

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Υπολογιστικές και
δομικές μελέτες
4-α-ελικοειδών
δεματίων

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Βασιλική Φαδούλογλου

Ηράκλειο, 1998

Περίληψη

Η εργασία αυτή αφορά το 4-α-ελικοειδές δομικό μοτίβο των πρωτεϊνών.

Προσδιορίστηκαν οι κατανομές των χ_1 , χ_2 διεδρων γωνιών των καταλοίπων στα 4-α-ελικοειδή δεμάτια και συγκρίθηκαν με αυτές που παρατηρούνται στο σύνολο των σφαιρικών πρωτεϊνών. Από την ανάλυση αυτή φάνηκε ότι: (i) Οι διαμορφώσεις των πλευρικών ομάδων στο μοτίβο περιορίζονται σε ένα υποσύνολο των διαμορφώσεων που παρατηρούνται για το σύνολο των σφαιρικών πρωτεϊνών. (ii) Για τη Tyr υπάρχει η ένδειξη ότι σχηματίζει μια εντελώς νέα συνάθροιση στο χώρο των χ_1 , χ_2 γωνιών. (iii) Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στις κατανομές διαμόρφωσης των πλευρικών ομάδων, τουλάχιστον της Tyr και της Ile ανάλογα με τη θέση που κατέχουν στο μοτίβο. Τέλος, βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στις συχνότερες, φυσικές μεταλλάξεις των 4-α-ελικοειδών δεματιών και στις προτιμώμενες διαμορφώσεις των αμινοξέων που συμμετέχουν σε αυτές.

Η πρωτεΐνη RM6 (μετάλλαξη που προήλθε από απαλοιφή πέντε αμινοξέων στο βρόχο της 4-α-ελικοειδούς Rop) κρυσταλλώθηκε και έγινε συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε διακριτικότητα 2.0Å. Με τα δεδομένα αυτά, που ήταν καλύτερα από τα μέχρι τότε διαθέσιμα στα 2.3Å, υπολογίστηκε χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας και έγινε σημαντική βελτίωση το υπάρχοντος ατομικού μοντέλου της πρωτεΐνης.

Στην προσπάθεια βελτίωσης των συνθηκών κρυστάλλωσης της RM7 (μετάλλαξη που προήλθε από την εισαγωγή δύο καταλοίπων στο βρόχο της Rop) κρυσταλλώθηκε η πρωτεΐνη XP. Για την πρωτεΐνη αυτή προσδιορίσαμε το μοριακό της βάρος (18.482Da), ενώ βρίσκονται σε εξέλιξη πειράματα για την ταυτοποίησή της.

Summary

In this thesis, a combined theoretical and experimental study of the 4-a-helical bundle protein tertiary motif is presented.

The distributions of the χ_1 , χ_2 dihedral angles in this motif have been determined and compared with those observed in globular proteins. This analysis suggests that: (i) The side-chains conformations in 4-a-helical bundles are limited to a subset of the conformations that are observed in globular proteins. (ii) The distribution of Tyr residues shows a novel cluster in the χ_1 , χ_2 conformational space. (iii) At least for Tyr and Ile, the conformational preferences of side-chains are position-dependent. This dependence can be rationalized in terms of the heptad concept used to describe the topology of 4-a-helical bundles. Natural mutations in 4-a-helical bundles follow a pattern that can be rationalized by the preferred side-chains conformations in this motif.

RM6, a Rop mutant with a five-residue deletion at the loop region has been crystallized and crystallographic data extending to a 2.0Å resolution have been collected. From this data set which represents a considerable improvement from the previous data to 2.3Å an electron density map has been calculated and we improved significantly the existent atomic model for the protein.

Our efforts to further improve the crystallization conditions for Rop mutant RM7 (a mutant with a two residue insertion of the loop) we crystallized an unknown protein XP. For the XP protein we have determined its molecular weight (18482Da). Experiments for its identification are in progress.

Ευχαριστίες

Αυτή η εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη πρακτική κυρίως βοήθεια που μου προσέφεραν αλλά και για την καλή συνεργασία μας.

Το θέμα της μελέτης υποδείχτηκε από τον καθηγητή Μ. Κοκκινίδη. Τον ευχαριστώ για την επιστημονική καθοδήγηση, την παροχή του απαιτούμενου υλικοτεχνικού εξοπλισμού και την οικονομική υποστήριξη των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ.Ν.Μ. Γλυκό για τις υποδείξεις, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις του σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας και κυρίως κατά την θεωρητική και πρακτική μου εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία. Η βοήθειά του υπήρξε επίσης ανεκτίμητη κατά τη συγγραφή. Ελπίζω ειλικρινά να έχει διατηρήσει αποθέματα υπομονής και επιμονής, γιατί θα τα χρειαστεί ξανά.

Ευχαριστώ την οικογένεια μου που πάντα ενθαρρύνει και υποστηρίζει τις σπουδές μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	I
Summary	Ii
Ευχαριστίες	Iii
Περιεχόμενα	Iv
Συντομογραφίες	Vi
1 Εισαγωγή	1
1.1 4-α-ελικοειδές δεμάτι: περιγραφή	1
1.2 Rop:ένα πρότυπο 4-α-ελικοειδές δεμάτι	3
1.3 Rop:ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη του 4-α-ελικοειδούς μοτίβου	6
1.4 Σκοπός της εργασίας	8
2 Ανάλυση των χ-διεδρων γωνιών για τα αμινοξέα του 4-α-ελικοειδούς δεματιού	10
2.1 Εισαγωγή	10
2.2 Συλλογή και ανάλυση δεδομένων	13
2.2.1 Εύρεση και ταξινόμηση των προτιμώμενων διαμορφώσεων των πλευρικών ομάδων	13
2.2.2 Στοιχίσεις ομόλογων πρωτεϊνών	15
2.3 Αποτελέσματα και συζήτηση	16
2.3.1 Αμινοξική σύνθεση των 4-α-ελικοειδών δεματιών	16
2.3.2 Ανάλυση των διαμορφώσεων της πλευρικής ομάδας σε πρωτεΐνες με δομή 4-α-ελικοειδούς δεματιού	17
2.3.3 Διάκριση στις κατανομές διαμόρφωσης των πλευρικών ομάδων ανάλογα με τη θέση στο 4-α-ελικοειδές δεμάτι.	22

2.3.4	Συσχέτιση των φυσικών μεταλλάξεων με τα rotamer	24
2.4	Συμπεράσματα	27
3	Καθαρισμός και κρυστάλλωση πρωτεϊνών, Περίθλαση ακτινών-Χ από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους	28
3.1	Καθαρισμός πρωτεϊνών	28
3.1.1	Χρωματογραφική ανάλυση	28
	I. Ιονανταλλακτική χρωματογραφία	29
	II. Χρωματογραφία υδροξυλαπατίτη	30
	III. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	31
3.1.2	Διαπίδυση	32
3.1.3	Μέθοδος Bradford	32
3.2	Κρυστάλλωση πρωτεϊνών	33
3.3	Περίθλαση ακτινών-Χ από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους	35
3.3.1	Συλλογή δεδομένων περίθλασης	35
3.3.2	Ανάκτηση της δομής από δεδομένα περίθλασης	37
4	Η μετάλλαξη RM6 της Rop	40
4.1	Εισαγωγή	40
4.2	Η κρυστάλλωση της RM6	43
4.3	Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης για τους κρυστάλλους της RM6	45
5	Η μετάλλαξη RM7 της Rop	51
5.1	Εισαγωγή	51
5.2	Ο καθαρισμός της RM7	53
5.3	Η κρυστάλλωση της RM7	57
5.4	Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης XP	59
6	Συζήτηση	62
	Βιβλιογραφία	66

Συντομογραφίες

Bis Tris	Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methane
BSA	Bovine serum albumin
CD	Circular dichroism (κυκλικός διχρωισμός)
DTT	Dithiothreitol (Διθειοθρεϊτόλη)
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Αιθυλένο διάμιν-τετραοξικό οξύ)
GdnHCl	Guanidine hydrochloride (Υδροχλωρική γουανιδίνη)
MB	Μοριακό βάρος
MeOH	Μεθανόλη
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός)
OD	Optical density
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RNA	Ribonucleic acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethane

Κεφάλαιο 1

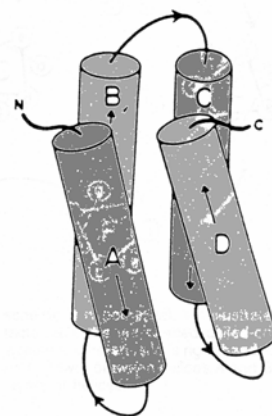
Εισαγωγή

Αν και ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία προΐδεάζει για δομική ομοιότητα δεν είναι καθόλου σπάνιο να παρατηρούνται δομικές ομοιότητες σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες που δεν παρουσιάζουν καμιά ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην κατάταξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε ένα σχετικά μικρό αριθμό τριποταγών μοτίβων που επαναλαμβάνονται σε λειτουργικά διαφορετικές πρωτεΐνες. Η ύπαρξη αυτών των μοτίβων, πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζει εξελικτικές λύσεις στη βασική απαίτηση για πρωτεϊνική, δομική σταθερότητα. Ένα τέτοιο επαναλαμβανόμενο δομικό μοτίβο, που χαρακτηρίζεται από δομική απλότητα και εξυπηρετεί μια ποικιλία λειτουργικών ρόλων είναι το 4-α-ελικοειδές δεμάτι.

1.1 4-α-ελικοειδές δεμάτι : περιγραφή

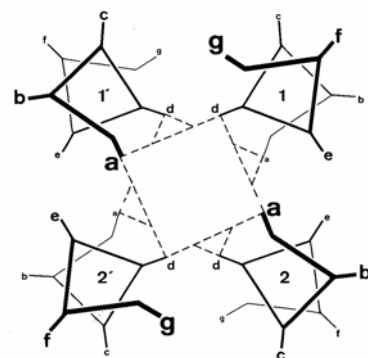
Το 4-α-ελικοειδές δεμάτι (4- α -helical bundle) αποτελεί ένα απλό και μάλλον κοινό πρωτεϊνικό δομικό μοτίβο (Weber *et al.*, 1980). Συνίσταται από τέσσερις α -έλικες που συνδέονται μεταξύ τους συνήθως με τρεις βρόχους. Οι έλικες πακετάρονται αντιπαράλληλα και στην ιδανική περίπτωση διασταυρώνονται υπό μια γωνία 20° (εικόνα 1.1).

Εικόνα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση ενός 4-α-ελικοειδούς δεματιού. Οι α-έλικες συμβολίζονται με κυλίνδρους, συνδέονται μεταξύ τους με τρεις βρόχους, πακετάρονται αντιπαράλληλα και διευθετούνται υπό γωνία (τροποποιημένη εικόνα από το άρθρο ανασκόπησης των Cohen & Parry, 1990).



Η αμινοξική αλληλουχία των ελίκων ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό πρότυπο υδρόφιλων και υδρόφοβων αμινοξέων, που επαναλαμβάνεται κάθε επτά αμινοξικά κατάλοιπα. Το πρότυπο αυτό ονομάζεται "επανάληψη επτάδας" (heptad repeat)¹, συμβολίζεται ως (a, b, c, d, e, f, g)_n και χαρακτηρίζεται από μια περιοδική κατανομή υδρόφοβων αμινοξέων στις θέσεις a, d. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται στο εσωτερικό της δομής και είναι ελάχιστα προσβάσιμες στο διαλύτη. Αντίθετα η θέση f είναι η περισσότερο εκτεθειμένη στο εξωτερικό περιβάλλον της πρωτεΐνης και καταλαμβάνεται συνήθως από υδρόφιλο αμινοξύ (Paliakasis & Kokkinidis, 1992, εικόνα 1.2).

Εικόνα 1.2 : Εγκάρσια τομή ενός 4-α-ελικοειδούς δεματιού με πάχος δύο στροφές της έλικας που δείχνει την αλληλεπίδραση των υδρόφοβων αμινοξέων του πυρήνα στα πλαίσια του προτύπου της επτάδας. Φαίνεται η διευθέτηση των επτά θέσεων (a-g) στις τέσσερις έλικες, που συμβολίζονται ως 1, 1', 2, 2'. Οι διακεκομμένες γραμμές ορίζουν προσεγγιστικά επίπεδα («φέτες», Banner *et al.*, 1987) στα οποία πετυχαίνεται το βέλτιστο πακετάρισμα των εσωτερικών, υδρόφοβων αμινοξέων (θέσεις a, d), (η εικόνα αναπαράχθηκε από το άρθρο των Paliakasis & Kokkinidis, 1992, με άδεια των συγγραφέων).



Αν και το μέσο μήκος των α-ελίκων στις σφαιρικές πρωτεΐνες είναι περίπου 11 αμινοξέα, στη περίπτωση του 4-α-ελικοειδούς δεματιού φαίνεται να είναι σημαντικά μεγαλύτερο. Συνήθως καλύπτει ένα εύρος από 15 μέχρι 24 αμινοξέα.

Οι α-έλικες συνδέονται μεταξύ τους με πρωτεϊνικά τμήματα ελεύθερης δομής που ποικίλουν ως προς την αμινοξική σύνθεση και το μήκος τους. Μπορεί να είναι μικρές, άκαμπτες στροφές ή εκτενείς, ευέλικτοι βρόχοι.

¹ Κάθε επτάδα αντιστοιχεί σε δύο πλήρης στροφές της έλικας.

Επίσης διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνουν τη σύνδεση των ελίκων και στον αριθμό τους. Συνήθως ένα 4-α-ελικοειδές δεμάτι σχηματίζεται από τέσσερις έλικες μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας (εικόνα 1.1) και τότε τρεις βρόχοι απαιτούνται για να συνδέσουν αυτές τις έλικες. Όταν όμως το δεμάτι σχηματίζεται από τη συνάθροιση δύο (Rop, εικόνα 1.3) ή τεσσάρων (Rm6, εικόνα 4.1) υπομονάδων τότε οι έλικες συνδέονται με δύο ή με κανένα βρόχο αντίστοιχα.

Το 4-α-ελικοειδές δεμάτι μπορεί να αναλάβει μια ποικιλία ενεργοτήτων: Μεταφορέας μοριακού οξυγόνου στη μυοαιμερυθρίνη, δεσμευτής του υποδοχέα (receptor binding) στους αιμοποιητικούς παράγοντες ανάπτυξης, δεσμευτής RNA (RNA-binding) στη Rop. Υπάρχουν δυο μορφές του μοτίβου ανάλογα με τη λειτουργία που επιτελεί. Στην πρώτη, ο υδρόφοβος πυρήνας του δεματιού λειτουργεί ως υποδοχέας προσθετικής ομάδας (όπως συμβαίνει στα κυτοχρώματα b₅₆₂ και c' όπου η αίμη δεσμεύεται στο εσωτερικό ενός 4-α-ελικοειδούς δεματιού). Σε αυτή τη περίπτωση η συναρμογή του δεματιού είναι χαλαρή στο ένα του άκρο γιατί οι έλικες εκεί είναι ξεδιπλωμένες. Στη δεύτερη, δεν δεσμεύεται προσθετική ομάδα στο εσωτερικό του δεματιού και η δομή είναι πιο σφικτά πακεταρισμένη (Cohen *et al.*, 1990).

Δυο 4-α-ελικοειδή δεμάτια είναι δυνατό να σχηματίσουν διμερή μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δομικών τους στοιχείων όπως το κυτόχρωμα c' και η αποφεριτίνη. Είναι δυνατή επίσης η συνάθροιση περισσότερων από δύο δεματιών οπότε προκύπτουν δομές υψηλότερης τάξης όπως στη μωσαϊκή του καπνού (Weber *et al.*, 1980).

1.2 Rop : ένα πρότυπο 4-α-ελικοειδές δεμάτι

Μια ιδανική αντιπροσώπευση του δομικού μοτίβου του 4-α-ελικοειδούς δεματιού βρέθηκε στη μικρή, φυσική πρωτεΐνη Rop (Repressor of primer).

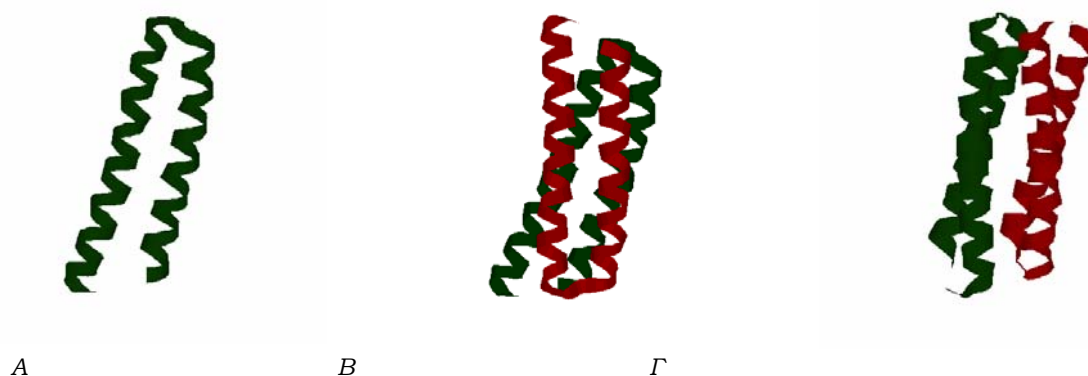
Η Rop (με μοριακό βάρος 7kDa) είναι το προϊόν του γονιδίου *rop* που βρίσκεται στο ColE1 και σε συγγενή πλασμίδια της *Escherichia coli*. Η λειτουργική μορφή της πρωτεΐνης, που είναι αυτή που έχει τη δομή του 4-α-ελικοειδούς δεματιού είναι το διμερές (MB=14kDa) που δρα ως RNA-δεσμευτής (RNA-binding). Έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της

πλασμιδιακής αντιγραφής και κατά συνέπεια στον έλεγχο του αριθμού των πλασμιδιακών αντιγράφων (Cesareni *et al.*, 1982, Lacatena *et al.*, 1984, Predki *et al.*, 1995). Επιτυγχάνει το ρόλο της διευκολύνοντας το σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα σε δύο ρυθμιστικά RNA μόρια, το RNAI και το RNAII¹. Η Rop επίσης φαίνεται να προστατεύει το σύμπλοκο από τη δράση ριβονουκλεασών (Helmer-Citterich *et al.*, 1988).

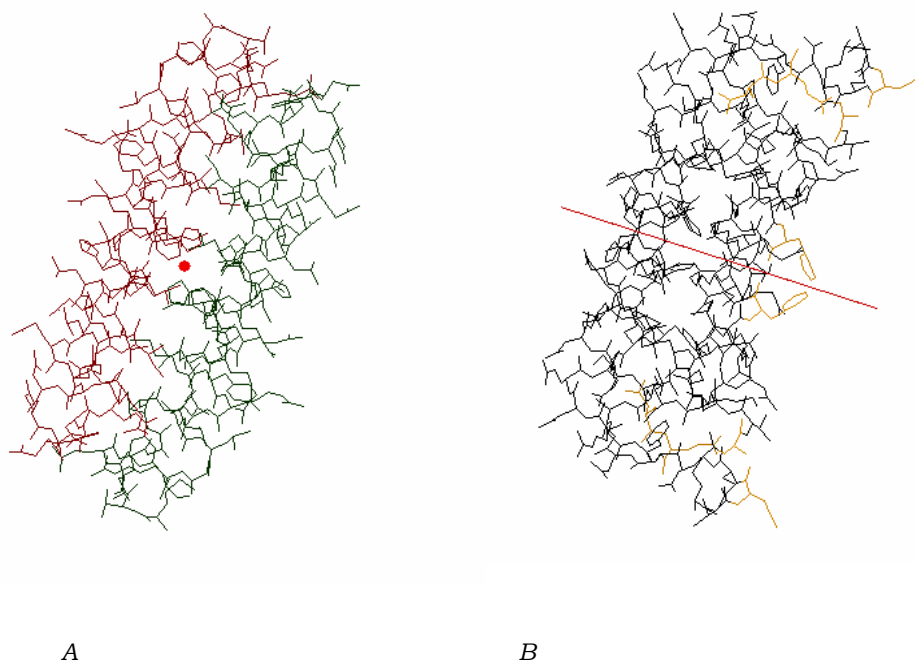
Η τρισδιάστατη δομή του μορίου είναι γνωστή από κρυσταλλογραφία ακτίνων-X στη διακριτικότητα των 1.7 Å (Banner *et al.*, 1987). Πρόκειται για μια απλή, ομοδιμερή πρωτεΐνη. Κάθε μονομερές αποτελείται από 63 αμινοξέα που σχηματίζουν δύο αντιπαράλληλες α-έλικες. Οι έλικες συνδέονται με μια μικρή κάμψη φουρκέτας². Τα δύο μονομερή συσχετίζονται μεταξύ τους αρχικά γρήγορα για να δώσουν ένα διμερές ενδιάμεσο και στη συνέχεια επαναδιευθετούνται αργά και σχηματίζουν τη τελική δομή που είναι ένα υψηλής κανονικότητας 4-α-ελικοειδές δεμάτι (Munson *et al.*, 1997). Το μόριο είναι ιδιαίτερα συμμετρικό εξαιτίας της ύπαρξης ενός τέλειου διπλού άξονα, τουλάχιστον στην κρυσταλλική δομή (εικόνα 1.3, 1.4).

¹ Γνωστό και ως πρόγονο του απαραίτητη RNA (RNA primer precursor).

² Μια ασυνέχεια του προτύπου της επτάδας στην περιοχή της κάμψης συσχετίστηκε με όμοιες ασυνέχειες στην αλληλουχία των α-ελικοειδών υπερελίκων. Σ' αυτές τις ασυνέχειες αποδόθηκαν στο παρελθόν (Cohen *et al.*, 1986) αλλαγές στη κατεύθυνση της αλυσίδας. Η μελέτη της υπόθεσης αυτής στην περίπτωση της δομής του δεματιού της Rop (Vlassi *et al.*, 1994, in press) δεν έδωσε μονοσήμαντα αποτελέσματα.



Εικόνα 1.3 : Απόψεις του μορίου της Rop. A: το μονομερές(φαίνεται μόνο η α αλυσίδα). B,Γ: το διμερές μόριο από δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες που διαφέρουν κατά γωνία 90° .



Εικόνα 1.4 : Πλήρης αναπαράσταση του μορίου της Rop, όπου φαίνονται και οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων. A : το διμερές της πρωτεΐνης σε θέση που κάνει εμφανή τη συμμετρία του. Με κόκκινο σημειώνεται ο χαρακτηριστικός του μορίου διπλός άξονας.(σ'αυτή την εικόνα είναι κάθετος στο επίπεδο της σελίδας). Σε καθένα από τα μονομερή έχει δοθεί διαφορετικό χρώμα. B: το ίδιο μόριο έχει στραφεί κατά 90° (γύρω από τον επιμήκη άξονα του). Η συμμετρία εξακολουθεί να είναι φανερή(με κόκκινο σημειώνεται κι εδώ ο διπλός άξονας που αυτή τη φορά βρίσκεται στο επίπεδο της σελίδας). Εκτός από τη συμμετρία σ' αυτή την εικόνα δίνεται έμφαση και στη λειτουργικότητα του μορίου. Με ανοικτό χρώμα σημειώνονται τα αμινοξέα που έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην εκδήλωση δράσης(Castagnoli *et al.*, 1989, Predki *et al.*, 1995) . Άξιο παρατήρησης είναι ότι εκτός από τις Phe14 που βρίσκονται στο κέντρο τα υπόλοιπα εντοπίζονται στα άκρα του μορίου.

1.3 Rop : ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη του 4-α-ελικοειδούς μοτίβου

Το 4-α-ελικοειδές δεμάτι είναι ένα απλό δομικό μοτίβο που αποτελεί ένα σύστημα ελκυστικό για μελέτες πρωτεϊνικής μηχανικής και de novo σχεδιασμό πρωτεϊνών (Guo *et al.*, 1996, Betz *et al.*, 1997).

Η Rop¹ είναι το απλούστερο 4-α-ελικοειδές δεμάτι με δομή γνωστή σε υψηλή διακριτικότητα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το μικρό της μέγεθος και την ιδιαίτερα κανονική δομή της, την καθιστούν ένα ιδανικό φυσικό μοντέλο για τη μελέτη της δομής του δεματιού. Μέχρι τώρα έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη διερεύνηση των βασικών ιδιοτήτων της τοπολογίας, της δομικής σταθερότητας και του μηχανισμού αναδίπλωσης και αποδιάταξης αυτού του μοτίβου. Όπως θα αναφερθεί με λεπτομέρεια στη συνέχεια, πλήθος μεταλλάξεων έχουν δημιουργηθεί και έχουν αναλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, NMR, θερμιδομετρία και αντιδράσεις κινητικής.

Η τελική διαμόρφωση στο χώρο και η σταθερότητα του μοτίβου καθορίζονται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις συναρμογής των υδρόφοβων αμινοξέων του πυρήνα (Paliakasis *et al.*, 1991). Αυτό διαφάνηκε από τότε που έγινε γνωστή η δομή της Rop (Banner *et al.*, 1987) και επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με θερμοδυναμικές και φασματοσκοπικές μελέτες (Steif *et al.*, 1993) καθώς και με πολλές σημειακές ή συνδυασμένες μεταλλάξεις. Αλλαγές αμινοξέων που βρίσκονται στη περιοχή του βρόχου ή γενικότερα έχουν πλευρικές ομάδες εκτεθειμένες στο διαλύτη, φάνηκε να αφήνουν αμετάβλητο το μόριο (Castagnoli *et al.*, 1989). Το ίδιο συνέβει και με συνδυασμένες μεταλλαγές των αμινοξέων του πυρήνα που έγιναν έτσι ώστε να παραμένει αμετάβλητο το ολικό πρότυπο υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Munson *et al.*, 1996). Αντίθετα σημειακές μεταλλαγές που αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις στον υδρόφοβο πυρήνα οδηγούν σε ιδιαίτερα ασταθείς πρωτεΐνες. Οι αλλαγές αυτές προκύπτουν όταν εισάγονται στον πυρήνα ογκώδεις ομάδες π.χ. στη μετάλλαξη Leu₄ όπου στις a, d θέσεις έχουν τοποθετηθεί λευκίνες (Munson *et al.*, 1996) ή αντίθετα όταν δημιουργούνται κενοί χώροι (cavities) από την εισαγωγή μικρών ομάδων (L→V, L→A) που αυξάνουν την πρόσβαση του διαλύτη στο εσωτερικό (Steif *et al.*, 1995, Vlassi *et al.*, 1998).

¹ Προκειμένου να διακριθεί από τις μεταλλάξεις της η Rop αναφέρεται συχνά ως wtRop (wild type Rop).

Ενώ ο καθοριστικός ρόλος των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη διαμόρφωση και τη σταθερότητα της δομής είναι γενικά αποδεκτός δεν συμβαίνει το ίδιο για τη περιοχή του βρόχου και για τις αλληλεπιδράσεις έλικας – βρόχου. Οι Carlacci & Chou (1990a, 1990b) βασιζόμενοι σ' ένα θεωρητικό μοντέλο υπολόγισαν πως η ενέργεια σταθεροποίησης στη δομή του δεματιού προέρχεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από αλληλεπιδράσεις ελίκων – βρόχων. Πειραματικές μελέτες που ακολούθησαν, αντέκρουσαν αυτή τη θεώρηση και απέδωσαν στους βρόχους δευτερεύοντα ρόλο για τον καθορισμό και τη σταθεροποίηση της δομής (Brunet *et al.*, 1993; Castagnoli *et al.*, 1994; Vlassi *et al.*, 1994). Πάντως, οι Predki & Regan (1995) επισημαίνουν πως αν και ο σωστός συσχετισμός των ελίκων φαίνεται να κατευθύνεται από το πακετάρισμα του υδρόφοβου πυρήνα, εντούτοις δεν θα πρέπει να αγνοηθεί ο ρόλος των βρόχων, αφού το μήκος τους είναι επίσης κρίσιμης σημασίας για τη σωστή διεύθυνση των ελίκων. Επιπλέον, ο βρόχος αν και παρουσιάζει μεγάλη ανοχή σε μεταλλάξεις δεν μπορεί να υιοθετήσει όλες τις πιθανές αλληλουχίες. Τέλος, ο ιδιαίτερος ρόλος της περιοχής της κάμψης στο σχηματισμό της δομής ενισχύεται από τη μελέτη της μετάλλαξης A31P¹. Αρχικά, μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού (CD spectra) και πειράματα θερμοδυναμικής έδειξαν μια μείωση του περιεχομένου της δομής σε α-έλικα της τάξης του 7% και μια μείωση της σταθερότητας περίπου 40% σε σύγκριση με τη wtRop (Peters *et al.*, 1997). Ο πρόσφατος προσδιορισμός της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ αποκάλυψε πως η A31P είναι ένα 4-α-ελικοειδές δεμάτι που έχει υιοθετήσει όχι μόνο ένα διαφορετικό πρότυπο αναδίπλωσης αλλά και διαφορετική τοπολογία σε σχέση με την αρχική πρωτεΐνη (Glykos, personal communication).

¹Στην wtRop η Ala31 κατέχει τη κεντρική θέση της περιοχής του βρόχου, αφού ουσιαστικά αυτή μαζί με τα εκατέρωθεν γειτονικά της αμινοξέα Asp30 και Asp32 σχηματίζουν την κάμψη. Η A31P είναι μετάλλαξη της wtRop όπου η Ala31 αντικαταστάθηκε από Pro.

1.4 Σκοπός της εργασίας

Στα 4-α-ελικοειδή δεμάτια οι απαιτήσεις της τοπολογίας και της συναρμογής των ελίκων επιβάλλουν αρκετούς περιορισμούς στην αμινοξική αλληλουχία. Καθεμιά από τις επτά διακριτές θέσεις αντιπροσωπεύει ένα μικροπεριβάλλον που μπορεί να φιλοξενήσει μόνο ορισμένα αμινοξέα με συγκεκριμένες ιδιότητες (Banner *et al.*, 1987; Paliakasis *et al.*, 1992).

Τα ιδιαίτερα σημαντικά αμινοξέα που καταλαμβάνουν τις a και d θέσεις (τον υδρόφοβο πυρήνα) προσέλκυσαν το ενδιαφέρον μας για μια πιο λεπτομερή ανάλυση. Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν και οι ενεργειακές απαιτήσεις που πιθανόν τους επιβάλλονται από την ειδική θέση τους ήταν τα βασικά ερωτήματα που μας απασχόλησαν. Επιχειρήσαμε μια θεωρητική προσέγγιση του θέματος μελετώντας ένα δείγμα 13 πρωτεϊνών που ήταν όλες όσες βρήκαμε στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων (PDB) που περιείχαν τη δομή του δεματιού. Χρησιμοποιώντας την έννοια της διέδρης γωνίας για τις πλευρικές ομάδες, (αναλυτική αναφορά γίνεται στο κεφάλαιο 2) εκτιμήσαμε τις ενεργειακά προτιμώμενες διαμορφώσεις των πλευρικών ομάδων αυτών των αμινοξέων και τις συγκρίναμε με τις προτιμήσεις των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων που καταλαμβάνουν τις υπόλοιπες θέσεις της επτάδας καθώς και των αμινοξέων που συναντώνται γενικά σε σφαιρικές πρωτεΐνες. Η σύγκριση αυτή, ελπίζαμε ότι θα έδειχνε διαφοροποιήσεις των αμινοξέων του δείγματος μας ως προς το δείγμα των σφαιρικών πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια, ασχοληθήκαμε με δυο πρωτεΐνες που προήλθαν από αλλαγές στο βρόχο της wtRop. Πρόκειται για την RM6 που προέκυψε μετά από απαλοιφή πέντε αμινοξέων στην περιοχή του βρόχου και την RM7 που προήλθε από προσθήκη δύο αμινοξέων στο βρόχο. Οι μεταλλάξεις αυτές αποτελούν αντίθετα και ακραία παραδείγματα για την επίδραση που μπορεί να έχουν στην αναδίπλωση της Rop αλλαγές στην περιοχή του βρόχου. Για το λόγο αυτό αποτελούν ιδανικά μοντέλα για την διερεύνηση του ρόλου του βρόχου στην ενεργειακή σταθερότητα της δομής του δεματιού. Άμεσως σκοπός μας ήταν η βελτίωση των υπάρχόντων για τις δομές αυτές κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Μετά την επίτευξη αυτού του στόχου ελπίζαμε ότι θα είχαμε την απαιτούμενη πληροφορία για την εξαγωγή συμπερασμάτων στον τομέα αυτό. Συγκεκριμένα, τέτοια δεδομένα θα κάνουν

δυνατή την εύρεση αλλαγών στον υδρόφοβο πυρήνα που πιθανώς συνοδεύουν και τείνουν να εξισορροπήσουν τις σοβαρές αλλαγές στο βρόχο.

Τέλος, στην προσπάθεια μας να κρυσταλλώσουμε την RM7, συγκρυσταλλώσαμε μια άγνωστη ακόμη σε μας πρωτεΐνη (που την αναφέρουμε ως XP). Πειράματα ταυτοποίησης της πρωτεΐνης αυτής βρίσκονται σε εξέλιξη.

Κεφάλαιο 2

Ανάλυση των χ-δίεδρων γωνιών των πλευρικών ομάδων στο 4-α-ελικοειδές δεμάτι.

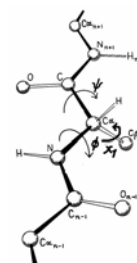
2.1 Εισαγωγή

Ένας από τους κύριους παράγοντες που καθορίζουν την αναδίπλωση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι οι ιδιότητες της αμινοξικής της αλληλουχίας. Σε αυτές τις ιδιότητες περιλαμβάνονται η χημική φύση και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της κάθε πλευρικής ομάδας και της κύριας αλυσίδας (Fasman G., 1990, Janin *et al.*, 1978).

Επειδή ο πεπτιδικός δεσμός έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού δεν υπάρχει η δυνατότητα περιστροφής γύρω από αυτόν. Αντίθετα οι δεσμοί του α-άνθρακα είναι απλοί και η περιστροφή γύρω από αυτούς θεωρητικά ελεύθερη (Schulz & Schrimmer, 1979). Ελεύθερη είναι και η περιστροφή γύρω από τους απλούς δεσμούς των πλευρικών ομάδων. Για την περιγραφή των διαμορφώσεων της πεπτιδικής μονάδας(και της πεπτιδικής αλυσίδας, κατ' επέκταση) χρησιμοποιείται η έννοια της διεδρης γωνίας. Ουσιαστικά, μια πλήρης περιγραφή του σκελετού της πεπτιδικής αλυσίδας επιτυγχάνεται με

τον προσδιορισμό των ϕ , ψ διεδρων γωνιών, που αναφέρονται στις περιστροφές γύρω από τους δεσμούς του α-άνθρακα (εικόνα 2.1). Η ελεύθερη περιστροφή γύρω από αυτούς τους δεσμούς περιορίζεται από στερικές παρεμποδίσεις. Έτσι οι γωνίες ϕ , ψ παίρνουν τιμές μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές, που παρουσιάζονται συχνά σε διδιάστατα διαγράμματα γνωστά ως Ramachandran plots.

Εικόνα 2.1 Οι ϕ , ψ και χ -γωνίες ορίστηκαν σύμφωνα με τις συμβάσεις της IUPAC-IUB, 1969. Πρόσβαση στις συμβάσεις αυτές υπάρχει από το Internet, <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/>. Στην εικόνα σημειώνονται οι ϕ , ψ και χ_1 γωνίες (τροποποιημένη εικόνα από τον Fasman, G. D., 1989).



Οι περιστροφές γύρω από τους απλούς δεσμούς των πλευρικών ομάδων περιγράφονται από τις χ_i -διεδρες γωνίες ($i : 1, 2, 3, 4$). Όμοια με προηγουμένως κατά την περιστροφή των χ -γωνιών στερικές παρεμποδίσεις από την αλληλεπικάλυψη ατόμων γειτονικών ομάδων δημιουργούν μέγιστα δυναμικής ενέργειας που απαγορεύουν ορισμένες διαμορφώσεις για την πλευρική ομάδα. Βασική πηγή τέτοιων παρεμποδισμών (κυρίως για τη χ_1 γωνία) είναι η κύρια αλυσίδα. Δομικές μελέτες (Janin *et al.*, 1978) έδειξαν ότι οι διεδρες γωνίες των πλευρικών ομάδων στις πρωτεΐνες, γενικά αντιστοιχούν στα ελάχιστα δυναμικής ενέργειας των μεμονωμένων (αδρανοποιημένων¹) αμινοξέων.

Ως επέκταση της δουλειάς του Ramachandran για τις επιτρεπόμενες διαμορφώσεις της κύριας αλυσίδας (κατανομές ϕ , ψ γωνιών) προέκυψε η έννοια του rotamer (δεν υπάρχει αντίστοιχος, δόκιμος, ελληνικός όρος). Αρχικά αυτό ορίστηκε ως ένα σημείο στο χώρο των χ -γωνιών, που αντιστοιχεί σε ένα τοπικό ελάχιστο της δυναμικής ενέργειας ενός αδρανοποιημένου αμινοξέος. Αργότερα η έννοια του rotamer επεκτάθηκε και ορίστηκε ως μια πυκνή συνάθροιση σημείων στο χώρο των χ -γωνιών (Ponder & Richards, 1987).

Οι Ponder & Richards (1987) προσδιόρισαν τις κατανομές των χ_1 , χ_2 -διεδρων γωνιών για τα αμινοξέα ενός συνόλου 10 πρωτεϊνών των οποίων οι δομές ήταν γνωστές σε διακριτικότητα καλύτερη ή ίση με 2Å. Βρήκαν πως οι περισσότερες πλευρικές ομάδες περιορίζονται σε ένα μικρό αριθμό από τα πολλά πιθανά

¹ Πρόκειται για ένα αμινοξύ με αδρανοποιημένα άκρα, $\text{CH}_3\text{CONH}-\text{RC}_\alpha\text{H}-\text{CONHCH}_3$, όπου το R παριστά την πλευρική ομάδα.

(χ_1, χ_2) ενεργειακά ελάχιστα. Για παράδειγμα ενώ η Leu έχει εννέα (χ_1, χ_2) πιθανά διαμορφωμερή το 88% των καταλοίπων του δείγματος της περιλαμβάνεται μόνο σε δύο από αυτά. Χρησιμοποιώντας 126 πρωτεϊνικές δομές, προσδιορισμένες σε διακριτικότητα 2Å ή καλύτερη οι Dunbrack & Karplus (1993) έδειξαν πως υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές του ζεύγους των ϕ, ψ γωνιών και στις προτιμήσεις των χ -διεδρων γωνιών των πλευρικών ομάδων. Τέλος, οι Schrauber *et al.*, (1993) από την ανάλυση ενός δείγματος 9276 αμινοξικών καταλοίπων υπολόγισαν ότι το 80% περίπου του πληθυσμού του κάθε αμινοξέος είναι κοντά σε κάποιο rotamer (βρίσκεται σε μια περιοχική ακτίνας 20°), αλλά το υπόλοιπο παρουσιάζει μεγάλη διασπορά. Το ποσοστό των καταλοίπων ενός δείγματος που ανήκει σε κάποιο rotamer προς το συνολικό αριθμό καταλοίπων του δείγματος αναφέρεται ως rotamericty του αμινοξέος (δεν υπάρχει αντίστοιχος, δόκιμος, ελληνικός όρος).

Μέχρι τώρα έχει αναλυθεί αρκετά εκτεταμένα η κατανομή των διεδρων γωνιών των πλευρικών ομάδων για τις σφαιρικές πρωτεΐνες. Η δική μας προσέγγιση περιλαμβάνει την ανάλυση των χ -διεδρων γωνιών ενός υποσυνόλου των σφαιρικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα αυτών με δομή 4-α-ελικοειδούς δεματιού. Το ερώτημα που διερευνήσαμε ήταν αν το μοτίβο του 4-α-ελικοειδούς δεματιού λόγω της δομικής του ιδιαιτερότητας περιορίζει τα αμινοξέα της επτάδας γενικά και του πυρήνα ειδικότερα ως προς τους επιτρεπόμενους συνδυασμούς των χ -διεδρων γωνιών. Ιδιαίτερα για τα αμινοξέα που καταλαμβάνουν τις a και d θέσεις ελέγχθηκε η πιθανότητα να προτιμούν σπάνιους συνδυασμούς γωνιών σε σύγκριση με τα αμινοξέα των υπολοίπων θέσεων και με τα αμινοξέα του γενικού δείγματος των σφαιρικών πρωτεϊνών. Παράλληλα ελέγχθηκε η πιθανότητα να υιοθετούν εντελώς νέους συνδυασμούς χ -γωνιών. Στη συνέχεια διερευνήσαμε τη σχέση μεταξύ των rotamer και των φυσικών μεταλλάξεων που εντοπίσαμε στοιχίζοντας ομόλογες πρωτεΐνες με δομή 4-α-ελικοειδούς δεματιού.

2.2 Συλλογή και ανάλυση δεδομένων.

2.2.1 Εύρεση και ταξινόμηση των προτιμώμενων διαμορφώσεων των πλευρικών ομάδων.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν όλα τα 4-α-ελικοειδή δεμάτια (συνολικά 13) που βρέθηκαν στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων Brookhaven (Brookhaven Protein Data Bank, PDB). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα I. Για καθεμία πρωτεΐνη του δείγματος εντοπίστηκαν οι έλικες που σχηματίζουν τη δομή του δεματιού, ταυτοποιήθηκαν οι θέσεις της επτάδας και καταγράφηκαν οι τιμές των διεδρων γωνιών των πλευρικών ομάδων που δίνονται από το πρόγραμμα O (Jones, J. A. *et al.*, 1991). Το δείγμα αποτελείται συνολικά από 741 αμινοξέα, στα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται τα αμινοξέα που σχηματίζουν τους βρόχους της δομής (πίνακας III). Από αυτά δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση : (i) όσα βρέθηκε να αποκλίνουν από τον κανόνα της επτάδας και κατείχαν ακραίες θέσεις του δεματιού, (ii) ένας μικρός αριθμός αμινοξέων για τα οποία τα αρχεία ατομικών συντεταγμένων δεν περιείχαν δεδομένα, (iii) καθώς επίσης τα αμινοξέα Gly, Pro και (iv) η Ala που αν και είναι ιδιαίτερα συχνό αμινοξύ στο εξεταζόμενο μοτίβο δεν έχει χ γωνίες. Έτσι ο αριθμός των στατιστικά χρήσιμων αμινοξέων περιορίστηκε στα 588.

Η ανάλυσή μας αφορά μόνο τις γωνίες χ_1 χ_2 . Οι θέσεις των ατόμων των πλευρικών ομάδων που αντιστοιχούν στις γωνίες χ_3 , χ_4 συνήθως προσδιορίζονται με μικρή ακρίβεια και έτσι η πληροφορία που έχουμε για τις γωνίες αυτές παρουσιάζει μεγάλη αβεβαιότητα. Επιπλέον η περιστροφή γύρω από τους δεσμούς που αντιστοιχούν στις γωνίες χ_3 , χ_4 είναι λιγότερο παρεμποδισμένη σε σύγκριση με τη περιστροφή γύρω από τους δεσμούς που αντιστοιχούν στις χ_1 , χ_2 γωνίες. Αυτό συμβαίνει λόγω της απουσίας ογκωδών υποκαταστατών (υπάρχουν μακριές μεθυλένο ομάδες στα αμινοξέα Glu, Gln, Lys, Met) και έχει ως αποτέλεσμα οι γωνίες χ_3 , χ_4 να υφίστανται μεγαλύτερο εύρος τιμών από τις χ_1 , χ_2 .

Στη συνέχεια για να ταξινομήσουμε τις χ_1 , χ_2 γωνίες των πλευρικών ομάδων σε rotamer χρησιμοποιήσαμε το κριτήριο (που χρησιμοποιήθηκε από τους Schrauber *et al.*, 1993) ότι κάθε χ γωνία δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 20° από την αντίστοιχη γωνία του rotamer στο οποίο κατατάσσεται. Το κριτήριο αυτό εξασφαλίζει ότι η αύξηση της δυναμικής ενέργειας δεν θα είναι μεγαλύτερη από 1 - 2 Kcal/mol για αποκλίσεις από το τοπικό ενεργειακό ελάχιστο του rotamer (Schrauber *et al.*, 1993) και ότι η

ακρίβεια για τη θέση των γ-ατόμων των αμινοξέων που χαρακτηρίζονται μόνο από χ_1 γωνία θα είναι καλύτερη από 0.5Å (Schrauber *et al.*, 1993).

Παράλληλα έγινε επεξεργασία και γραφική αναπαράσταση των δεδομένων με το πρόγραμμα SPSS v. 7.5 (SPSS Inc.).

Πίνακας I : Δεδομένα αλληλουχίας και δομής των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.

Πρωτεΐνη	Κωδικός καταχώρησης στη PDB	Έλικες που σχηματίζουν το δερμάτι (αριθμός και τύπος καταλοίπου)				r*
		(I)	(II)	(III)	(IV)	
Κυτόχρωμα c' (cytochrome c')	1cpq	28A-17L	36A-47L	99A-88M	107F-118C	1.72
Απολιποπρωτεΐνη E ₃ (Apolipoprotein E ₃)	1nfn	71L-56V	101Q-115L	155L-141L	26W-40V	1.8
(Απο)φερριτίνη ((Apo)ferritin)	1rcc	72R-54R	12C-30Y	117A-99A	125M-144L	2.4
Ανασταλτικός παράγοντας λευκαϊμίας (Leukemia inhibitory factor, LIF)	1lki	180F-162G	83L-101Q	129V-111L	26I-44Y	2.0
Κυτοκίνη (Granulocyte-colony stimulating factor, form II RCG-CSFII)	1bge	79L-96I	118I-100L	18C-36L	165A-148R	2.2
Κυτόχρωμα b562 (cytochrome b562)	256b	79A-65F	87A-101Y	17I-3L	26V-40A	1.4
Μυοαιμεριθρίνη (Myohemerythrin)	2mhr	111D-96V	21L-35C	58E-44L	73H-87L	1.7
Υποδοχέας του ασπαρτικού οξέος (Aspartate receptor)	2asr	123I-134L	104Y-93A	53L-64R	165F-154T	2.3
Λυσοζύμη από το βακτηριοφάγο T4 (Phage T4 Lysozyme)	1dyg	121L-114F	129A-136S	153F-146A	95R-102M	2.1
Καταστολέας του απαρχητή (Rop)	1rop	56F-31A	5E-29L	56F-31A	5E-29L	1.7
Μωσαϊκή του καρπού (TMV coat protein)	2tmv	76L-87F	132L-121I	23L-35F	52W-41R	2.9
Αυξητικός παράγοντας (Granulocyte-colony stimulating factor, R-HU-GCSF).	1rhg	103L-117I	92L-78L	154A-168L	31L-17C	2.2
Ιντερλευκίνη 2 (Interleukin 2)	3ink	96L-86I	53L-63L	128I-118L	14L-24I	2.5

r* : Κρυσταλλογραφική διακριτικότητα (resolution) σε Å.

2.2.2 Στοιχίσεις ομόλογων πρωτεϊνών

Για κάθεμια από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζονται στον πίνακα I βρέθηκε ένα σύνολο ομόλογων πρωτεϊνών (πρωτεΐνες με υψηλή ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία τους), χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Swiss Prot (Bairoch et al., 1997) και το πρόγραμμα FASTA (Pearson et al., 1988, πίνακας II). Στη συνέχεια οι ομόλογες πρωτεΐνες στοιχίστηκαν μεταξύ τους (πολλαπλή στοιχίση αμινοξικής αλληλουχίας) με το πρόγραμμα CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Έχοντας για πρότυπο σε κάθε στοιχίση την πρωτεΐνη γνωστής δομής εντοπίστηκαν και καταγράφηκαν οι φυσικές μεταλλάξεις στον πυρήνα. Βρέθηκε έτσι το είδος και η συχνότητα με την οποία τα αμινοξέα του πυρήνα αντικαθίστανται από άλλα. Τα αμινοξέα αυτά συγκρίθηκαν μεταξύ τους ως προς τα rotamer που υιοθετούν.

Πίνακας II : Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για την πολλαπλή στοιχίση .

Πρωτεΐνη	Οργανισμός	Κωδικός καταχώρησης στη Swiss Prot	Ταυτότητα αμινοξικής αλληλουχίας* (%)
Κυτόχρωμα c'		CYCP_RHOCA	-
		CYCP_PARSP	18
		CYCP_RHOFU	21
		CYCP_RHOGE	27
		CYCP_RHOTE	25
(Απο)φερριτίνη	<i>Rana catesbelana</i> (lower subunit)	FRI3_RANCA	-
	<i>Rana catesbelana</i> (higher subunit)	FRI1_RANCA	65
	<i>Homo sapiens</i> (heavy chain)	FRIH_HUMAN	61
	<i>Equus caballus</i> (light chain)	FRIL_HORSE	50
	<i>Homo sapiens</i> (light chain)	FRIL_HUMAN	49
	<i>Rattus norvegicus</i> (light chain)	FRIL_RAT	49
Ανασταλτικός παράγοντας λευκαϊμίας	Mouse	LIF_MOUSE	-
	Bovin	LIF_BOVIN	77
	Homo sapiens	LIF_HUMAN	79
	Rat	LIF_RAT	90
Κυτόχρωμα b562		C562_ECOLI	-
		C562_RHOSH	5
Μυοαιμεριθρίνη	<i>Themiste zostericola</i>	HEMM_THEZO	-
	<i>Phascolopsis gouldII</i>	HEM1_PHAGO	68
	<i>Nereis diversicolor</i>	HEMM_NERDI	61
Υποδοχέας ασπαρτικού οξέος	<i>Ecscherichia coli</i>	MCP2_ECOLI	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	MCP2_SALTY	78
Λυσοζυμη από το βακτηριοφάγο T4	Bacteriophage T4	LYCV_BPT4	-
		VG05_BPT4	42
		VG25_BPT4	9
Μωσαϊκή του καπνού	TMV <i>Vulgare</i>	COAT_TMV	-
	TMV strain U2	COAT_TMGMV	70
	TMV strain 06	COAT_TMV06	98
	TMV strain Cowpea	COAT_TMVCO	41
	TMV strain Holmes Ribgrass (HR)	COAT_TMV_HR	44

*Σε αυτή τη στήλη παρουσιάζεται η ταυτότητα της αμινοξικής αλληλουχίας ανάμεσα στην πρώτη πρωτεΐνη (που είναι η πρωτεΐνη γνωστής δομής) και στις υπόλοιπες της οικογένειας. Για κάποιες περιπτώσεις η ταυτότητα είναι ιδιαίτερα μικρή παρόλα αυτά τις έχουμε περιλάβει στην στοίχιση γιατί, όπως ελέγξαμε υπακούουν στο πρότυπο της επτάδας.

	▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼	
FRI3_RANCA	---MESQVRQNFHQDCEAGLNRTVNLKFSYVYLSMASYFNRDDVALSNFAKFFRERSE	57
FRIH_HUMAN	TTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSH	60
FRI1_RANCA	---MDSQVRQNFHRDCEAAINRMVNMELYASYTYLSMAFYFDRDDIALHNVAKFFKEQSH	57
FRIL_HORSE	----SSQIRQNYSTEVEAAVNRLVNLVLYLRASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVCHFFRELAE	56
FRIL_HUMAN	----SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAE	56
FRIL_RAT	----TSQIRQNYSTEVEAAVNRLVNLHLRASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVGHFFRELAE	56
	**:*:*:* : *:*:* :*:* :*:*:*:* :*:*:*:* .. :* : ..	
	▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼	
FRI3_RANCA	EEKEHAEKLI EYQNQRGGRVFLQSV EKPERDDWANGLEALQTALKLQKSVNQALLDLHAV	117
FRIH_HUMAN	EEREHAEKLMK LQNQRGGRIFLQDIKKPCDDWESGLNAMECALHLEKNNVQS LLELHKL	120
FRI1_RANCA	EEREHAEKLMKDQNKRGGRIVLQDVKKPERDEWGN TLEAMQAALQLEKTVNQALLDLHKV	117
FRIL_HORSE	EKREGAERLLKMQNQRGGRALFQDLQKPSQDEWGTTPDAMKAAIVLEKSLNQALLDLHAL	116
FRIL_HUMAN	EKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGTTPDAMKAAMALEKKNLQALLDLHAL	116
FRIL_RAT	EKREGAERLLKLQNERGGRALFQDVQKPSQDEWGTLEAMEAALALEKNLNQALLDLHAL	116
	::* *:*:*:* **:*:*:* :*:*:*:* *:*:* :*:*:* *:*:*:*:*:*:*:* :*	
	▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼	
FRI3_RANCA	AADKSDPHMTDFLESPYLSESVETIKKLGDHITSLKKLWSSH-----PGMAEYLFNK	169
FRIH_HUMAN	ATDKNDPHL CDFIETHYLNEQVKA IKELGDHV TNLKMGAP E-----SGLAEYLFDK	172
FRI1_RANCA	GSDKVDPHLCDFLETEYLEEQVKS IKQLGDYITNLKRLGLPQ-----NGMGEYLFDK	169
FRIL_HORSE	GSAQADPHL CDFLESHFLDEEVKLIKMGDHL TNIQRLVGSQ-----AGLGEYLFER	168
FRIL_HUMAN	GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHL TNLHRLGGPE-----AGLGEYLFER	168
FRIL_RAT	GSARTDPHLCDFLESHFLDKEVKLIKMGNHLTNLRRVQGPQPAQTGVAQASLGEYLFER	176
	.: : *:*:* *:*:*:* :*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:* .. :*:*:*:*:	
FRI3_RANCA	HTLG-----	173
FRIH_HUMAN	HTLGSDNES	182
FRI1_RANCA	HTMGESS---	176
FRIL_HORSE	LTLKHD----	174
FRIL_HUMAN	LTLKHD----	174
FRIL_RAT	LTLKHD----	182
	* :	

Εικόνα 2.2 : Παράδειγμα πολλαπλής στοίχισης. Η πρώτη πρωτεΐνη της σειράς είναι αυτή που έχει γνωστή δομή. Με βέλη δείχνονται οι a,d θέσεις.

*Δηλώνει ταυτότητα.

: και . δηλώνουν βαθμό ομοιότητας.

2.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.3.1 Αμινοξική σύνθεση των 4-α-ελικοειδών δερματιών

Η αμινοξική σύνθεση του δείγματος παρουσιάζεται στον πίνακα III. Εντύπωση προκαλεί η μεγάλη συχνότητα της Leu και της Ala σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αμινοξέα. Αντίθετα η Pro, η Trp και η Cys παρουσιάζουν τις μικρότερες συχνότητες εμφάνισης. Στον ίδιο πίνακα γίνεται σύγκριση με το δείγμα των 4-α-ελικοειδών δερματιών που αναλύθηκε από τους Paliakasis & Kokkinidis (1992). Γενικά εμφανίζονται μόνο μικρές διαφορές σε λίγα αμινοξέα. Εξαιρέση αποτελεί η Leu η οποία στο δείγμα μας είναι το αμινοξύ με τη μεγαλύτερη συχνότητα και με σημαντική διαφορά από την Ala το δεύτερο συχνότερο αμινοξύ, ενώ στο δείγμα των Paliakasis & Kokkinidis (1992) η Ala είναι συχνότερη της Leu και με μικρή μόνο διαφορά. Η Leu παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στην Ιντερλευκίνη-2 (56% των συνολικών καταλοίπων) και τον Αυξητικό παράγοντα (R-HU-GCSF, 50% των συνολικών καταλοίπων). Οι πρωτεΐνες αυτές δεν έχουν χρησιμοποιηθεί από τους Paliakasis & Kokkinidis (1992) και η διαφορά αυτή μπορεί εν μέρει τουλάχιστον, να δικαιολογήσει τη διαφορετική συχνότητα εμφάνισης της Leu στα δυο δείγματα.

Πίνακας III : Αμινοξική σύνθεση του συνολικού δείγματος.

Phe	26	3.5%	(4.2%)	Asp	39	5.2%	(5.9%)
Tyr	19	2.6%	(1.7%)	Asn	33	4.5%	(5.7 %)
His	18	2.4%	(3.1%)	Gln	42	5.7%	(5.1%)
Ile	36	4.9%	(4.6%)	Glu	43	5.8%	(7.2%)
Met	20	2.7%	(3.0%)	Lys	43	5.8%	(7.0%)
Leu	126	17%	(12.2%)	Arg	36	4.9%	(5.8%)
Val	41	5.5%	(5.4%)	Trp	7	0.9%	(0.7%)
Thr	46	6.2%	(5.8%)	Ala	84	11.3%	(13.4%)
Cys	13	1.8%	(1.9%)	Gly	35	4.7%	(2.7%)
Ser	31	4.2%	(3.2%)	Pro	3	0.4%	(1.3%)

Συνολικός αριθμός αμινοξικών καταλοίπων : 741 (100%).

Σε παρένθεση δίνονται τα αντίστοιχα ποσοστά του δείγματος των 4-α-ελικοειδών δερματιών που αναλύθηκε από τους Paliakasis & Kokkinidis (1992).

2.3.2 Ανάλυση των διαμορφώσεων της πλευρικής ομάδας σε πρωτεΐνες με δομή 4-α-ελικοειδούς δεματιού.

Στον πίνακα IV παρουσιάζονται ο συνολικός αριθμός κάθε αμινοξέος που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση καθώς και οι απόλυτοι και σχετικοί πληθυσμοί του κάθε rotamer για κάθε τύπο πλευρικής ομάδας.

Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν έναν κατάλογο rotamer (rotamer library) ειδικό για το δομικό μοτίβο του 4-α-ελικοειδούς δεματιού που μπορεί να συγκριθεί με τον κατάλογο των Schrauber *et al.* για τις σφαιρικές πρωτεΐνες. Ο κατάλογος αυτός παρατίθεται στην τελευταία στήλη του ίδιου πίνακα. Για να γίνουν εύκολα αντιληπτά τα αποτελέσματα της σύγκρισης δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα των χ_1 , χ_2 κατανομών, χωριστά για το κάθε είδος αμινοξέος. Παράλληλα στα διαγράμματα αυτά σημειώθηκαν οι τιμές των rotamer που υπολόγισαν οι Schrauber *et al.* (εικόνα 2.3).

Πίνακας IV : Κατάλογος rotamer για το 4-α-ελικοειδές δεμάτι και σύγκριση με τα rotamer του συνόλου των σφαιρικών πρωτεϊνών.

Αμινοξύ	Συνολικός αριθμός καταλοίπων	Αριθμός καταλοίπων ανά rotamer	(%)	Rotamer για το 4-α-ελικοειδές δεμάτι				Rotamer για τις σφαιρικές πρωτεΐνες (Schrauber et al.)	
Phe	22	9	41	176 75 (176 75)				-69 98 -177 83 62 89 -65 155 -80 200	
Tyr	19	8	42	174 72 (174 72)				-65 98 180 75 59 90 -74 167	
		5	26	-70 -73 (290 287)					
His	17	4	24	179 66 (179 66)				-61 -84 -182 75 -70 97	
		4	24	-172 -86 (188 274)				-173 -94	
		Ile	35	23	66	-67 170 (293 170)			
4	11			-62 -60 (298 300)				-58 -63 -171 -192 -163 67	
Met	19	10	53	-74 180 (286 180)				-72 -182 -62 -71	
		5	26	179 -176 (179 184)				-177 180 64 -178 -169 77	
Leu	125	50	40	-72 171 (288 171)				-64 -183	
		41	33	-179 61 (181 61)				-177 65 -96 38	
		5	4	-123 -155 (237 205)				-143 -148 -116 -172 57 74 -77 -54	
Val	40	33	82	171 (171)				177	
		3	8	-61 (299)				-60 59 120	
Thr	45	38	84	-60 (300)				-59	
		5	11	56 (56)				64 -173	

Πίνακας IV (συνέχεια)

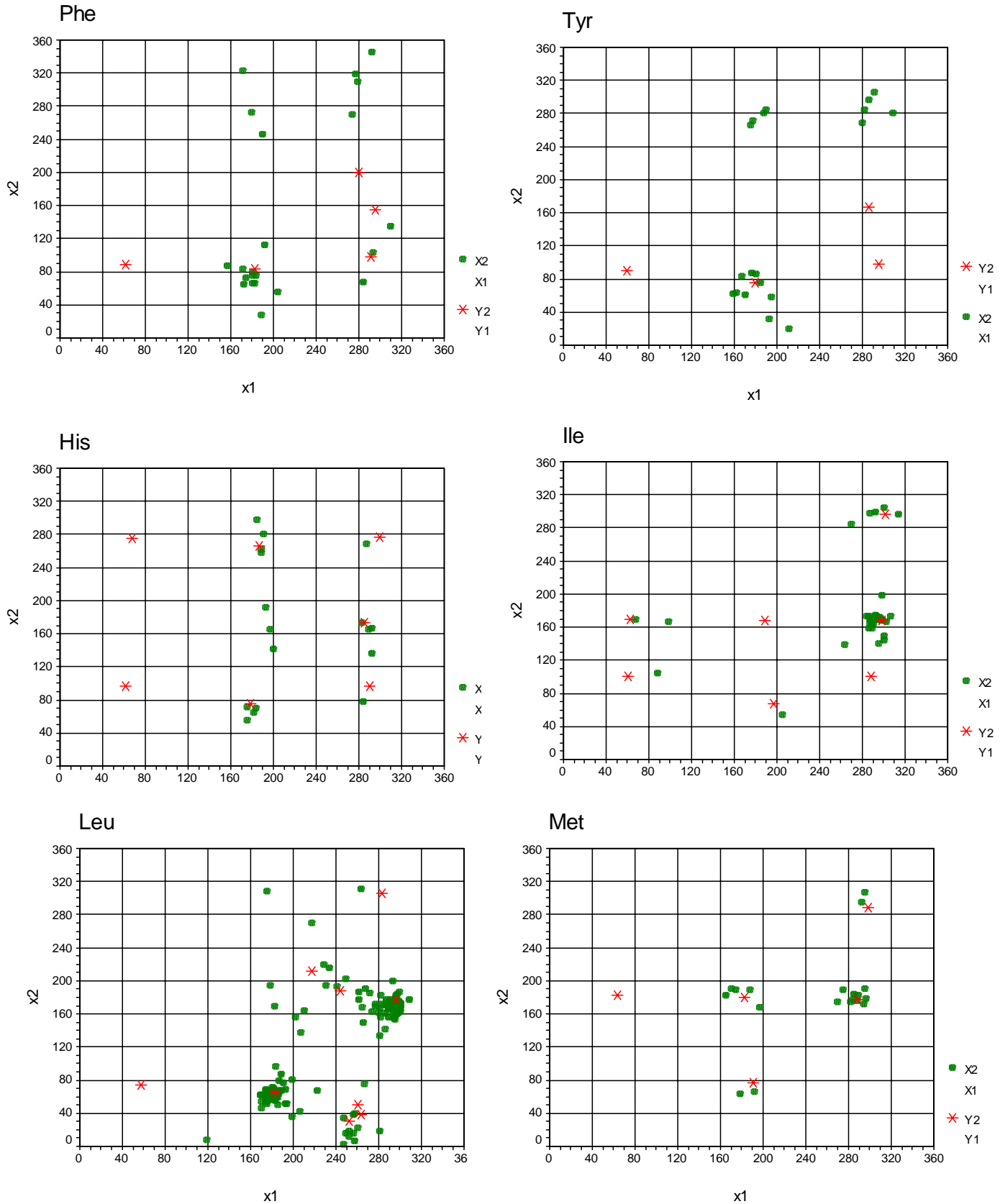
Αμινοξύ	Συνολικός αριθμός καταλοίπων	Αριθμός καταλοίπων ανά rotamer	(%)	Rotamer για το4-α-ελικοειδές δεμάτι			Rotamer για τις σφαιρικές πρωτεΐνες (Schrauber et al).	
Cys	13	10	77	-71	(289)		-65 -175 64	
Ser	30	7	23	51	(51)		69	
		8	27	-71	(289)		-67	
		9	30	-177	(183)		-177	
		3	10	-29	(331)			
Asp	38	21	55	-73	-10	(287 350)	-	
		6	17	178	64	(178 64)		
		3	8	-62	-50	(298 310)		
Asn	33	13	39	-75	-20	(285 340)	-	
		4	12	-174	-115	(186 245)		
		3	9	-70	165	(290 165)		
		3	9	-163	45	(197 45)		
		3	9	-85	116	(275 116)		
Gln	40	18	45	-70	176	(290 176)	-67 -181	
		4	10	-168	176	(192 176)	-174 -183	
		4	10	-73	-67	(287 293)	-64 -72	
		5	12	-170	71	(190 71)	-176 69 57 -179 -73 81 -167 -90	
Glu	40	16	40	-74	171	(286 171)	-68 -181	
		11	28	177	175	(177 175)	-176 180	
		6	15	-76	-66	(284 294)	-66 -61 -68 82 65 180 54 -84 -171 63 -159 -84	
Lys	40	17	42	-67	179	(293 179)	-69 -181	
		9	22	-178	-178	(182 182)	-174 -178	
		4	10	-65	-63	(295 297)	-56 -67 69 -175 -185 72 -155 -93 -83 93	
Arg	32	10	31	-72	176	(288 176)	-71 -178	
		8	25	-175	-177	(185 183)	-173 180	
		3	9	-63	-59	(297 301)	-59 -82	
		3	9	-179	67	(181 67)	68 -177 -177 70	

Το δείγμα που είχαμε για την Trp ήταν μικρό και διασκορπισμένο σε όλο το χώρο των χ-γωνιών.

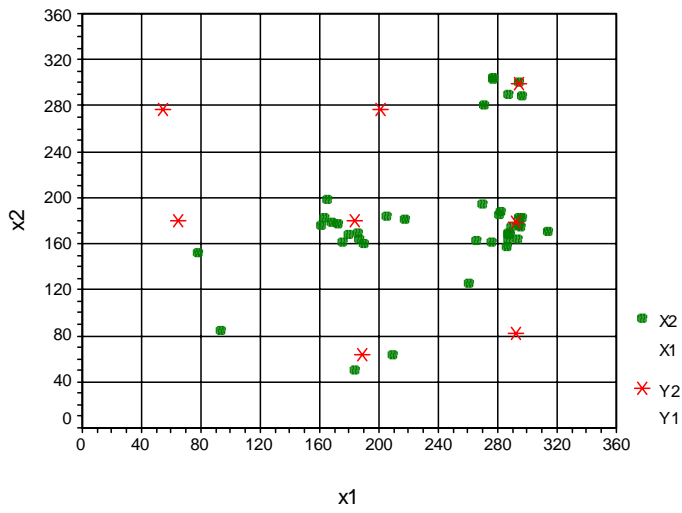
Αντίστοιχα οι Schrauber *et al.* δεν βρήκαν ευδιάκριτες συναθροίσεις για την Asp και την Asn.

Εικόνα 2.3 : Τα διαγράμματα κατανομής των χ_1 , χ_2 γωνιών του δείγματος, για κάθε τύπο αμινοξέος χωριστά (πράσινα σημεία). Οι τιμές των γωνιών δίνονται σε μοίρες, στο διάστημα $0^\circ - 360^\circ$ με εξαίρεση το διάγραμμα της Asp όπου το διάστημα είναι $40^\circ - 400^\circ$. Με διαφορετικό σύμβολο και χρώμα (κόκκινο άστρο) σημειώνονται τα rotamer των σφαιρικών πρωτεϊνών (κατάλογος των Schrauber *et al.* 1993). Για την Asp και την Asn οι Schrauber *et al.* δεν εντόπισαν ευδιάκριτες συναθροίσεις σημείων.

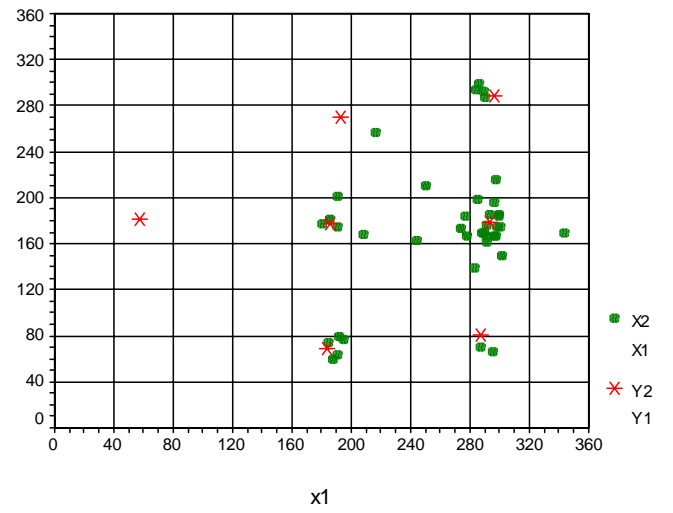
Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος SPSS v.7.5 (SPSS Inc.).



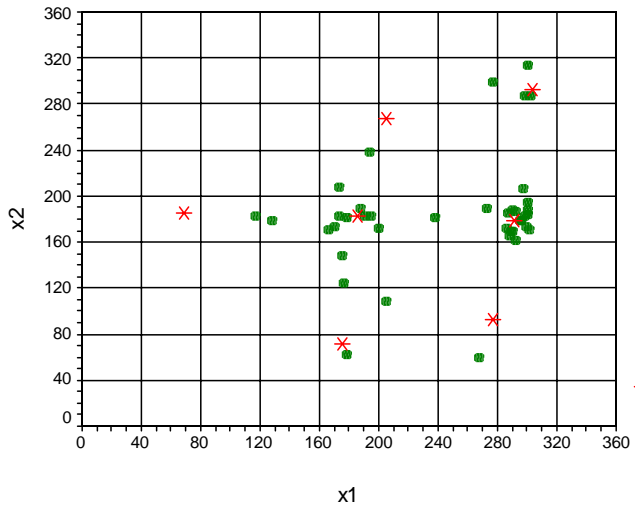
Glu



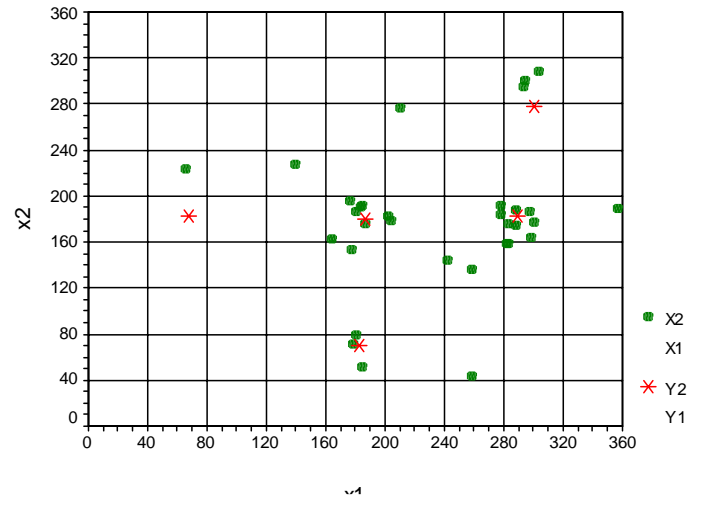
Gln



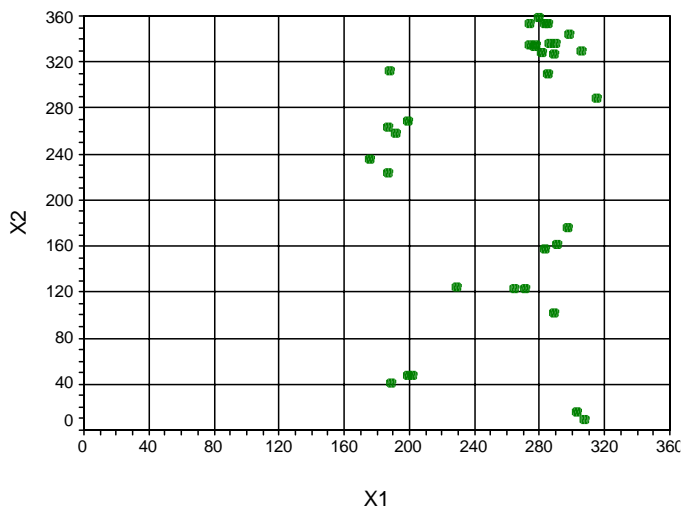
Lys



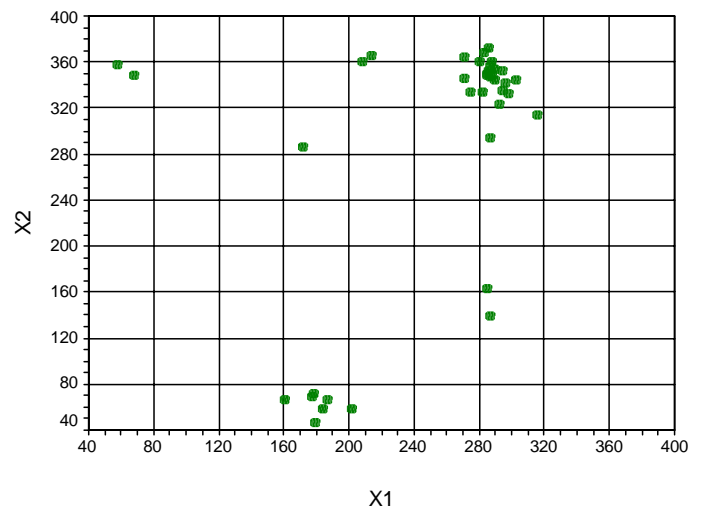
Arg



Asn



Asp



Γενικό χαρακτηριστικό για όλα τα αμινοξέα είναι ότι φαίνεται να προτιμούν ορισμένα μόνο από τα rotamer που έχουν παρατηρηθεί για το σύνολο των σφαιρικών πρωτεϊνών. Για τη Tyr ειδικότερα παρατηρείται μόνο μια συνάθροιση σημείων αντίστοιχη σε ήδη εντοπισμένο rotamer (180, 75). Παράλληλα, εμφανίζονται δύο νέες συναθροίσεις για τις οποίες δεν υπάρχει αντίστοιχο σημείο στον κατάλογο των Schrauber *et al.*. Η Leu, η Ile και η Ser επίσης φαίνεται να σχηματίζουν από ένα καινούριο rotamer η καθεμιά. Για την Asp και την Asn για το δείγμα των σφαιρικών πρωτεϊνών αναφέρεται ότι δεν εντοπίστηκαν ευδιάκριτες συναθροίσεις σημείων. Από τα αντίστοιχα διαγράμματα της εικόνας 2.3 πάντως, φαίνεται να υπάρχει μια προτίμηση για ορισμένες τιμές του ζεύγους χ_1, χ_2 , στη περίπτωση των δεματιών. Η Trp έχει πολύ μικρό δείγμα που δεν παρουσιάζει καμία συνάθροιση σε rotamer.

2.3.3 Διάκριση στις κατανομές διαμόρφωσης των πλευρικών ομάδων ανάλογα με τη θέση στο 4-α-ελικοειδές δεμάτι.

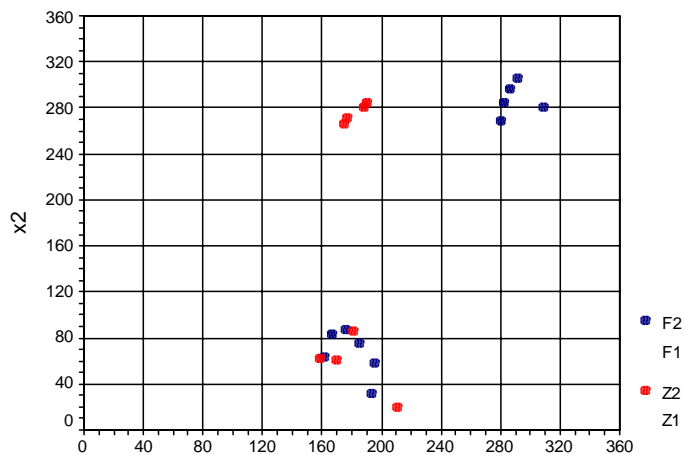
Γενικά στις σφαιρικές πρωτεΐνες τα υδρόφοβα αμινοξέα καταλαμβάνουν τις εσωτερικές θέσεις στις οποίες ο διαλύτης έχει μικρή ή καθόλου πρόσβαση ενώ τα υδρόφιλα βρίσκονται στην επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αμινοξική σύνθεση της ολικής πρωτεΐνης να διαφέρει από αυτήν του πρωτεϊνικού πυρήνα.

Οι πλευρικές ομάδες των εσωτερικών αμινοξέων πιστεύεται ότι έχουν μικρότερη περιστροφική ελευθερία σε σύγκριση με τα εξωτερικά, λόγω του στενού πακεταρίσματος στον πρωτεϊνικό πυρήνα. Πάντως οι Janin *et al.* (1978) αναφέρουν πως οι διαμορφώσεις που υιοθετούν οι πλευρικές ομάδες είναι ανεξάρτητες από τη θέση του αμινοξέος από το εάν δηλαδή βρίσκεται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό της πρωτεΐνης.

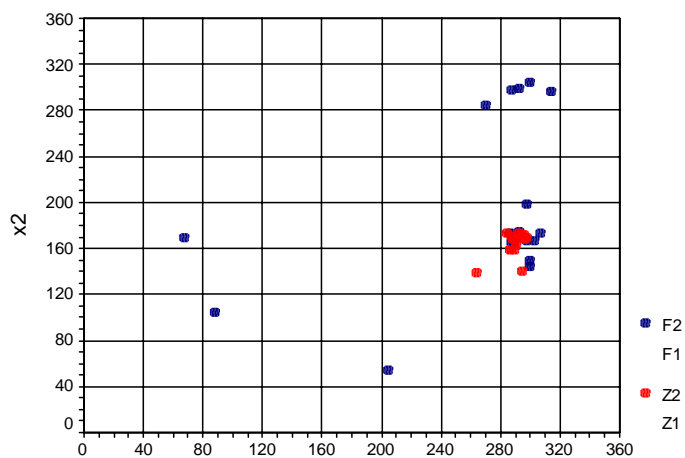
Για τη διερεύνηση του θέματος αυτού στη δομή του 4-α-ελικοειδούς δεματιού υπολογίσαμε τα διαγράμματα χ_1, χ_2 διακρίνοντας χρωματικά τις a, d θέσεις από τις υπόλοιπες (εικόνα 2.4, πίνακας V).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα διαγράμματα της Tyr της Ile και της Leu. Στη Tyr οι δύο συναθροίσεις που δεν αντιστοιχούν σε κάποιο από τα rotamer των Schrauber *et al.* φαίνεται τώρα ότι απαρτίζονται εξ ολοκλήρου η

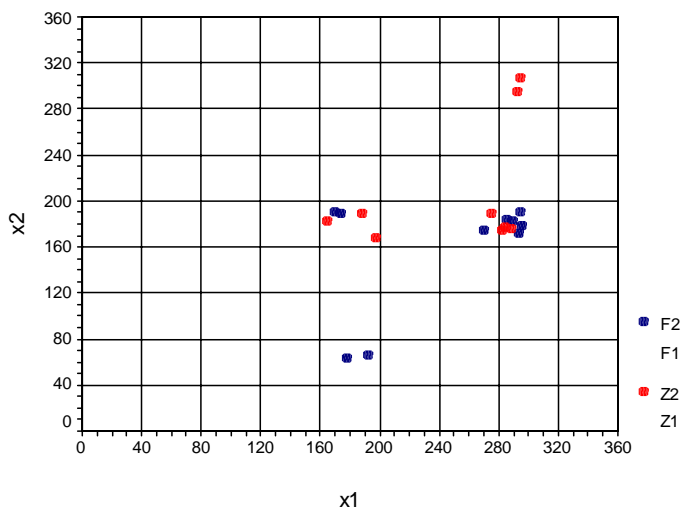
Tyr



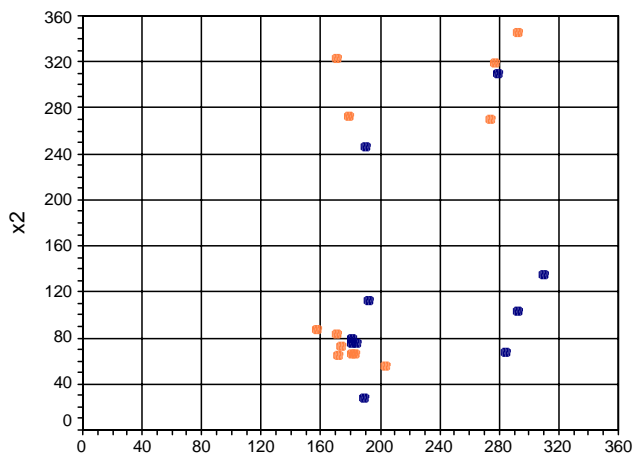
Ile



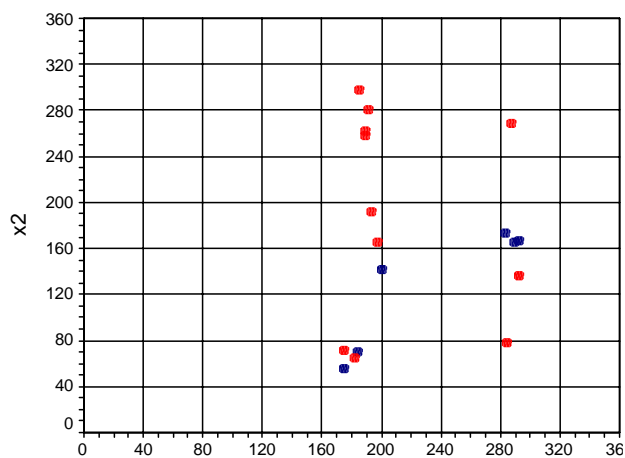
Met



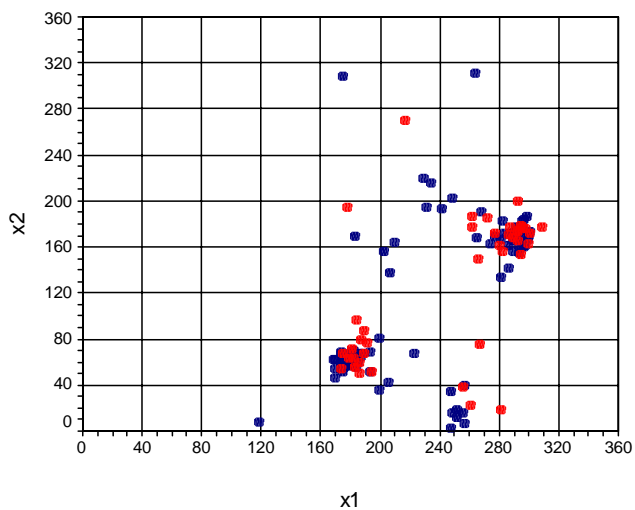
Phe



His



Leu



Εικόνα 2.4 : Διαγράμματα κατανομής των χ_1 , χ_2 γωνιών στα οποία γίνεται διάκριση ανάμεσα στα αμινοξέα των θέσεων a, d και στα αμινοξέα των υπολοίπων θέσεων. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι a, d θέσεις, με κόκκινο οι b, c, e, f, g θέσεις. Οι τιμές των γωνιών δίνονται σε μοίρες στο διάστημα $0^\circ - 360^\circ$.

Δεν παρουσιάζονται διαγράμματα των υπολοίπων αμινοξέων γιατί το δείγμα τους είναι πολύ μικρό στις θέσεις a, d.

καθεμιά από αμινοξέα της μιας ή της άλλης κατηγορίας. Στην Ile επίσης η μια από τις δύο συναθροίσεις σχηματίζεται από αμινοξέα μόνο των a, d θέσεων. Η συνάθροιση αυτή όμως αντιστοιχεί σε γνωστο rotamer των σφαιρικών πρωτεϊνών. Τέλος το διάγραμμα της Leu παρουσιάζει τουλάχιστον μια επιπλέον συνάθροιση (σε σύγκριση με τις σφαιρικές πρωτεΐνες). Επίσης δίνει την εντύπωση πως τα αμινοξέα των a, d θέσεων παρουσιάζουν μεγαλύτερη διασπορά από τα υπόλοιπα. Για να ελεγχθεί αυτό, δημιουργήθηκε ο πίνακας VI που δίνει τη rotamericitey του ολικού δείγματος και των εσωτερικών, εξωτερικών θέσεων χωριστά.

Πίνακας V : Αμινοξική σύνθεση του δείγματος των a, d θέσεων.

Phe	14	5.6%	Asp	1	0.4%
Tyr	11	4.4%	Asn	2	0.8%
His	6	2.4%	Gln	6	2.4%
Ile	20	8%	Glu	3	1.2%
Met	10	4%	Lys	1	0.4%
Leu	86	34.5%	Arg	8	3.2%
Val	17	6.8%	Trp	5	2%
Thr	9	3.6%	Ala	31	12.4%
Cys	9	3.6%	Gly	5	2%
Ser	5	2%	Pro	0	0%

Συνολικός αριθμός αμινοξικών καταλοίπων : 249 (100%).

Πίνακας VI

	Rotamericitey			
	4-α-ελικοειδής δερμάτι			Σφαιρικές πρωτεΐνες
	Για το σύνολο των αμινοξέων του δερματιού	Για τις εξωτερικές θέσεις (b,c,e,f,g _s)	Για τις εσωτερικές θέσεις (a,d)	Schrauber <i>et al.</i> (1993)
Phe	41	50	30	81.9
Tyr	89	88	91	75.8
His	66	55	83	68
Ile	88	100	79	83.1
Met	79	78	80	77.2
Leu	89	83	92	84.1
Val	90	83	100	94
Thr	95	94	100	92.6
Cys	77	75	78	92.4
Ser	90		100	85.3
Asp	80			
Asn	78			
Gln	77			73.6
Glu	83			69.4
Lys	74			60.7
Arg	74			65.8

Συγκρίνοντας τη δεύτερη με τη τρίτη στήλη γίνεται φανερό ότι αντίθετα με την αρχική εντύπωση, τα αμινοξέα που καταλαμβάνουν θέσεις του πυρήνα παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για συνάθροιση, τόσο στη Leu όσο και στα υπόλοιπα κατάλοιπα. Εμφανή εξαιρέση αποτελούν η Ile και η Phe.

Συγκρίνοντας την πρώτη με την τελευταία στήλη (του ίδιου πίνακα) παρατηρούμε ότι το δείγμα μας παρουσιάζει την ίδια ή μεγαλύτερη rotamericitey από το δείγμα των σφαιρικών πρωτεϊνών. Μόνες εξαιρέσεις αποτελούν η Phe και η Cys.

2.3.4 Συσχέτιση των φυσικών μεταλλάξεων με τα rotamer.

Τα αποτελέσματα από την πολλαπλή στοίχιση των ομόλογων πρωτεϊνών παρουσιάζονται στον πίνακα VII.

Τα 7 από τα 17 αμινοξέα που αναλύθηκαν μεταλλάσσονται σε Leu κατά πρώτη προτίμηση, ενώ οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι : Leu→Val, Val→Leu, Leu→Met, Leu→Ile, και Phe→Leu. Από τη συνεκτίμηση των πινάκων IV, VII φαίνεται να προκύπτει το ποιοτικό συμπέρασμα πως γενικά τα αμινοξέα του πυρήνα στο 4-α-ελικοειδές δεμάτι μεταλλάσσονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε αμινοξέα με τα οποία να έχουν κοινά rotamer. Αυτό ισχύει χωρίς καμία εξαίρεση στις συχνότερες μεταλλαγές που παρατηρήθηκαν. Έτσι, το συχνότερο rotamer της Ile και της Met συμπίπτει με το συχνότερο της Leu. Ενώ το μοναδικό rotamer της Phe συμπίπτει με το δεύτερο συχνότερο της Leu. Τέλος, αν θεωρήσουμε μόνο τη χ_1 γωνία παρατηρούμε ότι και τα δύο rotamer της Val συμπίπτουν με τη χ_1 γωνία των δύο συχνότερων rotamer της Leu. Αλλά και για τις λιγότερο συχνές μεταλλαγές ακολουθείται ο ίδιος κανόνας με εξαίρεση τις Val→Ile και Phe→Ile. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις a, d θέσεις η χ γωνία της Val παίρνει τιμές κοντά στις 180° , ενώ η Ile δεν έχει κανένα rotamer με χ_1 γωνία στην περιοχή αυτή.

Πίνακας VII : Παρουσίαση των παρατηρούμενων μεταλλαγών στις α, δ θέσεις του 4-α-ελικοειδούς δεματιού.

Αρχικό* αμινοξύ	Τελικό** αμινοξύ	Απόλυτος αριθμός μεταλλαγών	A † (%)	B ‡ (%)	Αρχικό αμινοξύ	Τελικό αμινοξύ	Απ. Αριθμός μεταλλαγών	A (%)	B (%)		
Leu (42)	Val	13	31	6.8	Ser(14)	Ala	5	36	2.6		
	Met	9	21	4.7		Glu	3	21	1.6		
	Ile	7	17	3.7		Met	2	14	1		
	Thr	4	10	2.1		Tyr	2	14	1		
	Ala	3	7	1.6		Gln	2	14	1		
	Asn	2	5	1		Tyr (9)	Phe	4	44	2.1	
	Phe	2	5	1			Leu	2	22	1	
	Gly	2	5	1			Met	2	22	1	
	Ala (19)	Gly	6	32		3.1	Asp	1	11	0.5	
		Ile	3	16		1.6	Cys (8)	Val	3	38	1.6
		Arg	2	11		1		Leu	2	25	1
		Val	2	11		1		Ala	2	25	1
		Ser	2	11		1	Ser	1	12	0.5	
Asp		1	5	0.5	Lys (8)	Leu	3	38	1.6		
Asn		1	5	0.5		Ile	2	25	1		
Thr		1	5	0.5		Gln	2	25	1		
Val (18)		Leu	1	5	0.5	Ser	1	12	0.5		
	Leu	11	61	5.8	Ile (7)	Leu	4	57	2.1		
	Ile	5	28	2.6		Val	2	29	1		
	Tyr	2	11	1		Ala	1	14	0.5		
Phe (15)	Leu	7	47	3.7	Gln (7)	Glu	5	71	2.6		
	Ile	5	33	2.6		Arg	2	29	1		
	Val	1	7	0.5		Arg (5)	Glu	2	40	1	
	Tyr	1	7	0.5	Tyr		2	40	1		
	Thr	1	7	0.5	Gly (4)	His	1	20	0.5		
Thr (15)	Leu	6	40	3.1		Ala	2	50	1		
	Cys	5	33	2.6		Ser	1	25	0.5		
	Gln	1	7	0.5		Val	1	25	0.5		
	Met	1	7	0.5		His (3)	Gly	3	100	0.5	
	Ala	1	7	0.5	Trp (2)		Leu	1	50	0.5	
Ser	1	7	0.5	Gln		1	50	0.5			
Met (14)	Leu	4	29	2.1	Asn (1)	Ala	1	100			
	Phe	4	29	2.1							
	Val	2	14	1							
	Tyr	2	14	1							
	Trp	1	7	0.5							
	Ile	1	7	0.5							

Παρατηρήθηκαν συνολικά 191 μεταλλαγές. Σε παρένθεση δίνεται ο συνολικός αριθμός μεταλλαγών του κάθε καταλοίπου.

*Αμινοξύ που μεταλλάσσεται

** Αμινοξύ που προκύπτει από τη μεταλλαγή

†Ποσοστό μεταλλαγών επί του συνολικού αριθμού μεταλλαγών του αρχικού καταλοίπου

‡Ποσοστό μεταλλαγών επί του συνολικού αριθμού παρατηρούμενων μεταλλαγών .

2.4 Συμπεράσματα

Το μικρό μέγεθος του δείγματός μας καθιστά δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ορισμένα αποτελέσματα που μας επιτρέπουν μερικές γενικεύσεις :

(i) Τα αμινοξέα των 4-α-ελικοειδών δεματιών προτιμούν ορισμένα μόνο από τα rotamer που έχουν παρατηρηθεί για το σύνολο των σφαιρικών πρωτεϊνών.

(ii) Η Tyr σχηματίζει δύο rotamer που δεν έχουν εντοπιστεί για τις σφαιρικές πρωτεΐνες στο δείγμα των Schrauber *et al.*, 1993 (αλλά ούτε προηγούμενα στο γενικό δείγμα των Ponder & Richards, 1987).

(iii) Η Asp και η Asn δείχνουν σαφή προτίμηση σε ορισμένα rotamer σε αντίθεση με τα ίδια αμινοξέα στο δείγμα των Schrauber *et al.*, (1993) που αναφέρεται πως δεν παρουσιάζουν ευδιάκριτες συναθροίσεις σημείων στο χώρο των χ γωνιών¹.

(iv) Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι σε ορισμένα αμινοξέα (Tyr, Ile) γίνεται διάκριση ανάμεσα στα rotamer που επιλέγονται από εσωτερικά και εξωτερικά αμινοξέα.

(v) Η rotamericitey των εσωτερικών αμινοξέων είναι συστηματικά μεγαλύτερη από αυτή των εξωτερικών.

(vi) Υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στις συχνότερες μεταλλάξεις και τα rotamer των αμινοξέων που συμμετέχουν σε αυτές.

¹ Οι Ponder & Richards πάντως, αναφέρουν rotamer και για τα δύο αυτά αμινοξέα, που δεν συμπίπτουν όμως με τα δικά μας εκτός από το πρώτο της Asn.

Κεφάλαιο 3

Καθαρισμός και κρυστάλλωση πρωτεϊνών, περίθλαση ακτίνων-Χ από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους.

3.1 Καθαρισμός πρωτεϊνών.

Συνήθως οι δομικές μελέτες, απαιτούν μεγάλες ποσότητες πολύ καθαρής πρωτεΐνης που να διατηρεί τη φυσική της στερεοδιάταξη και ενεργότητα. Γι' αυτό κατά την πορεία καθαρισμού μιας πρωτεΐνης αποφεύγεται η χρήση χρομοπικών παραγόντων και οι ακραίες τιμές pH ενώ παράλληλα λαμβάνονται όλα τα απαιτούμενα μέτρα για την ελαχιστοποίηση της πρωτεόλυσης.

3.1.1 Χρωματογραφική ανάλυση

Ο όρος χρωματογραφία, χρησιμοποιήθηκε στις αρχές του αιώνα για να χαρακτηρίσει μια μέθοδο διαχωρισμού χρωμάτων πάνω σε μια στήλη προσρόφησης. Αργότερα η λέξη χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μεθόδους διαχωρισμού μιγμάτων που στηρίζονται σε διαφορές της φυσικοχημικής συγγένειας των προς διαχωρισμό συστατικών έναντι μιας στατικής και μιας

κινητής φάσης. Η στατική φάση -που αναφέρεται και ως χρωματογραφικό υπόστρωμα ή προσροφητικό υλικό- αποτελεί το ακίνητο στρώμα στο οποίο προσροφώνται τα προς διαχωρισμό συστατικά και είναι συνήθως ένα αδιάλυτο στερεό πολυμερές. Η κινητή φάση, είναι ένα ρευστό που κινείται δια μέσου και κατά μήκος της στατικής.

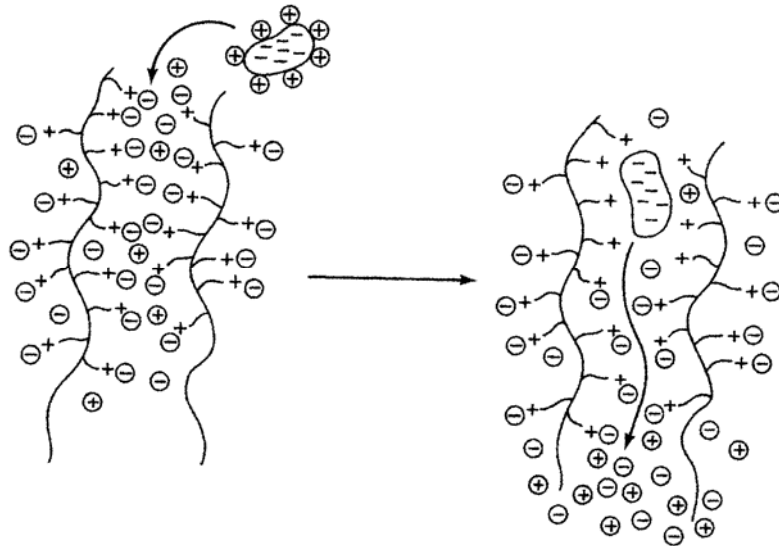
Όταν το προσροφητικό υλικό στοιβάζεται σε μια γυάλινη στήλη η τεχνική χαρακτηρίζεται ως χρωματογραφία στήλης. Στη χρωματογραφία στήλης κατατάσσονται οι περιπτώσεις που θα αναφερθούν παρακάτω.

I. Ιονανταλλακτική χρωματογραφία.

Η ιονανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μίγματος ιόντων και είναι μια από τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές μεθόδους για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μιγμάτων. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό φορτίο και επιτυγχάνεται ακόμα και μεταξύ πρωτεϊνών που παρουσιάζουν μικρές διαφορές σε αυτό. Σε αυτή τη χρωματογραφία το υλικό της στατικής φάσης φέρει χημικά προσδεδεμένες ιονισμένες ομάδες (ιονοφόρα) και ονομάζεται ιονανταλλάκτης (ion-exchanger). Ένας μεγάλος αριθμός ιόντων που ονομάζονται αντισταθμιστικά (counter-ions) προσδένονται ασθενώς στον ιοναντάκτη και εξασφαλίζουν τη συνολική ηλεκτρική του ουδετερότητα. Όταν ο ιοναντάκτης έρθει σε επαφή με το πρωτεϊνικό διάλυμα, τα ιόντα που έχουν ίδιο φορτίο με τα αντισταθμιστικά ανταλλάσσονται αντιστρεπτά με αυτά και αποκαθίσταται ισορροπία (εικόνα 3.1).

Ο διαχωρισμός με ιονανταλλακτική χρωματογραφία περιλαμβάνει: προσρόφηση του πρωτεϊνικού μίγματος στο χρωματογραφικό υπόστρωμα με ιονικές αλληλεπιδράσεις, έκπλυση για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που κατακρατήθηκαν με αλληλεπιδράσεις άλλης φύσης και έκλουση των ιονικά προσδεδεμένων πρωτεϊνών με εφαρμογή υδατικού διαλύματος υψηλής ιονικής ισχύος. Κατά τα στάδια αυτά δύο παράγοντες είναι ιδιαίτερα σημαντικοί : το pH και η ιονική ισχύς του διαλύματος που χρησιμοποιείται ως κινητή φάση. Με την αλλαγή της τιμής του pH ρυθμίζεται ο βαθμός ιονισμού των ιονοφόρων ομάδων τόσο της πρωτεΐνης όσο και του προσροφητή. Έτσι ελέγχεται ο βαθμός ιονικής αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Ανάλογα με τη ρύθμιση που θα γίνει ευνοείται η προσρόφηση της

πρωτεΐνης στον ιονανταλλάκτη ή η έκλυση της. Η ιονική ισχύς από την άλλη, χρησιμοποιείται για να ελέγξει το βαθμό δέσμευσης των ιονοφόρων ομάδων του ιονανταλλάκτη και της πρωτεΐνης από αντισταθμιστικά ιόντα. Μικρή ιονική ισχύς ευνοεί την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη στήλη ενώ μεγάλη ιονική ισχύς την έκλυση της (Harris and Angal, 1989).



Εικόνα 3.1 Μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη εισάγεται σε ανιοανταλλάκτη και δεσμεύεται από αυτόν. Ως επακόλουθο, απομακρύνεται από τη στήλη ίσος αριθμός θετικών και αρνητικών αντισταθμιστικών φορτίων (της πρωτεΐνης και του ιονανταλλάκτη αντίστοιχα). (Η εικόνα αναπαράχθηκε από το βιβλίο του R. Scopes , 1984, χωρίς άδεια του συγγραφέα).

II. Χρωματογραφία υδροξυλαπατίτη.

Σε αυτή τη χρωματογραφία η στατική φάση είναι μια κρυσταλλική μορφή φωσφορικού ασβεστίου $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ που ονομάζεται υδροξυλαπατίτης. Ο υδροξυλαπατίτης δεσμεύει πρωτεΐνες με διαφορετικό μηχανισμό από ότι τα πολυμερή υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως στις χρωματογραφίες στήλης. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχουν τόσο τα ιόντα ασβεστίου όσο και οι φωσφορικές ομάδες της κρυσταλλικής επιφάνειας. Αυτές οι αντίθετα φορτισμένες ομάδες βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους μέσα στον κρύσταλλο ώστε μπορούν να θεωρηθούν ως δίπολα. Έτσι πιστεύεται ότι συμβαίνουν αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου μεταξύ υποστρώματος και πρωτεΐνης. Παράλληλα συμβαίνουν και καθαρά ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κατά τις οποίες οι όξινες και ουδέτερες πρωτεΐνες προσδένονται στα ιόντα ασβεστίου ενώ οι βασικές προσροφώνται από τις φωσφορικές ομάδες της επιφάνειας του υδροξυλαπατίτη. Ο μοριακός

διαχωρισμός που επιτυγχάνεται δεν εξαρτάται ούτε από το μοριακό βάρος αλλά ούτε και από το σχήμα, την πυκνότητα φορτίου, το pI των πρωτεϊνών ή άλλες ιδιότητες στις οποίες βασίζονται οι άλλες τεχνικές διαχωρισμού. Αυτό καθιστά τη χρωματογραφία υδροξυλαπατίτη πολύτιμη συμπληρωματική διαδικασία για διαχωρισμούς που δεν μπορούν να επιτευχθούν με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές (Harris and Angal, 1989).

Η προσρόφηση πρωτεϊνών στη στήλη του υδροξυλαπατίτη πραγματοποιείται σε χαμηλές συγκεντώσεις ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών, με pH στην ουδέτερη περιοχή. Η έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη επιτυγχάνεται με εφαρμογή αυξανόμενης συγκέντρωσης φωσφορικών.

III. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης επιτυγχάνει το διαχωρισμό μορίων με βάση την υδροδυναμική ακτίνα τους και όχι τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (εικόνα 3.2). Η στατική φάση στη χρωματογραφία αυτή συνίσταται από σφαιρίδια πολυμερούς υλικού που χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό πορωσιμότητας και σταθερό μέγεθος πόρων. Μόρια αρκετά μικρότερα σε μέγεθος από τη διάμετρο των πόρων διαχέονται εύκολα στο εσωτερικό των σφαιριδίων και παραμένουν εκεί για αρκετό χρόνο. Αντίθετα μόρια με μέγεθος πολύ μεγαλύτερο από τη διάμετρο των πόρων δεν μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό, διαφεύγουν από τα κενά μεταξύ των πόρων και εκλύονται πρώτα από όλα τα συστατικά του μίγματος σε ένα χαρακτηριστικό όγκο που ονομάζεται νεκρός όγκος (void volume, Scopes, 1982).

3.1.2 Διαπίδυση.

Πολλές φορές είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν μικρομοριακές ουσίες που συνοδεύουν το δείγμα ή να αλλάξει εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεΐνης ώστε να επιτευχθεί μετάβαση από το ένα στάδιο του καθαρισμού στο επόμενο με τις μικρότερες απώλειες (π.χ. όπως



Εικόνα 3.2 Καθώς το μοριακό μίγμα περνά μέσα από τη στήλη τα μικρότερα μόρια συγκρατούνται για μεγαλύτερο χρόνο στους πόρους του προσροφητή και εκλύονται αργότερα από τα μεγαλύτερα μόρια (η εικόνα αναπαράχθηκε από τον οδηγό χρωματογραφικών υλικών “Standard Chromatography media guide” της Pharmacia).

έχει ήδη αναφερθεί για τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής το pH και η ιονική ισχύς πρέπει να ρυθμίζονται κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζεται η δέσμευση των πρωτεϊνών στο χρωματογραφικό υπόστρωμα). Αυτό επιτυγχάνεται συχνά υποβάλλοντας το δείγμα σε διαπίδυση (Harris & Angal, 1989). Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σε μια κύστη ημιπερατής μεμβράνης που περιβάλλεται εξωτερικά από το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα. Τα μικρά μόρια περνούν ελεύθερα δια μέσου της μεμβράνης και ανταλλάσσονται ενώ τα μεγάλα παραμένουν στον αρχικό τους χώρο. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης καθορίζει το μέγιστο μέγεθος των μορίων που θα ανταλλάγουν.

3.1.3 Μέθοδος Bradford.

Ιδιαίτερα στο τέλος ενός καθαρισμού είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται το συνολικό ποσό καθαρής πρωτεΐνης που απομονώθηκε. Για το σκοπό αυτό πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί από τις οποίες ιδιαίτερα δημοφιλής είναι η μέθοδος Bradford. Υπό κατάλληλες συνθήκες οι όξινες και βασικές ομάδες των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με αποχωρούσες ομάδες οργανικών χρωστικών και σχηματίζουν έγχρωμα ιζήματα. Στο φαινόμενο αυτό στηρίζεται η μέθοδος Bradford κατά την οποία χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που σχηματίζει σύμπλοκα πρωτεΐνης-χρωστικής με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm (Harris & Angal, 1989). Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος στα 595nm, με μια πρότυπη καμπύλη που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης BSA με τη απορρόφηση τους στα 595nm. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι ευαίσθητη, γρήγορη και σχετικά ακριβής. Αλλά έχει δύο βασικά μειονεκτήματα : παρουσιάζει σημαντική εξάρτηση από την αμινοξική αλληλουχία και είναι ευαίσθητη σε χημικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στα εργαστήρια (π.χ. φαινόλη, Tris, EDTA).

3.2 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Οι κρύσταλλοι είναι υλικά που σε μοριακό επίπεδο χαρακτηρίζονται από μια περιοδική επανάληψη ταυτόσημων μονάδων. Αυτή η εσωτερική κανονικότητα τους διαφοροποιεί από τα υπόλοιπα –άμορφα- στερεά ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και την ικανότητα να περιθλούν ακτίνες-Χ.

Οι κρύσταλλοι των βιολογικών μακρομορίων, σε αντίθεση με τους κρυστάλλους των ανόργανων αλάτων είναι συνήθως μικροί, εύθραυστοι, ευαίσθητοι σε αλλαγές εξωτερικών παραγόντων, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυτή και χαρακτηρίζονται από ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιομορίων.

Η κρυστάλλωση των βιομορίων είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η διερεύνηση των συνθηκών κρυστάλλωσης καταλήγει στη δημιουργία των διαγραμμάτων φάσης. Τα διαγράμματα αυτά παριστούν τη διαλυτότητα του βιολογικού μακρομορίου ως συνάρτηση ενός ή περισσότερων από τους παράγοντες που την επηρεάζουν (Ducruix & Giege, 1992, Papanikolaou & Kokkinidis, 1992). Τα διαγράμματα αυτά είναι χαρακτηριστικά του κάθε βιομορίου και η γνώση τους αποτελεί σημαντικό βήμα για την κατάστροψη των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

Η κρυστάλλωση ενός βιομορίου είναι μια φυσική διαδικασία που πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης και στο δεύτερο οι πυρήνες αυτοί μεγαλώνουν και δίνουν τους τελικούς κρυστάλλους του μορίου. Συχνά, στο εργαστήριο επιδιώκεται ο διαχωρισμός των διαδικασιών σε δυο πειράματα γιατί με αυτό τον τρόπο λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα δηλαδή μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι. Έτσι, αρχικά δημιουργούνται πολλοί πυρήνες και στη συνέχεια κάποιοι από αυτούς επιλέγονται και εμβαπίζονται σε ένα καινούριο διάλυμα του βιομορίου, όπου αφήνονται να μεγαλώσουν. Η τεχνική αυτή ονομάζεται ενπυρήνωση (seeding) και επιτρέπει την επιλογή ορισμένου αριθμού και τύπου κρυστάλλων (Ducruix & Giege, 1992). Ανάλογα με το μέγεθος των επιλεγμένων κρυστάλλων διακρίνεται σε μικροενπυρήνωση και σε μακροενπυρήνωση ενώ ιδιαίτερα αποτελεσματική είναι και η τεχνική της γραμμωτής ενπυρήνωσης (streak seeding technique). Η τελευταία μπορεί να περιγραφεί ως εξής : Με την άκρη μιας τρίκας

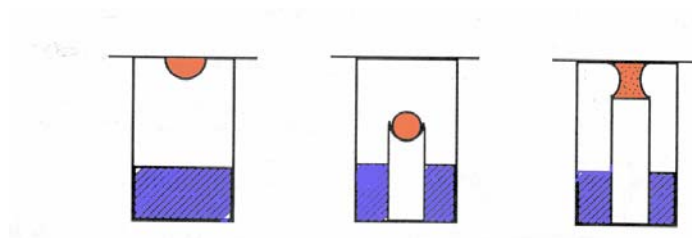
αγγίζεται ένας προϋπάρχον και πιθανώς κακοσχηματισμένος κρύσταλλος ή απλά η τρίκα εμβαπτίζεται σε ένα διάλυμα μικροκρυσταλλιτών. Και στις δύο περιπτώσεις πυρήνες κρυστάλλωσης προσκολλώνται στην άκρη της τρίκας και μεταφέρονται σε καινούριο διάλυμα μακρομορίου όπου αφήνονται να μεγαλώσουν (Ducruix & Giege, 1992).

Για την κρυστάλλωση των βιολογικών μακρομορίων έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι από τις οποίες εδώ θα αναφερθούν τρεις :

Ολική ανάμιξη (batch method). Το βιολογικό μακρομόριο αναμιγνύεται με διάλυμα που περιέχει τους κατάλληλους παράγοντες κρυστάλλωσης στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις ώστε να δημιουργηθούν κρύσταλλοι.

Διαπίδυση (dialysis method). Η μέθοδος επιτρέπει αλλαγές στις συγκεντρώσεις διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση. Χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι συσκευών διαπίδυσης αλλά όλες ακολουθούν την ίδια αρχή. Το βιολογικό μακρομόριο διαχωρίζεται από το διαλύτη με μία ημιπερατή μεμβράνη που επιτρέπει ελεύθερη διέλευση σε μικρά μόρια αλλά εμποδίζει τη διέλευση του μακρομορίου. Τελικά, η θέση ισορροπίας που θα επιτευχθεί εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης, την αναλογία συγκεντρώσεων των παραγόντων κρυστάλλωσης μέσα κι έξω από το χώρο της πρωτεΐνης, τη θερμοκρασία και τη γεωμετρία της συσκευής. Όταν οι όγκοι που χρησιμοποιούνται είναι μικροί, η μέθοδος αναφέρεται ως μικροδιαπίδυση.

Διάχυση ατμών (vapour diffusion method). Είναι μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδος που στηρίζεται στο φαινόμενο της τάσης ατμών. Μέσα σε ένα κλειστό δοχείο συνυπάρχουν δύο διαλύματα. Το ένα έχει μικρό όγκο (αναφέρεται ως σταγόνα) και περιέχει το προς κρυστάλλωση βιολογικό μακρομόριο και τους απαιτούμενους παράγοντες κρυστάλλωσης. Το άλλο που είναι σημαντικά μεγαλύτερου όγκου (αναφέρεται ως δεξαμενή), περιέχει μόνο τους παράγοντες κρυστάλλωσης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τη σταγόνα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος λαμβάνει χώρα μια πορεία εξισορρόπησης της τάσης ατμών των δύο διαλυμάτων. Αποτέλεσμα της εξισορρόπησης είναι η αλλαγή του όγκου της σταγόνας και επομένως η αλλαγή στις συγκεντρώσεις των συστατικών της. Έχουν αναπτυχθεί τρεις τεχνικές για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου (εικόνα 3.3): η κρεμαστή σταγόνα (hanging drop), η καθιστή σταγόνα (sitting drop) και η εκατέρωθεν περιορισμένη σταγόνα (sandwich drop).



Εικόνα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση των τεχνικών που εφαρμόζονται στη μέθοδο της διάχυσης ατμών. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται η κρεμαστή σταγόνα, η καθιστή σταγόνα και η εκατέρωθεν περιορισμένη σταγόνα. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζεται το διάλυμα του βιολογικού μακρομορίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται το διάλυμα των παραγόντων κρυστάλλωσης (που δεν περιέχει το βιολογικό μακρομόριο). (Εικόνα τροποποιημένη από τους Ducruix & Giege, 1992).

3.3 Περίθλαση ακτίνων-Χ από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους.

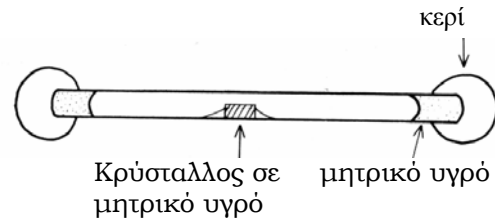
3.3.1 Συλλογή δεδομένων περίθλασης

Όταν ο κρύσταλλος φτάσει τις τελικές του διαστάσεις, ακολουθεί η τοποθέτηση του σε διάταξη παραγωγής ακτίνων-Χ και η συλλογή των δεδομένων που προκύπτουν από την περίθλαση που προκαλεί.

Τοποθέτηση του κρυστάλλου σε γυάλινο τριχοειδή σωλήνα: Οι κρύσταλλοι των βιολογικών μακρομορίων περιέχουν μεγάλο ποσοστό του διαλύματος στο οποίο μεγάλωσαν. Έτσι, αν εκτεθούν στον αέρα υπό φυσιολογικές συνθήκες εργαστηρίου, το υγρό που περιέχουν θα εξατμιστεί γρήγορα. Αυτό θα προκαλέσει στενότερο πακετάρισμα των μακρομορίων και ταυτόχρονα απώλεια της περιοδικής διευθέτησής τους. Η μακροσκοπική συνέπεια των αλλαγών αυτών είναι η εμφάνιση ραγισμάτων στην επιφάνεια.

Γι' αυτό το λόγο, οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι πριν χρησιμοποιηθούν για πειράματα περίθλασης, προστατεύονται από τις συνθήκες περιβάλλοντος. Με μια κατά το δυνατόν γρήγορη διαδικασία (γνωστή ως mounting) απομακρύνονται από το διάλυμα που μεγάλωσαν και μεταφέρονται σε γυάλινους τριχοειδείς σωλήνες (capillaries) με διαστάσεις που εξαρτώνται από το μέγεθος του επιλεγμένου κρυστάλλου. Ένας μικρός όγκος μητρικού υγρού τοποθετείται στον τριχοειδή σωλήνα εκατέρωθεν του κρυστάλλου. Έτσι ο χώρος κορρένυται στους ατμούς του διαλύτη και αποκαθίσταται ισορροπία που εμποδίζει την εξάτμιση υγρού από τη μάζα του κρυστάλλου (εικόνα 3.4). Στη συνέχεια τα άκρα κλείνονται με κερί και τόσο ο κρύσταλλος όσο και το υγρό που τον περιβάλλει δεν μετακινούνται μέσα στον σωλήνα. Επιπλέον το γυαλί δεν σκεδάζει αλλά ούτε και απορροφά ακτινοβολία και έτσι δεν επηρεάζει σημαντικά τα διαγράμματα περίθλασης.

Εικόνα 3.4 Κρύσταλλος τοποθετημένος σε γυάλινο τριχοειδή σωλήνα (η εικόνα αναπαράχθηκε από τους Blundell & Johnson, 1976 χωρίς άδεια των συγγραφέων).



Στη συνέχεια ο τριχοειδής σωλήνας -που περιέχει τον κρύσταλλο- τοποθετείται σε μια διάταξη που παράγει ακτίνες-Χ και καταγράφει την περίθλαση των ακτίνων από τον κρύσταλλο.

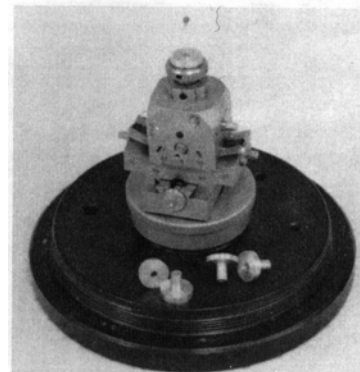
Παραγωγή δέσμης ακτίνων-Χ: Η περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με μήκη κύματος μεταξύ $0.1 - 100 \text{ \AA}$ αποτελεί την περιοχή των ακτίνων-Χ. Το μήκος κύματος των ακτίνων-Χ που είναι χρήσιμο για κρυσταλλογραφικές μελέτες είναι της τάξης του 1 \AA .

Ακτίνες-Χ παράγονται όταν ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από ηλεκτρικά θερμαινόμενη κάθοδο επιταχύνονται από ηλεκτρικό πεδίο και κατευθύνονται σε μια μικρή περιοχή της ανόδου. Συγκρούσεις των ηλεκτρονίων με τα άτομα της ανόδου παράγουν ένα συνεχές φάσμα ακτινοβολίας καθώς επίσης και μια σειρά διάκριτων φασματικών γραμμών μεγάλης έντασης των οποίων οι θέσεις εξαρτώνται από το υλικό της ανόδου. Για την ανάλυση των περισσότερων βιολογικών μορίων η άνοδος που χρησιμοποιείται είναι από χαλκό ή μολυβδαίνιο.

Τοποθέτηση κρυστάλλου μέσα στη δέσμη ακτίνων-Χ: Ο τριχοειδής σωλήνας που περιέχει τον κρύσταλλο τοποθετείται σε μια γωνιομετρική κεφαλή. Η γωνιομετρική κεφαλή είναι μια βάση που δίνει τη δυνατότητα σε ό,τι εφαρμόζεται πάνω της να μετατοπίζεται κατά μήκος δύο κάθετων διευθύνσεων και να περιστρέφεται πάνω σε δύο κάθετα τόξα κατά βούληση (εικόνα 3.5). Έτσι, η τοποθέτηση του κρυστάλλου στη γωνιομετρική κεφαλή κάνει δυνατή

Εικόνα 3.5

Γωνιομετρική κεφαλή με τοποθετημένο capillary. (Η εικόνα αναπαράχθηκε από τον McPherson, 1989, χωρίς άδεια του συγγραφέα).



την ευθυγράμμισή του με τις ακτίνες-Χ και την επιλογή της επιφάνειας που θα στοχευτεί από τις ακτίνες.

Περίθλαση ακτίνων-Χ και καταγραφή των περιθλώμενων ακτίνων: Η περίθλαση είναι ένα φυσικό φαινόμενο που παρατηρείται όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συναντάει αντικείμενα που έχουν περιοδικότητες συγκρίσιμες με το μήκος κύματος που τη χαρακτηρίζει. Αποτέλεσμα του φαινομένου είναι τα διαγράμματα περίθλασης. Οι

κρύσταλλοι είναι υλικά που παρουσιάζουν περιοδικότητα. Οι ακτίνες-X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος της ίδιας τάξης μεγέθους με την περιοδικότητα των κρυστάλλων. Έτσι οι κρύσταλλοι περιθλούν τις ακτίνες-X και το αποτέλεσμα είναι κανονικά διαγράμματα περίθλασης.

Ο ανιχνευτής είναι το όργανο που συλλέγει και καταγράφει τις περιθλώμενες ακτίνες. Η πληροφορία που καταγράφεται από τον ανιχνευτή μεταφέρεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και παρουσιάζεται με τη μορφή διαγράμματος περίθλασης (image plate).

Συνήθως η συλλογή δεδομένων συνεχίζεται μέχρι ο κρύσταλλος να μη περιθλά ικανοποιητικά.

3.3.2 Ανάκτηση της δομής από δεδομένα περίθλασης.

Οι ακτίνες-X σκεδάζονται από τα ηλεκτρονικά νέφη των ατόμων. Έτσι, ένας στοιχειώδης όγκος dv στη θέση \mathbf{r} σκεδάζει ανάλογα με την ηλεκτρονική του πυκνότητα $\rho(\mathbf{r})$. Η φάση του κύματος που σκεδάζεται από αυτόν τον στοιχειώδη όγκο εξαρτάται από τον παράγοντα $2\pi\mathbf{r} \cdot (\mathbf{k}-\mathbf{k}_0)/\lambda$ (1), όπου \mathbf{r} είναι το διάνυσμα θέσης, \mathbf{k} και \mathbf{k}_0 είναι τα διανύσματα του σκεδαζόμενου και του προσπίπτοντος κύματος αντίστοιχα και λ είναι το μήκος κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Για συντομία γράφεται $\mathbf{k}-\mathbf{k}_0/\lambda=\mathbf{S}$, όπου το \mathbf{S} ονομάζεται διάνυσμα σκέδασης και ο (1) γίνεται $2\pi\mathbf{r}\cdot\mathbf{S}$. Το συνολικό σκεδαζόμενο κύμα στη διεύθυνση \mathbf{S} δίνεται από το ολοκλήρωμα :

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) dv \quad (2)$$

όπου είναι ο συνολικός όγκος του αντικειμένου.

Όταν το αντικείμενο που περιθλά είναι ένας κρύσταλλος, η περιοδικότητα του, εισάγει και στην περίθλαση έναν παράγοντα περιοδικότητας. Έτσι, τα μέγιστα της περίθλασης παρατηρούνται πάνω σε ένα πλέγμα (h,k,l) του οποίου οι διαστάσεις είναι αντιστρόφως ανάλογες των διαστάσεων της στοιχειώδους κυψελίδας. Η σχέση (2) για έναν κρύσταλλο γράφεται :

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \int_{\substack{\text{όγκος} \\ \text{στοιχειώδους} \\ \text{κυψελίδας}}} \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) dv \quad (3)$$

ή ισοδύναμα

$$\mathbf{F}_{hkl} = \int_{\substack{\text{όγκος} \\ \text{στοιχειώδους} \\ \text{κυψελίδας}}} \rho(x, y, z) \exp[2\pi i (hx+ky+lz)] dx dy dz \quad (4)$$

Οι τιμές του $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ (ή \mathbf{F}_{hkl} στο σημείο του αντίστροφου πλέγματος με δείκτες (h,k,l)) που υπολογίζονται από την (3) ή ισοδύναμα τη (4) ονομάζονται παράγοντες δομής του κρυστάλλου. Ο παράγοντας δομής $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ εκφράζει το συνολικό σκεδαζόμενο κύμα από όλα τα άτομα της στοιχειώδους κυψελίδας στη διεύθυνση \mathbf{S} και χαρακτηρίζεται από πλάτος και φάση. Αφού η συνάρτηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας αποτελείται από τα ηλεκτρονικά νέφη όλων των ατόμων του αντικειμένου που περιθλά, η (3) είναι ισοδύναμη με το άθροισμα των ολοκληρωμάτων του κάθε ατόμου, οπότε προκύπτει :

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}) \quad (5)$$

όπου N : το σύνολο των ατόμων της στοιχειώδους κυψελίδας, f_j : ονομάζεται ατομικός παράγοντας σκέδασης και εξαρτάται από το $|\mathbf{S}|$ και το είδος του ατόμου, \mathbf{r}_j : η θέση του κάθε ατόμου j .

Οι εντάσεις των μεγίστων περιθλασης από πραγματικούς κρυστάλλους είναι ανάλογες του τετραγώνου του πλάτους των παραγόντων δομής:

$$I_{hkl} = |\mathbf{F}_{hkl}|^2 \quad (6)$$

Για την ανάκτηση της μοριακής δομής από τα δεδομένα περιθλασης εφαρμόζεται ο αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier στην εξίσωση (4). Ως ανάλυση Fourier, ορίζεται η ιδιότητα κάθε συνάρτησης να μπορεί να γραφεί ως άθροισμα απείρων όρων ημιτονοειδών και συνημιτονοειδών συναρτήσεων. Η (4) αποτελεί ένα άθροισμα τέτοιων όρων και έτσι αν εφαρμοστεί σε αυτήν ο αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier προκύπτει η εξίσωση :

$$\rho(x, y, z) = \sum_{hkl} \mathbf{F}_{hkl} \exp[-2\pi i (hx+ky+lz)] \quad (7)$$

που δίνει την ηλεκτρονική πυκνότητα στη θέση (x, y, z) της στοιχειώδους κυψελίδας αν είναι γνωστοί οι παράγοντες δομής \mathbf{F}_{hkl} (πλάτος και φάση) για όλες τις ανακλάσεις, hkl . Το I_{hkl} είναι πειραματικά μετρούμενη ποσότητα, έτσι από την εξίσωση (6) υπολογίζεται το πλάτος των παραγόντων δομής, αλλά η πληροφορία για τις φάσεις χάνεται. Αυτό είναι τελικά το βασικό πρόβλημα στο προσδιορισμό μιας κρυσταλλικής δομής με την τεχνική της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X.

Για τους σκοπούς αυτής της εργασίας η επιλυση του προβλήματος των φάσεων δεν ήταν αναγκαία αφού η ύπαρξη ενός προϋπάρχοντος μοντέλου μας επέτρεψε τον υπολογισμό των φάσεων των παραγόντων σκέδασης, το συνδυασμό τους με τα πειραματικά προσδιορισμένα πλάτη τους και τέλος τον υπολογισμό βελτιωμένων χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας μέσω εξίσωσης ανάλογης της (7) (Blundell & Jonson, 1976).

Κεφάλαιο 4

Η μετάλλαξη RM6 της Rop

4.1 Εισαγωγή

Η RM6 (ή Δ5aa) είναι μια μετάλλαξη της πρωτεΐνης Rop. Προέκυψε από την απαλοιφή των πέντε αμινοξέων (Asp30, Ala31, Asp32, Glu33, Gln34) που αποτελούν το βρόχο κάθε μονομερούς στη wtRop. Σχεδιάστηκε με σκοπό να ελεγχθεί η υπόθεση ότι ασυνέχειες στην επανάληψη του προτύπου της επτάδας οδηγούν στο σχηματισμό του βρόχου της wtRop. Αυτή η υπόθεση προτάθηκε όταν παρατηρήθηκε ότι η αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελούν την περιοχή της στροφής δεν εμφανίζουν το χαρακτηριστικό πρότυπο. Έτσι, σχεδιάστηκε η RM6 όπου το πρότυπο της επτάδας αποκαθίσταται με την αφαίρεση της αμινοξικής αλληλουχίας που δεν υπακούει σ' αυτό.

Ανάλυση της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X αποκάλυψε δραματικές αλλαγές στη τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή (Kokkinidis *et al.*, 1998). Στο επίπεδο της τριτοταγούς δομής το μονομερές αλλάζει, και από ένα ζεύγος αντιπαράλληλων ελίκων που συνδέονται με μια μικρή περιοχή κάμψης μετατρέπεται σε μια μονή και μακριά έλικα. Στο επίπεδο της τεταρτοταγούς δομής, η πρωτεΐνη μετατρέπεται από διμερές σε τετραμερές. Παρ' όλα αυτά, η τοπολογία διατηρείται και η RM6 εξακολουθεί να είναι ένα αντιπαράλληλο 4-α-ελικοειδές δεμάτι. Η διαφορά είναι ότι το δεμάτι σχηματίζεται από τέσσερις μακριές α-έλικες. Οι σημαντικές δομικές αλλαγές συνοδεύονται από εξίσου σημαντικές αλλαγές στη σταθερότητα. Η RM6 είναι σημαντικά σταθερότερη από τη wtRop και αυτό φαίνεται από την αύξηση της θερμοκρασίας μετάπτωσης. Έτσι, ενώ η wtRop χαρακτηρίζεται από μια θερμοκρασία μετάπτωσης 71°C, στην RM6 η θερμοκρασία αυτή έχει ανέβει στους 101°C. Παράλληλα, η ενέργεια Gibbs για την αποδιάταξη αυξήθηκε από 71.7 kJ/mol (διμερούς) στη wtRop σε 195.1 kJ/mol (τετραμερούς)

στην RM6 (Lassale *et al.*, 1998). Η αξιοσημείωτη αλλαγή στη θερμική σταθερότητα της RM6 αντανακλάται σε σημαντικές αλλαγές στη σταθερά ταχύτητας που χαρακτηρίζει την πορεία αναδίπλωσης αυτής της πρωτεΐνης. Από κινητικές μελέτες που αφορούν την αντίστροφη αντίδραση δηλαδή την αποδιάταξη προκύπτουν δεδομένα που υποστηρίζουν την άποψη ότι το ξεδίπλωμα της RM6 είναι μια πορεία που ακολουθεί κινητική δεύτερης τάξης. Συγκεκριμένα θεωρείται ότι κατά την έκθεση της πρωτεΐνης σε υδροχλωρική γουανιδίνη ($GdnHCl$) το τετραμερές διαχωρίζεται γρήγορα σε δύο διμερή που πρακτικά διατηρούν τη δομή τους σχετικά με το τετραμερές. Σε ένα δεύτερο αργό στάδιο, τα διμερή παύουν να αλληλεπιδρούν με τελικό αποτέλεσμα τη πλήρη αποδιάταξη. Ο μηχανισμός αυτός, μολονότι είναι συνεπής με τα πειραματικά δεδομένα είναι εντελώς ασυνήθιστος για το πρωτεϊνικό ξεδίπλωμα. (Lassale & Hinz, 1998).

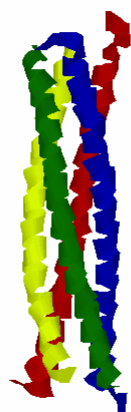
Συνοψίζοντας, θα λέγαμε πως η RM6 παρουσιάζει μια πλήρη αναδιοργάνωση του υδρόφοβου πυρήνα σε σχέση με τη wtRop. Η συμπεριφορά της μετάλλαξης υποστηρίζει την υπόθεση ότι στο Rop η αμινοξική αλληλουχία κυρίως εμπεριέχει πληροφορία για την ιδιαίτερη τοπολογία στην οποία ανήκει η πρωτεΐνη παρά για τη συγκεκριμένη δομή με την οποία διπλώνεται.

Ύστερα απ' όλα αυτά γίνεται φανερό ότι μια προσεκτική και αναλυτική μελέτη τη μετάλλαξης αυτής ίσως επιτρέψει την εξαγωγή κάποιων συμπερασμάτων σε σχέση με το δίπλωμα και τη στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών. Για να αποκτήσουμε πρόσβαση στην τυχόν υπάρχουσα πληροφορία προσπαθήσαμε να βελτιώσουμε τα διαθέσιμα κρυσταλλογραφικά δεδομένα ώστε να μάθουμε περισσότερες λεπτομέρειες για τη δομή. Έτσι κρυσταλλώσαμε την RM6 και συλλέξαμε κρυσταλλογραφικά δεδομένα στη διακριτική ικανότητα των 2.0 Å.

Πίνακας I: Η αμινοξική αλληλουχία της wtRop κατανεμημένη σε επτάδες.

	f	g	a	b	c	d	e
1	Met	Thr					
3	Lys	Gln	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu
10	Asn	Met	Ala	Arg	Phe	Ile	Arg
17	Ser	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu
24	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Leu	Asp
31		Ala		Asp	Glu	Gln	Ala
36	Asp	Ile	Cys	Glu	Ser	Leu	His
43	Asp	His	Ala	Asp	Glu	Leu	Tyr
50	Arg	Ser	Cys	Leu	Ala	{ Arg	Phe }
57	(Gly	Asp	Asp	Gly	Glu	Asn	Leu)

Τα επτά τελευταία αμινοξέα (του καρβοξυτελικού άκρου) δεν ακολουθούν το πρότυπο της επτάδας και καταχρηστικά τοποθετούνται στον πίνακα. Η πλευρική ομάδα της Phe 56 υποκαθιστά την Arg 55. Η κάμψη συμβαίνει στην Ala31 και διακόπτει το πρότυπο της επτάδας. Όταν τα πέντε αμινοξέα που είναι σημειωμένα με έντονα τυπογραφικά απομακρύνθηκαν, ώστε να αποκατασταθεί η κανονικότητα της επανάληψης των επτά αμινοξέων, δημιουργήθηκε το τετραμερές της RM6.

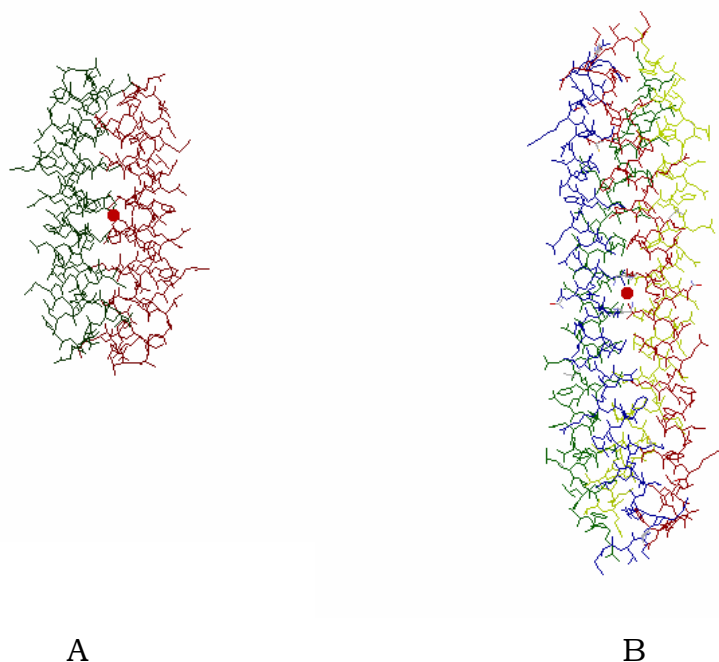


A



B

Εικόνα 4.1 Το τετραμερές της RM6 από δύο διαφορετικές γωνίες που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 90°. Φαίνονται οι τέσσερις α-έλικες με διαφορετικά χρώματα.



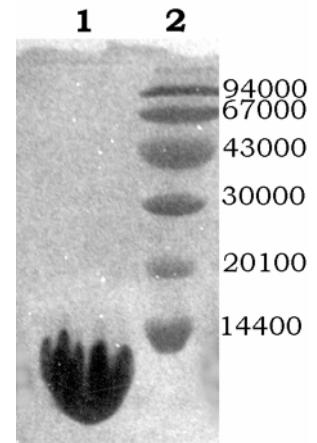
Εικόνα 4.2 A : Το διμερές της Rop. B : Το τετραμερές της RM6. Συγκριτική εικόνα ανάμεσα στην αρχική πρωτεΐνη και τη μετάλλαξη της. Το κόκκινο σημάδι παριστά τον διπλό άξονα συμμετρίας που στην εικόνα είναι κάθετος στο επίπεδο της σελίδας.

4.2 Η κρυστάλλωση της RM6

Το δείγμα της RM6 που χρησιμοποιήθηκε για τις κρυσταλλώσεις είχε απομονωθεί και καθαριστεί πριν τρία τουλάχιστον χρόνια. Για αυτό το χρονικό διάστημα φυλάχτηκε στους -20°C χωρίς να υποστεί πρωτεόλυση όπως διαπιστώθηκε με αποδιαταχτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης (εικόνα 4.3). Η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 30mg/ml .

Οι αρχικές συνθήκες κρυστάλλωσης προήλθαν από προηγούμενα πειράματα κρυστάλλωσης (Υ. Παπανικόλαου, 1995). Αναλυτικά οι συνθήκες κρυστάλλωσης αναφέρονται στον πίνακα II ενώ η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής πορεία : Αρχικά, δημιουργήθηκαν πυρήνες κρυστάλλωσης με τη μέθοδο της ολικής ανάμιξης (κεφ. 3, σελ. 32). Στη συνέχεια, ένας μικρός αριθμός αυτών των πυρήνων μεταφέρθηκε με την τεχνική της γραμμωτής ενπυρήνωσης ή εναλλακτικά με την τεχνική της μικροενπυρήνωσης σε σύστημα μικροδιαπίδυσης (κεφ. 3, σελ. 31, 32) και αφέθηκε να μεγαλώσει σε ορισμένα πειράματα στους 17°C και σε ορισμένα άλλα σε θερμοκρασία δωματίου ($\sim 23^{\circ}\text{C}$). Και από τις δύο θερμοκρασίες πήραμε καλοσχηματισμένους κρυστάλλους που για να φτάσουν στο τελικό τους μέγεθος δεν χρειάστηκαν περισσότερες από 4 ημέρες (εικόνα 4.4). Οι συνθήκες κρυστάλλωσης παρουσιάζονται στον πίνακα II.

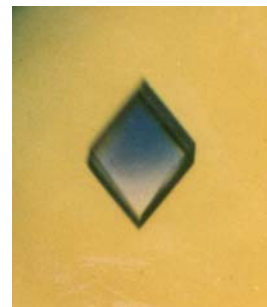
Εικόνα 4.3 Αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης. Σε αυτά τα πήκτωμα οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιαταγμένα μονομερή. **Λωρίδα 1:** Το μονομερές της RM6. Έχει μοριακό βάρος περίπου 7000. Δεν παρατηρούνται ίχνη διάσπασης ή συνάθροισης. **Λωρίδα 2:** Μάρτυρας (marker) μοριακών βαρών.



Πίνακας II : Συνθήκες κρυστάλλωσης

Μέθοδος κρυστάλλωσης	Διαλύματα	Αποτελέσματα
Ολική ανάμιξη	900 mM NaCl 45 % v/v MeOH 0.05 M Bis Tris 8 mg/ml πρωτεΐνη 0.001 M EDTA 0.1 % DTT	Πυρήνες κρυστάλλωσης
Μικροδιαπίδυση	Σταγόνα : 900 mM NaCl 30mg/ml πρωτεΐνη V = 25 μ l Δεξαμενή : 800 mM NaCl	Κρύσταλλοι με διαστάσεις 0.8mm x 0.8mm x 0.2mm

Εικόνα 4.4 Ένας τυπικός, πρισματικός κρύσταλλος της RM6. (Η εικόνα αναπαράχθηκε από τη διδακτορική διατριβή του Γ. Παπανικολάου, 1995).



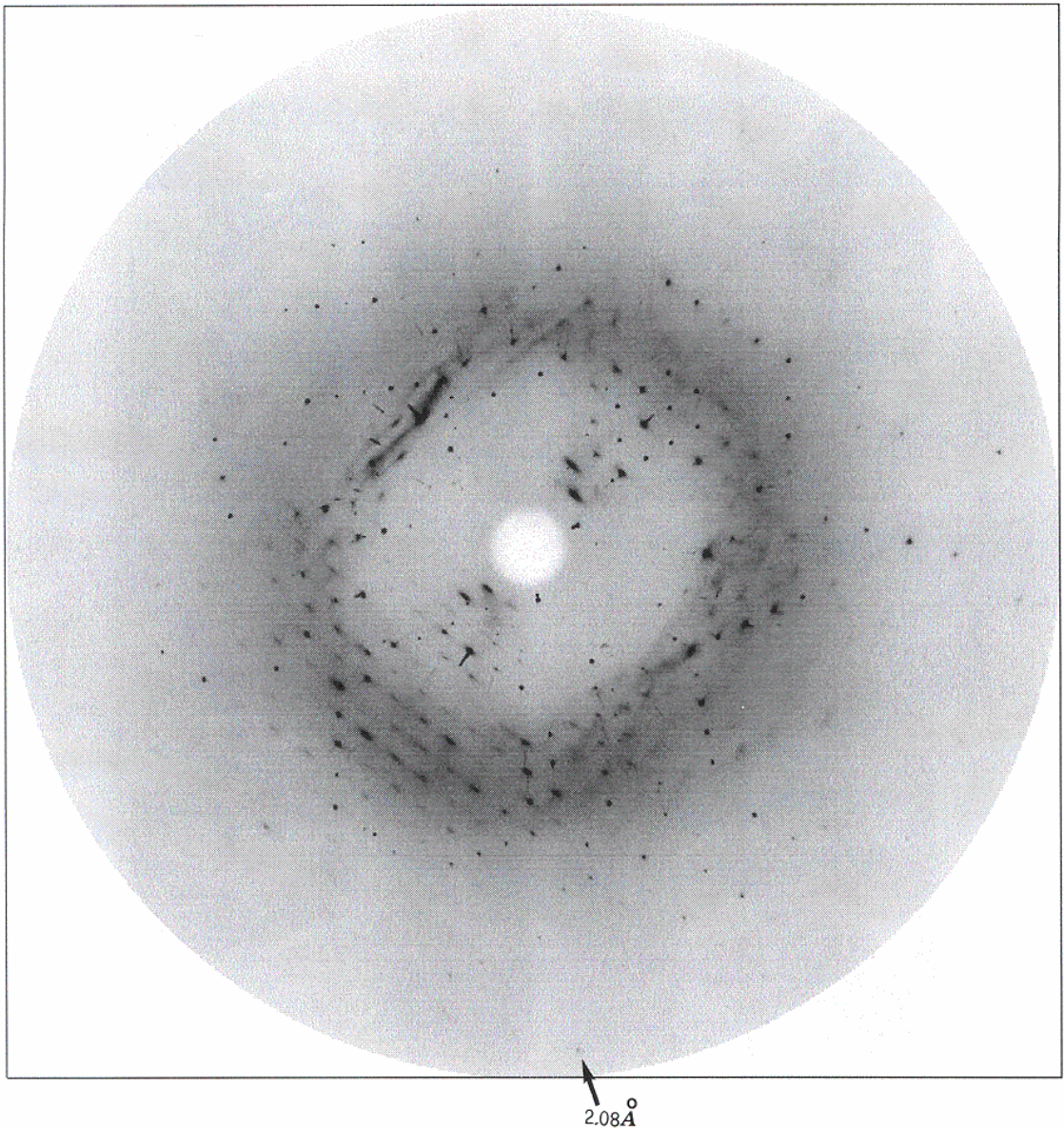
4.3 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης για τους κρυστάλλους της RM6.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα περίθλασης μετρήθηκαν σε γεννήτρια ακτίνων-X περιστρεφόμενης ανόδου τύπου Rigaku RU-H3R. Η ακτινοβολία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η $K\alpha$ γραμμή του χαλκού μονοχρωματισμένη και εστιασμένη μέσω ενός συστήματος δύο κυρτών καθρεπτών νικελίου. Οι μετρήσεις των δεδομένων έγιναν από ανιχνευτή δίσκου ειδώλου (image plate detector) της Mar Research με διάμετρο 300mm και είδωλο διαστάσεων 2000

x 2000 pixels (όπου κάθε pixel είναι 150 x 150 μm). Για τη συλλογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Mar Control που χορηγείται από την Mar Research. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα DENZO, εμπορική ονομασία HKL (Otwinowski Z. & Minor W., 1997). Ένα παράδειγμα των δεδομένων που συλλέχθηκαν δίνεται στην εικόνα 4.5.

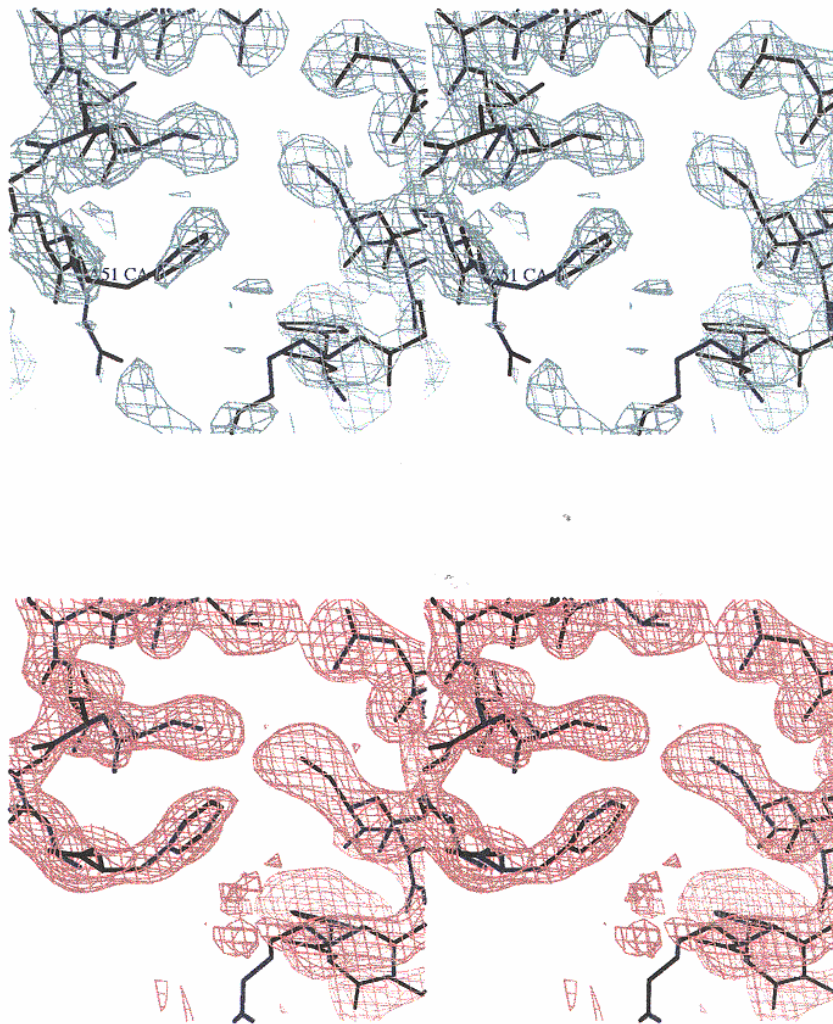
Οι κρύσταλλοι της RM6 ανήκουν στην ομάδα χώρου (space group) C2. Η στοιχειώδης κυψελίδα έχει διαστάσεις : $a=54.48\text{\AA}$, $b=42.57\text{\AA}$, $c=51.72\text{\AA}$, $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=104.68^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$. Η διακριτική ικανότητα των δεδομένων μας ήταν 2.02 \AA έναντι των 2.3 \AA των δεδομένων του Papanikolaou (1995).

Τα πειραματικά προσδιορισμένα πλάτη των παραγόντων δομής δόθηκαν στη Δρ. Μ. Βλάσση (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος) η οποία έχει αναλάβει τη βελτιστοποίηση (refinement) της δομής της RM6. Το μοντέλο που προέκυψε από την επεξεργασία αυτών των δεδομένων το χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια για να υπολογίσουμε χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας με τον τρόπο που αναφέρεται στο κεφάλαιο 3, σελ. 35. Στα διαγράμματα που ακολουθούν (εικόνες 4.6, 4.7, 4.8, 4.9) συγκρίνουμε τους νέους χάρτες με αντίστοιχους χάρτες που είχαν υπολογιστεί με τα χαμηλότερης διακριτικότητας δεδομένα, 2.3 \AA (σε όλους τους χάρτες που παρουσιάζονται δείχνονται ισοϋψείς σε επίπεδο ηλεκτρονικής πυκνότητας 1σ υψηλότερο από τη μέση ηλεκτρονική πυκνότητα, οι χάρτες υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα X-PLOR, Brunger, A.T., 1993). Η βελτίωση που επήλθε ειδικά σε ορισμένα σημεία του χάρτη είναι δραματική. Αυτό δείχνει τη σημασία της προσεκτικής ή πλήρους συλλογής δεδομένων σε όσο το δυνατό υψηλότερη διακριτικότητα.



Εικόνα 4.5 Διάγραμμα περίθλασης της πρωτεΐνης RM6. Η εικόνα αυτή προήλθε από έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες-X για 900sec με $\Delta\varphi=1^\circ$. Στην περιφέρεια του ειδώλου αντιστοιχούν δεδομένα σε διακριτικότητα 2.01Å ενώ ο συγκεκριμένος κρύσταλλος περιθλά μέχρι τα 2.08Å.

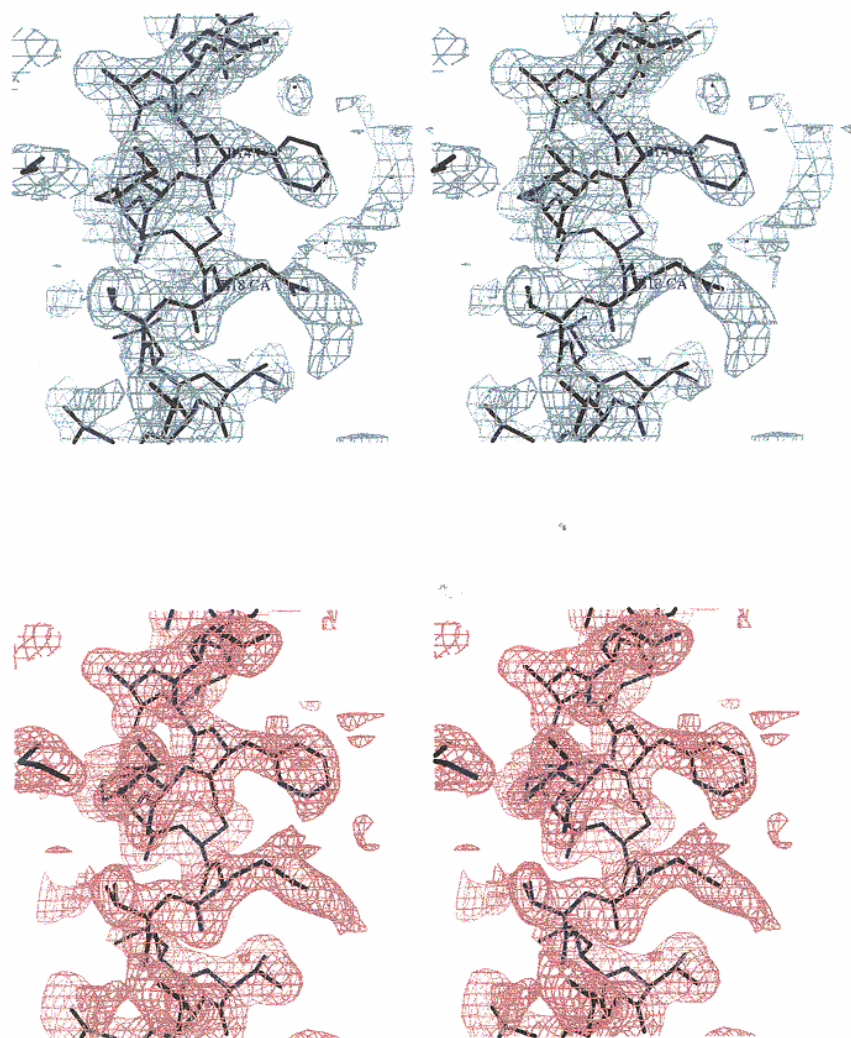
Το διάγραμμα αυτό δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Irdisp (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).



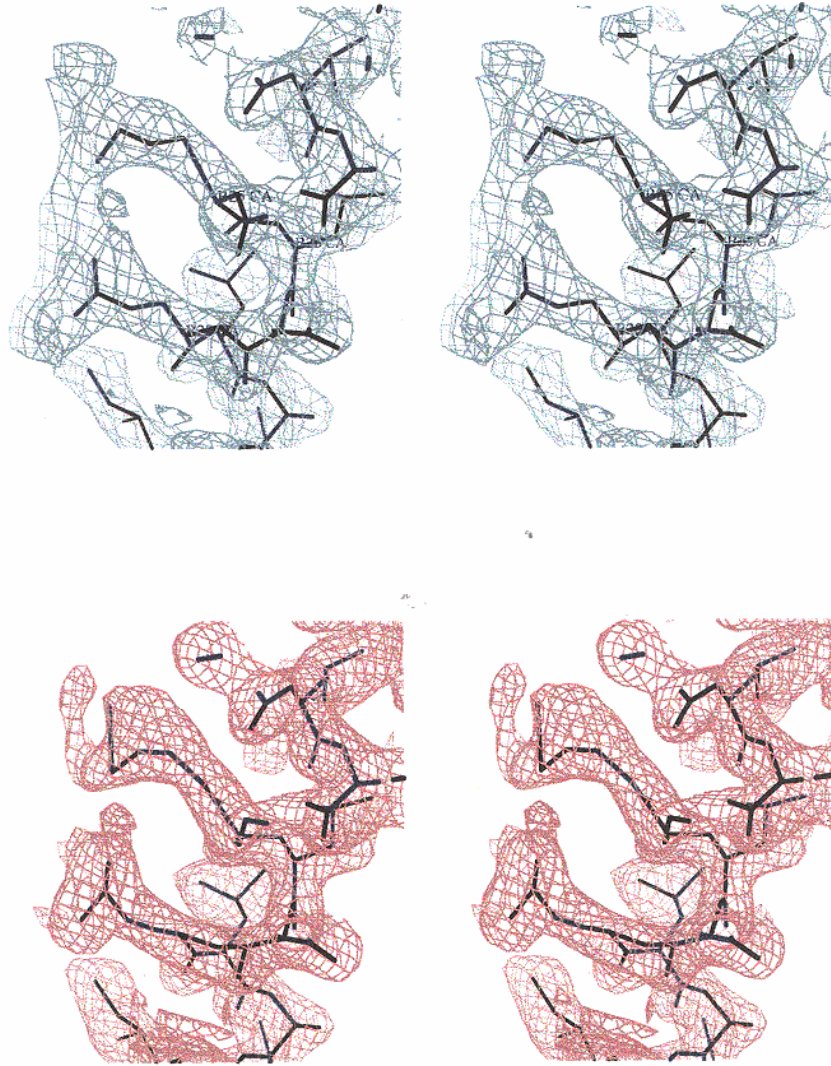
Εικόνα 4.6 : Σ' αυτήν και στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται στερεοδιαγράμματα που συγκρίνουν αντίστοιχα σημεία των χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας, που προέκυψαν από τα δεδομένα στα 2.3 Å (μπλε χρώμα) και στα 2.0 Å (κόκκινο χρώμα). Σε κάθε χάρτη έχει γίνει υπέρθεση του αντίστοιχου ατομικού μοντέλου.

Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η περιοχή γύρω από τη Phe 51 της RM6.

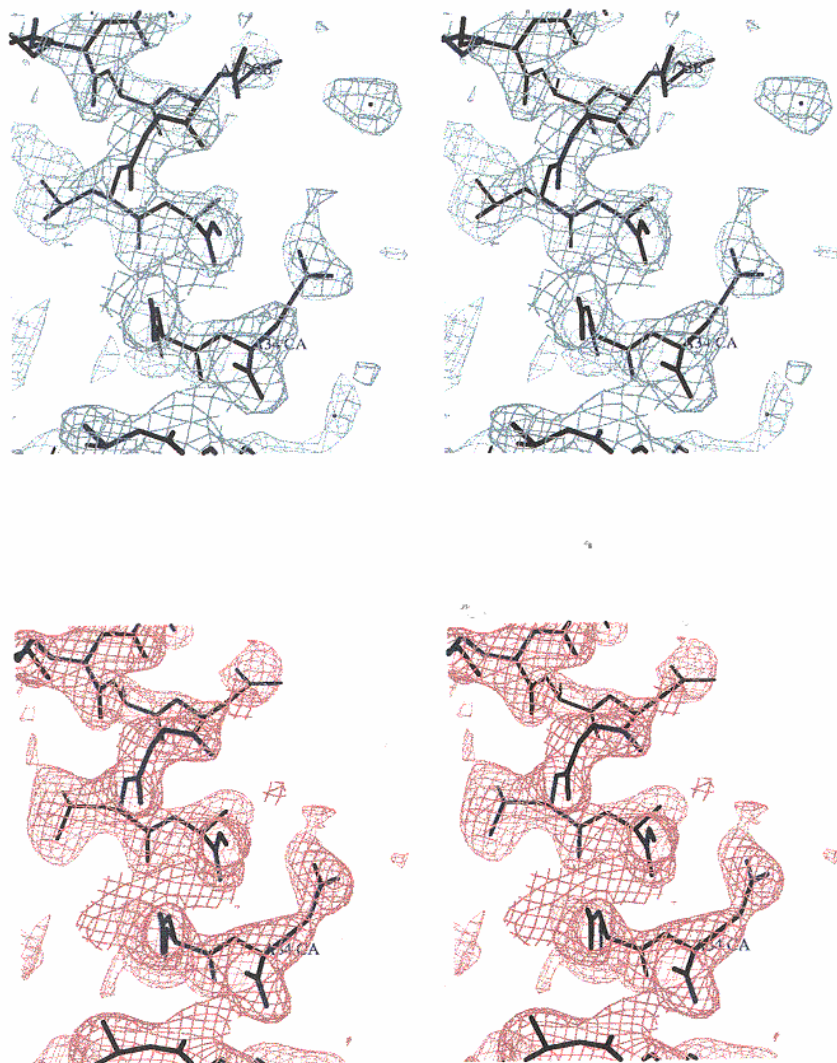
Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων O και Orplot (Jones, J. A. *et al.*, 1991).



Εικόνα 4.7 Στερεοδιάγραμμα του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας που παρουσιάζει την περιοχή γύρω από τη Phe 14. Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων O και Orplot (Jones, J. A. *et al.*, 1991).



Εικόνα 4.8 Στερεοδιάγραμμα του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας που παρουσιάζει την περιοχή γύρω από τη Lys 25. Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων O και Orplot (Jones, J. A. *et al.*, 1991).



Εικόνα 4.9 Στερεοδιάγραμμα του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας που παρουσιάζει την περιοχή γύρω από το Glu 34. Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων O και Orplot (Jones, J. A. *et al.*, 1991).

Κεφάλαιο 5

Η μετάλλαξη RM7 της Rop

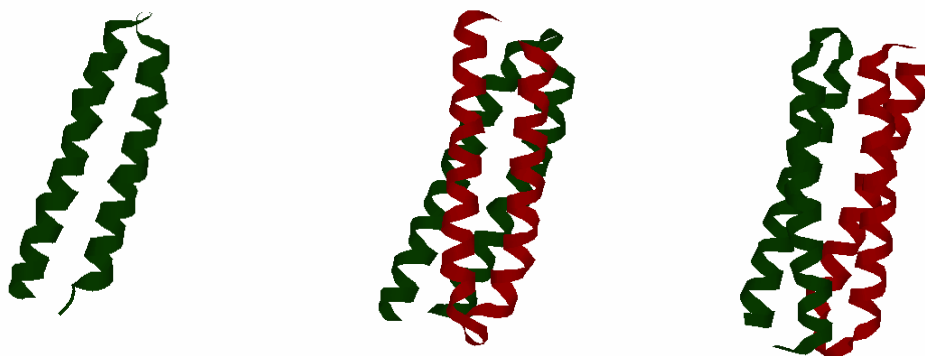
5.1 Εισαγωγή

Η RM7 (ή <2aa>) είναι μια μετάλλαξη της Rop που όμοια με την RM6 σχεδιάστηκε με σκοπό να ελεγχθεί αν ο σχηματισμός κάμψεων στις α-έλικες επάγεται από ασυνέχειες του προτύπου της επτάδας. Στη μετάλλαξη αυτή η ασυνέχεια του προτύπου της επτάδας που παρατηρείται στην περιοχή του βρόχου της wtRop αποκαταστάθηκε με ένθεση δύο καταλοίπων, μιας Ala μεταξύ της Leu29 και της Asp30 και επίσης μιας Ala μεταξύ της Asp30 και της Ala31 (πίνακας I).

Πίνακας I : Η αμινοξική αλληλουχία της RM7 κατανεμημένη σε επτάδες

	f	g	a	b	c	d	e
1	(Met	Thr)					
3	Lys	Gln	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu
10	Asn	Met	Ala	Arg	Phe	Ile	Arg
17	Ser	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu
24	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Leu	Ala
31	Asp	Ala	Ala	Asp	Glu	Gln	Ala
36	Asp	Ile	Cys	Glu	Ser	Leu	His
43	Asp	His	Ala	Asp	Glu	Leu	Tyr
50	Arg	Ser	Cys	Leu	Ala	Arg	Phe
57	(Gly	Asp	Asp	Gly	Glu	Asn	Leu)

Με έντονα τυπογραφικά στοιχεία σημειώνονται τα αμινοξέα που προστέθηκαν στην αμινοξική αλληλουχία της wtRop.



Με έντονα τυπογραφικά στοιχεία σημειώνονται τα αμινοξέα που προστέθηκαν στην αμινοξική αλληλουχία της wtRop.

Αντίθετα με τις μεγάλες δομικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην RM6 και παρά τις εικασίες για ανάλογη συμπεριφορά η RM7 είναι ένα διμερές που διαφέρει ελάχιστα από τη wtRop (Vlassi *et al*, 1994, εικόνα 5.1).

A

B

Γ

Εικόνα 5.1 Το μόριο της RM7. A: Το μονομερές. B,Γ: Το διμερές από δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες που διαφέρουν κατά 90°. Μπορεί να γίνει σύγκριση με την εικόνα 1.3 του μορίου της wtRop.

Έτσι όμοια με τη wtRop, η RM7 σχηματίζει ένα κανονικό αριστερόστροφο, αντιπαράλληλο 4-α-ελικοειδές δεμάτι, με έλικες που διασταυρώνονται υπό μια γωνία περίπου 20° (Vlassi *et al*, 1994).

Η RM7 είναι μια πρωτεΐνη που κρυσταλλώνει δίνοντας μεγάλους και καλοσχηματισμένους κρυστάλλους, που περιθλούν ισχυρά τις ακτίνες-X και παρέχουν δεδομένα περίθλασης σε υψηλή διακριτικότητα (είναι χαρακτηριστικό ότι η δομή της προσδιορίστηκε αρχικά στα 1.4Å, Vlassi *et al*, 1994 και αργότερα στα 1.07Å, paper in press). Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν ιδανικό υποψήφιο για μελέτες σε ακόμη υψηλότερη διακριτικότητα. Έτσι, αφού την παρήγαμε (από κύτταρα *E.coli* της σειράς <2aa>, που την υπερεκφράζουν) και την καθαρίσαμε, επιχειρήσαμε να βελτιστοποιήσουμε τις συνθήκες κρυστάλλωσης ώστε να παράγουμε ακόμα μεγαλύτερους κρυστάλλους, που να περιθλούν σε διακριτικότητες καλύτερες του 1Å.

5.2 Ο καθαρισμός της RM7

Η RM7 είναι μια πρωτεΐνη που υπερεκφράζεται από κύτταρα *E.coli* της κυτταρικής σειράς <2aa>. Επώαση 20l κυτταρικής καλλιέργειας στις κατάλληλες συνθήκες¹ (fermentation) απέδωσε 60gr κυτταρικής πάστας.

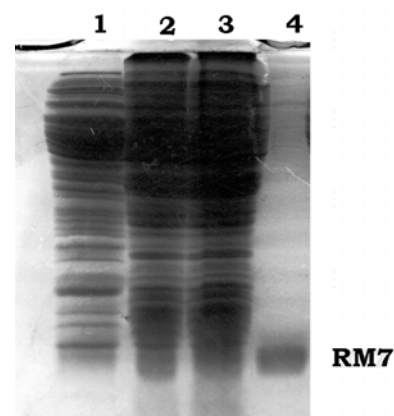
Ως πρωτόκολλο αναφοράς για τον καθαρισμό της RM7 χρησιμοποιήθηκε το βελτιωμένο σχήμα απομόνωσης των μεταλλαγών της Rop που περιγράφεται από τον Υ. Παπανικολαου (1995). Αν και η μέθοδος δεν σχεδιάστηκε με βάση τις ιδιαίτερες απαιτήσεις της RM7 με λίγες τροποποιήσεις απέδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Αρχικά η βακτηριακή πάστα ομογενοποιήθηκε με διάλυμα που περιείχε μεγάλη συγκέντρωση άλατος² σε τελικό όγκο διπλάσιο της αρχικής της μάζας. Η διάρρηξη των κυττάρων απαιτήσε 600 μg λυσοζύμης για κάθε ml ομογενοποιημένου διαλύματος, ποσότητα που είναι διπλάσια από αυτή που χρησιμοποιείται συνήθως για τη λύση κυττάρων *E.coli* (εικόνα 5.3 και εικόνα 5.4, λωρίδες 1, 2). Ακολούθησε φυγοκέντρηση (για μία ώρα στα 14000g) για το διαχωρισμό των κυτταρικών θραυσμάτων (ίζημα) από το κυρίως πρωτεϊνικό διάλυμα (υπερκείμενο).

Εικόνα 5.3 Πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

1: Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης από τη λύση των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιώντας 300μg λυσοζύμης για κάθε ml ομογενοποιημένου διαλύματος.

2,3 : Το ίζημα της ίδιας φυγοκέντρησης μετά από θερμική κατεργασία, σε διαφορετικές αραιώσεις. **4 :** Μάρτυρας RM7. Συγκρίνοντας τη λωρίδα 1 με τις 2, 3 γίνεται φανερό ότι μεγάλο μέρος του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων έχει μείνει στο ίζημα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα της ανεπαρκούς λύσης των κυττάρων.



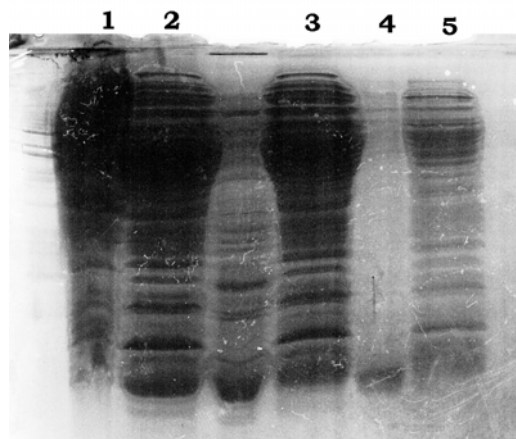
Το υπερκείμενο μετά από ρύθμιση του pH του στο 8.5, φορτώθηκε σε ανιοανταλλάκτη (κεφ. 3, σελ. 27) Q Sepharose, fast flow (Pharmacia).

¹ Η καλλιέργεια αφήνεται να μεγαλώσει στους 30°C μέχρι OD₆₀₀ = 0.5. Ακολουθεί απότομη αύξηση της θερμοκρασίας στους 42°C και παραμονή σε αυτές τις συνθήκες για 3 ώρες.

² Διάλυμα ομογενοποίησης : 50mM Tris pH 7.5, 1mM DTT, 1mM EDTA, 200mM NaCl, 5% γλυκερόλη και 1mM PMSF. Σε όλα τα στάδια της πρωτεϊνικής απομόνωσης που περιγράφονται στη συνέχεια (συμπεριλαμβανομένης της ομογενοποίησης) η θερμοκρασία δεν ξεπέρασε τους 4°C.

Ακολούθησαν εκπλύσεις του χρωματογραφικού υποστρώματος με διαλύματα Tris pH 8.5, 7.5 (πίνακας II). Η RM7 και στις δύο αυτές τιμές pH έχει αρνητικό συνολικό φορτίο και αναμενόταν ότι θα παρέμενε δεσμευμένη στον ανιοανταλλάκτη. Εντούτοις, μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης του δείγματος δεν κατακρατήθηκε στη στήλη αλλά εκλούσθηκε κατά το φόρτωμα και την έκπλυση (εικόνα 5.4 λωρίδες 3,4,5).

Εικόνα 5.4 1: Το ίζημα της φυγοκέντρησης από τη λύση κυττάρων χρησιμοποιώντας 600μg λυσοζύμης για κάθε ml ομογενοποιημένου διαλύματος. **2** : Το υπερκείμενο της ίδιας φυγοκέντρησης. **3** : Το διάλυμα που εκλούεται από τη Q καθώς φορτώνεται το προς διαχωρισμό δείγμα. **4** : Μάρτυρας RM7. **5** : το διάλυμα που εκλούεται από τη Q κατά τη διάρκεια της έκπλυσης με διάλυμα Tris. Συγκρίνοντας τις λωρίδες 1,2,4 φαίνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της RM7 βρίσκεται στο υπερκείμενο. Από τη σύγκριση των 3,4,5 συμπεραίνεται ότι η RM7 δεν συγκρατείται στη στήλη.

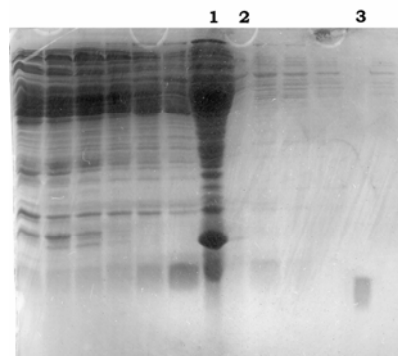


Αυτή η συμπεριφορά αποδόθηκε στην υψηλή συγκέντρωση άλατος (περίπου 200 mM NaCl) με την οποία φορτώθηκε το δείγμα στη στήλη. Το αλάτι συνόδευε το πρωτεϊνικό διάλυμα από τη διαδικασία ομογενοποίησης της βακτηριακής πάστας. Μετά την ανάκτηση της πρωτεΐνης που δεσμεύτηκε στην κολώνα και τη συνένωσή της με τα διαλύματα των εκπλύσεων, το πρωτεϊνικό διάλυμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης¹. Στη συνέχεια φορτώθηκε και πάλι στην ανιοανταλλακτική στήλη από την οποία και δεσμεύτηκε αυτή τη φορά. Ακολούθησαν εκπλύσεις της στήλης με διαλύματα Tris όπως και προηγουμένως και εφαρμογή διαβάθμισης συγκέντρωσης NaCl (εικόνα 5.5).

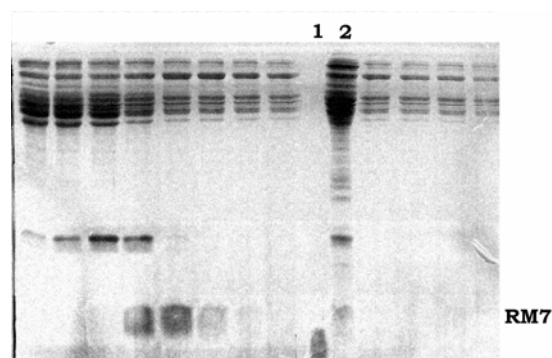
Τα κλάσματα που περιείχαν την RM7 ενώθηκαν και το δείγμα φορτώθηκε ως είχε σε στήλη υδροξυλαπατίτη (κεφ.3, σελ. 28) που είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα Tris pH 7.5. Ακολούθησαν εκπλύσεις της στήλης και εφαρμογή κλίσης συγκέντρωσης φωσφορικών (εικόνα 5.6, πίνακας II).

¹ Το προς εξισορρόπηση διάλυμα ήταν 25mM Tris pH 8.5.

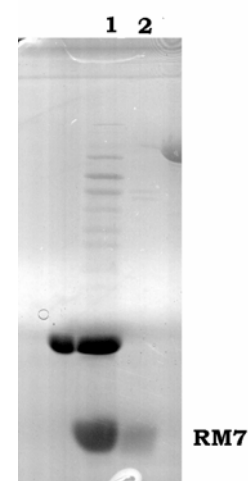
Εικόνα 5.5 1: Το δείγμα που φορτώθηκε στη Q (απαλλαγμένο από το αλάτι). **2 :** Το διάλυμα που εκλούσθηκε απο τη στήλη κατά την έκπτυση. **3:** Μοριακός μάρτυρας RM6 (Το μονομερές της RM7 τρέχει λίγο πιο αργά από αυτό της RM6). Οι υπόλοιπες λωρίδες δείχνουν τα κλάσματα που περιείχαν την RM7 .



Εικόνα 5.6 1: Μοριακός μάρτυρας RM6. **2 :** Το δείγμα που φορτώθηκε στον υδροξυλαπατίτη. Οι υπόλοιπες λωρίδες δείχνουν κλάσματα από την εφαρμογή της διαβάθμισης φωσφορικών.



Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν μέχρι τελικού όγκου 3ml. Στη συνέχεια το δείγμα φορτώθηκε σε κολώνα μοριακής διήθησης (gel filtration, Sephacryl S-100 Pharmacia, κεφ.3, σελ.29, πίνακας II) .Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν μέχρι τα 600μl. Το δείγμα συνοδεύεται από άγνωστη, ανεπιθύμητη πρωτεΐνη (εικόνα 5.7 λωρίδα 1). Η συγκέντρωση υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford (κεφ.3, σελ.30) και βρέθηκε να είναι 13mg/ml. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με άλλα 60gr βακτηριακής πάστας και απέδωσε 400μl πρωτεϊνικού διαλύματος (εικόνα 5.7 λωρίδα 2) συγκέντρωσης 4mg/ml (Bradford).



Εικόνα 5.7. Πήκτωμα στο οποίο συγκρίνονται τα δείγματα που προέκυψαν από τους δύο καθαρισμούς. **1:** 2μl δείγματος από τον πρώτο καθαρισμό. Μεγάλη ποσότητα ανεπιθύμητης πρωτεΐνης φαίνεται να συνοδεύει την RM7. **2:** 2μl δείγματος από το δεύτερο καθαρισμό. Το δείγμα είναι λιγότερο και καθαρότερο συγκριτικά με το προηνούμενο.

Πίνακας II : Χρωματογραφικά υλικά. Διαλύματα εξισορρόπησης και εκπλύσεων. Διαβαθμίσεις συγκέντρωσης άλατος .

	Χρωματογραφικά Υλικά. Γενικά Χαρακτηριστικά	Διαλύματα εξισορρόπησης και εκπλύσεων χρωματογραφικών στήλων. Κλίσεις συγκέντρωσης άλατος για έκλυση της RM7
Ανιοανταλλάκτης	Q Sepharose Fast Flow : είναι ένας ισχυρός ανιοανταλλάκτης με εξαιρετικά χαρακτηριστικά ροής και υψηλή χωρητικότητα για πρωτεΐνες με pI σε όλες τις τιμές. Η ιονοφόρος ομάδα είναι μια τεταρτοταγής αμίνη που παραμένει φορτισμένη διατηρώντας υψηλή χωρητικότητα σε εύρος pH 2-12.	V=80ml, U=450ml/h Διαλυμα Εξισορρόπησης : 25mM Tris, pH 8.5 Διάλυμα 1ης έκπλυσης : 25mM Tris, pH 8.5 Διάλυμα 2ης έκπλυσης : 20mM Tris, pH 7.5 Κλίση άλατος : 0 – 600 mM NaCl
Υδροξυλαπατίτης	Υδροξυλαπατίτης (Hydroxyapatite, HA): Πρόκειται για μια κρυσταλλική μορφή φωσφορικού ασβεστίου που χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευαστική βιοχημεία. Έχει υψηλή χωρητικότητα και παρουσιάζει αμελητέα μη ειδική προσρόφηση υδρόφοβων και μικρομοριακών υποστρωμάτων. Είναι θερμικά σταθερός και χρησιμοποιείται σε pH>5.5.	V=70ml, U=400ml/h Διάλυμα Εξισορρόπησης : 20mM Tris, pH 7.5 Διάλυμα 1ης έκπλυσης: 20mM Tris, pH 7.5 Διάλυμα 2ης έκπλυσης : 10mM διάλυμα φωσφορικών pH 6.8 Κλίση άλατος : 10 – 300 mM διαλ/τος φωσφορικών, pH 6.8
Μοριακή Διήθηση	Sephacryl S-100 : είναι ένα συμπολυμερές δεξτράνης- διακρυλαμιδης που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών με εύρος μοριακών βαρών 1000-100000 Da. Είναι σταθερό στη θερμοκρασία καθώς και σε ελαφρώς όξινα και αλκαλικά διαλύματα και στους κοινούς οργανικούς διαλύτες. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη περιοχή pH 3-11 χωρίς να αλλοιωθούν οι διαχωριστικές του ικανότητες.	V =300ml, U=80ml/h Το διάλυμα εξισορρόπησης είναι ίδιο με το διάλυμα έκλυσης των πρωτεϊνών : 2mM Tris,pH 7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT.

V : Ο όγκος της χρωματογραφικής στήλης που χρησιμοποιήθηκε

U: Η ταχύτητα ροής .

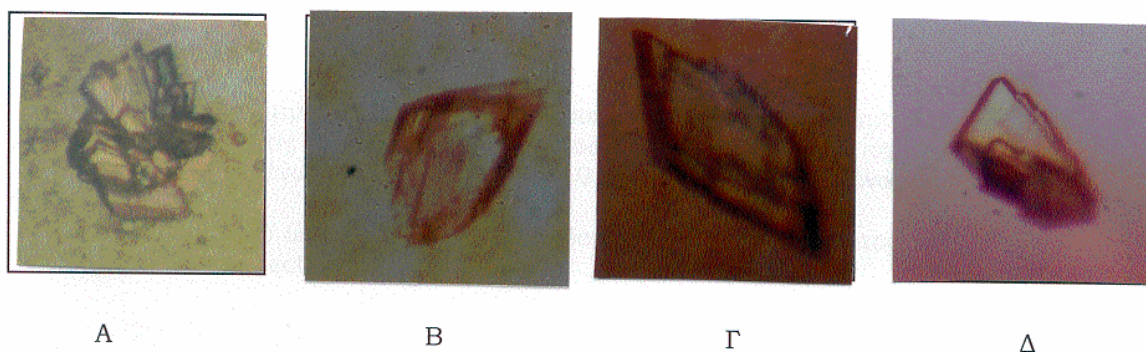
5.3 Η κρυστάλλωση της RM7

Για την κρυστάλλωση της RM7 εφαρμόστηκε η μέθοδος της διάχυσης ατμών (σε Linbro boxes, κεφ.3, σελ.32). Κρεμαστές σταγόνες όγκου 4μl (1:1, πρωτεϊνικό διάλυμα : διάλυμα κατακρήμνισης) τοποθετήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες με υδρόφοβη επιφάνεια, πάνω από 1ml του διαλύματος κατακρήμνισης σε θερμοκρασία 17°C (πίνακας III).

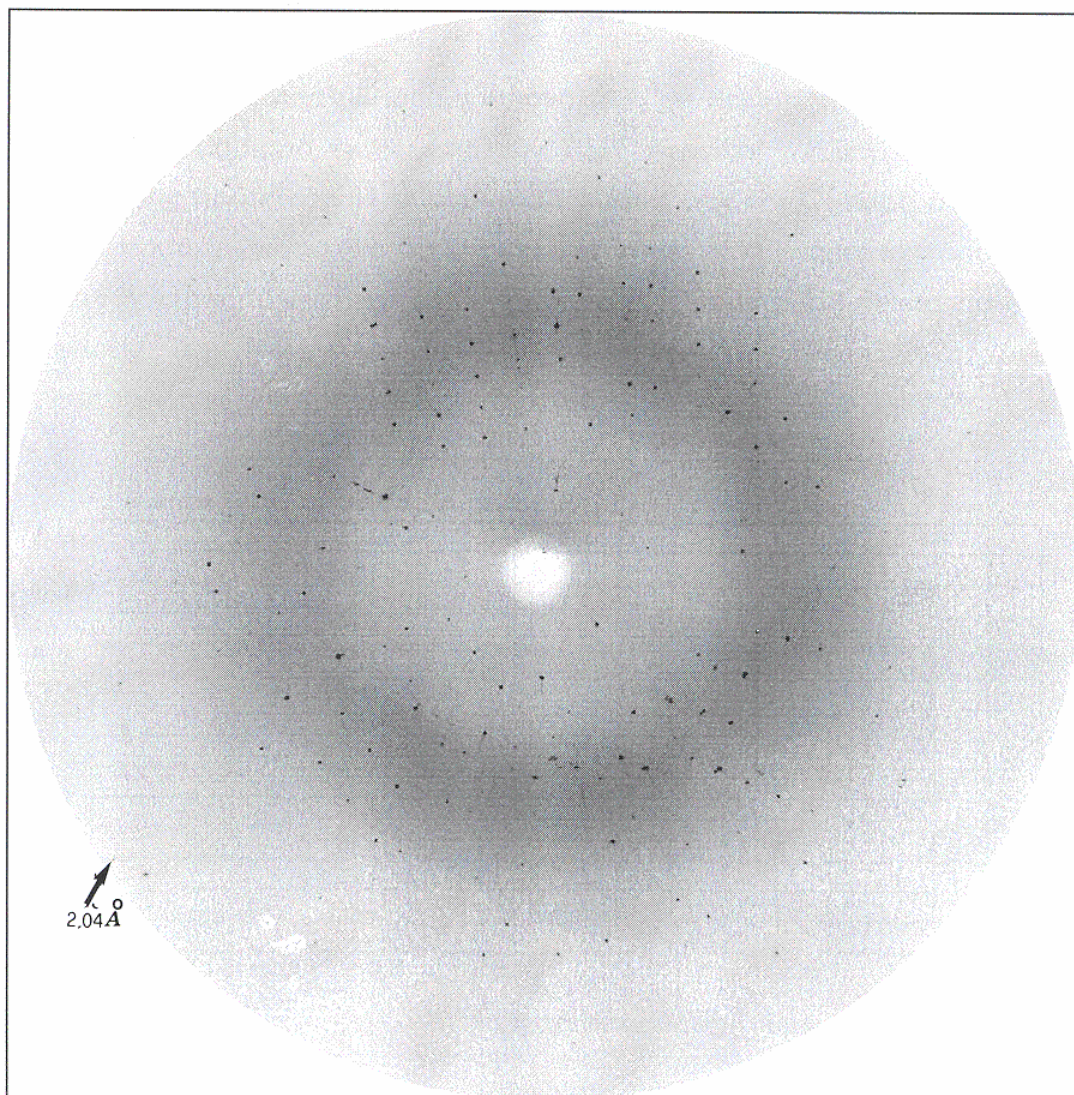
Πίνακας III. Συνθήκες κρυστάλλωσης

Μέθοδος κρυστάλλωσης	: Διάχυση ατμών / κρεμαστή σταγόνα
Περιεχόμενο κρεμαστής σταγόνας	: 7.5mg/ml πρωτεΐνη 100mM ρυθμ. διάλυμα οξικών (pH 4.7-5.0) 0.7-1.0M θειϊκό αμμώνιο
Περιεχόμενο διαλ/τος κατακρήμνισης	: 200mM ρυθμ. διάλυμα οξικών (pH 4.7-5.0) 1.4-2.0M θειϊκό αμμώνιο

Από τα δύο διαθέσιμα πρωτεϊνικά δείγματα, κρυστάλλους απέδωσε μόνο αυτό με πρωτεϊνική συγκέντρωση 13mg/ml. Οι κρύσταλλοι που εμφανίστηκαν περίπου σε μια εβδομάδα ήταν εξωτερικά κακοσχηματισμένοι (εικόνα 5.8) και δεν περιθλούσαν ικανοποιητικά τις ακτίνες-X ώστε να είναι κατάλληλοι για συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων (εικόνα 5.9). Παρ' όλα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πυρήνες κρυστάλλωσης σε μελλοντικά πειράματα μακροενπυρήνωσης.



Εικόνα 5.8 Κρύσταλλοι της RM7. Α: Πολυκρυσταλλικό σύμπλεγμα. Β, Γ: Κρύσταλλοι που φαίνεται να σχηματίζονται από αλληπάλληλες στρώσεις φυλλιδίων. Δ: Κακοσχηματισμένος κρύσταλλος.

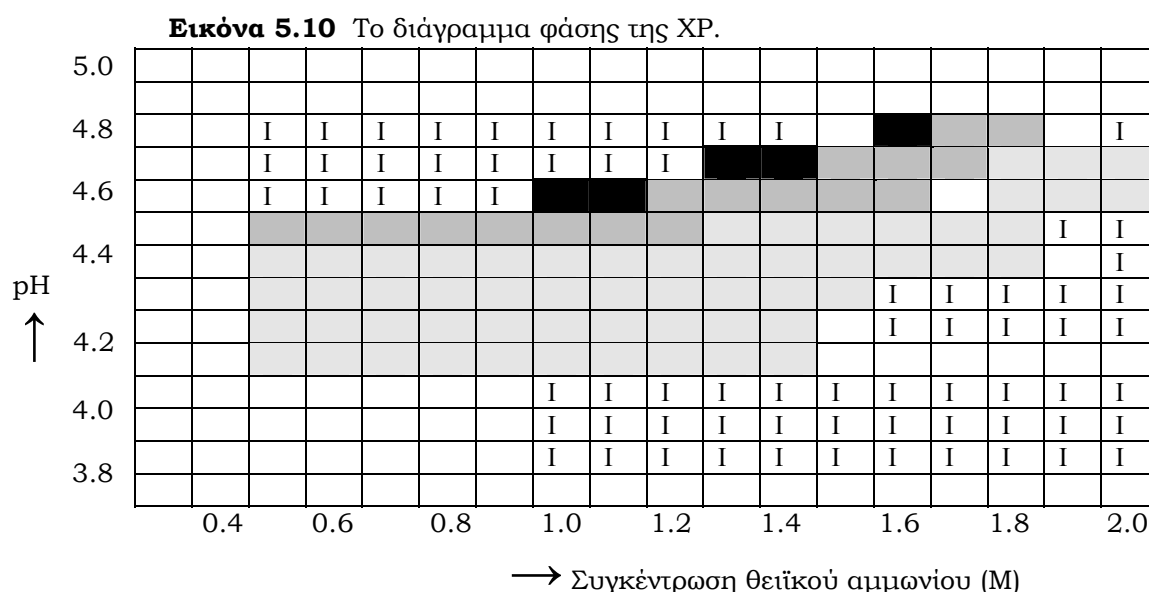


Εικόνα 5.9 Διάγραμμα περίθλασης της πρωτεΐνης RM7. Η εικόνα αυτή προήλθε από έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες-X για 1200sec με $\Delta\phi=1^\circ$. Στην περιφέρεια του ειδώλου αντιστοιχούν δεδομένα σε διακριτικότητα 2.01Å ενώ ο συγκεκριμένος κρύσταλλος περιθλά μέχρι τα 2.04Å.

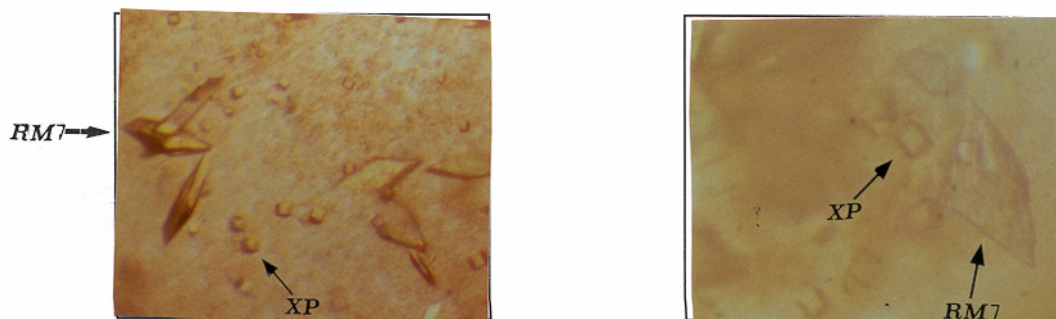
Το διάγραμμα αυτό δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Irdisp (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

5.4 Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης XP.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 5.7, το δείγμα που προέκυψε από τον πρώτο καθαρισμό εκτός από την RM7 περιείχε σημαντική ποσότητα μιας δεύτερης πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή (που μας είναι ακόμη άγνωστη και την αναφέρουμε προσωρινά ως XP) κρυσταλλώνει σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που δοκιμάσαμε για την RM7. Παρακάτω (εικόνα 5.10) δίνεται το διάγραμμα φάσης της (pH συναρτήσει της συγκέντρωσης θειϊκού αμμωνίου) και φωτογραφίες των κρυστάλλων της (εικόνα 5.11).

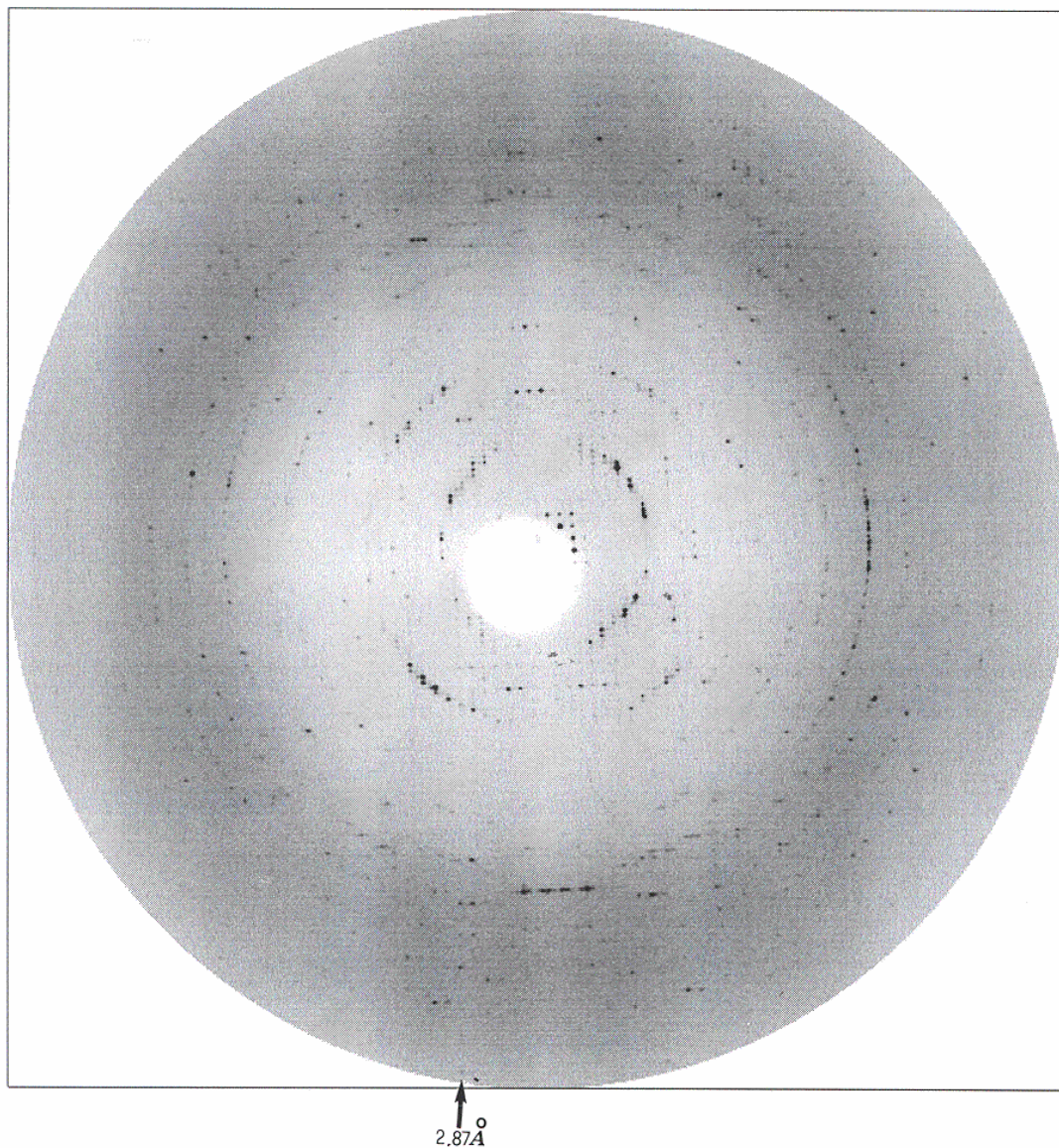


Με τις δυο αποχρώσεις του γκρι σημειώνεται η περιοχή που πήραμε κρυστάλλους. Στην περιοχή που χρωματίζεται με σκούρο γκρι πήραμε σχετικά μεγάλους κρυστάλλους (μεγαλύτερους από $0.05 \times 0.05 \times 0.05$ mm, με μαύρο σημειώνονται οι συνθήκες που έδωσαν τους καλύτερους κρυστάλλους), ενώ στην περιοχή που χρωματίζεται με το ανοικτό γκρι πήραμε μικρότερους κρυστάλλους. Με "I" σημειώνονται οι συνθήκες στις οποίες πήραμε άμορφο ίζημα, ενώ τα κενά δηλώνουν συνθήκες που δεν εξετάσαμε.



Εικόνα 5.11 Φωτογραφίες των κρυστάλλων της XP μαζί με κρυστάλλους της RM7. Οι κρύσταλλοι της XP έχουν διαφορετική γεωμετρία (είναι μικροί και κυβικοί) από τους κρυστάλλους της RM7 και είναι εύκολη η οπτική τους διάκριση.

Οι κρύσταλλοι της ΧΡ περιθλούν ικανοποιητικά τις ακτίνες-Χ, όπως φαίνεται από το διάγραμμα περίθλασης της παρακάτω εικόνας (εικόνα 5.12).



Εικόνα 5.12 Διάγραμμα περίθλασης της πρωτεΐνης ΧΡ. Η εικόνα αυτή προήλθε από έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες-Χ για 1200sec με $\Delta\varphi=0.5^\circ$. Στην περιφέρεια του ειδώλου αντιστοιχούν δεδομένα σε διακριτικότητα 2.85\AA ενώ ο συγκεκριμένος κρύσταλλος περιθλά μέχρι τα 2.88\AA .

Το διάγραμμα αυτό δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Irdisp (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη XP, δηλαδή να προσδιοριστεί το ακριβές μοριακό της βάρος, με φασματοσκοπία μάζας (mass spectroscopy) και να βρεθεί η αμινοξική αλληλουχία του N-τελικού της άκρου στάλθηκε δείγμα της στην εταιρεία M-Scan Ltd (England). Δυστυχώς, παρότι ο προσδιορισμός του μοριακού της βάρους ήταν επιτυχής (MB=18482), η εύρεση της N-τελικής αλληλουχίας δεν στάθηκε δυνατή, πιθανώς γιατί είναι δεσμευμένο το προς προσδιορισμό άκρο της. Απόπειρες να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη μέσω πειραμάτων περιορισμένης πρωτεόλυσης και φασματοσκοπίας μάζας βρίσκονται σε εξέλιξη.

Κεφάλαιο 6

Συζήτηση

Το 4-α-ελικοειδές δεμάτι είναι ένα δομικό μοτίβο που συναντάται συχνά σε πρωτεΐνες με ιατρικό ενδιαφέρον όπως στους αυξητικούς παράγοντες, στις απολιποπρωτεΐνες και στις ιντερλευκίνες. Παράλληλα είναι ένα από τα πιο απλά δομικά μοτίβα. Για τους λόγους αυτούς έχει χρησιμοποιηθεί επισταμένα με σκοπό τόσο την κατανόηση της πρωτεϊνικής δομής όσο και τον σχεδιασμό νέων πρωτεϊνών (Munson *et al.*, 1994). Συγκεκριμένα η δομή του 4-α-ελικοειδούς δεματιού έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη μελέτη του ρόλου των αμινοξέων του υδρόφοβου πυρήνα και του βρόχου στη δομή, τη σταθερότητα και την πρωτεϊνική αναδίπλωση. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τέτοιες μελέτες χρησιμοποιούνται συχνά για να εξηγήσουν δομικές επιλογές που παρατηρούνται στο σύνολο των πρωτεϊνών.

Αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό όλων των σφαιρικών πρωτεϊνών η τάση να κρύβουν στο εσωτερικό τους, μακριά από το διαλύτη, τα υδρόφοβα αμινοξέα τους. Το γεγονός αυτό εκτός του ότι συνεισφέρει σημαντικά στη σταθεροποίηση της αναδιπλωμένης δομής (σε σχέση με την αποδιαταγμένη) φαίνεται επιπλέον να παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στο τελικό σχήμα της πρωτεΐνης. Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα η πρωτεΐνη Rop, που είναι ένα χαρακτηριστικό 4-α-ελικοειδές δεμάτι και οι μεταλλάξεις της. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, που περιλάμβαναν κυρίως σημειακές και συνδυασμένες αλλαγές αμινοξέων στον

υδρόφοβο πυρήνα της Rop (Munson *et al.*, 1996) καθώς και κρυσταλλογραφικές, θερμοδυναμικές και κινητικές μελέτες των παραγόμενων μεταλλάξεων οδηγούν σχεδόν χωρίς εξαίρεση στο συμπέρασμα ότι το πακετάρισμα των πλευρικών ομάδων στο εσωτερικό της δομής και οι εκτεταμένες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις τους αναλαμβάνουν τον κυρίαρχο ρόλο στην αναδίπλωση και τη σταθερότητα του μοτίβου.

Αν και ο ρόλος του υδρόφοβου πυρήνα είναι γενικά παραδεκτός αντίστοιχα πειράματα για το βρόχο δεν φαίνεται να δίνουν μονοσήμαντα αποτελέσματα. Οι βρόχοι, που είναι οι περιοχές όπου η πολυπεπτιδική αλυσίδα αλλάζει διεύθυνση, βρίσκονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών και συχνά έχουν μεγάλη λειτουργική σημασία. Οι αμινοξικές αλληλουχίες που συνειστούν αυτή τη περιοχή δείχνουν ελάχιστη εξελικτική διατήρηση, τουλάχιστον όταν δεν παρουσιάζουν λειτουργική σημασία. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι έχουν μάλλον ένα παθητικό ρόλο στο σχηματισμό και τη διατήρηση της δομής. Η ίδια άποψη υποστηρίζεται από πολυάριθμες κατευθυνόμενες μεταλλάξεις στην περιοχή του βρόχου του κυτοχρώματος b-562 (που είναι ένα 4-α-ελικοειδές δεμάτι, Brunet *et al.*, 1993, Kamtekar & Hecht, 1995) και κυρίως της Rop (Castagnoli *et al.*, 1994). Αν και μικρότερες αλλαγές στην περιοχή του βρόχου είναι πιθανές η συνολική δευτεροταγής και τριτοταγής δομή του δεματιού δεν παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στις αρχικές πρωτεΐνες και τις μεταλλάξεις τους. Πάντως, πειράματα που έγιναν με μοντέλο τη Rop και σκοπό τη διερεύνηση της σπουδαιότητας του μήκους των βρόχων έδειξαν αυτό ενώ δεν είναι κρίσιμης σημασίας για τη τελική αναδίπλωση δεν πρέπει να ξεπερνά ορισμένα όρια (Predki & Regan, 1995, Nagi & Regan, 1997). Έτσι, όταν το μήκος του βρόχου αυξάνει πολύ η σταθερότητα της πρωτεΐνης ελαττώνεται ενώ όταν κονταίνει ο βρόχος εμποδίζεται ο σωστός συσχετισμός των ελίκων και η πρωτεΐνη υιοθετεί ένα εναλλακτικό σχήμα αναδίπλωσης. Σε αντίθεση με την άποψη του παθητικού ρόλου των βρόχων έρχονται ορισμένα πειράματα που δείχνουν πως η περιοχή αυτή αναλαμβάνει μάλλον σημαντικό ρόλο για την επίτευξη της σταθερότητας της τελικής δομής. Ένα πρόσφατο παράδειγμα προέρχεται από τον προσδιορισμό της δομής της Rop μετάλλαξης A31P με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (paper in preparation). Η μετάλλαξη αυτή, που προήλθε από την αντικατάσταση ενός καταλοίπου Ala από ένα κατάλοιπο Pro στη θέση 31 του βρόχου της wtRop. Η πρωτεΐνη που

προκύπτει εξακολουθεί να είναι ένα 4-α-ελικοειδές δεμάτι αλλά αλλάζει ριζικά όχι μόνο ο τρόπος αναδίπλωσης αλλά και η τοπολογία.

Μια υπόθεση που θα επέτρεπε ικανοποιητικά την εξήγηση όλων των παραπάνω δεδομένων είναι ότι υπάρχει κάποιο είδος συσχέτισης ανάμεσα στις περιοχές του βρόχου και του υδρόφοβου πυρήνα στα 4-α-ελικοειδή δεμάτια. Η συσχέτιση αυτή επιτρέπει πιθανώς μικρές, εξωτερικές αλλαγές που συμβαίνουν στο ένα δομικό στοιχείο να αντισταθμίζονται από ανακατατάξεις στο άλλο. Όταν όμως η εξωτερική παρεμβολή ξεπερνά κάποια όρια τότε η ισορροπία διαταράσσεται κατά τρόπο μη αντιστρεπτό. Στην εργασία αυτή εστιαστήκαμε στο δομικό μοτίβο του 4-α-ελικοειδούς δεματιού και ασχοληθήκαμε και με τις δύο δομικές περιοχές που χαρακτηρίζουν το μοτίβο, τον υδρόφοβο πυρήνα και τις εκτεθειμένες στο διαλύτη ελεύθερες δομικές περιοχές του βρόχου. Επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε τόσο την ύπαρξη και τον προσδιορισμό ενεργειακών περιορισμών στους οποίους υπόκεινται τα αμινοξέα του πυρήνα όσο και να εντοπίσουμε έναν πιθανό μηχανισμό αλληλεπίδρασης αυτής της περιοχής με την περιοχή του βρόχου.

Για την απάντηση στο πρώτο ερώτημα χρησιμοποιήσαμε όλα τα 4-α-ελικοειδή δεμάτια (συνολικά 13) που βρήκαμε στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων. Βρήκαμε ότι τα αμινοξέα που συναντώνται σε αυτό το μοτίβο ανεξάρτητα από τη θέση τους δείχνουν μια προτίμηση μόνο σε ορισμένες από τις διαμορφώσεις που έχουν σημειωθεί για τα αντίστοιχα αμινοξέα των σφαιρικών πρωτεϊνών γενικά. Επίσης η Tyr και η Leu φαίνεται να εισάγουν και ορισμένες νέες διαμορφώσεις. Τέλος στα αμινοξέα Tyr και Ile παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στις προτιμώμενες διαμορφώσεις ανάλογα με τη θέση του αμινοξέος στο δεμάτι (εσωτερικό ή εξωτερικό). Η προσέγγισή μας έχει περισσότερο ποιοτικό χαρακτήρα. Πιο ποσοτικά αποτελέσματα θα μπορούσαν να προκύψουν από την εφαρμογή μιας στατιστικής ανάλυσης για μικρό δείγμα. Μια τέτοια ανάλυση απαιτεί μαθηματικές γνώσεις που ξεπερνούν τις δυνατότητές μας.

Για τη διερεύνηση του δεύτερου ερωτήματος χρησιμοποιήσαμε ως δομικό μοντέλο τη Rop πρωτεΐνη και συγκεκριμένα τις μεταλλάξεις της RM6 και RM7. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν δύο αντίθετα, ακραία παραδείγματα μεταλλάξεων στην περιοχή του βρόχου. Και οι δύο δημιουργήθηκαν για να αντικατασταθεί το πρότυπο της επιάδας που διακόπτεται στην περιοχή του βρόχου. Παρόλα αυτά, η αποκατάσταση αυτή στην μια περίπτωση δεν

προκάλεσε σχεδόν καμία αλλαγή στον τρόπο αναδίπλωσης και την τοπολογία και στην άλλη άλλαξε εντελώς το σχήμα αναδίπλωσης και προκάλεσε πλήρη αναδιοργάνωση του υδρόφοβου πυρήνα. Σκοπός μας ήταν η βελτίωση των υπαρχόντων κρυσταλλογραφικών δεδομένων για τις δομές αυτές που πιθανώς θα μας επέτρεπε να εντοπίσουμε πληροφορία για έναν πιθανό μηχανισμό αλληλεπίδρασης βρόχου-πυρήνα που στη μια περίπτωση εξισορροπεί την προκαλούμενη αλλαγή χωρίς να μεταβληθεί καθόλου η αναδίπλωση ενώ στην άλλη επιτυγχάνει να απλώς τη διατήρηση της τοπολογίας. Πράγματι, για την RM6 συλλέξαμε δεδομένα περίθλασης σε καλύτερη διακριτικότητα 2\AA (έναντι των 2.3\AA των διαθέσιμων μέχρι τότε δεδομένων), που μας επέτρεψε να υπολογίσουμε ένα καλύτερο ατομικό μοντέλο. Πάντως, για την εξαγωγή συμπερασμάτων στο ερώτημα που θέσαμε αρχικά απαιτούνται ακόμα καλύτερα δεδομένα. Για την RM7 δεν καταφέραμε να παράγουμε κρυστάλλους που να σκεδιάζουν καλύτερα και να παρέχουν δεδομένα υψηλότερης διακριτικότητας από τα ήδη υπάρχοντα. Εντούτοις, κατά τα πειράματα κρυστάλλωσης της RM7 κρυσταλλώσαμε μια πρωτεΐνη (την αναφέρουμε ως XP) για την οποία βρίσκονται σε εξέλιξη πειράματα ταυτοποίησης.

Βιβλιογραφία

Bairoch, A. & Apweiler, P. (1997). The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research. *J. Mol. Med.* 75, 312-316.

Banner, D. W., Kokkinidis, M. & Tsernoglou, D. (1987). Structure of the ColE1 Rop protein at 1.7Å resolution. *J. Mol. Biol.* 196, 657-675.

Betz, S. F., Liebman, P. A. & DeGrado, W. F. (1997). De novo design of native proteins: characterization of proteins intended to fold into antiparallel, rop-like, four-helix bundles. *Biochemistry.* 36, 2450-2458.

Blundell, T. L. & Jonson, L. N. (1976). *Molecular Biology. An international series of monographs and textbooks. Protein Crystallography*, edited by Horcker, B., Kaplan, N. O., Marmur, J. & Sceraga, H. A. London: Academic Press.

Brunet, A. P., Huang, E. S., Huffine, M. E., Loeb, J. E., Weltman, R. J. & Hecht, M. H. (1993). The role of turns in the structure of an α -helical protein. *Nature.* 364, 355-358.

Brünger, A. T. (1993). *X-PLOR version 3.1.* Yale University Press, New Haven.

Carlacci, L. & Chou, K.-C. (1990a). Energetic approach to the folding of four α -helices connected sequentially. *Protein Engng.* 3, 509-514.

Carlacci, L. & Chou, K.-C. (1990b). Protocol. Electrostatic interactions between loops and α -helices in four-helix bundle proteins. *Protein Engng.* 4, 225-227.

Castagnoli, L., Scarpa, M., Kokkinidis, M., Banner, D. W., Tsernoglou, D. & Cesareni, G. (1989). Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein. *EMBO J.* 8, 621-629.

Castagnoli, L., Vetriani, C., & Cesareni, G. (1994). Linking an easily detectable phenotype to the folding of a common structural motif. Selection of rare turn mutations that prevent the folding of Rop. *J. Mol. Biol.* 237, 378-387.

Cesareni, G., Muesing, M. A. & Polisky, B. (1982). Control of ColE1 DNA replication: The rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 6313-6317.

Cohen, C. & Parry, D. A. D. (1990). α -helical coiled coils and bundles: how to design an α -helical protein. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 7, 1-15.

Collaborative Computational Project Number 4. (1994). The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography version 3.1. *Acta Cryst.* D50 760-763.

Ducruix, A. & Giegé, R. (1992). Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach. The practical approach series edited by Rickwood, D. & Hames, B. D., New York: Oxford University Press.

Dunbrack, R. L. & Karplus, M. (1993). Backbone-dependent rotamer library for proteins. Applications to side-chain prediction. *J. Mol. Biol.* 230, 543-574.

Guo, Z., & Thirumalai, D. (1996). Kinetics and thermodynamics of folding of a de novo designed four-helix bundle protein. *J. Mol. Biol.* 263, 323-343.

Harris, E. L. V. & Angal, S. (1989). Protein purification methods. A practical approach. The practical approach series edited by Rickwood, D. & Hames, B. D., New York: Oxford University Press.

Helmer-Citterich, M., Anceschi, M. M., Banner, D. W. & Cesareni, G. (1988). Control of Cole1 replication: low affinity specific binding of Rop (Rom) to RNA I and RNA II. *EMBO J.* 7, 557-566.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970). *J. Mol. Biol.* 52, 1-17

Janin, J., Wodak, S., Levitt, M. & Maigret, B. (1978). Conformation of amino acid side-chain in proteins. *J. Mol. Biol.* 125, 357-386.

Jones, J. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crust.* A47, 110-119.

Kamtekar, S. & Hecht, M. H. (1995). The four-helix bundle: what determines a fold ? *FASEB J.* 9, 1013-1022.

Kokkinidis, M., Vlassi, M., Papanikolaou, Y., Kotsifaki, D., Kingswell, Tsernoglou, D. & Hinz, H.-J. (1993). Correlation between protein stability and crystal properties of designed Rop variants. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 16, 214-216.

Lacatena, R. M., Banner, D.W., Castagnoli, L. & Cesareni, G. (1984). Control of initiation of pMB1 replication: purified Rop protein and RNA I affect primer formation in vitro. *Cell.* 37, 1009-1014.

Lassale, M. W., Hinz, H.-J., Wenzel, H., Vlassi, M., Kokkinidis, M. & Cesareni, G. (1998). Dimer-to-tetramer transformation: loop excision dramatically alters structure and stability of the Rop four α -helix bundle protein. *J. Mol. Biol.* 279, 987-1000.

Lassale, M. W. & Hinz, H.-J. (1998). Unfolding of the tetrameric loop deletion mutant of Rop protein is a second-order reaction. *Biochemistry.* 37, 8465-8472.

McPherson, A. (1989). Preparation and analysis of protein crystals. New York: Wiley.

Munson, M., O'Brien, R., Sturtevant, J. M. & Regan, L. (1994). Redesigning the hydrophobic core of a four-helix-bundle protein. *Protein Sci.* 3, 2015-2022.

Munson, M., Balasubramanian, S., Fleming, K. G., Nagi, A. D., O'Brien, R., Sturtevant, J. M. & Regan L. (1996). What makes a protein a protein ? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. *Protein Sci.* 5, 1584-1593.

Munson, M., Anderson, K. S. & Regan, L. (1997). Speeding up protein folding: mutations that increase the rate at which Rop folds and unfolds by over four orders of magnitude. *Folding & Design.* 2, 77-87.

Nagi, A. D. & Regan, L. (1997). An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein. *Folding & Design.* 2, 67-75.

Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in enzymology*, 276: Makromolecular Crystallography, part-A, pp. 307-326. Edited by Carter, C. W., Sweet, Jr. & R. M. Academic Press.

Paliakasis, C. D., & Kokkinidis, M. (1991). The stability of the four- α -helix bundle motif in proteins. *Protein Engng.* 4, 849-850.

Paliakasis, C. D., & Kokkinidis, M. (1992). Protein Engng. Relationships between sequence for the four- α -helix bundle tertiary motif in proteins. *Protein Engng.* 5, 739-748.

Papanikolaou, Y. (1995). PhD thesis, University of Crete, Greece.

Pearson & Lipman (1988). *Proc. Natl. Sci., USA* 85, 2444-2448

Peters, K., Hinz, H.-J. & Cesareni, G. (1997). Introduction of a proline residue into position 31 of the loop of the dimeric 4- α -hlical protein Rop causes a drastic destabilization. *Biol. Chem.* 378, 1141-1152.

Ponder, J. W. & Richards, F. M. (1987).. Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J. Mol. Biol* 193, 775-791.

Predki, P. F. & Regan, L. (1995). Redesigning the topology of a four-helix-bundle protein: monomeric Rop. *Biochemistry.* 34, 9834-9839.

Predki, P. F., Nayak, M. L., Gottlieb, B. C. & Regan, L. (1995). Dissecting RNA-protein interactions: RNA-RNA recognition by Rop. *Cell.* 80, 41-50.

Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (1990). Prediction of protein structure and the principles of protein conformation, edited by Fasman, G. D. pp.1-95. New York and London: Plenum Press.

Schrauber, H., Eisenhaber, F. & Argos, P. (1993). Rotamers: to be or not to be. An analysis of amino acid side-chain conformations in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 230, 592-612.

Schulz, G.E. & Schirmer, R. H. (1985). Principles of protein structure, edited by Cantor, C. R. New York: Springer-Verlag.

Scopes, R. (1984). Protein purification. Principles and practice, edited by Cantor, C. R. New York: Springer-Verlag.

Steif, C., Weber, P., Hinz, H.-J., Flossdorf, J., Cessareni, G. & Kokkinidis, M. (1993). Subunit interactions provide a significant contribution to the stability of a dimeric four- α -helical-bundle protein Rop. *Biochemistry*. 32, 3867-3876.

Steif, C., Hinz, H.-J. & Cesareni G. (1995). Effects of cavity-creating mutations on conformational stability and structure of the dimeric 4- α -helical protein Rop: thermal unfolding studies. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 23, 83-96.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22, 4673-4680.

Vlassi, M., Steif, C., Weber, P., Tsernoglou, D., Wilson, K. S., Hinz, H.-J., & Kokkinidis, M. (1994). Restored heptad pattern continuity does not alter the folding of a four- α -helix bundle. *Structure Biol.* 1, 706-716.

Vlassi, M., Cesareni, G. & Kokkinidis, M. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Submitted.

Weber, P. C. & Salemme, F. R. (1980). Structural and functional diversity in 4- α -helical proteins. *Nature*. 287, 82-83.