 vs. 8.6). Figure 4 (upper) shows a comparison of the electrostatic surface of HAH1 and Atx1, highlighting the strong positive potential at the putative interaction region. By contrast, MNK2 is possibly the metal-binding domain in ATP7A most different from either of the two domains of yeast Ccc2 with respect to electrostatic properties. Indeed, MNK2 has a *pI* of 8.7 vs. 4.3–4.4 for the two domains of Ccc2. The *pI* of MNK5 is instead 6.4. As can be seen from Fig. 4 (lower), there is little similarity between the electrostatic potential at the surface of MNK2, MNK5 and Ccc2. The poor energetics of electrostatic interaction between MNK2/MNK5 and HAH1 is such that the formation of a long-lived Cu(I)MNK2/(MNK5/HAH1) adduct is unfavourable, as indicated by the behaviour of the NMR signals along titrations. Consequently, we can observe experimentally only the copper(I) exchange process. The thermodynamic contribution to the formation of the adduct resulting from the formation of copper(I)-bridged heterodimers is not sufficient to stabilize the adduct. In this respect it is worth noting that reversal of the charge of amino acids at the Atx1/Ccc2 interface is known to be able to abolish their interaction altogether [29] as

does mutation of the metal-binding cysteines to serines [28]. The data are thus consistent with a mechanism in which HAH1 and any of the ATP7A metal-binding domains interact via an unstable bi-molecular intermediate (transition state), whose concentration in solution at equilibrium is too low to allow detection by NMR. The intermediate could form through a copper(I) bridge, with the metal ion coordinated by one or two cysteines of both molecules. It is possible to speculate that the formation of the bridged intermediate should logically constitute the slow step in the copper(I) transfer reaction, while dissociation of the intermediate immediately after copper(I) transfer should be fast due to the poor energetics of interaction between the two proteins (Fig. 4). In the yeast system, attraction between residues of opposite charge at the surface of the two partners stabilizes the intermediate, which becomes detectable by NMR (and can be structurally characterized) [15,17]. Note that key residues of Ccc2 involved in the formation of the latter adduct [17] are indeed nonconservatively replaced in the two MNK domains studied here.

The copper(I) transfer process has an equilibration constant of the order of 5–10, with the soluble domains of ATP7A being better ligands for copper(I) than HAH1. In other words, our data are consistent with the copper(I)-binding constant of MNK2 and MNK5 being 5–10 times that of HAH1. The same ratio is close to one for yeast Atx1/Ccc2 [5]. This result is in agreement with competition experiments performed on HAH1 and the second metal-binding domain of the ATP7B (Wilson) protein (WND2 hereafter), which showed that WND2 has a higher affinity for copper(I) than HAH1 [22]. In contrast, isothermal titration calorimetry performed on HAH1 and various constructs of ATP7B present a relatively complex picture in which the number of metal-binding domains contained in each specific construct appeared to affect significantly copper(I) capabilities [30]. In fact, the binding constant of a given domain could differ by a 10-fold in a two-domain construct with respect to the entire six-domain construct, thereby possibly making HAH1 a copper(I) ligand as good as the ATP7B domains [30]. If the above data are relevant also to the ATP7A protein studied here, it should be concluded that the affinity of each domain for copper(I) is dependent on the context within which it is located. Long-range interactions between different metal-binding domains should then reduce the affinity for copper(I) of the individual metal-binding domains with respect to the 'intrinsic' affinity of the isolated domain, which, as shown here, is higher than that of the chaperone.

It has been proposed for the ATP7B protein that the second metal-binding domain constitutes the preferred one for the uptake of the first metal ion by the ATPase from the chaperone, as a result of the specificity of protein–protein interactions between WND2 and HAH1 [22]. Our data suggest that a preferential (with respect to the other metal-binding domains of ATP7A) protein–protein interaction between MNK2 and HAH1 is unlikely. Given that the surface charges of MNK2 and WND2 are fairly similar, a preferential interaction of the chaperone with the second domain seems unlikely also in the case of ATP7B. The selectivity, if any, for the interaction of one of the six metal-binding domains with the chaperone should thus result from the global conformation of the entire soluble portion of the ATPases.

## Materials and methods

HAH1 and MNK2 samples were produced as described previously [19,21]. The protocol adopted to clone, express and purify MNK5 was essentially the same as that used for MNK2 [21]. The main exception was that samples retaining the poly(His) tag were used to record the spectra for NMR frequency assignments as they showed a markedly longer lifetime. Comparison of two-dimensional HSQC and NOESY spectra of MNK5 with and without the poly(His) tag shows that there is no detectable interaction between the tag and the remainder of the protein and that the solution structure of MNK5 is not sensitive to the presence of the tag. Recombinant protein characterization, NMR frequency assignments and solution structure determination of MNK5 in both the apo- and copper(I) forms were carried out following the same approach used for MNK2 [21], and showed MNK5 to be monomeric in solution in both forms. Copper(I)–MNK5 was found from atomic absorption measurements to bind one copper(I) ion per protein molecule.

The procedure used for NMR titrations was the same as described in a previous study from our laboratory reporting on the interaction between yeast Atx1 and Ccc2 [15]. Protein concentrations were typically around 0.3–0.5 mM; titrations were carried out up to protein ratios of 4 : 1.

## Acknowledgements

We thank Fiorenza Cramaro for MNK5 frequency assignments and initial structure calculations. Manuele Migliardi is thanked for help in HAH1 protein preparations. This work was supported by MIUR-COFIN 2003, Ente Cassa di Risparmio di Firenze and the European Commission (contract-no. QL2-CT-2002-00988).

## References

- Linder MC (1991) *Biochemistry of Copper*. Plenum Press, New York.
- O'Halloran TV & Culotta VC (2000) Metallochaperones: an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* **275**, 25057–25060.
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M & Dameron CT (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* **25**, 29–32.
- Puig S & Thiele DJ (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 171–180.
- Huffman DL & O'Halloran TV (2000) Energetics of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper transporter, Ccc2. *J Biol Chem* **275**, 18611–18614.
- Rae T, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC & O'Halloran TV (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805–808.
- Klomp LW, Lin SJ, Yuan D, Klausner RD, Culotta VC & Gitlin JD (1997) Identification and functional expression of *HAH1*, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem* **272**, 9221–9226.
- Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin S-J, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Cizewski Culotta V, Penner-Hahn JE & O'Halloran TV (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu (I) receptor Atx1. *Science* **278**, 853–856.
- Petris MJ, Mercer JF, Culvenor JG, Lockhart P & Camakaris J (1996) Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J* **15**, 6084–6095.
- Bull PC & Cox DW (1994) Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet* **10**, 246–252.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Molteni E, Huffman DL & O'Halloran TV (2002) Metallochaperones and metal transporting ATPases. A comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res* **12**, 255–271.
- Goodyer ID, Jones EE, Monaco AP & Francis MJ (1999) Characterization of the Menkes protein copper-binding domains and their role in copper-induced protein relocalization. *Hum Mol Genet* **8**, 1473–1478 doi: 9208958.
- Voskoboinik I, Strausak D, Greenough M, Brooks H, Petris M, Smith S, Mercer JF & Camakaris J (1999) Functional analysis of the N-terminal CXXC metal-binding motifs in the human Menkes copper-transporting P-type ATPase expressed in cultured mammalian cells. *J Biol Chem* **274**, 22008–22012.

- 14 Huster D & Lutsenko S (2003) The distinct roles of the N-terminal copper-binding sites in regulation of catalytic activity of the Wilson's disease protein. *J Biol Chem* **278**, 32212–32218.
- 15 Arnesano F, Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL & O'Halloran TV (2001) Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J Biol Chem* **276**, 41365–41376.
- 16 Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Del Conte R & Gonnelli L (2003) Understanding copper trafficking in bacteria: interaction between the copper transport protein CopZ and the N-terminal domain of the copper ATPase CopA from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **42**, 1939–1949.
- 17 Arnesano F, Banci L, Bertini I & Bonvin AMJJ (2004) A docking approach to the study of copper trafficking proteins: interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure* **12**, 669–676.
- 18 Ralle M, Lutsenko S & Blackburn NJ (2003) X-Ray absorption spectroscopy of the copper chaperone HAH1 reveals a linear two-coordinate Cu (I) center capable of adduct formation with exogenous thiols and phosphines. *J Biol Chem* **278**, 23163–23170.
- 19 Anastassopoulou J, Banci L, Bertini I, Cantini F, Katsari E & Rosato A (2004) Solution structure of the apo- and copper (I) loaded human metallo-chaperone HAH1. *Biochemistry* **43**, 13046–13053.
- 20 Arnesano F, Banci L, Bertini I, Huffman DL & O'Halloran TV (2001) Solution structure of the Cu (I) and Apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry* **40**, 1528–1539.
- 21 Banci L, Bertini I, Del Conte R, D'Onofrio M & Rosato A (2004) Solution structure and backbone dynamics of the Cu (I) and apo-forms of the second metal-binding domain of the Menkes protein ATP7A. *Biochemistry* **43**, 3396–3403.
- 22 Walker JM, Huster D, Ralle M, Morgan CT, Blackburn NJ & Lutsenko S (2004) The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's disease protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1. *J Biol Chem* **279**, 15376–15384.
- 23 Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer AG III & Skelton N (1996) *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*. Academic Press, San Diego.
- 24 Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL & O'Halloran TV (2001) Solution structure of the yeast copper transporter domain Ccc2a in the apo and Cu (I)-loaded states. *J Biol Chem* **276**, 8415–8426.
- 25 Jones CE, Daly NL, Cobine PA, Craik DJ & Dameron CT (2003) Structure and metal binding studies of the second copper binding domain of the Menkes ATPase. *J Struct Biol* **143**, 209–218.
- 26 Rosenzweig AC (2001) Copper delivery by metallochaperone proteins. *Acc Chem Res* **34**, 119–128.
- 27 Banci L & Rosato A (2003) Structural genomics of proteins involved in copper homeostasis. *Acc Chem Res* **36**, 215–221.
- 28 Strausak D, Howie MK, Firth SD, Schlicksupp A, Pipkorn R, Multhaup G & Mercer JF (2003) Kinetic analysis of the interaction of the copper chaperone Atox1 with the metal binding sites of the Menkes protein. *J Biol Chem* **278**, 20821–20827.
- 29 Portnoy ME, Rosenzweig AC, Rae T, Huffman DL, O'Halloran TV & Cizewski Culotta V (1999) Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J Biol Chem* **274**, 15041–15045.
- 30 Wernimont AK, Yatsunyk LA & Rosenzweig AC (2004) Binding of copper (I) by the Wilson disease protein and its copper chaperone. *J Biol Chem* **279**, 12269–12276.
- 31 Koradi R, Billeter M & Wüthrich K (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structure. *J Mol Graphics* **14**, 51–55.

**A NMR STUDY OF THE INTERACTION OF A THREE-DOMAIN CONSTRUCT OF ATP7A WITH COPPER(I) AND COPPER(I)-HAH1: THE INTERPLAY OF DOMAINS**

Lucia Banci<sup>1,2</sup>, Ivano Bertini<sup>1,2,\*</sup>, Francesca Cantini<sup>1,2</sup>, Cbristos T. Chasapis<sup>1</sup>, Nick Hadjiliadis<sup>1,3</sup>, Antonio Rosato<sup>1,2</sup>

From Magnetic Resonance Center (CERM) – University of Florence, Via L. Sacconi 6, 50019 Sesto Fiorentino, Italy (1); Department of Chemistry - University of Florence, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino, Italy (2) ; Section of Inorganic and Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece (3)

Running Title: Interaction of MNK456 with Cu(I)-HAH1

\*Address correspondence to: Prof. Ivano Bertini Magnetic Resonance Center, University of Florence Via L. Sacconi, 6 50019 Sesto Fiorentino, ITALY Fax: +39 055 4574271 Tel: +39 055 4574272 E-mail:

[ivanobertini@cerm.unifi.it](mailto:ivanobertini@cerm.unifi.it)

ATP7A is a P-type ATPase involved in copper(I) homeostasis in humans. It possesses a long N-terminal tail protruding into the cytosol and containing six copper(I)-binding domains, which are individually folded and capable of binding one copper(I) ion. ATP7A receives copper from a soluble protein, the metallochaperone HAH1. The exact role and interplay of the six soluble domains is still quite unclear, as it has been extensively demonstrated that they are strongly redundant with respect to copper(I) transport *in vivo*. In the present work, a three-domain (fourth to sixth, MNK456) construct has been investigated in solution by NMR, in the absence and in the presence of copper(I). In addition, the interaction of MNK456 with copper(I)-HAH1 has been studied. It is proposed that the fourth domain is the preferential site for the initial interaction with the partner. A significant dependence of the overall domain dynamics on the metallation state and on the presence of HAH1 is observed. This dependence could constitute the molecular mechanism to trigger copper(I) translocation and/or ATP7A relocalization from the trans-Golgi network to the plasmatic membrane.

Copper, an essential trace metal, is utilized as a cofactor in a variety of redox and hydrolytic proteins, which, in eukaryotes, are found in various cellular locations(1). However, copper can be potentially toxic *in vivo* and thus its intracellular concentration is presumably strictly controlled (2-4). Disruption of copper homeostasis leads to illness, such as in Menkes or Wilson diseases (5). The latter are caused by mutations respectively in ATP7A and ATP7B, which translocate copper in the trans-Golgi network or across the plasma membrane (3;4), depending on cellular conditions (6). Even though ATP7A and ATP7B contain six cytosolic copper(I)-binding domains, it appears that one (7;8), or even no

soluble domain if copper is abundant (9), is sufficient for copper translocation. In addition, only one of the two most C-terminal metal-binding domains is sufficient for correct protein relocalization (10), while both C-terminal metal-binding domains (i.e. the fifth and sixth domains) are needed to regulate copper affinity and protein phosphorylation rates (11). In humans, the function of HAH1 is to transfer copper(I) to the ATP7A and ATP7B proteins (12). This process has been investigated through a variety of low-resolution techniques, suggesting that there may be preferential interaction sites within the cytoplasmic tail (13;14). NMR data are available for the interaction of individual ATP7A soluble domains (2, 5 and 6) with HAH1, showing copper(I) transfer and a slow kinetics of interaction (15).

The possible differentiation *in vivo* among the six domains, their possible reciprocal interaction(s) and the interaction with HAH1 and with copper(I) are all open matters of discussion. Here, these matters are addressed through the NMR investigation of a three-domain ATP7A construct, spanning from domain 4 to 6 (MNK456 hereafter)<sup>1</sup>. This construct presents several points of interest: *i*) it contains the last two domains, which are important for catalytic phosphorylation of ATP7B (11); *ii*) it contains domain 4, one of the proposed favoured interaction sites with HAH1 (14); *iii*) domains 4 and 5 are connected by a 41-residue linker, while domains 5 and 6 are connected by a 6-residue linker (shortest inter-domain linker in ATP7A). This combination provides insight into the global dynamics and domain interplay of the N-terminal tail of the enzyme, and thus information on possible molecular mechanisms *in vivo*.

## MATERIALS AND METHODS

The three C-terminal metal-binding domains of ATP7A have been expressed as a

single construct in *Escherichia coli* and purified using affinity chromatography based on the use of His<sub>6</sub>-tag. The protein has been produced in M9 minimal media and enriched in <sup>15</sup>N or <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C for NMR studies. The thermal stability of apo-MNK456 has been investigated through <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra (16) at various temperatures, from 298 K up to 323 K. The protein was metallated by titrating it with an acetonitrile complex of copper(I) after reduction with a five-fold excess of DTT. The titration was followed through <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra. The MNK56 and MNK4 constructs have been similarly produced in *E. coli* from rich media cultures.

The protein showed significant precipitation over one-two days at concentrations above 500 μM. To minimize sample aggregation and obtain best spectra quality, NMR samples were typically 200-300 μM in a 100 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. All spectra were acquired using cryo-probe technology at 500 (for protein dynamics measurements), or 800 / 900 MHz (for experiments for resonance assignment) spectrometers. The NMR frequencies of backbone nuclei have been assigned using a standard approach based on triple-resonance experiments, and are given in the supplementary material for both the apo- and the fully metallated state (Cu<sub>3</sub>MNK456) (Tables S1 and S2). The backbone dynamics of MNK456 was studied in the apo-form as well as in Cu<sub>3</sub>MNK456 through the analysis of <sup>15</sup>N R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> relaxation rates and heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N NGEs (17).

The interaction with the human copper(I) chaperone HAH1 has been studied through NMR by titrating isotopically enriched apo-MNK456 with unlabelled copper-(I) HAH1 to a HAH1:MNK456 molar ratio of up to 8:1. In addition, the backbone dynamics of MNK456 was also studied in presence of HAH1 at various molar ratios (1:1, 2:1, 4:1). Apo-HAH1 was purified from rich media cultures, as previously described (18), reduced with two-fold DTT, then metallated by adding a slight excess of [Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>]<sup>+</sup> in a N<sub>2</sub> atmosphere chamber. Samples were then passed on a desalting column to remove DTT and acetonitrile. The degree of metallation of HAH1 was checked by NMR and found to be essentially 100%. For titrations, copper(I)-HAH1 was added to reduced apo-MNK456 samples, from which DTT had been removed using a desalting column, in a N<sub>2</sub> atmosphere chamber. Relative ratios of HAH1:MNK456 were measured from the intensity of well-resolved NMR signals in the methyl region.

For chemical labeling experiments, 400 pmol of apo-MNK456 alone or in presence of copper(I)-HAH1 were incubated with a 50-fold molar excess of the cysteine-directed reagent 7-diethylamino -3-(4' maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM, Sigma) for 2.5 min in the dark under anaerobic conditions. The reaction was quenched with a 10-fold molar excess of β-mercaptoethanol over CPM. The same experimental set-up has been used for MNK56 and MNK4. To investigate the role of the various domains within MNK456, the latter was partially proteolyzed with trypsin at a 1:2000 (w/w) ratio for 3h at room temperature. The reaction was stopped with the addition of 2mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMFS Sigma) protease inhibitor. The proteolyzed MNK456 fragments were separated on a 15% Tricine gel, and the separation of the CPM- labeled peptides was monitored under UV light using a Gel-Doc system. The protein fragments were also stained with Coomassie R250. The present protocol is essentially the same as that described in (13). In the case of the MNK56 and MNK4 constructs, no digestion has been performed.

## RESULTS AND DISCUSSION

The NMR spectra of MNK456 are quite crowded and showed broadening due to conformational exchange processes, thus complicating the analysis and interpretation of spectra (Fig. S1). The observed broadening experienced a significant enhancement with increasing concentration. The problem was particularly evident for domain 5, as also observed for the isolated domain (15). The complexity and the behaviour in solution of MNK456 prevented a *de novo* structural characterization of the protein. As the NMR structure of all the individual domains is available (15;19), backbone amide chemical shifts, which are excellent reporters of tertiary structure changes (20), could be compared. Fig. 1 indeed shows that the structure of the three metal-binding domains is conserved in apo-MNK456, as significant variations are localized only next to linker regions and are a consequence of the peptide bonds at the N- and C-termini of each domain.

After addition of 1.0 equivalent of copper(I) to apo-MNK456, signals from the residues in the loop containing the metal-binding cysteines (loop I) of the metallated fourth and sixth domains are both already observable (Fig. S2). In the fifth domain, the signals from the residues in loop I are not observed in the apo- nor

in the copper(I) form. The relative intensity of the signals of the metallated fourth and sixth domains indicates that they have similar affinity for copper (within 20%). When increasing the Cu:MNK456 ratio, broadening of several signals within and close to the metal-binding loops of all three domains is observed. In the fifth domain most signals, even far from the metal-binding region, become extremely weak or undetectable.

Based on  $^{15}\text{N}$  relaxation data, a distinct dynamic behaviour is observed in different MNK456 regions (Fig. 2). Each of the three domains appears to be individually rigid in solution on the sub-nanosecond time scale, as shown by the relatively uniform  $^{15}\text{N}$   $R_1$  and NOE values within each domain, while the first linker region instead experiences extensive dynamics on the same time scale. The overall dynamics of the multi-domain construct is somewhat complex. Domain 4 reorients in solution more freely than the other two domains, being allowed to do so by the long flexible linker I (shown in Fig. 2 by the higher  $R_1$  and lower  $R_2$  values). Indeed, the correlation time for tumbling in solution of domain 4, calculated from  $R_2/R_1$  values, is significantly lower than for domains 5 and 6:  $7.1 \pm 0.3$ ,  $12.8 \pm 1.3$  and  $10.8 \pm 1.3$  ns for domains 4, 5 and 6 respectively. Note that the above values for the correlation times should be regarded as estimates because they are based on the assumption of isotropic reorientation in solution. Conformational equilibria are present in domains 5-6, which tumble in solution with similar rates. The similar tumbling rate of the two C-terminal domains is in agreement with what observed for a *Bacillus subtilis* homolog of ATP7A (21), and can be ascribed to the shortness of linker II. A small degree of uncoupling in the motion of domains 5 and 6 is possibly reflected in the slightly higher correlation time of the former, even though the difference is hardly statistically significant. Loading apo-MNK456 with copper(I) induces a constraining of the motional freedom of domain 4 (Fig.3A), whose apparent correlation time increases from  $7.1 \pm 0.3$  to  $8.3 \pm 0.6$  ns. The mobility of domain 6 appears instead globally unaltered. It was not possible to estimate the mobility of domain 5 in the presence of copper(I) because of the mentioned difficulty in observing signals from its nuclei.

When apo-MNK456 is presented with copper(I)-HAH1, the metal ion is transferred from the chaperone to the ATPase. As shown in Fig. 4, signals of Cys17 and Val18 in the metal-binding loop (loop I) of the apo-form of domain 4 disappear upon the addition of copper(I)-HAH1 at

a HAH1:MNK456 ratio slightly exceeding 1.0 (i.e. when only one copper(I) ion is available per MNK456 molecule), suggesting a slow kinetics of exchange, similarly to isolated MNK2 and MNK5 domains (15). A reduction of the intensity of signals from the metal-binding loop of domains 5 and 6 is also observed during the titration, but this is much shallower than for domain 4, suggesting that in the initial stages (HAH1:MNK456 ratio up to 1.0) of the titration copper is preferentially transferred to domain 4. The chemical shift variations observed during the titration are very small. Signals from copper(I)-domain 6 appear at a HAH1:MNK456 ratio of 2:1, showing that copper(I) eventually is loaded in this domain. To independently analyze the possible preferential interaction of copper(I)-HAH1 with a single domain within the present three-domain construct, an experiment based on chemical labelling with a fluorophore and proteolysis, as applied to the Wilson protein (13), was performed (Fig.5). Cysteines become labelled by the fluorophore only when they are not engaged in any bond, i.e. when they are reduced and not bound to the metal. Therefore, the detection of the modification by the chemical label, or absence thereof, is indicative of the copper(I)-binding state (13). The experiment shows that copper(I)-HAH1 does transfer the metal to MNK456, as HAH1 is (partly) labelled by the fluorophore (separate experiments, not shown, demonstrate that copper(I)-HAH1 does not react with the chemical label). In the presence of excess copper(I)-HAH1 (rightmost lane in Fig. 5), one of the bands from the MNK456 digest disappears, demonstrating preferential protection from the cysteine-directed probe caused by copper(I) transfer (13). The molecular weight of the band disappearing is about 8,000 Da indicating that it contains a single domain. As previously discussed for the Wilson protein (13), this experiment shows that copper(I)-HAH1 selects an individual domain in the present three-domain construct as the initial interaction site. The results of NMR experiments (Fig. 4) are fully consistent with this picture, and clearly suggest domain 4 to be the preferential interaction site. To independently assess the identity of the domain constituting the preferential site for HAH1 docking, we separately produced MNK56 and MNK4, and repeated the chemical labelling experiments (Fig. 6). Fig.6 clearly shows that copper(I)-HAH1 can transfer its metal cargo to MNK4 but not to MNK56. Transfer to MNK4 is demonstrated by the disappearance of the MNK4 band and the appearance of a lower molecular weight band due to apo-HAH1 (compare the 4<sup>th</sup>

and the 3<sup>rd</sup> lane in Fig. 6). Instead, MNK56 reacts with the fluorophore both in absence and in presence of copper(I)-HAH1 (first two lanes in Fig.6), demonstrating that it is unable to uptake the metal ion from the chaperone.

NMR shows that the presence of copper(I)-HAH1 affects protein dynamics with respect to isolated apo-MNK456 (Fig.3B), inducing slower tumbling in domain 4 (but to a smaller extent than Cu<sub>3</sub>MNK456) as well as enhanced conformational averaging. Instead, in domains 5 and 6 copper(I)-HAH1 induces faster tumbling (tumbling correlation times reduced respectively by  $1.4 \pm 2.4$  and  $1.0 \pm 1.9$  ns). In addition, the presence of HAH1 causes conformational exchange in the linker I region, so that signals from residues in this region are broadened beyond detection.

The present data are consistent with a mechanism for copper(I) transfer to MNK456 from HAH1 where the first entry point for the metal ion into the ATPase is provided by domain 4. This is presumably due to MNK4 having a better electrostatic and/or steric complementarity to the physiological partner. Shielding of domains 5 and 6 by domain 4 in MNK456 is unlikely to play a role in tuning the interaction, as the two-domain construct MNK56 does not interact with HAH1 (Fig. 6). Domain 4 has a surface electrostatic potential relatively similar to that of the two metal-binding domains of Ccc2, the yeast homolog of ATP7A, which form a relatively stable adduct with their partner (22;23). It is also relevant that the pI of domain 4 in ATP7A, as well as ATP7B, is the most similar to that both domains of yeast Ccc2 (4.0-4.5). Other ATP7A domains, whose surface is somewhat dissimilar from Ccc2, do not form such an adduct and feature a slow kinetic of interaction with HAH1 (15). A role for domain 4 as the preferential interaction site for HAH1 in ATP7B has been recently proposed (14), possibly together with domain 2, while earlier work identified only domain 2 (13). Notably, domain 2 has a pI slightly higher than 8.0 in ATP7A and ATP7B, thus quite different from domain 4, but the electrostatic surface at the putative interaction site is still compatible with that of HAH1 (13). The present data show that copper(I) is anyway distributed over the various domains. It is not possible to ascertain whether transfer to domains other than the fourth happens by way of direct interaction with domain 4 or with HAH1 or through the release of free copper(I) in solution. The latter

mechanism appears quite unlikely to be physiologically relevant.

A second noteworthy conclusion from the present work is that the dynamics of the multi-domain MNK456 construct is quite elaborate, and depends significantly on the presence of copper(I) and of HAH1. This can be the result both of a modulation of inter-domain contacts and of the variation of dynamics in the linker I region. There is also some unexpected modulation in the dynamic processes involving the interaction between domain 5 and domain 6, permitted by the relatively short linker II. It can be suggested that the dependence of domain dynamics on copper(I) and HAH1 (which might be associated also to changes of the time-averaged protein conformation) constitutes a molecular mechanism to signal (internally to the other domains and/or externally to other biomolecules) the status of copper(I) loading of the cytoplasmic tail. Indeed, the present data provide direct experimental support for previous proposals that ATP7A multiple domains could modulate protein relocalization and/or the affinity for copper(I) of the metal binding sites in the trans-membrane region, through copper(I)-dependent variations in the conformation and/or dynamics of the cytoplasmic tail (11;24).

In summary, it is proposed that when interacting with the MNK456 triple-domain construct, copper(I)-HAH1 preferentially donates its cargo to domain 4. The present work thus reinforces the view that interaction of ATP7A or ATP7B with their partner metallochaperone does not involve all the domains equally, with some domains actually interacting more readily than others. This preferential interaction is presumably under kinetic control. Thermodynamically all domains have similar affinity for copper(I) (25). The metal donated by HAH1 is indeed found to distribute over all domains in MNK456. It might be supposed that *in vivo* this (re)distribution happens via inter-domain contacts. Loading the cytoplasmic tail of ATP7A with copper(I) as well as the interaction with the partner induce a significant change in ATP7A domain dynamics. This change (or the associated variation of the time-averaged protein conformation) may be relevant to activate copper(I) translocation across the membrane and/or ATP7A relocalization from the trans-Golgi to the cytoplasmic membrane.



## Reference List

1. Linder, M. C. (1991) *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York
2. O'Halloran, T. V. and Culotta, V. C. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 25057-25060
3. Harrison, M. D., Jones, C. E., Solioz, M., and Dameron, C. T. (2000) *Trends Biochem Sci* **25**, 29-32
4. Puig, S. and Thiele, D. J. (2002) *Curr Opin Chem Biol* **6**, 171-180
5. Menkes, J. H., Alter, M., Steigleder, G. K., Weakley, D. R., and Sung, J. H. (1962) *Pediatrics* **29**, 764-779
6. Petris, M. J., Mercer, J. F., Culvenor, J. G., Lockhart, P., and Camakaris, J. (1996) *EMBO J.* **15**, 6084-6095
7. Iida, M., Terada, K., Sambongi, Y., Wakabayashi, T., Miura, N., Koyama, K., Futai, M., and Sugiyama, T. (1998) *FEBS Lett.* **428**, 281-285
8. Forbes, J. R., Hsi, G., and Cox, D. W. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 12408-12413
9. Voskoboinik, I., Strausak, D., Greenough, M., Brooks, H., Petris, M., Smith, S., Mercer, J. F., and Camakaris, J. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 22008-22012
10. Strausak, D., La Fontaine, S., Hill, J., Firth, S. D., Lockhart, P. J., and Mercer, J. F. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 11170-11177
11. Huster, D. and Lutsenko, S. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 32212-32218
12. Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S.-J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Cizewski Culotta, V., Penner-Hahn, J. E., and O'Halloran, T. V. (1997) *Science* **278**, 853-856
13. Walker, J. M., Huster, D., Ralle, M., Morgan, C. T., Blackburn, N. J., and Lutsenko, S. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 15376-15384
14. van Dongen, E. M., Klomp, L. W., and Merckx, M. (2004) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **323**, 789-795
15. Banci, L., Bertini, I., Chasapis, C., Ciofi-Baffoni, S., Hadjiliadis, N., and Rosato, A. (2005) *FEBS J.* **272**, 865-871
16. Bodenhausen, G. and Ruben, D. J. (1980) *Chem.Phys.Lett.* **69**, 185-188
17. Ishima, R. and Torchia, D. A. (2000) *Nature Struct.Biol.* **7**, 740-743
18. Anastassopoulou, J., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Katsari, E., and Rosato, A. (2004) *Biochemistry* **43**, 13046-13053
19. Gitschier, J., Moffat, B., Reilly, D., Wood, W. I., and Fairbrother, W. J. (1998) *Nature Struct.Biol.* **5**, 47-54
20. Wishart, D. S. and Case, D. A. (2001) *Methods Enzymol* **338**, 3-34
21. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Gonnelli, L., and Su, X. C. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 50506-50513

22. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Ciofi-Baffoni, S., Huffman, D. L., and O'Halloran, T. V. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 41365-41376
23. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., and Bonvin, A. M. J. J. (2004) *Structure* **12**, 669-676
24. Voskoboinik, I., Mar, J., Strausak, D., and Camakaris, J. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 28620-28627
25. Wernimont, A. K., Yatsunyk, L. A., and Rosenzweig, A. C. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 12269-12276
26. Garrett, D. S., Seok, Y. J., Peterkofsky, A., Clore, G. M., and Gronenborn, A. M. (1997) *Biochemistry* **36**, 4393-4398

#### FOOTNOTES

This work was supported by MIUR-COFIN 2003, MIUR-PISR, Ente Cassa di Risparmio di Firenze (Project "PROMELAB"), the European Commission (contract-no. QLG2-CT-2002-00988). Dr. W. Fairbrother is thanked for providing us with chemical shift data for MNK4.

<sup>1</sup>The abbreviations used are: MNK456: three-domain ATP7A construct, spanning from domain 4 to 6; MNK56: two-domain ATP7A construct, containing domains 5 and 6; MNK2: second binding domain of the ATP7A protein, MNK4: fourth binding domain of the ATP7A protein; MNK5: fifth binding domain of the ATP7A protein; HSQC: heteronuclear single quantum coherence spectroscopy; CPM: 7-diethylamino -3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Top scheme: Secondary structure of apo-MNK456 as deduced from the chemical shift index. Vertical broken lines indicate domain boundaries. Grey walls indicate unassigned residues. Graph A: Combined NMR chemical shift variations between apo- and Cu<sub>3</sub>MNK456. Graph B: Combined NMR chemical shift variations between individual metal-binding domains (apo-form) and apo-MNK456. Combined NMR chemical shift variations are calculated from the experimental <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N chemical shift variations ( $\Delta\delta(^1\text{H})$  and  $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ , respectively) measured between corresponding peaks, through the following equation (26)

$$\Delta\delta^{combined} = \sqrt{\frac{(\Delta\delta(^1\text{H}))^2 + \frac{1}{25}(\Delta\delta(^{15}\text{N}))^2}{2}}$$

**Fig. 2.** <sup>15</sup>N relaxation data for apo-MNK456. Negative NOE values for residues 70-110 indicate that this region (linker I) is significantly mobile on the sub-nanosecond time scale. Higher R<sub>1</sub> together with lower R<sub>2</sub> values for the region corresponding to domain 4 with respect to domains 5-6 indicate that domain 4 reorients in solution more rapidly. R<sub>2</sub> values for some residues in domains 5 (mostly) and 6 are increased because of local conformational exchange processes.

**Fig. 3.** Variation in <sup>15</sup>N relaxation parameters between (A) Cu<sub>3</sub>MNK456 and apo-MNK456. (B) between apo-MNK456 in the presence of 3 equivalents of copper(I)-HAH1 and apo-MNK456. The simultaneous reduction of R<sub>1</sub> values and increase of R<sub>2</sub> values indicates a restriction in domain motion in solution (e.g. for domain 4 in panel A, i.e. upon copper(I) binding), which is quantified by an increase in the correlation time for tumbling. Viceversa, an increase of R<sub>1</sub> values and reduction of R<sub>2</sub> values indicates enhanced tumbling rates, corresponding to a smaller correlation time for tumbling.

**Fig. 4.** Variation of the intensity of selected signals of residues in domain 4 during the titration of <sup>15</sup>N-enriched apo-MNK456 with unlabelled copper(I)-HAH1. All signal intensities have been referenced to the intensity of the signal of Cys17 in the absence of HAH1.

**Fig. 5.** Interaction of MNK456 with copper(I)-HAH1 revealed through chemical labelling of free (i.e. not bound to the metal) cysteines with a fluorescent probe. From left to right: 1<sup>st</sup> lane, apo-MNK456; 2<sup>nd</sup> lane, apo-MNK456 treated with trypsin; 3<sup>rd</sup> to 5<sup>th</sup> lane, apo-MNK456 incubated with increasing concentration of copper(I)-HAH1 (MNK456:HAH1 ratios, 1:1, 3:1 and 5:1, respectively). The disappearing band from a MNK456 fragment and the band corresponding to apo-HAH1 are indicated by arrows.

**Fig. 6.** Interaction of MNK56 and MNK4 with copper(I)-HAH1 revealed through chemical labelling. From left to right: 1<sup>st</sup> lane, apo-MNK56; 2<sup>nd</sup> lane, apo-MNK56 in the presence of excess copper(I)-HAH1; 3<sup>rd</sup> lane, apo-MNK4; 4<sup>th</sup> lane: apo-MNK4 in the presence of excess copper(I)-HAH1. The bands of MNK56, MNK4 and apo-HAH1 (formed upon copper(I) transfer) are indicated by arrows. Lanes containing only apo-

MNK are labelled with a sign “—”on top of the Figure; lanes containing apo-MNK incubated with copper(I)-HAH1 are labelled with a sign “+”.

FIGURE 2

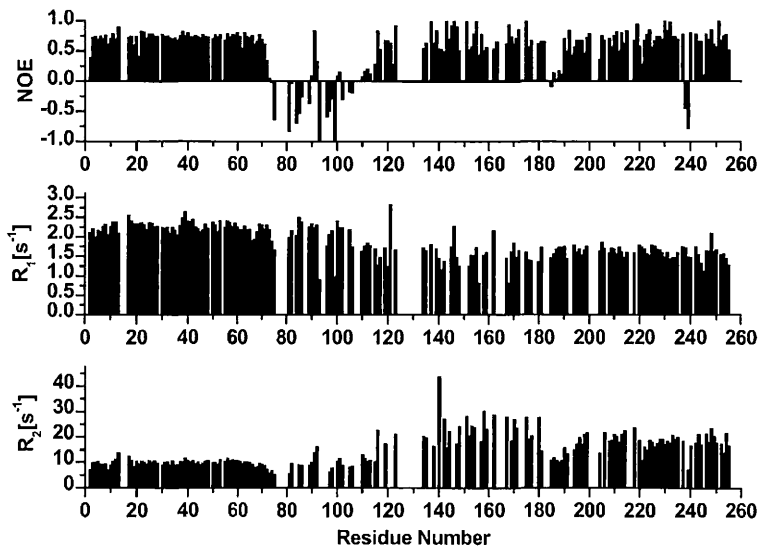


FIGURE 1

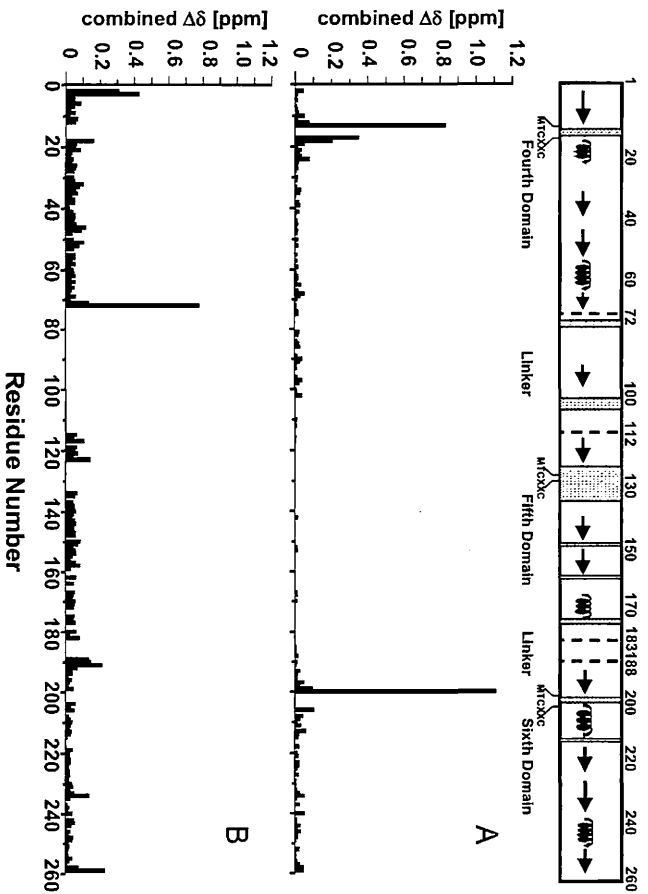


FIGURE 3

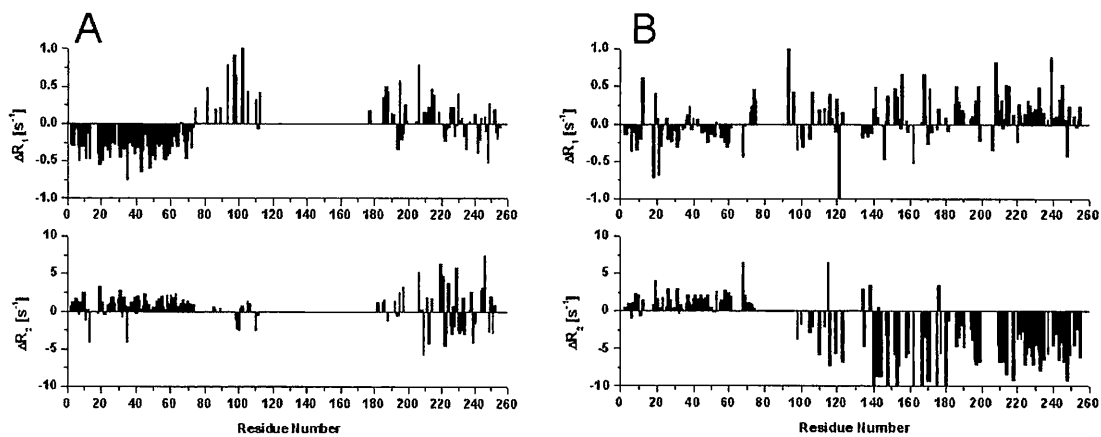
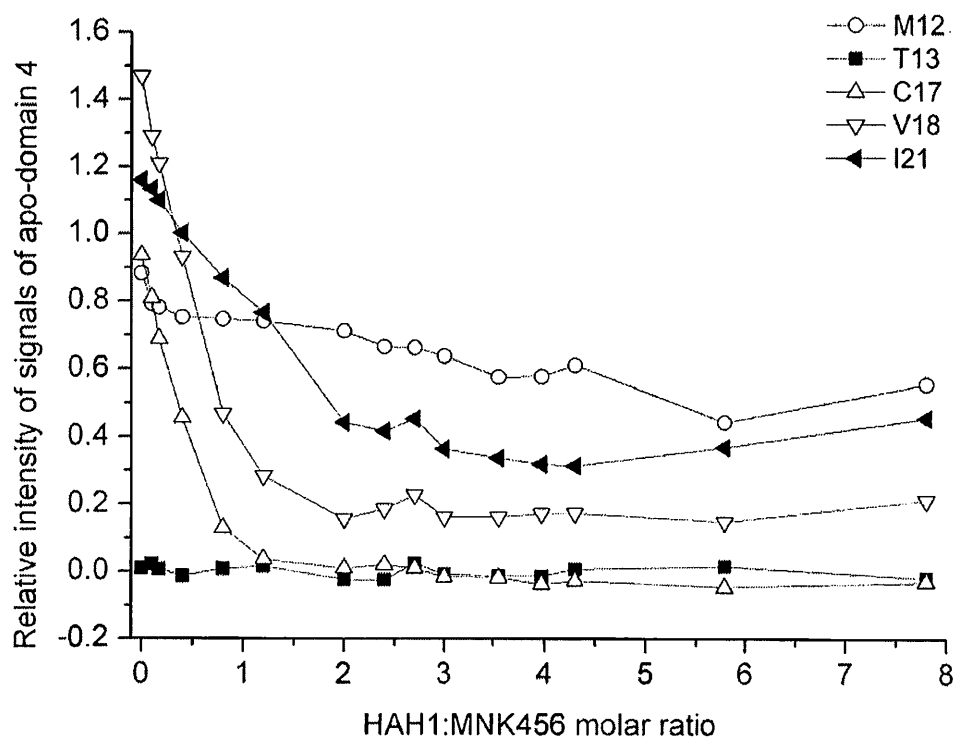
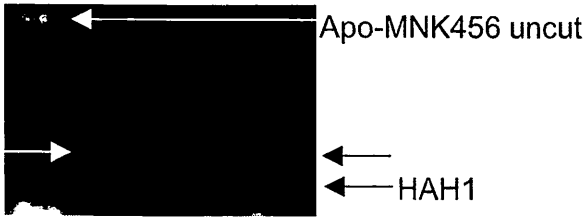


FIGURE 4



**FIGURE 5**



**FIGURE 6**

