

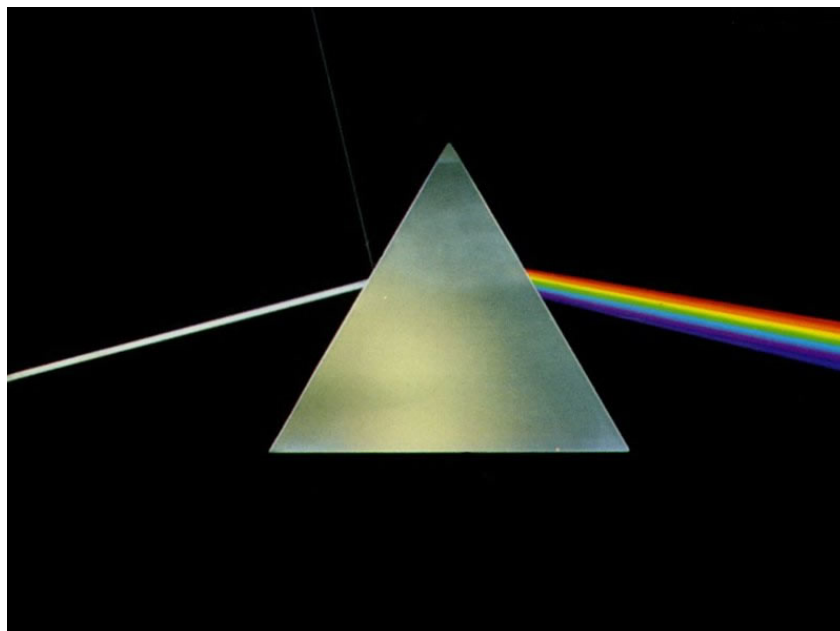
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ Τμήματα Βιολογίας & Χημείας
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
" ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ "

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

‘Ο ρόλος της στροφής και του μοτίβου της επτάδας στην
αναδίπλωση και σταθερότητα της πρωτεΐνης Rop’

ΦΕΛΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
Μ. ΚΟΚΚΙΝΙΔΗΣ



ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
2006

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κοκκινίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριό του, καθώς και για τη συνεχή του στήριξη σε όλους τους τομείς αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Ντίνα και στη Μαίρη για την αγάπη που μου έδειξαν, τη στήριξή τους και γιατί είναι οι μητέρες του εργαστηρίου (Ντίνα, καλό είναι αυτό!!!).

Είμαι ευγνώμων στον άνθρωπο που με εισήγαγε αρχικά στο χώρο της δομικής βιολογίας και συνεχίζει να με στηρίζει, αν και του κάνω τη ζωή δύσκολη. Κύριε Γλυκέ, ένα μεγάλο ευχαριστώ για όλα.

Επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την καλή μας συνεργασία και το φιλικό κλίμα του εργαστηρίου. Την Τάνια, που με βοήθησε άπειρες φορές σε ότι ζήτησα (αν και ακόμα δεν κατάφερα να την κάνω να αγαπήσει τη μουσική όσο εγώ), τη Βίκυ για τις πολύτιμες συμβουλές της, τη Βάνια, που αν και όχι πολύ καιρό στο εργαστήριο, με βοήθησε σε κρίσιμα σημεία και την ευχαριστώ θερμά, τη Μαρία για την καλή μας συνεργασία και τις πολλές μας συζητήσεις, τη Χρύσα για τις χρήσιμες συμβουλές, το Γιώργο και το Νίκο για την αντρική αλληλεγγύη και την Μαρία και την Κλητώ για την καλή μας συνεργασία. Ευχαριστώ και όλα τα παιδιά που κατά καιρούς πέρασαν από το εργαστήριο.

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά του ορόφου για την καλή συνεργασία που είχαμε. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δήμητρα για την πολύτιμη βοήθειά της σε ότι και αν ζήτησα.

Πολλά ευχαριστώ στα γειτονικά εργαστήρια Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας και Κρυσταλλογραφίας και τα εργαστήρια Τεχνολογίας Βιοαισθητήρων, Βιοτεχνολογίας Φυτών και Μοριακής Βιολογίας Φυτών για την καλή συνεργασία που είχαμε και για την πολύπλευρη βοήθεια που μου παρείχαν, όποτε αυτό χρειάστηκε.

Το Ecolab και όλους τους ανθρώπους, με τους οποίους συνεργάστηκα τους τρεις μήνες που ήμουν εκεί, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου: τη Βάσια, για τη στήριξη και τη φιλία της αυτά τα 2 χρόνια. Της είμαι ευγνώμων για όλα και ειδικά για τη βοήθειά της τον τελευταίο μήνα, τον Μιχάλη, τη Γιούλη, την κουμπάρα (κατά κόσμων Θάνια) και την Αλεξάνδρα για τη συνεχή τους στήριξη, την καλή παρέα και τις χρήσιμες συμβουλές. Ευχαριστώ για όλα παιδιά!!!

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την αγάπη και στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τους οφείλω τα πάντα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
SUMMARY	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7-29
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών	7
1.2 Προτεινόμενα μοντέλα για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών	9
1.3 Η πρωτεΐνη Rop	16
1.4 Η πρωτεΐνη Rop ως μοντέλο	19
1.4.1 Μελέτες της αγρίου τύπου (wt) Rop	20
1.4.2 Μελέτες μεταλλαγών και παραλλαγών του υδρόφοβου πυρήνα	20
1.4.3 Μελέτες μεταλλαγών και παραλλαγών της στροφής	24
1.4.4 Μελέτες του προτύπου της επανάληψης της επτάδας (heptad's pattern repeat)	27
ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33-46
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
2.1 Παραγωγή της αγρίου τύπου 6His-Tag Rop πρωτεΐνης και των παραγώγων της	33
2.2 Αρχικές προσπάθειες κρυστάλλωσης της D30PA31P Rop	35
2.3 Παραγωγή της D30PA31P Rop με το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού	35
2.4 Πειράματα σε βαθμονομημένη κολόνα μοριακής διήθησης (Gel Filtration)	36
2.5 Μελέτες πρωτεϊνών με φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)	39
2.6 Κρυστάλλωση της D30PA31P Rop	45
2.7 Τα υπόλοιπα μεταλλάγματα της Rop	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48-54
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55-81
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
4.1 Οι φορείς κλωνοποίησης	55
4.1.1 Ο φορέας κλωνοποίησης pET26b(+) (Novagen)	55
4.1.2 Ο φορέας κλωνοποίησης pF1K T7 Flexi Vector (Promega)	56
4.2 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας-Χειρισμός DNA	56
4.2.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	56
4.2.2 Παρασκευή και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση για διαγνωστικούς σκοπούς	57
4.2.3 Παρασκευή και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA, ποιότητας αλληλούχισης, με αλκαλική λύση	58
4.2.4 Εξαγωγή DNA από πηκτή αγαρόζης	58
4.2.5 Επανακλωνοποίηση του γονιδίου rop στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+)	59

4.2.6 Κατασκευή της wtRop	61
4.2.7 Κατασκευή του μεταλλάγματος στροφής D30PA31P της Rop	62
4.2.8 Κατασκευή μεταλλάγματος στροφής D30GA31P και μεταλλαγμάτων αποκατάστασης του προτύπου της επτάδας 2aaL και 2L της Rop	63
4.2.9 Επανακλωνοποίηση του γονιδίου της Rop στον πλασμιδιακό φορέα pF1K T7 Flexi της Promega	64
4.3 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων (competent cells) <i>E.coli</i>	66
4.4 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων (competent cells) <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA	67
4.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών	67
4.5.1 Προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford	67
4.5.2 Προσδιορισμός με τη μέθοδο απορρόφησης (A) στα 280nm	67
4.6 Καθαρισμός των 6xHis-Rop πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγενείας Ni ²⁺ -NTA και χρωματογραφία μοριακής διήθησης	68
4.7 Αρχικό σχήμα καθαρισμού	69
4.8 Βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού	70
4.9 Ανάλυση καθαρότητας και μεγέθους πρωτεϊνών	71
4.9.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	71
4.9.2 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου με χρώση Coomassie Blue	71
4.10 Πρωτεϊνικές μελέτες με τη χρήση Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωισμού (CD)	72
4.11 Κρυστάλλωση του μεταλλάγματος στροφής D30PA31P της Rop	74
4.11.1 Τεχνικές και Μέθοδοι	74
4.11.2 Αρχικές προσπάθειες κρυστάλλωσης	77
4.11.3 Τελικές προσπάθειες κρυστάλλωσης	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες είναι πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες αναδιπλώνουν σε συγκεκριμένες τρισδιάστατες διαμορφώσεις. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αναδίπλωση των πρωτεϊνών και γίνεται εξαιρετικά γρήγορα. Από τα πρωτοποριακά πειράματα του Anfinsen ήταν γνωστό ότι η απαραίτητη πληροφορία για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών βρίσκεται κωδικοποιημένη στα αμινοξέα που τις αποτελούν. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, δεν έχει γίνει εφικτή η πλήρης κατανόηση του μηχανισμού αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, κάτι που είναι γνωστό ως πρόβλημα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Στην προσπάθεια κατανόησης αυτού του μηχανισμού έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες πρωτεΐνες ως μοντέλα και βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων και των θεωρητικών προσεγγίσεων έχουν διατυπωθεί ποικίλες θεωρίες για τον τρόπο αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Μια από τις πρωτεΐνες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η πρωτεΐνη Rop.

Η Rop είναι ένα ομοδιμερές, αντιπαράλληλο, 4-α-ελικοειδές δεμάτιο και, φυσιολογικά, συμμετέχει στο μηχανισμό ελέγχου του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων της ColE1 οικογένειας. Η τοπολογία κάθε μονομερούς είναι έλικα-στροφή-έλικα με τη στροφή να σχηματίζεται από τρία κατάλοιπα. Επίσης, στο δεμάτιο της Rop, όπως και σε όλα τα α-ελικοειδή δεμάτια, εμφανίζεται η περιοδικότητα της επτάδας, η οποία διαταράσσεται στην περιοχή της στροφής. Ποικίλες μελέτες έχουν αποδώσει δευτερεύοντες ή περισσότερο πρωταρχικούς ρόλους στη στροφή και στην περιοδικότητα της επτάδας, σε ότι αφορά στην αναδίπλωση και σταθερότητα της Rop.

Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια να διαφωτιστεί ακόμη περισσότερο η σημασία των παραπάνω στοιχείων στον τρόπο με τον οποίο αναδιπλώνεται η πρωτεΐνη Rop. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν τέσσερα μεταλλάγματα. Από αυτά, τα δυο αφορούν στο σχεδιασμό στρατηγικών μεταλλαγών στην περιοχή της στροφής με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της στην πορεία αναδίπλωσης της πρωτεΐνης, ενώ τα άλλα δυο αφορούν στην αποκατάσταση της περιοδικότητας της επτάδας στην περιοχή της στροφής.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας έγινε δυνατή η παραγωγή ενός από τα παραπάνω μεταλλάγματα, το οποίο αφορά στην αντικατάσταση των καταλοίπων Asp30 και Ala31 της στροφής της αγρίου τύπου Rop, με δυο προλίνες. Η πρωτεΐνη μελετήθηκε

ως προς τις φασματοσκοπικές και θερμοδυναμικές της ιδιότητες και υπήρξε δυνατή η κρυστάλλωσή της. Τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν ότι το μετάλλαγμα αυτό έχει παρόμοιες φασματοσκοπικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες με αυτές του μεταλλάγματος A31P, το οποίο έχει υποθεθεί ότι αποτελεί μια molten globule κατάσταση και επιβεβαιώνουν τη σημασία των καταλοίπων της στροφής στην επιλογή του μονοπατιού αναδίπλωσης της πρωτεΐνης. Περαιτέρω πειράματα απαιτούνται για τον ακριβή χαρακτηρισμό του. Οι κρύσταλλοι του μεταλλάγματος D30PA31P, που σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας χρειάζονται περαιτέρω βελτίωση, προκειμένου να είναι κατάλληλοι για περίθλαση ακτίνων X. Το μετάλλαγμα D30PA31P κρυσταλλώνει σε συνθήκες παρόμοιες με τις συνθήκες στις οποίες κρυσταλλώνουν οι παραλλαγές του υδρόφοβου πυρήνα και όχι οι παραλλαγές της στροφής.

SUMMARY

Since Anfinsen's pioneering experiments, it was known that the information necessary to drive protein folding is coded in the linear amino acid sequence of the protein. Despite intense research, the folding process is not fully understood. Various proteins have been used as model systems in order to examine the folding process and numerous theories have tried to interpret the experimental results. A well characterized protein, used in this context, is the Rop protein.

Rop is a homodimeric, 4- α -helix bundle, which participates in the control of plasmid copies of the ColE1 family. The topology of each monomer is of the type helix-loop-helix, the loop consisting of three residues. A heptad pattern is present in the Rop sequence and is disturbed only in the loop region. The roles of loop and heptad periodicity in the folding process and stability of Rop have been extensively studied.

In this study, we have attempted to further elucidate the roles of turn and heptad pattern in Rop folding. Towards this aim, four mutants were designed. Two of them comprise altered residues in the turn region, while the other two mutants aim at restoring the heptad periodicity in the same region.

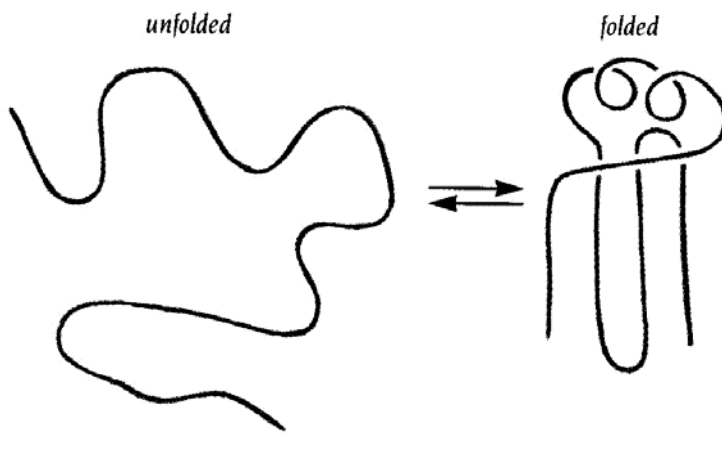
A mutant, comprising two proline residues in positions 30 and 31 of wtRop, was constructed. Spectroscopic and thermodynamic studies were carried out and protein crystallization experiments were set up. Results of this work suggest that this mutant is comparable in its spectroscopic and thermodynamic properties to the A31P mutant, which has been compared to a molten-globule like state. This confirms the role of turn residues in the choice of folding pathway. Farther experiments are needed in order to fully characterize this protein. Protein crystals were obtained, but these are not yet suitable for X-ray diffraction experiments. This mutant, although being a loop variant, crystallizes in conditions more close to those of hydrophobic core Rop variants.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες αναδιπλώνονται σε τρισδιάστατες δομές. Αυτές περιέχουν διακριτά δευτεροταγή δομικά στοιχεία, όπως α-έλικες, β-πτυχωτά φύλλα και βρόχους. Η διαδικασία μέσω της οποίας οι πρωτεΐνες μετατρέπονται από μια ανενεργή, μη διπλωμένη κατάσταση (unfolded state) στην βιολογικά ενεργή, αναδιπλωμένη κατάστασή τους (native, folded state) ονομάζεται αναδίπλωση των πρωτεϊνών (protein folding) (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Η απλοποιημένη διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. (Σχήμα από Branden and Tooze, 1999).

Η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά γρήγορη, καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες αναδιπλώνονται στην τριτοταγή τους δομή σε λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο, με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες να χρειάζονται περισσότερο χρόνο (Karplus and Weaver 1994; Branden and Tooze 1999). Από το 1973 και τα πρωτοποριακά πειράματα του Anfinsen, ήταν γνωστό ότι η απαραίτητη πληροφορία για την αναδίπλωση μιας πεπτιδικής αλυσίδας σε μια συγκεκριμένη, ενεργή, τρισδιάστατη μορφή, βρίσκεται στα αμινοξέα που την αποτελούν (Anfinsen 1973; Karplus and Weaver 1994).

Ωστόσο, τριάντα χρόνια μετά, δεν έχει επιτευχθεί ακόμη η κατανόηση του μηχανισμού της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και ειδικότερα ο τρόπος με τον οποίο η αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης καθορίζει την τριτοταγή της δομή. Το τελευταίο είναι γνωστό ως πρόβλημα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (protein folding problem) (Lattman and Rose 1993; Tooze 1999; Radford 2000) και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αναπάντητα ερωτήματα στο χώρο της μοριακής βιολογίας.

Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της αναδιπλωμένης και της μη αναδιπλωμένης κατάστασης είναι πολύ μικρή, περίπου 5-15 kcal/mol, κάτι που ισοδυναμεί με την ενεργειακή εισφορά μερικών, μόνο, δεσμών υδρογόνου (Lattman and Rose 1993; Tooze 1999; Fersht and Daggett 2002). Οι κύριοι παράγοντες που οδηγούν σε αυτή την ενεργειακή διαφορά είναι η ενθαλπία (H) και η εντροπία (S). Η πρώτη είναι το αποτέλεσμα των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και ιοντικοί δεσμοί) που σχηματίζονται στην πρωτεΐνη. Σε αντίθεση με τους ομοιοπολικούς δεσμούς που είναι, με εξαίρεση τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι ίδιοι τόσο στη μη διπλωμένη όσο και στη διπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης, οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί διαφέρουν σημαντικά στις δυο αυτές καταστάσεις της ίδιας πρωτεΐνης. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύ πιο ισχυρές στην αναδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης και η ενεργειακή τους συνεισφορά (ενθαλπία) είναι πολύ μεγαλύτερη σε αυτή την κατάσταση. Το αποτέλεσμα είναι η διαφορά ενθαλπίας (ΔH) μεταξύ των δυο καταστάσεων να φτάνει μέχρι και μερικές εκατοντάδες kcal/mol (Tooze 1999).

Ο δεύτερος παράγοντας (εντροπία) έχει να κάνει με την απαιτούμενη προσφορά ενέργειας προκειμένου να δημιουργηθεί τάξη (Δεύτερος Νόμος Θερμοδυναμικής). Σύμφωνα με τη Θερμοδυναμική, η εντροπία ενός συστήματος τείνει να αυξάνει, δηλαδή η μεταβολή της εντροπίας ενός συστήματος θα είναι πάντα $\Delta S > 0$. Η διαφορά εντροπίας μεταξύ της μη διπλωμένης και της διπλωμένης μορφής της πρωτεΐνης είναι αρνητική (μεγαλύτερη η εντροπία της μη διπλωμένης κατάστασης) και μπορεί να φτάσει και αυτή σε μερικές εκατοντάδες kcal/mol.

Η διαφορά της μεταβολής αυτών των δυο παραγόντων (ΔH και ΔS) αποτελεί τη συνολική διαφορά ενέργειας μεταξύ της μη διπλωμένης και της αναδιπλωμένης μορφής μιας πρωτεΐνης και είναι γνωστή ως διαφορά ελεύθερης ενέργειας (ΔG). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η διαφορά αυτή είναι πολύ μικρή, με αποτέλεσμα ο υπολογισμός της κατάστασης ελάχιστης ενέργειας να μην είναι πάντα εύκολος, κάτι που καθιστά περισσότερο πολύπλοκη τη μελέτη της διαδικασίας αναδίπλωσης των

πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η πορεία που ακολουθείται κατά την αναδίπλωση είναι πολύ πιο περίπλοκη σε σχέση με το απλοποιημένο μοντέλο του σχήματος 1. Στην πραγματικότητα, η μη διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα λαμβάνει μια πληθώρα διαφορετικών, μη διακρινόμενων και συνεχώς μεταβαλλόμενων δομών μέχρι να καταλήξει στην τελική της κατάσταση (Fersht and Daggett 2002).

Όλα αυτά καθιστούν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών ως μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που απασχολεί θεωρητικούς και πειραματιστές τα τελευταία 30 χρόνια.

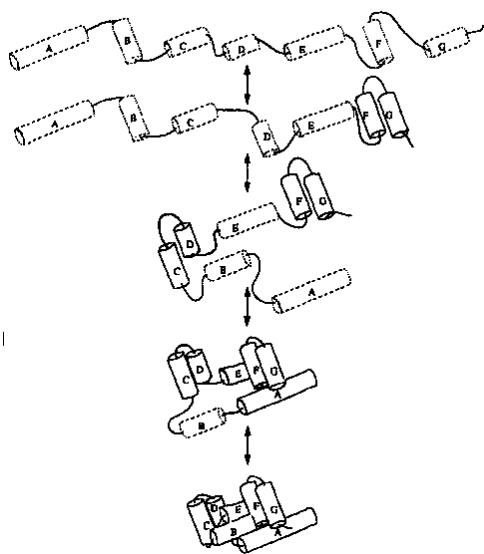
1.2 Προτεινόμενα μοντέλα για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Από τα πρώτα μοντέλα που προτάθηκαν για το μηχανισμό αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είναι αυτό που πρότεινε ο Levinthal το 1968 (sequential model) (Levinthal 1968). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ένα μέρος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, όντας ακόμη μη διπλωμένο, λειτουργεί ως πυρήνας (nucleus) που ωθεί ολόκληρη την αλυσίδα στο να λάβει την τριτοταγή της δομή. Το μοντέλο αυτό προϋποθέτει ότι αυτός ο πυρήνας είναι αρκετά μικρός ώστε να μπορεί να 'ψάξει', ανάμεσα σε άλλες, για τη σωστή του δομή. Μόλις λάβει τη σωστή του δομή, αυτός ο πυρήνας προκαλεί τη διαδοχική αναδίπλωση και των υπόλοιπων καταλοίπων, μέσα από ένα μοναδικό μονοπάτι (unique folding pathway) στην τελική, τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης. Αυτό το μοντέλο απλοποιεί αρκετά τη διαδικασία της αναδίπλωσης καθώς προσπαθεί να εξηγήσει μια παρατήρηση που ο ίδιος ο Levinthal έκανε και έχει μείνει γνωστή ως 'το παράδοξο του Levinthal' (Dinner, Sali et al. 2000): Αν υποθεθεί ότι κάθε αμινοξύ μπορεί να λάβει μόνο δυο διαφορετικές στερεοχημικές διαμορφώσεις, τότε για μια πρωτεΐνη των 100 αμινοξέων υπάρχουν 2^{100} ή $\sim 10^{30}$ δυνατές διαμορφώσεις της κύριας αλυσίδας. Αν υποθεθεί ότι η αλληλομετατροπή μεταξύ των διαφόρων αυτών διαμορφώσεων μπορεί να γίνει σε χρόνο 10^{-11} sec., θα χρειαζόντουσαν 10^{14} χρόνια για να διερευνηθούν 10^{30} δυνατές διαμορφώσεις. Το γεγονός ότι η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στην κατάσταση με τη χαμηλότερη ενέργεια γίνεται σε λιγότερο από 1 sec., παρά το χρόνο που χρειάζεται για να διερευνηθούν όλες οι πιθανές καταστάσεις, αποτελεί το 'παράδοξο του Levinthal'.

Το αρχικό μοντέλο του Levinthal αναπτύχθηκε περαιτέρω από τον Go και τους συνεργάτες του (Go and Miyazawa 1980), οι οποίοι διατύπωσαν το λεγόμενο growth-

merge model, το οποίο περιέχει στοιχεία τόσο του προηγούμενου μοντέλου, όσο και του επόμενου που διατυπώθηκε από τους Karplus και Weaver.

Το 1976, οι Karplus και Weaver πρότειναν το μοντέλο της ‘διάχυσης και σύγκρουσης’ (diffusion-collision model). Το μοντέλο αυτό στηρίζεται στην ύπαρξη μικροπεριοχών (microdomains), που μπορεί να αποτελούν μέρος σχηματιζόμενων δευτεροταγών στοιχείων ή υδροφοβικών συμπλεγμάτων (hydrophobic clusters). Αυτές οι μικροπεριοχές ‘διαχέονται’ στο χώρο και ‘συγκρούονται’ με άλλες παρόμοιες. Οι συγκρούσεις αυτές οδηγούν στο σχηματισμό ενδιάμεσων πολυμικροπεριοχών (multimicrodomain intermediates), που μπορούν να περιέχουν μικροπεριοχές, οι οποίες βρίσκονται μακριά στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η αναδίπλωση συνεχίζεται με διαδοχικά βήματα σχηματισμού τέτοιων ενδιάμεσων μέσω ενός ή πολλαπλών μονοπατιών (Karplus and Weaver 1976; Karplus and Weaver 1994) (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου ‘διάχυσης και σύγκρουσης’. Το σύστημα ξεκινάει από μια κατάσταση τυχαίων σπειραμάτων. Οι μικροπεριοχές A-G είναι ασταθείς από μόνες τους και η διαμόρφωσή τους εναλλάσσεται συνεχώς. Όταν κάποιες μικροπεριοχές αποκτούν δευτεροταγή δομή, οι συγκρούσεις μεταξύ τους οδηγούν σε πιο σταθερά ενδιάμεσα που συγκρατούνται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Τα σχηματιζόμενα ενδιάμεσα συγκρούονται και οδηγούν σταδιακά στην πιο σταθερή, αναδιπλωμένη κατάσταση. (Σχήμα από Karplus and Weaver, 1994).

Το μοντέλο των Karplus και Weaver αποτέλεσε τη βάση για άλλα μοντέλα όπως το ‘μοντέλο του πλαισίου’ (framework model) (Kim and Baldwin 1982) και το ‘μοντέλο συναρμολόγησης’ (jigsaw puzzle model) (Harrison and Durbin 1985). Το πρώτο μοντέλο προτείνει ότι αρχικά σχηματίζονται όλα τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής

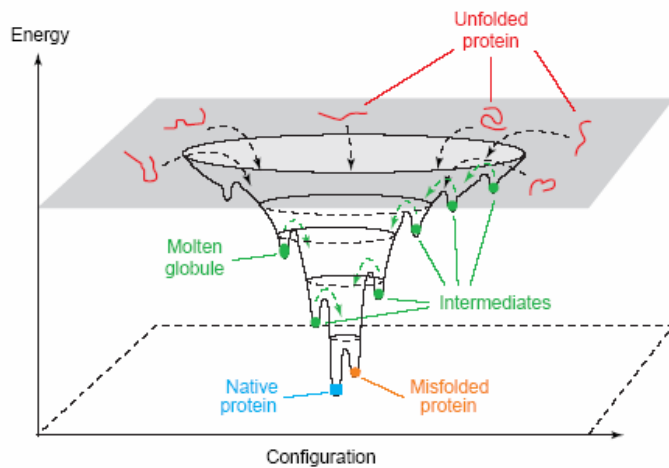
της πρωτεΐνης, τα οποία στη συνέχεια μέσω συγκρούσεων (collision) συγκροτούν την τριτοταγή δομή του μορίου. Το δεύτερο μοντέλο θεωρεί ότι οι πρωτεΐνες αναδιπλώνουν μέσω ποικίλων, παράλληλων μονοπατιών και όχι μέσω μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας γεγονότων.

Ένα άλλο μοντέλο που προτάθηκε είναι το λεγόμενο 'μοντέλο της υδρόφοβης κατάρρευσης' (hydrophobic collapse model) (Levitt and Warshel 1975). Σύμφωνα με αυτό, στα αρχικά ακόμη στάδια της αναδίπλωσης, οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες τοποθετούνται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης και μακριά από το νερό. Έτσι, σχηματίζεται μια ενδιάμεση ή molten globule κατάσταση η οποία περιορίζει σημαντικά τις δυνατές διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει το μόριο.

Αυτά τα αρχικά μοντέλα δημιούργησαν νέα δεδομένα στη μελέτη της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και αποτέλεσαν τη βάση για τις σύγχρονες προσεγγίσεις σε αυτό το θέμα (Radford 2000). Πόσο, όμως, έχει προχωρήσει, σήμερα, η κατανόηση της πολύπλοκης αυτής διαδικασίας;

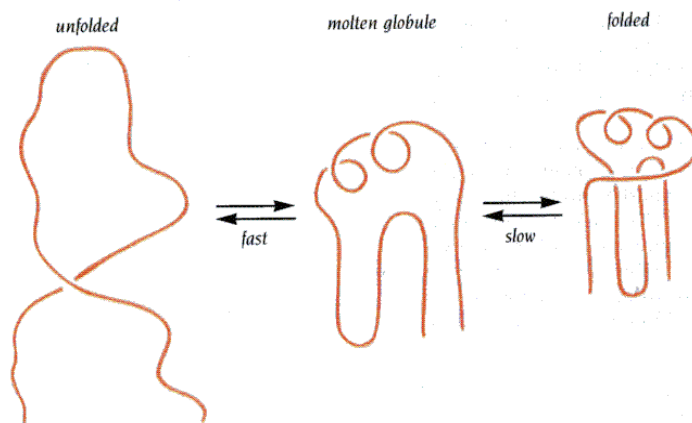
Είναι γνωστό, πλέον, ότι δεν υπάρχει ένα, μόνο, μονοπάτι, που μια πρωτεΐνη μπορεί να ακολουθήσει κατά την αναδίπλωσή της (Radford 2000). Αντίθετα, ένα πολυδιάστατο ενεργειακό τοπίο (multidimensional energy landscape), που απεικονίζεται ως ένα, συνήθως, αδρό χωνί (folding funnel), χαρακτηρίζει καλύτερα τη διαδικασία της αναδίπλωσης (Σχήμα 3). Αυτά τα ενεργειακά τοπία βασίζονται στη γενικευμένη λογική όλων των χημικών αντιδράσεων. Οι τελευταίες αποτελούν συνάρτηση της ενέργειας αλληλεπίδρασης των αντιδρώντων ατόμων, με τη σχετική τους θέση στο χώρο. Στην περίπτωση της διαδικασίας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, η ενέργεια αυτή αφορά στην ελεύθερη ενέργεια και τις μεταβολές της (Dinner, Sali et al. 2000).

Μέσα από αυτό το πρίσμα, γίνεται αντιληπτό ότι προκειμένου να κατανοηθεί ο μηχανισμός της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, θα πρέπει να χαρακτηριστούν τόσο δομικά όσο και θερμοδυναμικά όλες οι καταστάσεις που μεσολαβούν από μια ξεδίπλωτη πεπτιδική αλυσίδα ως την αναδιπλωμένη πρωτεΐνη (Fersht and Daggett 2002).



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση ενός ενεργειακού τοπίου κατά την αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης. Τα αποδιαταγμένα μόρια που βρίσκονται στην κορυφή του χωνιού μπορούν να οδηγηθούν στην αναδιπλωμένη κατάσταση μέσω πολλών διαφορετικών οδών. Κάποιες από αυτές τις οδούς περιέχουν διακριτές ενδιάμεσες καταστάσεις, που αποτελούν τοπικά ελάχιστα, ενώ άλλες περιέχουν κινητικές παγίδες (misfolded states). Για πρωτεΐνες που αναδιπλώνονται χωρίς διακριτά ενδιάμεσα η επιφάνεια ενός τέτοιου τοπίου θα είναι λεία. (Σχήμα από Radford, 2000).

Στο σχήμα , παρουσιάζονται δυο σημαντικές ενδιάμεσες καταστάσεις της πορείας αναδίπλωσης. Η κατάσταση ‘λιωμένης σφαίρας’ (molten globule state) και τα διάφορα ενδιάμεσα (intermediates). Αυτό που είναι γνωστό για την molten globule κατάσταση είναι ότι εμφανίζεται στην πορεία αναδίπλωσης ορισμένων, τουλάχιστον, πρωτεϊνών και είναι μια εν μέρει, οργανωμένη, σφαιρική κατάσταση (Ohgushi and Wada 1983; Ohgushi and Wada 1984; Kuwajima 1989; Tooze 1999) (Σχήμα 4).

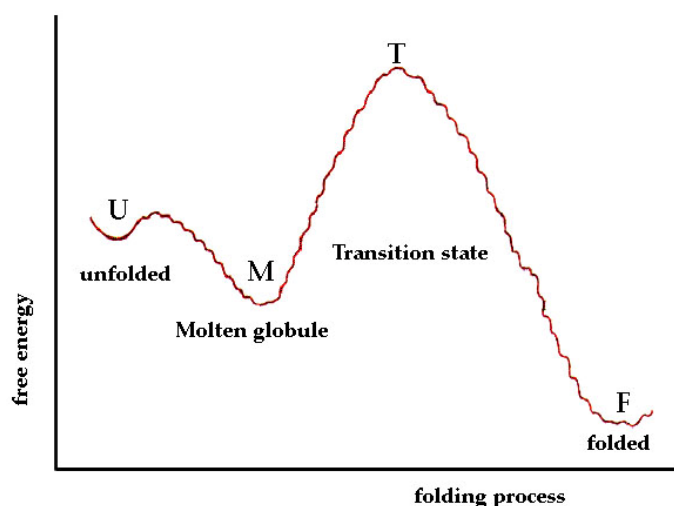


Σχήμα 4. Η κατάσταση molten globule είναι μια σημαντική ενδιάμεση κατάσταση κατά την μετατροπή μιας ξεδιπλωτής αλυσίδας στην αναδιπλωμένη της μορφή. (Σχήμα από Branden and Tooze, 1999).

Αν και λίγα είναι γνωστά για τα γεγονότα που προηγούνται αυτής της κατάστασης, εντούτοις κάποιες ιδιότητές της έχουν διαφωτιστεί. Η κατάσταση molten globule περιέχει μεγάλο ποσοστό των δευτεροταγών στοιχείων της αναδιπλωμένης μορφής, αλλά είναι λιγότερο συμπαγής από αυτήν (Gilmanshin and Ptitsyn 1987; Kuwajima 1989; Toozze 1999). Στο εσωτερικό της πρωτεΐνης δεν έχουν σχηματιστεί πλήρως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι εσωτερικές πλευρικές αλυσίδες είναι εξαιρετικά κινητικές με αποτέλεσμα το εσωτερικό της πρωτεΐνης να είναι περισσότερο ρευστό (molten) σε σχέση με το καλά οργανωμένο εσωτερικό της τελικής αναδιπλωμένης κατάστασης. Επίσης, στοιχεία όπως οι στροφές και οι βρόχοι παραμένουν σχετικά ξεδίπλωτα. Έτσι, η molten globule κατάσταση θεωρείται ως ένα σύνολο αλληλομετατρέπομενων δομών και όχι ως μια μοναδική δομική οντότητα (Toozze 1999).

Οι ενδιάμεσες καταστάσεις (folding intermediates) αποτελούν χαρακτηριστικά σημεία τοπικού ελάχιστου στα ενεργειακά τοπία και μπορεί να περιέχουν αναδιπλωμένα τμήματα της τελικής δομής. Ο ρόλος που έχουν στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης είναι αμφισβητήσιμος. Σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται να αποτελούν σημαντικά στοιχεία της πορείας της πολυπεπτιδικής αλυσίδας προς την αναδίπλωσή της, ενώ άλλες αναφορές υποδεικνύουν ότι είναι καταστάσεις που προκαλούνται από τη μη ειδική κατάρρευση της πεπτιδικής αλυσίδας ή λόγω κινητικής παγίδευσής τους (Brockwell, Smith et al. 2000). Η φύση των ενδιάμεσων αυτών δεν επιτρέπει τον δομικό τους χαρακτηρισμό, καθώς αποτελούν συνεχώς εναλλασσόμενες καταστάσεις με μικρούς, μη ανιχνεύσιμους πληθυσμούς στην κάθε μια (Oliveberg 2001).

Μια, καλύτερα, χαρακτηρισμένη κατάσταση στην πορεία της αναδίπλωσης είναι η λεγόμενη μεταβατική κατάσταση (transition state). Η κατάσταση αυτή αποτελεί το υψηλότερο ενεργειακό σημείο σε ένα μονοπάτι αναδίπλωσης (Σχήμα 5) και εμφανίζει τα εξής χαρακτηριστικά: α. Ένα μόριο που βρίσκεται σε μεταβατική κατάσταση μπορεί να επιστρέψει στην κατάσταση από την οποία προήλθε (unfolded state) με την ίδια συχνότητα με την οποία μετακινείται στην τελική κατάσταση (native state) (de Prat Gay, Ruiz-Sanz et al. 1994; Fersht 1995; Fersht 1995; Daggett, Li et al. 1996; Fersht 2000; Fersht 2000; Daggett 2001; Li and Shakhnovich 2001) (Fersht and Daggett 2002) και β. αποτελεί μια εξαιρετικά συμπαγή κατάσταση, που δεν επηρεάζεται από διαταραχές λόγω μεταλλάξεων ή συμπεριφοράς του διαλύτη (Oliveberg 2001).



Σχήμα 5. Η μετάβαση από την μη αναδιπλωμένη κατάσταση προς την αναδιπλωμένη κατάσταση χαμηλής ενέργειας περιλαμβάνει το πέρασμα από μια μη αναδιπλωμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας (transition state). (Σχήμα τροποποιημένο από Branden and Tooze, 1999).

Στη μελέτη της μεταβατικής κατάστασης βοήθησε σημαντικά η ανακάλυψη μικρών πρωτεϊνών, όπως η CI2 (Jackson and Fersht 1991; Jackson and Fersht 1991; Jackson, elMasry et al. 1993; Jackson, Moracci et al. 1993; de Prat Gay, Ruiz-Sanz et al. 1995; Itzhaki, Neira et al. 1995; Itzhaki, Otzen et al. 1995; Shaw, Davis et al. 1995), οι οποίες αναδιπλώνονται με κινητική 1^{ου} βαθμού (two-state kinetics) και χωρίς την παρουσία ενδιάμεσων. Το 1986 ο Fersht και οι συνεργάτες του εισήγαγαν ένα νέο μέγεθος, το οποίο ονομάζεται ϕ (Fersht 1986). Στην ανάλυση της μεταβατικής κατάστασης με τη χρήση αυτού του μεγέθους, προκαλούνται μεταλλάξεις οι οποίες μπορούν να αλλάξουν ή να εξαλείψουν υπάρχουσες, αδύναμες αλληλεπιδράσεις (Fersht, Leatherbarrow et al. 1987; Fersht 2004; Fersht 2004; Fersht and Sato 2004). Η παράμετρος ϕ ισούται με τον λόγο $\Delta\Delta G^\ddagger/\Delta\Delta G^0$, όπου $\Delta\Delta G^\ddagger$ είναι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης και $\Delta\Delta G^0$ είναι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της αναδίπλωσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης και αποτελεί ένα μέτρο της τρισδιάστατης διαμόρφωσης στην περιοχή της μετάλλαξης. Το ϕ μπορεί να πάρει τιμές από 0 (διαμόρφωση όμοια με αυτή της αποδιαταγμένης κατάστασης) έως 1 (διαμόρφωση όμοια με αυτή της αναδιπλωμένης, φυσικής κατάστασης) (Fersht and Sato 2004). Η ανάλυση της μεταβατικής κατάστασης με την παράμετρο ϕ δύναται να δώσει στοιχεία για το σχηματισμό της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής (Sato, Religa et al. 2004), καθώς και το σημείο εμφάνισης της μεταβατικής κατάστασης στο ενεργειακό τοπίο, που περιγράφει την αναδίπλωση της, υπό μελέτη, πρωτεΐνης (Hedberg and Oliveberg 2004).

Πρωτεΐνες-μοντέλα στις εργασίες τους αποτελούν η προαναφερθείσα CI2, η tRNA συνθετάση της τυροσίνης (Fersht, Wilkinson et al. 1985; Fersht and Winter 1985; Leatherbarrow, Fersht et al. 1985; Fersht 1987; Ward, Jones et al. 1987; Fersht, Knill-Jones et al. 1988; Fersht and Wells 1991) και η πρωτεΐνη barnase (Matouschek, Kellis et al. 1989; Bycroft, Matouschek et al. 1990; Matouschek, Kellis et al. 1990; Bycroft, Ludvigsen et al. 1991; Sali, Bycroft et al. 1991; Fersht, Matouschek et al. 1992; Matouschek, Serrano et al. 1992; Sancho, Neira et al. 1992; Serrano, Kellis et al. 1992; Serrano, Matouschek et al. 1992; Sanz, Johnson et al. 1994; Fersht 1995; Matouschek, Otzen et al. 1995; Oliveberg and Fersht 1996; Fersht 2000; Khan, Chuang et al. 2003; Salvatella, Dobson et al. 2005). Ανάμεσα στα ενδιαφέροντα αποτελέσματα των εργασιών τους είναι η διαπίστωση ότι η δομή της μεταβατικής κατάστασης καθορίζεται από την τοπολογία της αναδιπλωμένης μορφής της πρωτεΐνης, χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα από συγκεκριμένες πλευρικές αλυσίδες (Plaxco, Simons et al. 1998).

Όλα αυτά οδηγούν στη διατύπωση ενός νέου μοντέλου για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, που ονομάζεται ‘συμπύκνωση πυρήνων’ (nucleation condensation) (Fersht 1995; Daggett and Fersht 2003). Το μοντέλο αυτό είναι στην ουσία ένας συνδυασμός των μοντέλων που πρότειναν ο Levinthal και οι Levit και Warshel. Σύμφωνα με αυτό τριτοταγείς, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται ταυτόχρονα με τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης.

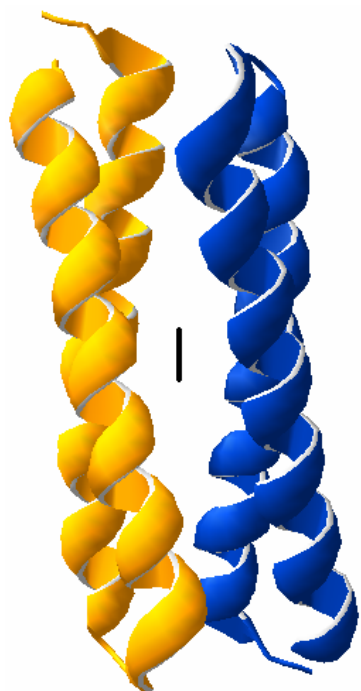
Τελικά, είναι φανερό ότι μέχρι σήμερα έχουν γίνει σημαντικά βήματα στην προσπάθεια κατανόησης της διαδικασίας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη ποικιλία της αρχιτεκτονικής των πρωτεϊνών, το διαφορετικό κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο αναδιπλώνονται και τη διαφορετική πίεση που δέχονται κατά την πορεία της εξέλιξης, θεωρείται μάλλον απίθανο να υπάρχει ένας μοναδικός μηχανισμός της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (Fersht and Daggett 2002).

1.3 Η πρωτεΐνη Rop

Η Rop είναι μια μικρή ομοδιμερής πρωτεΐνη. Κάθε μονομερές αποτελείται από 63 κατάλοιπα και το μοριακό βάρος του ομοδιμερούς είναι 14456Da (Lacatena, Banner et al. 1984; Castagnoli, Scarpa et al. 1989). Το γονίδιο *rop* βρίσκεται στα περισσότερα πλασμίδια της οικογένειας των ColE1 πλασμιδίων της *E.coli* και το προϊόν του συμμετέχει στο μηχανισμό που ελέγχει τον αριθμό των αντιγράφων των πλασμιδίων αυτών (Banner, Kokkinidis et al. 1987; Castagnoli, Scarpa et al. 1989). Συγκεκριμένα, τα ColE1 πλασμίδια έχουν αναπτύξει ένα ρυθμιστικό μηχανισμό μέσω του οποίου καταφέρνουν να διατηρούν ένα σταθερό αριθμό αντιγράφων τους μέσα στα κύτταρα. Αυτό κατορθώνεται με έναν αρνητικό έλεγχο της συχνότητας των γεγονότων έναρξης της αντιγραφής μέσω της αλληλεπίδρασης των RNA I και RNA II μορίων και της Rop. Αρχικά το RNA II μόριο υβριδίζεται σε συγκεκριμένη θέση στο DNA, κάτι που είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής και στη συνέχεια το RNA I μόριο και η Rop δρουν ανασταλτικά: Το μεν πρώτο αλληλεπιδρά με το RNA II και δεν επιτρέπει τη συνέχιση της αντιγραφής, η δε Rop λειτουργεί έμμεσα βοηθώντας στη σωστή τοποθέτηση των δυο RNA μορίων (Castagnoli, Scarpa et al. 1989). Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η Rop ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων σε μια θέση υποκινητή όπου προσδένεται ένας RNA εκκινητής (RNA II) και για αυτό ονομάστηκε Rop (Repressor Of Primer) (Cesareni, Muesing et al. 1982; Cesareni, Cornelissen et al. 1984; Tomizawa and Som 1984). Ωστόσο, η Rop δεν δρα ως κλασσικός καταστολέας, αλλά ως ενισχυτής της δράσης του RNA I μορίου, για αυτό συναντάται και με το όνομα Rom (RNA I Modulator) (Castagnoli, Scarpa et al. 1989).

Η δομή της Rop έχει προσδιοριστεί με μεθόδους κρυσταλλογραφίας (Banner, Kokkinidis et al. 1987) και NMR (Eberle, Pastore et al. 1991) και παρουσιάζεται στην εικόνα 1. Το μόριο είναι ομοδιμερές και τα δυο μονομερή σχετίζονται, μεταξύ τους, με έναν διπλό άξονα συμμετρίας. Κάθε μονομερές αποτελείται από δυο α -έλικες που συνδέονται με ένα βρόχο (loop) που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Asp30, Ala31 και Asp32. Η Rop είναι ένα αριστερόστροφο, αντιπαράλληλο 4- α -ελικοειδές δεματίο (4- α -helix bundle), στο οποίο οι υδρόφοβες πλευρικές ομάδες πακετάρονται στο εσωτερικό του μορίου σύμφωνα με το μοντέλο 'κουμπιά σε τρύπες' ('knobs in holes' model), ενώ οι υδρόφιλες ομάδες βρίσκονται εκτεθειμένες στην επιφάνεια του μορίου. Αυτή η διεύθυνση είναι χαρακτηριστική για τα α -ελικοειδή δεμάτια και έχει

ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υδρόφοβου πυρήνα. Άλλες πρωτεΐνες στις οποίες εμφανίζεται το πρότυπο του 4-ελικοειδούς δεματίου είναι η αιμερυθρίνη, η μυοαιμερυθρίνη, το κυτόχρωμα c, το κυτόχρωμα b₅₆₂ και η φερριτίνη (Tooze 1999).



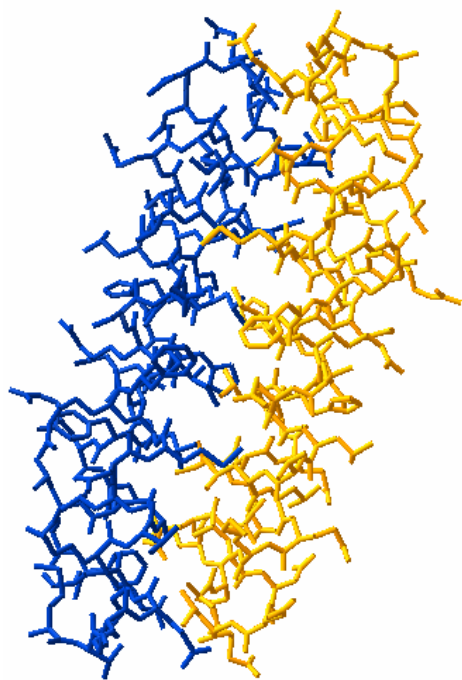
Εικόνα 1. Η δομή της Rop (Banner, Kokkinidis et al., 1987). Τα δυο μονομερή είναι χρωματισμένα μπλε και πορτοκαλί, αντίστοιχα. Στην εικόνα απεικονίζεται ο διπλός άξονας συμμετρίας. (PDB ID: 1ROP).

Τα α-ελικοειδή δεμάτια, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης Rop, εμφανίζουν το πρότυπο της επανάληψης της επτάδας (heptad's pattern repeat). Σύμφωνα με αυτό το πρότυπο, συσχετιζόμενες α-έλικες εμφανίζουν μια περιοδικότητα επτά αμινοξέων στην αλληλουχία τους, που συνήθως περιγράφονται με τα γράμματα a-g [(a, b, c, e, f, g)_n] (Crick 1953; Cohen 1986). Το πρώτο (a) και το τέταρτο (d) κατάλοιπο της επτάδας είναι υδρόφοβα και υπεύθυνα για το σχηματισμό του υδρόφοβου πυρήνα (Banner, Kokkinidis et al. 1987). Τα κατάλοιπα που βρίσκονται στη θέση f είναι, κυρίως, υδρόφιλα και περισσότερο εκτεθειμένα στο διάλυμα.

Οι Παλιακάσης και Κοκκινίδης διερεύνησαν τη σχέση αλληλουχίας-δομής σε διάφορα ελικοειδή δεμάτια σε συνάρτηση με τη συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων αμινοξέων στις θέσεις της επαναλήψιμης επτάδας (Paliakasis and Kokkinidis 1992). Σε αυτή την εργασία αναφέρουν ότι σχεδόν το 50% των καταλοίπων στις θέσεις a και d της επτάδας είναι αλανίνη, λευκίνη και φαινυλαλανίνη, με 50% των καταλοίπων στη θέση d να είναι αλανίνη ή λευκίνη. Αντίθετα, τα υδρόφιλα κατάλοιπα των εξεταζόμενων δεμάτων εμφανίζουν πιο ισορροπημένη κατανομή στις εκτεθειμένες

θέσεις των μορίων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι περίπου το 10% των θέσεων a και d καταλαμβάνονται από υδρόφιλα αμινοξέα και το 10-20% των εκτεθειμένων θέσεων b και c από υδρόφοβα. Επίσης, τα αποτελέσματα τους δείχνουν πιο ισορροπημένη κατανομή των αμινοξέων στις θέσεις e και g.

Η επανάληψη της επτάδας στη Rop έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται 8 διακριτές φέτες (slices) (κάθετα στον κατακόρυφο άξονα του ομοδιμερούς) από τις θέσεις a και d που σχηματίζουν τον υδρόφοβο πυρήνα και να δίνεται η εντύπωση της δημιουργίας σκάλας (Εικόνα 2). Η επανάληψη της επτάδας στο μόριο της Rop διακόπτεται μόνο στην περιοχή της στροφής (Πίνακας 1). Αυτή ακριβώς η απόκλιση από το πρότυπο της επτάδας έχει υποθεθεί ότι είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό της στροφής στο μόριο της Rop (Banner, Kokkinidis et al. 1987; Glykos, Papanikolaou et al. 2006) και αποτελεί τη βάση για τη δημιουργία ποικίλων μεταλλαγμάτων (Castagnoli, Scarpa et al. 1989; Vlassi, Steif et al. 1994; Lassalle and Hinz 1998; Lassalle, Hinz et al. 1998; Glykos, Papanikolaou et al. 2006), καθώς και ορισμένων μεταλλαγμάτων της παρούσας εργασίας (βλ. παρακάτω). Ωστόσο, η Rop δεν είναι η μόνη πρωτεΐνη στην οποία παρατηρείται αυτή η διαταραχή της επτάδας. Άλλες πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες, όπως η μυοσίνη και ενδιάμεσα ινίδια εμφανίζουν παρόμοιες αποκλίσεις από το πρότυπο των επαναλήψιμων επτάδων (Banner, Kokkinidis et al. 1987).



Εικόνα 2. Οι 8 φέτες (slices) του υδρόφοβου πυρήνα, που σχηματίζονται από τις θέσεις a και d, δίνουν την εντύπωση σκάλας.

Πίνακας 1. Η ανάθεση των θέσεων της επτάδας στα κατάλοιπα της Rop. Θεωρητικά, λείπουν δυο κατάλοιπα σε θέσεις f και g τις οποίες καλύπτει η Ala31. Η τελευταία σειρά (από Gly57) αποτελείται από τα ευκίνητα καρβοξυ-τελικά κατάλοιπα.

	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)

Η πρωτεΐνη Rop έχει μελετηθεί εκτεταμένα ως προς τον τρόπο με τον οποίο λειτουργεί σε μοριακό επίπεδο και αποτελεί μέρος ενός μηχανισμού-μοντέλου της αντιγραφής των πλασμιδίων. Ωστόσο, μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η δομή της. Η Rop είναι ένα μικρό, ομοδιμερές, 4-α-ελικοειδές δεμάτιο με σχετικά απλή δομή, δυνατότητες εφαρμογής πρωτεϊνικής μηχανικής και διερεύνησης θερμοδυναμικών και κινητικών παραμέτρων, καθώς και χρησιμοποίησής της ως μοντέλου για τη μελέτη του τρόπου αναδίπλωσης των 4-α-ελικοειδών δεμάτων και των α-ελικοειδών δομών, γενικότερα (Banner, Kokkinidis et al. 1987; Steif, Weber et al. 1993; Peters, Hinz et al. 1997; Glykos, Papanikolau et al. 2006).

1.4 Η πρωτεΐνη Rop ως μοντέλο

Μετά τον προσδιορισμό της δομής της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (Banner, Kokkinidis et al. 1987; Eberle, Pastore et al. 1991), η Rop έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως μοντέλο για τη διαλεύκανση μιας πλειάδας ερωτημάτων: Ποια πορεία ακολουθεί η αναδίπλωση των 4-α-ελικοειδών δεμάτων; Ποια είναι τα στοιχεία που οδηγούν στη

σταθερότητά τους; Ποιος είναι ο ρόλος της στροφής στην αναδίπλωση και σταθερότητα των πρωτεϊνών; Ποιος ο ρόλος του υδρόφοβου πυρήνα και του προτύπου της επανάληψης της επτάδας; Ποικίλες τεχνικές έχουν επιστρατευτεί στην προσπάθεια απάντησης αυτών των ερωτημάτων, όπως κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, φασματοσκοπικές, κινητικές και θερμοδυναμικές μελέτες, καθώς και εξομοιώσεις μοριακών δυναμικών (Molecular Dynamics simulations).

1.4.1 Μελέτες της αγρίου τύπου (wt) Rop

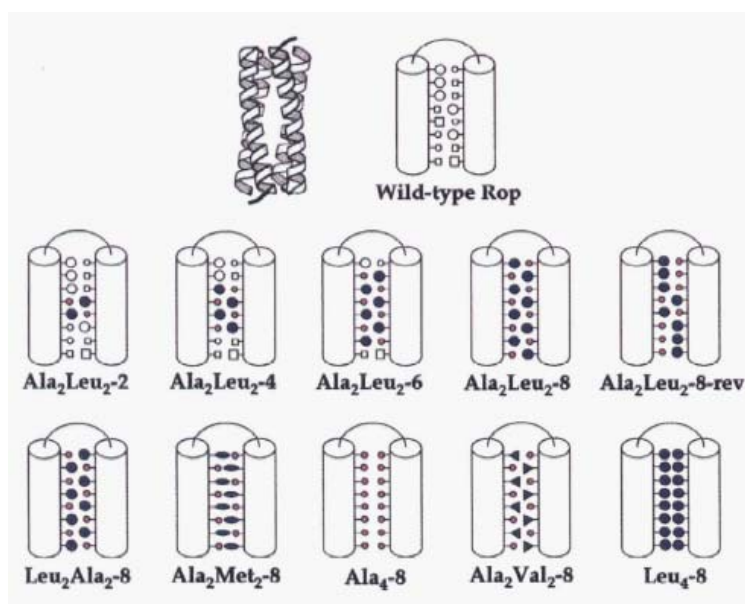
Οι θερμοδυναμικές μελέτες, που έχουν γίνει πάνω στην αγρίου τύπου Rop, έχουν αποδείξει ότι πρόκειται για ιδιαίτερα σταθερό μόριο (Steif, Weber et al. 1993; Rosengarth, Rosgen et al. 1999). Κατά την αποδιάταξή της, η πρωτεΐνη εμφανίζει κινητική δεύτερης τάξης με $T_m=71^\circ\text{C}$ και μεταβολή ελεύθερης ενέργειας $\Delta G_D^0=71.7\text{kJ/mol}$ of dimer. Η μεταβολή αυτή είναι εξαιρετικά υψηλή, τουλάχιστον συγκρινόμενη με άλλες μεσόφιλες, σφαιρικές πρωτεΐνες. Για την αποδιάταξη της Rop έχει προταθεί ότι γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση: $\text{N}_2 \leftrightarrow 2\text{N}^* \leftrightarrow 2\text{D}$, όπου N^* είναι τα ενδιάμεσα μονομερή. Οι θερμοδυναμικές μελέτες της wtRop υπογραμμίζουν τη σημασία της ειδικής αλληλεπίδρασης των υδρόφοβων καταλοίπων των γειτονικών αλυσίδων στη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Ωστόσο, άλλες μελέτες (Nagi, Anderson et al. 1999) αμφισβητούν την κινητική δεύτερης τάξης της Rop και προτείνουν την παρουσία ενδιάμεσων κατά την αποδιάταξη του μορίου.

1.4.2 Μελέτες μεταλλαγών και παραλλαγών του υδρόφοβου πυρήνα

Ο υδρόφοβος πυρήνας της Rop έχει μελετηθεί εκτεταμένα ως προς τη σημασία του στη σταθερότητα και στον τρόπο αναδίπλωσης της πρωτεΐνης (Munson, O'Brien et al. 1994; Steif, Hinz et al. 1995; Nagi, Anderson et al. 1999; Vlassi, Cesareni et al. 1999; Willis, Bishop et al. 2000). Το αποτέλεσμα είναι μια ποικιλία μεταλλαγμάτων στα κατάλοιπα που σχηματίζουν το υδρόφοβο εσωτερικό της Rop. Σε μια μελέτη επανασχεδιασμού του υδρόφοβου πυρήνα της Rop (Munson, O'Brien et al. 1994), τα κατάλοιπα του υδρόφοβου πυρήνα αντικαταστάθηκαν από τα περισσότερο συμβατά, με τις θέσεις a και d της επτάδας, αμινοξέα αλανίνη και λευκίνη. Η μια παραλλαγή της Rop αφορά στον επανασχεδιασμό και των οκτώ στρωμάτων με σκοπό να διερευνηθεί, παράλληλα, η σημασία των δυο ασυνήθιστων εξωτερικών στρωμάτων της wtRop, που περιέχουν ένα κατάλοιπο φαινυλαλανίνης (Phe56). Η δεύτερη

παραλλαγή αφορά στον επανασχεδιασμό των έξι εσωτερικών στρωμάτων, αφήνοντας ανέπαφα τα εξωτερικά στρώματα. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας είναι ενδιαφέροντα, καθώς δείχνουν ότι οι δυο αυτές παραλλαγές είναι περισσότερο σταθερές ($T_m=82^\circ\text{C}$ και 91°C , αντίστοιχα) από την wtRop, διατηρώντας τα δομικά χαρακτηριστικά της εγγενούς πρωτεΐνης.

Σε μια επόμενη εργασία (Munson, Balasubramanian et al. 1996) μελετήθηκαν ποικίλες παραλλαγές της Rop, που αφορούν στη διαφοροποίηση είτε του αριθμού των στρωμάτων αλανίνης και λευκίνης, είτε του είδους των καταλοίπων στις θέσεις a και d της επτάδας. Οι διάφορες παραλλαγές που σχεδιάστηκαν παρουσιάζονται στο σχήμα 6 και διακρίνονται σε τρεις ομάδες: Η ομάδα I αποτελείται από όλες τις Ala₂Leu₂ παραλλαγές και την παραλλαγή Ala₂Leu₂-8-rev. Η ομάδα II περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Leu₂Ala₂ και Ala₂Ile₂ και η ομάδα III τις παραλλαγές Ala₂Met₂, Ala₂Val₂ και Ala₄. Οι πρωτεΐνες Ala₂Val₂ και Ala₄ σχεδιάστηκαν με στόχο τη διαταραχή του πακεταρίσματος (underpacking) του πυρήνα, ενώ η πρωτεΐνη Leu₄ αποσκοπεί στην ενίσχυση του πακεταρίσματος (overpacking) του υδρόφοβου πυρήνα.



Σχήμα 6. Οι παραλλαγές του υδρόφοβου πυρήνα της Rop. Η σχηματική απεικόνιση των καταλοίπων έχει ως εξής: Μεγάλοι κύκλοι: κατάλοιπα λευκίνης, μικροί κύκλοι: κατάλοιπα αλανίνης, μεγάλα τετράγωνα: κατάλοιπα με μεγάλες πλευρικές αλυσίδες (εκτός λευκίνης), μικρά τετράγωνα: κατάλοιπα με μικρές πλευρικές αλυσίδες (εκτός αλανίνης), ελλείψεις: κατάλοιπα μεθειονίνης, τρίγωνα: κατάλοιπα βαλίνης. Οι χρωματισμένες πλευρικές αλυσίδες υποδεικνύουν τα νέα στρώματα. (Σχήμα από Munson, Balasubramanian et al., 1996).

Οι παραλλαγές της ομάδας I εμφανίζουν αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με την wtRop, ενώ φαίνεται να είναι πολύ όμοιες, δομικά, με την τελευταία. Επίσης, οι μελέτες αυτών των παραλλαγών δείχνουν ότι μπορούν να αναγνωρίζουν και να δεσμεύονται στο RNA υπόστρωμα της Rop με συγγένεια παρόμοια με αυτή της wtRop. Οι παραλλαγές της ομάδας II χαρακτηρίζονται από την ανικανότητά τους να δεσμευθούν στο RNA. Αν και οι πρωτεΐνες αυτές είναι εξαιρετικά σταθερές και φαίνεται να διατηρούν υψηλά ποσοστά α-έλικας, η τρισδιάστατη δομή τους θα πρέπει να διαφέρει σημαντικά από αυτή της wtRop. Επίσης, οι παραλλαγές της ομάδας III στερούνται της ικανότητας να δεσμευθούν στο RNA και είναι λιγότερο σταθερές από την wtRop.

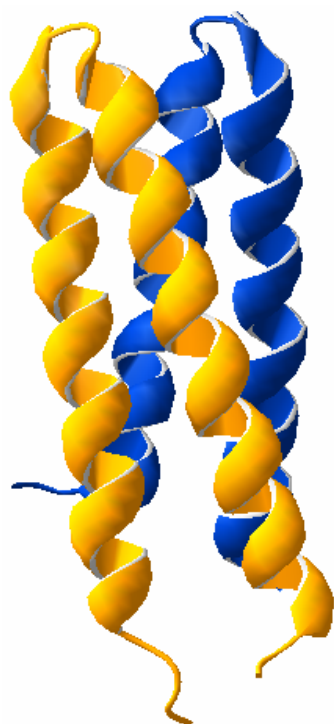
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραλλαγή Leu4. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται ότι σχηματίζει τετραμερές και είναι εξαιρετικά σταθερή κάτι που σημαίνει ότι η αυξημένη υδροφοβικότητα και αλληλεπίδραση του εσωτερικού αυτού του μορίου μπορεί να αντισταθμίσει το ενεργειακό κόστος του κακού πακεταρίσματος.

Οι μελέτες των παραπάνω παραλλαγών του υδρόφοβου πυρήνα της Rop καταδεικνύουν τη μεγάλη σημασία της ύπαρξης ευνοϊκών στερικών αλληλεπιδράσεων στο εσωτερικό μιας πρωτεΐνης και του σωστού πακεταρίσματος του υδρόφοβου πυρήνα, προκειμένου η πρωτεΐνη να είναι σταθερή.

Η δομή της παραλλαγής Ala2Ile2-6 έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφική ανάλυση (Willis, Bishop et al. 2000) (Εικόνα 3). Στην πρωτεΐνη αυτή όλες οι θέσεις a των έξι εσωτερικών στρωμάτων έχουν καλυφθεί από αλανίνες και οι θέσεις d των αντίστοιχων στρωμάτων από ισολευκίνες. Αν και η Ala2Ile2-6 εξακολουθεί να είναι ένα αντιπαράλληλο 4-α-ελικοειδές δεμάτιο, εντούτοις η επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δυο μονομερών έχει αλλάξει λόγω μιας αναστροφής κατά 180° του ενός μονομερούς σε σχέση με το άλλο. Αυτό οδηγεί στην αλλαγή του προσανατολισμού του μορίου με τις δυο στροφές να βρίσκονται στο ένα άκρο του δεματίου και τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα στο άλλο. Αυτή η αλλαγή είναι υπεύθυνη και για την απώλεια της δραστηριότητας αυτού του μορίου. Η δομή της Ala2Ile2-6 δείχνει ότι το μόριο έχει αποκτήσει την syn τοπολογία, σε αντίθεση με την anti τοπολογία της wtRop.

Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην ανάγκη ερμηνείας των αποτελεσμάτων και των υπόλοιπων παραλλαγών σε ότι αφορά τη δομή και την τοπολογία τους. Σε μια μεταγενέστερη μελέτη (Levy, Cho et al. 2005) προτείνεται ότι οι θερμοδυναμικές και λειτουργικές ιδιότητες των υπόλοιπων παραλλαγών του υδρόφοβου πυρήνα μπορεί

να οφείλονται στην υιοθέτηση της *syn* τοπολογίας (ή παρόμοιας), όπως και στην περίπτωση της Ala2Ile2-6.



Εικόνα 3. Η δομή της παραλλαγής Ala2Ile2-6 της Rop (Willis, Bishop et al., 2000). Η πρωτεΐνη έχει αποκτήσει *syn* τοπολογία. (PDB ID: 1F4N).

Δυο άλλα μεταλλάγματα της Rop, το Leu41Val και το Leu41Ala, σχεδιάστηκαν με σκοπό τη μελέτη των επιπτώσεων, που θα μπορούσε να έχει, στη δομή και στη σταθερότητα του μορίου η δημιουργία κοιλοτήτων στον υδρόφοβο πυρήνα της Rop (Steif, Hinz et al. 1995; Vlassi, Cesareni et al. 1999). Οι θερμοδυναμικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι τα μεταλλάγματα αυτά έχουν μειωμένη σταθερότητα και μειωμένα ποσοστά α -έλικας σε σχέση με τη wtRop. Η τρισδιάστατη δομή αυτών των μεταλλαγμάτων προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά (Vlassi, Cesareni et al. 1999) και είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι δομικές αλλαγές σε σχέση με την wtRop περιορίζονται κοντά στην περιοχή των μεταλλαγών.

Συγκεκριμένα, τα δυο μεταλλάγματα σχηματίζουν καλοσχηματισμένα 4- α -ελικοειδή δεμάτια με μικρές αποκλίσεις από τη δομή της wtRop. Οι διαφορές εντοπίζονται στη μικρή κλίση της δεύτερης έλικας προς την κοιλότητα που σχηματίζεται από τα νέα κατάλοιπα, στην παρουσία ενός επιπλέον μορίου νερού στο κέντρο του υδρόφοβου πυρήνα του L41A μεταλλάγματος καθώς και στην αυξημένη κινητικότητα των

καταλοίπων του πυρήνα και, κυρίως, των καταλοίπων Ile15 και Thr19. Τα δυο τελευταία πακετάρονται απέναντι από τη θέση μετάλλαξης στο επίπεδο του διμερούς.

1.4.3 Μελέτες μεταλλαγών και παραλλαγών της στροφής

Ως στροφή μπορεί να οριστεί η περιοχή μιας πρωτεΐνης όπου η πολυπεπτιδική αλυσίδα αλλάζει την κατεύθυνσή της (Rose 1985; Castagnoli, Vetriani et al. 1994). Οι στροφές εμφανίζονται συχνά στις σφαιρικές πρωτεΐνες, καθώς αποτελούν σχεδόν το 1/3 του μορίου (Castagnoli, Vetriani et al. 1994). Ωστόσο, ο ρόλος των στροφών και των βρόχων στην αναδίπλωση και στη σταθερότητα των πρωτεϊνών είναι αμφιλεγόμενος. Είναι απλά συνδεδετικοί κρίκοι μεταξύ των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής ή έχουν έναν πιο ενεργό ρόλο στον καθορισμό του μονοπατιού της αναδίπλωσης και της τελικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης; (Nagi and Regan 1997; Nagi, Anderson et al. 1999).

Τα διάφορα μοντέλα της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών δίνουν διαφορετική αξία στην ύπαρξη των στροφών. Έτσι, από τη μια υπάρχουν τα μοντέλα που υποστηρίζουν ότι η αναδίπλωση οφείλεται στο σχηματισμό της δευτεροταγούς δομής, οπότε οι στροφές διαδραματίζουν λιγότερο ενεργό ρόλο, ενώ από την άλλη οι στροφές φαίνεται να δρουν πιο ενεργά σε μοντέλα, όπως αυτό της διάχυσης και σύγκρουσης (diffusion-collision model) (Karplus and Weaver 1976), όπου σχηματιζόμενα δευτεροταγή στοιχεία πρέπει να έρθουν κοντά για την τελική διαμόρφωση του μορίου.

Ο ρόλος των στροφών έχει αποτελέσει στόχο ποικίλων μελετών: Κάποιες από αυτές αποδίδουν στις στροφές σημαντικό ρόλο στην πορεία της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης (Dyson, Rance et al. 1988; Chou, Maggiora et al. 1992; Nagi, Anderson et al. 1999), ενώ σε άλλες μελέτες, τους αποδίδεται δευτερεύων ρόλος. Αυτό που φαίνεται να ισχύει, περισσότερο, είναι ότι ο ρόλος των στροφών και βρόχων εξαρτάται από τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη στην οποία βρίσκονται, από την τοπολογική τους θέση μέσα σε αυτήν και από το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται (Leszczynski 1986; Brunet, Huang et al. 1993; Ybe and Hecht 1996; Zhou 1996; Peters, Hinz et al. 1997; Nagi, Anderson et al. 1999). Ποιος, όμως ο ρόλος της στροφής στην Rop;

Όπως προαναφέρθηκε, η στροφή (ή βρόχος) που σχηματίζεται στο μόριο της Rop αποτελείται από τρία, κυρίως, κατάλοιπα: Asp30, Ala31 και Asp32 (Εικόνα 4), αν και η δομή της α -έλικας 1 έχει ήδη διαταραχθεί στο κατάλοιπο Leu29, το οποίο εμφανίζει χαρακτήρα 3_{10} έλικας. Το κατάλοιπο Ala31 ξεχωρίζει όχι μόνο για την ασυνήθιστη διαμόρφωσή του ($\phi = -94^\circ$, $\psi = 89^\circ$), αλλά και για το γεγονός ότι είναι το μοναδικό

κατάλοιπο που σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και με τις δυο έλικες. Το κατάλοιπο Asp30 εμφανίζει διαμόρφωση αριστερόστροφης α-έλικας ($\phi= 57^\circ$, $\psi= 38^\circ$) και το ασπαρτικό οξύ στη θέση 32 εμφανίζει περισσότερο α-ελικοειδή στερεοδιαμόρφωση ($\phi= -59^\circ$, $\psi= -54^\circ$) και αποτελεί την αρχή της δεύτερης έλικας.

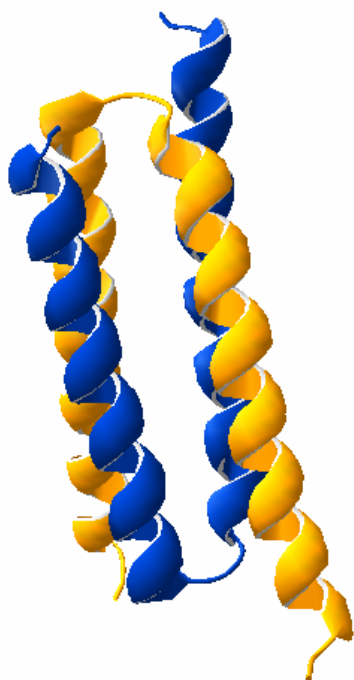


Εικόνα 4. Η στροφή της Rop. Παρουσιάζεται το μονομέρες της Rop και τα κατάλοιπα της στροφής είναι χρωματισμένα μπλε.

Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο ρόλος των συγκεκριμένων καταλοίπων στο σχηματισμό της στροφής της Rop, τα τρία κατάλοιπα Asp30, Ala31 και Asp32 αντικαταστάθηκαν από άλλα αμινοξέα με διαφορετικές φυσικοχημικές και στερεοχημικές ιδιότητες (Castagnoli, Vetriani et al. 1994). Η συστηματική αντικατάσταση των καταλοίπων της στροφής οδήγησε σε μια συλλογή 380 μεταλλαγμάτων, από τα οποία τα περισσότερα (>99%) δεν φαίνεται να επηρεάζουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης σε 4-α-ελικοειδές δεμάτιο. Τα πειράματα αυτής της εργασίας προτείνουν ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των καταλοίπων της στροφής δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του δεματίου και ότι η δομική πληροφορία που εμπεριέχεται στη στροφή είναι δευτερεύουσας σημασίας.

Ωστόσο, μια σημειακή μετάλλαξη στη θέση 31 έδωσε νέες διαστάσεις στο ρόλο των καταλοίπων της στροφής. Η μετάλλαξη Ala31Pro σχεδιάστηκε με βάση τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της προλίνης, που είναι πολύ διαφορετικά από αυτά της αλανίνης (Castagnoli, Scarpa et al. 1989; Castagnoli, Vetriani et al. 1994; Peters, Hinz et al. 1997; Glykos, Cesareni et al. 1999; Glykos and Kokkinidis 2004). Το

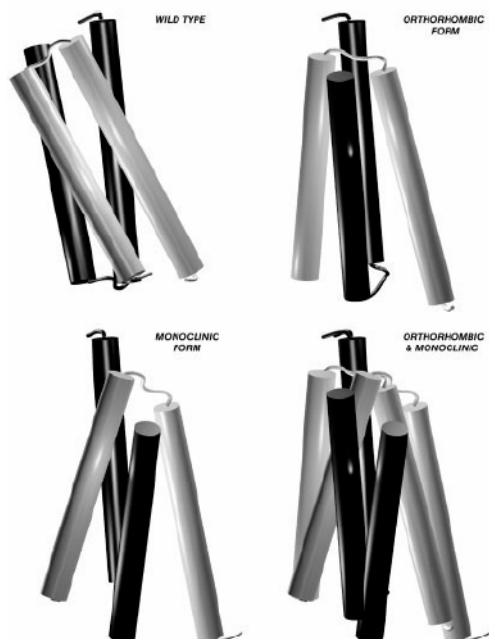
μετάλλαγμα αυτό διατηρεί, εν μέρει, την ικανότητα να δεσμεύει το RNA υπόστρωμά του, ωστόσο είναι τελείως διαφορετικό από την wtRop σε όλους τους άλλους τομείς. Το μόριο είναι πολύ πιο ασταθές από την wtRop και έχει μειωμένη περιεκτικότητα σε α -έλικα (Peters et al., 1997). Η δομή της A31P προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά (Glykos, Cesareni et al. 1999) και παρουσιάζεται στην εικόνα 5. Όπως φαίνεται, η διευθέτηση των α -ελίκων έχει αλλάξει τελείως σε σχέση με την wtRop και το μόριο έχει αποκτήσει διχοτόμο U τοπολογία (bisecting U topology) (Glykos, Cesareni et al. 1999; Levy, Cho et al. 2005). Η πρωτεΐνη έχει μετατραπεί από αριστερόστροφο, αντιπαράλληλο δεμάτιο σε δεξιόστροφο μείγμα δεξιόστροφων και αριστερόστροφων ελίκων. Εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στην A31P έχει αλλάξει και η στροφή: Στο νέο μόριο, η στροφή ξεκινά από το κατάλοιπο Asn27 και τελειώνει στο Asp30, ενώ η προλίνη, που βρίσκεται σε trans διαμόρφωση, δεν συμμετέχει άμεσα στο σχηματισμό της στροφής (Glykos, Cesareni et al. 1999).



Εικόνα 5. Η δομή της A31P Rop (Glykos, Cesareni et al. 1999). Η τοπολογία της πρωτεΐνης έχει αλλάξει δραστικά με μια σημειακή μετάλλαξη. (PDB ID: 1B6Q, 1GMG).

Το μετάλλαγμα αυτό παρουσιάζει δυο, μερικώς, διαφορετικές διαμορφώσεις (εικόνα 6) και φαίνεται να αποτελεί μια κατάσταση molten globule, στην οποία έχει παγιδευτεί, ενεργειακά, το δεμάτιο της Rop (Glykos and Kokkinidis 2004). Οι μελέτες πάνω σε αυτό το μετάλλαγμα δείχνουν ότι μια, μόνο, σημειακή μετάλλαξη

είναι ικανή να αλλάξει πλήρως τη διαμόρφωση ενός μορίου και ότι, στην περίπτωση της Rop, υπάρχει κάποια δομική πληροφορία στην περιοχή της στροφής.



Εικόνα 6. Η A31P Rop κρυστάλλωσε σε δυο διαφορετικές συνθήκες και σε δυο διαφορετικές διαμορφώσεις (ορθορομβική και μονοκλινής), οι οποίες διαφέρουν τόσο ώστε όταν διατηρείται σταθερή μια έλικα (ο κύλινδρος στο βάθος) οι υπόλοιπες έλικες δεν συμπίπτουν (Εικόνα από Glykos and Kokkinidis., 2004).

Μια διαφορετική προσέγγιση στη διερεύνηση του ρόλου της στροφής της Rop αφορά στην αντικατάσταση των καταλοίπων της στροφής με 2 ή περισσότερα κατάλοιπα γλυκίνης (Nagi, Anderson et al. 1999). Οι μελέτες αυτών των μεταλλαγμάτων δείχνουν ότι η παρουσία καταλοίπων γλυκίνης στη στροφή της Rop επιταχύνει τόσο την επαναδιάταξη, όσο και την αποδιάταξη της Rop με επιβράδυνση της πρώτης και επιτάχυνση της δεύτερης όσο αυξάνει ο αριθμός των παρεμβαλλόμενων γλυκινών στη στροφή. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της στροφής στην πορεία αναδίπλωσης της Rop.

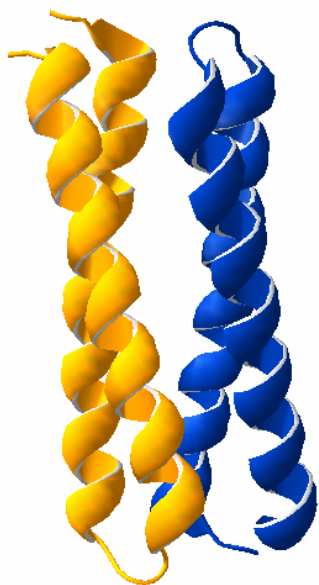
1.4.4 Μελέτες του προτύπου της επανάληψης της επτάδας (heptad's pattern repeat)

Όπως προαναφέρθηκε, το πρότυπο της επανάληψης της επτάδας εμφανίζεται σε όλα τα α -ελικοειδή δεμάτια και στην περίπτωση της Rop διακόπτεται μόνο στην περιοχή της στροφής. Αυτό διαπιστώνεται εύκολα από την ανάθεση των καταλοίπων της Rop στις θέσεις της επαναλήψιμης επτάδας (Πίνακας 1), όπου το κατάλοιπο Ala31 της στροφής καταλαμβάνει τρεις θέσεις. Αυτή η διαπίστωση οδηγεί στο εξής ερώτημα:

Θα μπορούσε η αποκατάσταση της επτάδας με τη χρήση της πρωτεϊνικής μηχανικής να παράγει μόρια με διαφορετικές ιδιότητες από αυτές της wtRop;

Στην προσπάθεια να απαντηθεί αυτό το ερώτημα δημιουργήθηκαν δυο παραλλαγές της Rop: Στη μια παραλλαγή (2αα) έχουν προστεθεί 2 αλανίνες εκατέρωθεν του Asp30 με σκοπό την αποκατάσταση μιας συνεχούς επτάδας (Castagnoli, Scarpa et al. 1989; Vlasi, Steif et al. 1994), ενώ στην άλλη παραλλαγή (RM6) έχουν διαγραφεί πέντε κατάλοιπα (Asp30 μέχρι και Gln34) σχηματίζοντας ένα μόριο με αποκαταστημένη επανάληψη επτάδας, αλλά με επτά αμινοξέα λιγότερα από το 2αα μετάλλαγμα (Castagnoli, Scarpa et al. 1989; Lassalle and Hinz 1998; Lassalle, Hinz et al. 1998; Glykos, Papanikolaou et al. 2006).

Η συμπεριφορά και η διαμόρφωση του πρώτου μεταλλάγματος είναι διαφορετική από ότι αναμενόταν. Το μόριο παρουσιάζει θερμοδυναμικές παραμέτρους εξαιρετικά όμοιες με αυτές της wtRop και η τριτοταγής διαμόρφωσή της έχει αλλάξει ελάχιστα (Vlasi, Steif et al. 1994) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Η δομή του μεταλλάγματος 2αα είναι εξαιρετικά όμοια με αυτή της αγρίου τύπου Rop (Vlasi, Steif et al. 1994). (PDB ID: 1NKD).

Από την άλλη, το μετάλλαγμα RM6 είναι τελείως διαφορετικό από την wtRop (Εικόνα 8). Το μόριο είναι πλέον τετραμερές και εξαιρετικά σταθερό με ιδιαίτερα αργή κινητική αντίδρασης αποδιάταξης. Σε αυτή την περίπτωση η αφαίρεση των πέντε καταλοίπων οδηγεί στην αποκατάσταση της συνεχόμενης επτάδας με τις στροφές να έχουν απαλειφθεί και το μόριο να αποτελείται από τέσσερα μονομερή, που πλέον είναι επιμήκεις αλυσίδες.



Εικόνα 8. Το μετάλλωμα RM6 είναι εξαιρετικά σταθερό μόριο και σχηματίζεται από τέσσερα μονομερή της αγρίου τύπου Rop (Glykos, Paranikolau et al. 2006). (PDB ID: 1QX8).

ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι μελέτες του ρόλου της στροφής και του μοτίβου της επτάδας στην αναδίπλωση της Rop αποτέλεσαν τη βάση για το σχεδιασμό των μεταλλάξεων αυτής της εργασίας. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο ρόλος της στροφής στην αναδίπλωση της Rop δεν έχει διαφωτιστεί πλήρως: Κάποιες μελέτες προτείνουν έναν δευτερεύοντα ρόλο της στροφής στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης (Castagnoli, Vetriani et al. 1994), ενώ άλλες εργασίες ενισχύουν την άποψη ότι η στροφή έχει περισσότερο ενεργό ρόλο, κατευθύνοντας το μονοπάτι της αναδίπλωσης σε περισσότερο επιτρεπτές διαμορφώσεις (Glykos, Cesareni et al. 1999; Nagi, Anderson et al. 1999). Για να διαφωτιστεί ακόμη περισσότερο ο ρόλος της στροφής, σχεδιάστηκαν δυο μεταλλάξεις στη στροφή της Rop: Η μετάλλαξη D30PA31P, όπου το ασπαρτικό οξύ στη θέση 30 αντικαθίσταται από μια προλίνη, διατηρώντας την προλίνη στη θέση 31 και η D30GA31P, στην οποία τη θέση 30 καταλαμβάνει μια γλυκίνη. Και οι δυο αυτές μεταλλάξεις βασίζονται στο μετάλλαγμα A31P της Rop, του οποίου οι μελέτες (Peters, Hinz et al. 1997; Glykos, Cesareni et al. 1999; Glykos and Kokkinidis 2004) καταδεικνύουν τη σημασία της στροφής στα διάφορα μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει η αναδίπλωση της πρωτεΐνης.

Η προλίνη είναι ένα ιδιαίτερο αμινοξύ (ιμινοξύ), καθώς η πλευρική της αλυσίδα ενώνεται με την κύρια αλυσίδα σχηματίζοντας έναν πυρρολιδικό δακτύλιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η προλίνη να είναι το αμινοξύ με τους λιγότερους βαθμούς ελευθερίας, περιορίζοντας κατά πολύ τις δυνατές διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει. Το κατάλοιπο Asp30 στην αγρίου τύπου Rop έχει γωνίες $\phi = 57.32^\circ$ και $\psi = 37.65^\circ$, οι οποίες είναι αρκετά διαφορετικές από αυτές της α -έλικας. Στην A31P Rop, το ίδιο κατάλοιπο υιοθετεί τελείως διαφορετικές γωνίες ($\phi = -74.02^\circ$ και $\psi = 157.08^\circ$). Οι παραπάνω τιμές απέχουν αρκετά από αυτές που μπορεί να υιοθετήσει η προλίνη, της οποίας η γωνία ϕ περιορίζεται, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, σε τιμές $\sim -60^\circ$. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η δυνατότητα της προλίνης να λαμβάνει τόσο cis όσο και trans διαμορφώσεις. Αν και, θεωρητικά, η cis διαμόρφωση είναι δυνατή και για τα υπόλοιπα αμινοξέα, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται. Αντίθετα, η προλίνη συναντάται σε cis διαμόρφωση πολύ συχνότερα. Επίσης, η παρουσία δυο προλινών σε σειρά ευνοεί το σχηματισμό πολυπρολίνης ή κολλαγόνου (Fasman 1990). Έτσι, η μετάλλαξη D30PA31P στοχεύει, κυρίως, σε δυο ερωτήματα: 1. Είναι το ίδιο σημαντικά όλα τα κατάλοιπα της στροφής στην κατεύθυνση του μονοπατιού

αναδίπλωσης της Rop και 2. λαμβάνοντας υπόψη την ιδιαίτερη στερεοχημεία της προλίνης και τη μεγαλύτερη δυνατότητα αυτής να λαμβάνει cis διαμορφώσεις, θα μπορούσε η είσοδος μιας δεύτερης προλίνης στη στροφή της Rop να περιορίσει ακόμη περισσότερο τις δυνατές διαμορφώσεις της στροφής, οδηγώντας σε διαφορετικά μονοπάτια την αναδίπλωσή της;

Στη μετάλλαξη D30GA31P το ασπαρτικό οξύ στη θέση 30 αντικαθίσταται από μια γλυκίνη. Η γλυκίνη έχει ως πλευρική αλυσίδα ένα μόνο υδρογόνο και είναι το αμινοξύ με τους περισσότερους βαθμούς ελευθερίας, επιτρέποντας έναν μεγάλο αριθμό στερεοχημικών διαμορφώσεων. Καθώς, όπως έχει υποθεθεί, η πρωτεΐνη A31P Rop αποτελεί μια κατάσταση molten globule, στην οποία έχει παγιδευτεί ενεργειακά το μόριο, το ερώτημα στο οποίο αναμένεται να δώσει απάντηση το μετάλλαγμα D30GA31P είναι αν η γλυκίνη, με τους απεριόριστους βαθμούς ελευθερίας που διαθέτει, θα μπορούσε να επιτρέψει στην πρωτεΐνη να υπερβεί την 'ενεργειακή παγίδα' (τοπικό ελάχιστο) στην οποία έχει μεταπέσει και, έτσι, το μόριο να οδηγηθεί σε άλλα μονοπάτια και σε πιο εγγενείς διαμορφώσεις.

Τα άλλα δυο μεταλλάγματα που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία αφορούν στην αποκατάσταση του προτύπου της επτάδας στο μόριο της Rop. Το πρώτο (2aaL) είναι μια παραλλαγή ενός, ήδη, μελετημένου μεταλλάγματος, του 2aa. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μετάλλαγμα αυτό αποσκοπούσε στην αποκατάσταση μιας συνεχόμενης επτάδας στην περιοχή της στροφής με την είσοδο δυο καταλοίπων αλανίνης. Ωστόσο, όπως φάνηκε, η δομή αυτού του μορίου δεν διαφοροποιείται από αυτή της αγρίου τύπου Rop. Στο σχήμα 7 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες της αγρίου τύπου Rop και της 2aa παραλλαγής με την ανάθεση των θέσεων a και d της επτάδας. Όπως φαίνεται, στην παραλλαγή 2aa έχει επανέλθει η συνεχόμενη επτάδα στην περιοχή της στροφής με τα κατάλοιπα ADA να καταλαμβάνουν τις θέσεις e-g της μιας επτάδας και τα κατάλοιπα ADEQ τις θέσεις a-d της επόμενης επτάδας. Το μόνο κατάλοιπο που φαίνεται να αποκλίνει από την, θεωρητικά, σωστή αποκατάσταση της επτάδας είναι το Q34, στην αγρίου τύπου Rop, ή Q36 στην παραλλαγή 2aa, καθώς πρόκειται για ένα υδρόφιλο αμινοξύ που καταλαμβάνει μια, εξορισμού, υδρόφοβη θέση (d). Η υπόθεση εργασίας είναι ότι η αντικατάσταση αυτού του καταλοίπου με ένα υδρόφοβο αμινοξύ, πιο συμβατό με τη θέση d της επτάδας, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια διαμόρφωση παρόμοια με αυτή της RM6 παραλλαγής, αλλά με μια επτάδα επιπλέον.

wtRop

MTKQEKTALNMARFIRSQTLTLLEKLNELDADEQADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGENL

2αα

MTKQEKTALNMARFIRSQTLTLLEKLNELADAADEQADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGEN

L

Σχήμα 7. Οι αλληλουχίες των αγρίου τύπου και 2αα Rop με την ανάθεση των θέσεων a και d της επτάδας. Οι θέσεις a είναι χρωματισμένες πορτοκαλί και οι θέσεις d είναι υπογραμμισμένες. Οι δυο επιπλέον αλανίνες είναι χρωματισμένες μπλε. Το μη συμβατό Q34 είναι χρωματισμένο κόκκινο.

Το δεύτερο μετάλλαγμα της Rop (2L) αφορά και αυτό στην αποκατάσταση της επτάδας στην περιοχή της στροφής. Ωστόσο, η λογική του σχεδιασμού του είναι διαφορετική. Όπως φαίνεται στο σχήμα 8, στην 2L παραλλαγή εισάγονται δυο κατάλοιπα λευκίνης εκατέρωθεν των καταλοίπων E33 και Q34. Με τον τρόπο αυτό, μετά τα κατάλοιπα DAD στην περιοχή της στροφής, που καταλαμβάνουν θέσεις e-g, τη θέση a στην επόμενη επτάδα καταλαμβάνει η νεοεισερχόμενη λευκίνη. Τα κατάλοιπα E και Q μετά από αυτήν καταλαμβάνουν τις θέσεις b και c, με τη δεύτερη λευκίνη να βρίσκεται στη θέση d αυτής της επτάδας. Τα επόμενα κατάλοιπα (ADI) διατηρούν τις θέσεις τους e-g και η επόμενη επτάδα ξεκινά από το κατάλοιπο Cys38 (αριθμημένο σύμφωνα με τη θέση του στην αγρίου τύπου Rop). Έτσι, στην περίπτωση αυτή, γίνεται μια πλήρης αποκατάσταση της συνεχόμενης επτάδας στην περιοχή της στροφής, χωρίς να διαταράσσονται οι υπόλοιπες επτάδες του μορίου. Το μόριο αυτό αναμένεται να αποκτά παρόμοια διαμόρφωση με αυτή του RM6 μεταλλάγματος.

2L

MTKQEKTALNMARFIRSQTLTLLEKLNELDADALEQLADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGENL

MTKQEKTALNMARFIRSQTLTLLEKLNELDADALEQLADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGENL

Σχήμα 8. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η αμινοξική αλληλουχία της 2L παραλλαγής της Rop. Τα κατάλοιπα λευκίνης που εισάγονται είναι χρωματισμένα με πράσινο. Κάτω, παρουσιάζεται η αλληλουχία με τη νέα ανάθεση των θέσεων a και d. Χρησιμοποιείται ο ίδιος χρωματικός κώδικας με το σχήμα 2.

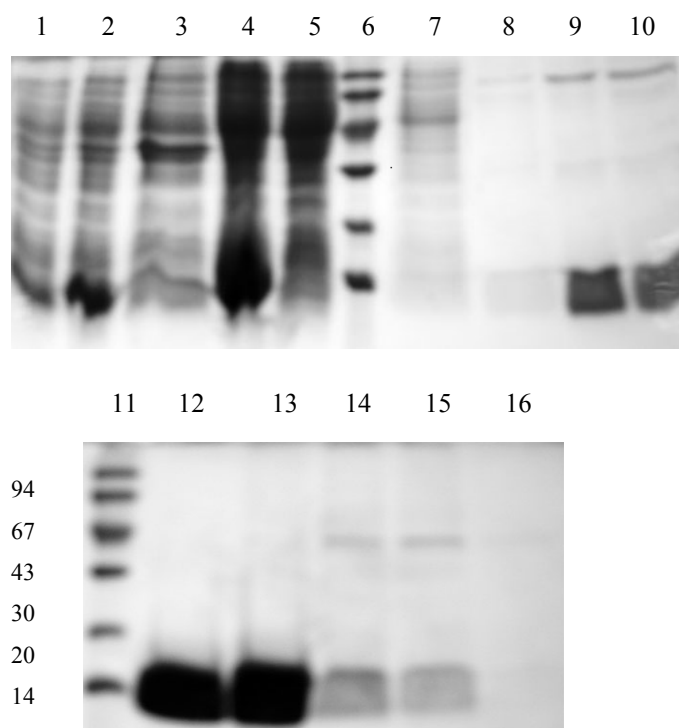
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Παραγωγή της αγρίου τύπου 6His-Tag Rop πρωτεΐνης και των παραγώγων της

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να παραχθούν η αγρίου τύπου Rop και τα παράγωγά της με την προσθήκη ενός εξαϊστιδινικού επιτόπου. Από όσα είναι γνωστά, αυτή είναι η πρώτη φορά που γίνεται αυτό. Προκειμένου να αποφευχθεί η εμπλοκή του επιτόπου με την πορεία αναδίπλωσης της πρωτεΐνης, επιλέχθηκε η ενσωμάτωση αυτού στο καρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Οι μελέτες της Rop έχουν δείξει ότι τα τελευταία επτά καρβοξυ-τελικά κατάλοιπα του μονομερούς της Rop είναι πολύ ευκίνητα και δεν εντοπίζονται στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας (Banner, Kokkinidis et al. 1987). Έτσι, το καρβοξυ-τελικό τμήμα της Rop κρίνεται ως το πλέον κατάλληλο για την ενσωμάτωση του εξαϊστιδινικού επιτόπου. Το αρχικό υλικό, που υπήρχε διαθέσιμο ήταν το κλωνοποιημένο, στον φορέα pEX43 (Castagnoli, Scarpa et al. 1989), γονίδιο rop, που φέρει τη μεταλλαγή A31P και ο φορέας που επιλέχθηκε για την υπερέκφραση του γονιδίου είναι ο pET26b(+) (Novagen). Ο τρόπος κλωνοποίησης του αρχικού υλικού στο φορέα pET26b(+) αναφέρεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 4. Μετά την κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου στον pET26b(+) ακολούθησε ο μετασχηματισμός κατάλληλων, για υπερπαραγωγή πρωτεϊνών, κυττάρων [BL21(DE3)] και παρήχθησαν μικρές καλλιέργειες για την εύρεση κατάλληλων συνθηκών για την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης. Τα αρχικά πειράματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη είναι διαλυτή και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Έτσι, ακολούθησε η παραγωγή πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα και ο καθαρισμός της σύμφωνα με το αρχικό σχήμα καθαρισμού, που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση με SDS-PAGE των βημάτων καθαρισμού της 6His-Tag A31P Rop παρουσιάζεται στην εικόνα 1. Όπως φαίνεται, η A31P παράγεται σε μεγάλες ποσότητες (~50mg/l) και με μεγάλη καθαρότητα. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία Ni²⁺-NTA ακολουθείται από το πέρασμα του πρωτεϊνικού δείγματος από κολόνα μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (Amerham Pharmacia Biotech) και το τελικό δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C. Η προσθήκη του εξαϊστιδινικού επιτόπου και των δυο καταλοίπων του φορέα (λόγω του

τρόπου κλωνοποίησης) οδηγεί στην παραγωγή ενός μορίου με 71 κατάλοιπα, που στην περίπτωση της A31P Ror έχει μοριακό βάρος μονομερούς 8319,2Da.



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των διαφόρων σταδίων καθαρισμού σε 15% SDS-PAGE. 1. Κυτταρικό εκχύλισμα πριν την προσθήκη IPTG(non-induced), 2. Κυτταρικό εκχύλισμα μετά την προσθήκη IPTG (induced), 3. Δείγμα από το μη διαλυτό μέρος των κυττάρων, 4. Δείγμα από το υπερκείμενο που φορτώθηκε στην κολόνα Ni²⁺-NTA, 5. Δείγμα από το εκλουόμενο διάλυμα μετά το φόρτωμα της κολόνας (FT), 6. Μάρτυρας, 7. Δείγμα από το διάλυμα έκπλυσης 1 (W1), 8. Δείγμα από το διάλυμα έκπλυσης 2 (W2), 9. Δείγμα από το διάλυμα έκπλυσης 3 (W3), 10. Δείγμα από το κλάσμα έκλυσης 1 (E1), 11. Μάρτυρας (αριστερά τα Μοριακά Βάρη σε kDa), 12-16. Δείγμα από τα κλάσματα έκλυσης 2-6 (E2-E6).

Μετά τον επιτυχή καθαρισμό της 6His-Tag A31P, ακολούθησε η παραγωγή της αγρίου τύπου Ror. Η παραγωγή της αγρίου τύπου 6His-Tag Ror και της 6His-Tag A31P Ror κρίνεται αναγκαία, για τη συγκρισιμότητα και σωστή ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων. Η κατασκευή του αγρίου τύπου γονιδίου ror περιγράφεται στο κεφάλαιο 4. Η παραγωγή της αγρίου τύπου Ror και ο καθαρισμός της έγινε με τον ίδιο τρόπο που παρήχθη και καθαρίστηκε η A31P και η πρωτεΐνη παράγεται σε συγκρίσιμες ποσότητες με την A31P. Τόσο η αγρίου τύπου Ror όσο και η A31P Ror αποθηκεύτηκαν, μετά τον καθαρισμό τους, στους -80°C. Με τη χρήση της ίδιας μεθοδολογίας κατασκευάστηκε το μετάλλαγμα D30PA31P Ror. Τα διάφορα βήματα του καθαρισμού με χρωματογραφία Ni²⁺-NTA της D30PA31P Ror παρουσιάζονται στο σχήμα 3. Μετά τον καθαρισμό της, ποσότητα της D30PA31P

Rop αποθηκεύτηκε στους 4°C, ενώ το υπόλοιπο πρωτεϊνικό δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C για μακρόχρονη φύλαξη. Η πρωτεΐνη παραμένει σταθερή στους 4°C για αρκετές εβδομάδες.

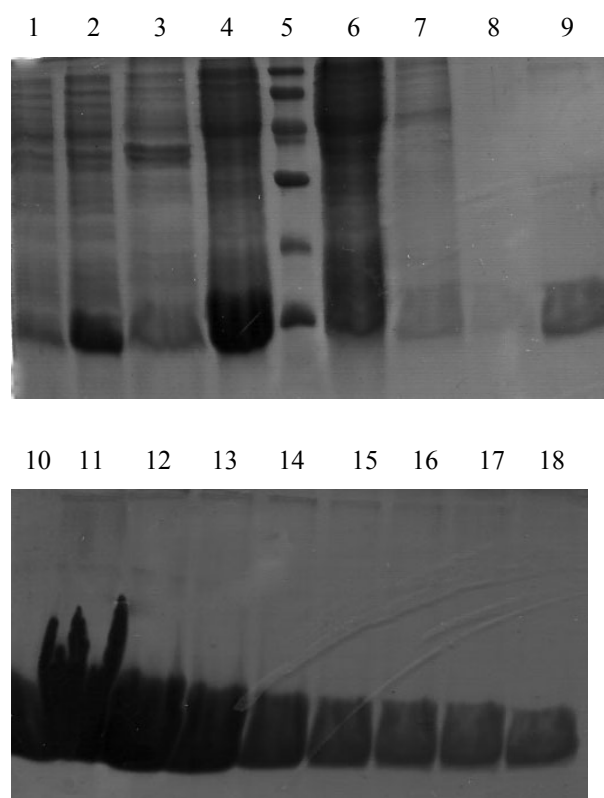
2.2 Αρχικές προσπάθειες κρυστάλλωσης της D30PA31P Rop

Αμέσως μετά τον καθαρισμό της, η D30PA31P Rop χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα κρυστάλλωσής της. Σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά δείγματα που είχαν αποθηκευτεί τόσο στους 4°C όσο και στους -80°C. Οι συνθήκες που εξετάστηκαν για την κρυστάλλωση της D30PA31P παρουσιάζονται στους αντίστοιχους πίνακες του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 25mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl. Για την παραγωγή κρυστάλλων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διάχυσης ατμών με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Παρά το μεγάλο εύρος των συνθηκών που εξετάστηκαν, δεν κατέστη δυνατή η κρυστάλλωση του μεταλλάγματος D30PA31P Rop. Ιζήματα, διαυγείς σταγόνες και διαχωρισμός φάσεων ήταν τα κυρίαρχα αποτελέσματα των προσπαθειών αυτών. Η αποτυχία εύρεσης συνθηκών κρυστάλλωσης της D30PA31P μπορεί να αποδοθεί, κυρίως σε δυο, πιθανούς, λόγους: α. Ο εξαϊστιδινικός επίτοπος εμποδίζει τη δημιουργία κατάλληλων κρυσταλλικών επαφών ή β. Το πρωτεϊνικό δείγμα δεν είναι αρκετά καθαρό ή ομοιογενές. Για να εξαιρεθεί η πιθανότητα του δεύτερου χρησιμοποιήθηκε ένα βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού.

2.3 Παραγωγή της D30PA31P Rop με το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού

Το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού σχεδιάστηκε με σκοπό τη μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα και ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος. Το πλήρες σχήμα καθαρισμού περιγράφεται στο κεφάλαιο 4. Η κύρια διαφορά αυτού του σχήματος σε σχέση με το αρχικό εντοπίζεται στον καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη συνεχή παρουσία αναγωγικού σε όλα τα στάδια καθαρισμού. Εφόσον η Rop φέρει, σε επίπεδο διμερούς, δυο κυστεΐνες, όχι πολύ μακριά μεταξύ τους και καθώς η διαμόρφωση των επιμέρους ελίκων στο μετάλλαγμα D30PA31P δεν είναι γνωστή,

κρίθηκε αναγκαία η παρουσία αναγωγικού κατά τον καθαρισμό της. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση SDS-PAGE των βημάτων του καθαρισμού της D30PA31P παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Οι μικρότεροι όγκοι των κλασμάτων έκλυσης σε αυτό το σχήμα καθαρισμού επιτρέπουν την περαιτέρω χρησιμοποίηση των καθαρότερων κλασμάτων. Το ίδιο σχήμα καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε και για τον καθαρισμό των αγρίου τύπου και A31P Rop.

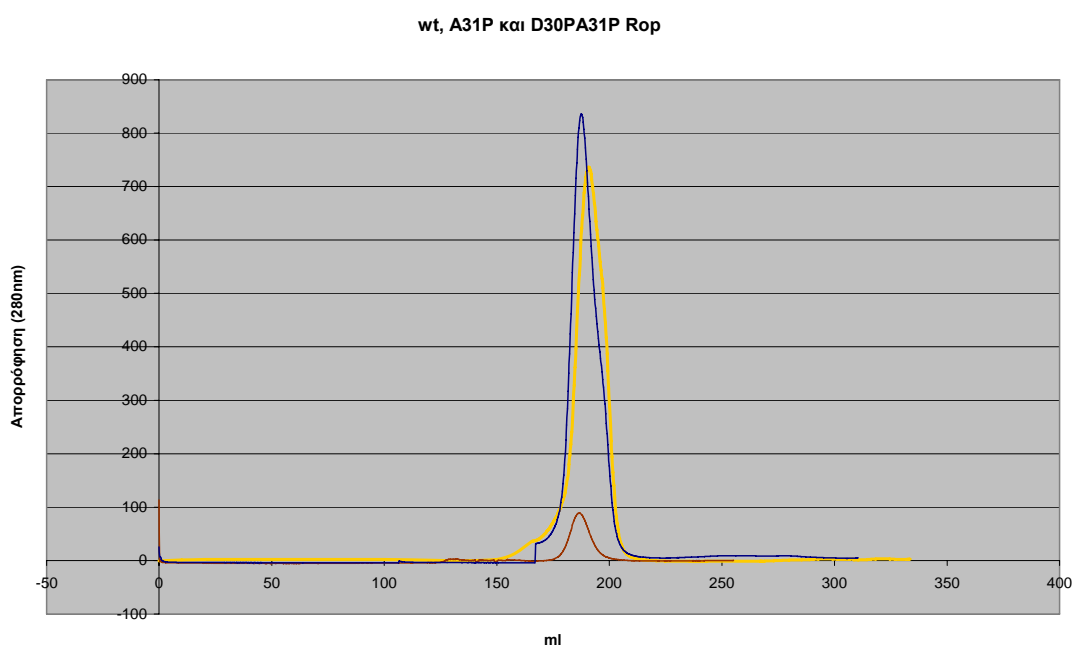


Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των σταδίων καθαρισμού, της D30PA31P Rop με τη χρήση του βελτιωμένου σχήματος σε 15% SDS-PAGE. 1. Κυτταρικό εκχύλισμα πριν την προσθήκη IPTG, 2. Κυτταρικό εκχύλισμα μετά την προσθήκη IPTG, 3. Δείγμα από το μη διαλυτό μέρος των κυττάρων, 4. Δείγμα από το υπερκείμενο που φορτώθηκε στην κολόνα Ni²⁺-NTA, 5. Μάρτυρας (Μοριακά βάρη όπως και στην εικόνα 1), 6. Δείγμα από το εκλούμενο διάλυμα μετά το φόρτωμα της κολόνας (FT), 7. Δείγμα από το διάλυμα έκλυσης 1 (W1), 8. Δείγμα από το διάλυμα έκλυσης 2 (W2), 9-18. Δείγμα από τα κλάσματα έκλυσης 1-10.

2.4 Πειράματα σε βαθμονομημένη κολόνα μοριακής διήθησης (Gel Filtration)

Μετά τον καθαρισμό τους με χρήση χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA, οι πρωτεΐνες φορτώθηκαν σε βαθμονομημένη κολόνα μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (Amerham Pharmacia Biotech). Οι πρότυπες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση της κολόνας είναι οι: ριβονουκλεάση A (M.B. 13700Da),

χυμοτριψινογόνο A (M.B. 25000), οβαλβουμίνη (M.B. 43000Da) και αλβουμίνη (M.B. 67000Da), που περιλαμβάνονται στο Low Molecular Calibration Kit της Amersham Pharmacia Biotech. Κατά τη διέλευση των πρωτεϊνών από την κολόνα καταγράφεται η απορρόφηση στα 280nm σε συνάρτηση με τον όγκο, στον οποίο εκλύονται. Ο συνολικός όγκος της κολόνας είναι 345ml. Στο σχήμα 1 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των αγρίου τύπου, A31P και D30PA31P Rop, οι οποίες εκλύονται σε όγκο 187,45ml, 186,82ml και 190,73ml, αντίστοιχα.

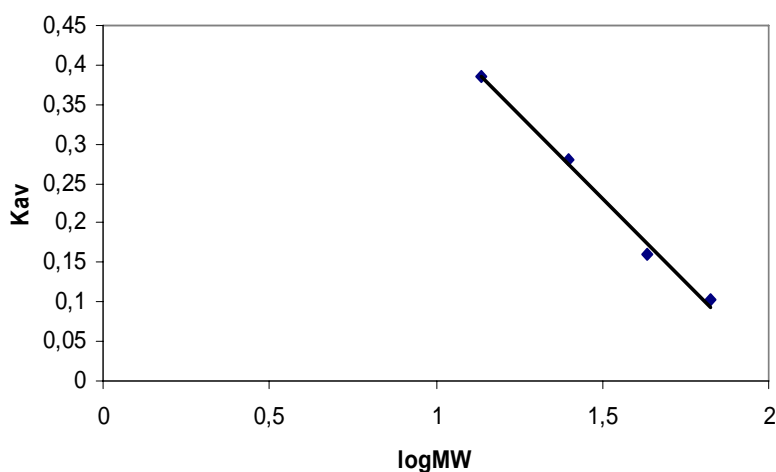


Σχήμα 1. Χρωματογράφημα έκλυσης των αγρίου τύπου, A31P και D30PA31P Rop στην κολόνα μοριακής διήθησης S-100. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την απορρόφηση στα 280nm κατά τη διέλευση του δείγματος από την κολόνα και ο οριζόντιος άξονας τον όγκο έκλυσης των πρωτεϊνών. Το χρωματογράφημα της αγρίου τύπου Rop παρουσιάζεται με μπλε χρώμα, της A31P με καφέ και της D30PA31P με κίτρινο. Τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται μαζί για καλύτερη σύγκριση.

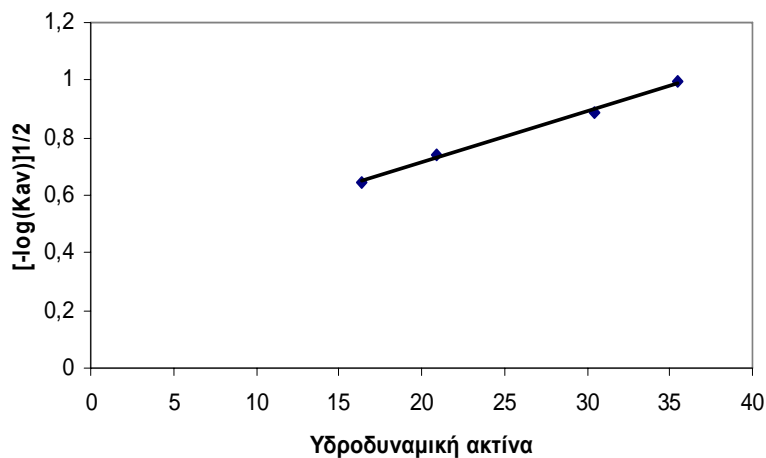
Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια ειδική παράμετρος, που ονομάζεται K_{av} (Amersham Pharmacia Biotech) και δίνεται από τη σχέση: $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$, όπου V_e είναι ο όγκος έκλυσης της πρωτεΐνης, V_o είναι ο νεκρός όγκος της στήλης και V_t είναι ο συνολικός όγκος της κολόνας. Ο υπολογισμός των μοριακών βαρών γίνεται με βάση τη συνάρτηση του K_{av} με τον λογάριθμο του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης. Αυτή η σχέση ισχύει, κυρίως, για σφαιρικές πρωτεΐνες. Σε περίπτωση μη σφαιρικών πρωτεϊνών ο υπολογισμός της

υδροδυναμικής ακτίνας R_s , που είναι ένα μέτρο του μεγέθους της πρωτεΐνης, θεωρείται πιο αξιόπιστος. Η υδροδυναμική ακτίνα υπολογίζεται από τη συνάρτηση του μεγέθους $-\log(K_{av})^{1/2}$ με την υδροδυναμική ακτίνα R_s .

Για τη βαθμονομημένη κολόνα S-100 που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία οι πρότυπες καμπύλες των παραπάνω συναρτήσεων παρουσιάζονται στα σχήματα 2 και 3. Το μοριακό βάρος των διμερών αγρίου τύπου, A31P και D30PA31P Rop είναι 16586,2Da, 16638,4Da και 16602,4Da, αντίστοιχα. Θεωρητικά, θα ήταν αναμενόμενο οι πρωτεΐνες να εκλύονται σε όγκους αντίστοιχους για αυτά τα μοριακά βάρη. Ωστόσο, θα πρέπει να υπενθυμιστεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν οκτώ επιπλέον κατάλοιπα τα οποία δεν αναμένεται να συνεισφέρουν στη σφαιρικότητα των μορίων. Έτσι, η αγρίου τύπου Rop εκλύεται σε όγκο 187,45ml, η A31P σε όγκο 186,82ml και η D30PA31P σε όγκο 190,73ml. Αυτοί οι όγκοι έκλυσης αντιστοιχούν, σύμφωνα με τη βαθμονόμηση της κολόνας, σε μοριακά βάρη 25508Da για την αγρίου τύπου Rop, 25918Da για την A31P και 23475Da για την D30PA31P. Επιπρόσθετα, η υδροδυναμική ακτίνα για την αγρίου τύπου Rop υπολογίστηκε σε 22,2Å, για την A31P σε 22,4Å και για την D30PA31P σε 21,3Å.



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη για την εκτίμηση του μοριακού βάρους στη βαθμονομημένη κολόνα S-100.



Σχήμα 3. Πρότυπη καμπύλη για την εκτίμηση της υδροδυναμικής ακτίνας στη βαθμονομημένη κολόνα S-100.

2.5 Μελέτες πρωτεϊνών με φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού είναι μια πολύπλευρη μέθοδος, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί, μεταξύ άλλων, για τη μελέτη της περιεκτικότητας μιας πρωτεΐνης σε δευτεροταγή δομικά στοιχεία και της σταθερότητας αυτής κατά την θερμική ή χημική της μετουσίωση. Η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε δευτεροταγή δομικά στοιχεία μπορεί να εκτιμηθεί από το φάσμα της πρωτεΐνης στο άπω-υπεριώδες φως (far UV 240-170nm). Για την αξιόπιστη εξαγωγή συμπερασμάτων θα πρέπει να τηρούνται κάποιες βασικές αρχές, όπως οι εξής:

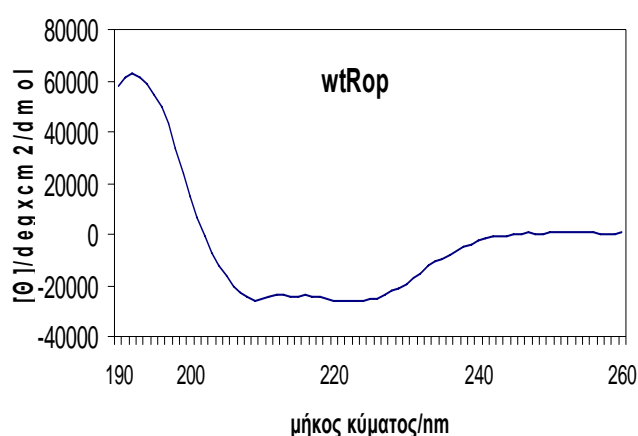
α. Ο λόγος σήμα/θόρυβος (signal/noise ratio, S/N) θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερος. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με τη χρήση κατάλληλου πρωτεϊνικού διαλύματος. Τα συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα απορροφούν αρκετά έντονα στο άπω-υπεριώδες με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου S/N. Έτσι, είναι αναγκαία η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Ο λόγος S/N επηρεάζεται και από τις διάφορες παραμέτρους, που χρησιμοποιούνται κατά τη μέτρηση των φασμάτων.

β. Τα φάσματα των πρωτεϊνών θα πρέπει να περιλαμβάνουν αρκετή πληροφορία, δηλαδή οι μετρήσεις να περιλαμβάνουν τιμές σε, όσο το δυνατό, χαμηλές περιοχές

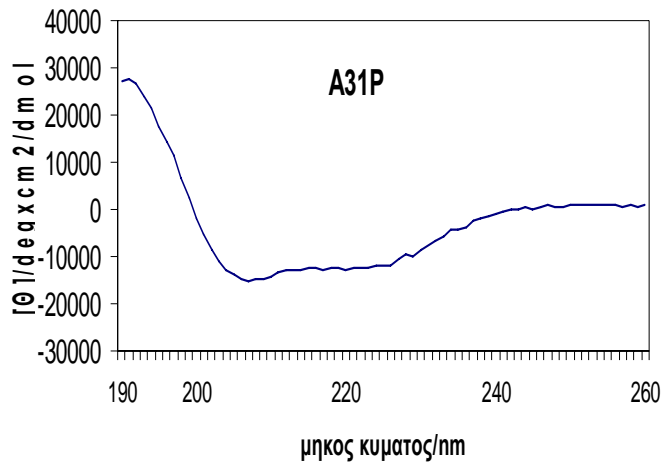
του άπω-υπεριώδους. Όπως φαίνεται στο σχήμα 8, τα φάσματα του κυκλικού διχρωισμού περιέχουν πληροφορία δευτεροταγούς δομής μέχρι και τα 160-170nm.

Η μελέτη της σταθερότητας μιας πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με τη συνεχή παρακολούθηση του φάσματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, ενώ αυξάνει η θερμοκρασία. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να υπολογιστεί η θερμοκρασία αποδιάταξης ή τήξης (T_m). Η θερμοκρασία αυτή αντιστοιχεί σε θερμοκρασία όπου ~50% της πρωτεΐνης είναι αποδιαταγμένη, ενώ ~50% παραμένει αναδιπλωμένη και αποτελεί χρήσιμο μέτρο της θερμικής σταθερότητας μιας πρωτεΐνης. Επίσης, με τη χρήση της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού, είναι δυνατή η μέτρηση φασμάτων άπω-υπεριώδους κατά την θερμική μετουσίωση μιας πρωτεΐνης. Ο συνδυασμός αυτός μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο αποδιατάσσεται μια πρωτεΐνη.

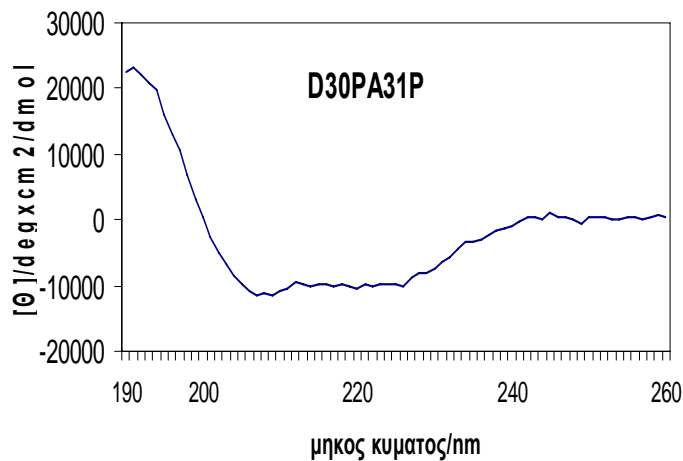
Στη συγκεκριμένη εργασία, για τις μετρήσεις των φασμάτων στο άπω-υπεριώδες χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά διαλύματα με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,02mg/ml σε 10mM PO_4^- pH 7.0. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο μέτρησης της απορρόφησης στα 280nm, η οποία αναφέρεται στο κεφάλαιο 4. Οι μετρήσεις έγιναν στους 25°C και στην περιοχή 260-186nm του άπω-υπεριώδους. Τα φάσματα, στο άπω-υπεριώδες, των αγρίου τύπου Rop, A31P και D30PA31P παρουσιάζονται στα σχήματα 4, 5 και 6.



Σχήμα 4. Φάσμα στο άπω-υπεριώδες της αγρίου τύπου Rop. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κατά τη μέτρηση ήταν 0.02mg/ml και χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα πάχους 1mm. Η ταχύτητα μέτρησης του φάσματος ήταν 50nm/min. και το τελικό φάσμα είναι ο μέσος όρος οκτώ μετρήσεων.



Σχήμα 5. Φάσμα στο άπω-υπεριώδες της A31P Rop. Οι συνθήκες και οι παράμετροι κατά τη μέτρηση του φάσματος είναι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την αγρίου τύπου Rop.

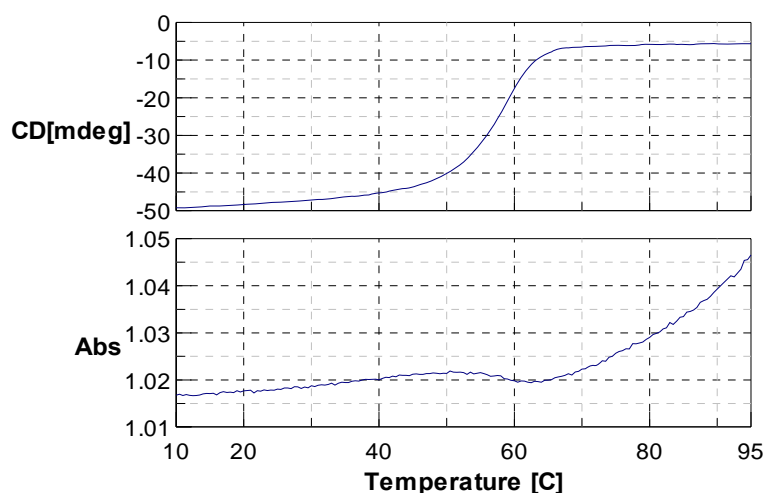


Σχήμα 6. Φάσμα στο άπω-υπεριώδες της D30PA31P Rop. Οι συνθήκες και οι παράμετροι είναι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν και για τις άλλες δυο πρωτεΐνες.

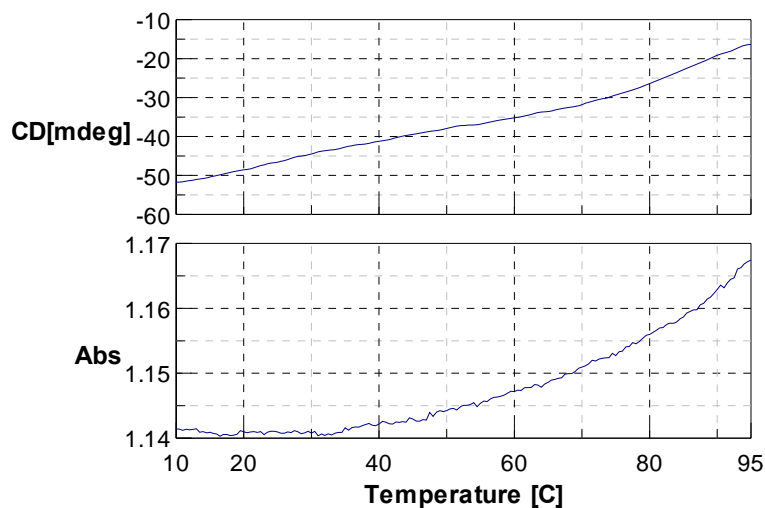
Όπως φαίνεται από το σχήμα 6, το φάσμα της D30PA31P Rop εμφανίζει μειωμένο σήμα στα 222nm, όπως ισχύει και για την A31P.

Η θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών έγινε με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 10°C μέχρι τους 95°C με ταχύτητα 80°C/h και συνεχή μέτρηση του φάσματος στα 222nm, καθώς το συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι χαρακτηριστικό για την α-έλικα και χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας γινόταν λήψη φάσματος στο άπω-υπεριώδες ανά 2, 5 ή 10°C. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες με μήκος 0.1cm και 1cm. Τα πρωτεϊνικά διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν συγκέντρωση 0,1mg/ml και

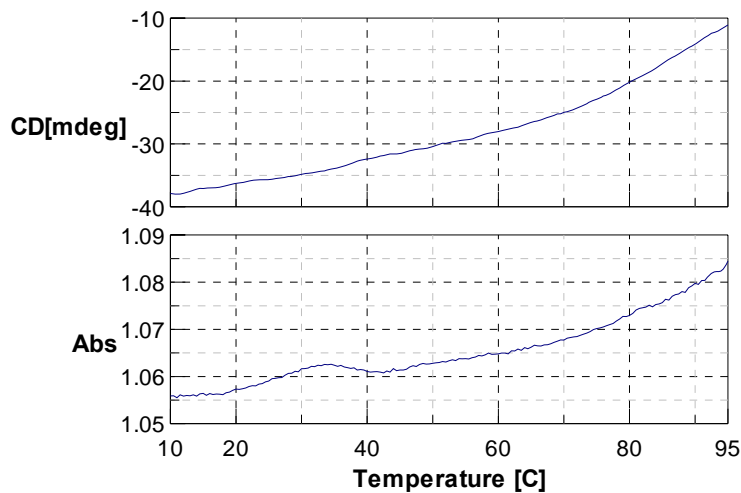
0,5mg/ml σε 10mM PO₄⁻ pH 7.0, 10mM Na₂SO₄, 1mM EDTA pH 8.0. Στα σχήματα 7, 8 και 9 παρουσιάζονται οι καμπύλες θερμικής μετουσίωσης των αγρίου τύπου, A31P και D30PA31P Rop. Τα διαδοχικά φάσματα στο άπω-υπεριώδες, που ελήφθησαν κατά τη μετουσίωση των πρωτεϊνών, παρουσιάζονται στα σχήματα 10, 11 και 12 για την αγρίου τύπου, A31P και D30PA31P Rop, αντίστοιχα.



Σχήμα 7. Θερμική μετουσίωση της αγρίου τύπου Rop. Η αύξηση της θερμοκρασίας έγινε από τους 10°C στους 95°C με ταχύτητα 80°C/h. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η καταγραφή του φάσματος στα 222nm σε μονάδες mdeg. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η μεταβολή της απορρόφησης (Abs) του δείγματος κατά την αύξηση της θερμοκρασίας. Η απορρόφηση φαίνεται να διαταράσσεται κατά την μετάβαση στην αποδιαταγμένη κατάσταση.

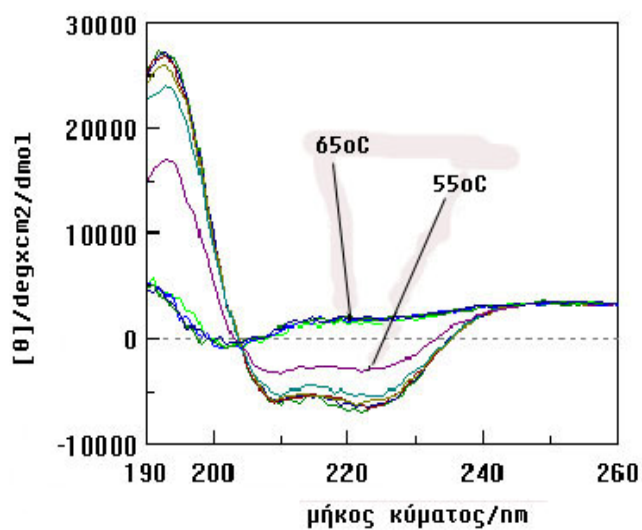


Σχήμα 8. Θερμική μετουσίωση της A31P Rop. Η αύξηση της θερμοκρασίας έγινε από τους 10°C στους 95°C με ταχύτητα 80°C/h. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η καταγραφή του φάσματος στα 222nm σε μονάδες mdeg. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η μεταβολή της απορρόφησης (Abs) του δείγματος κατά την αύξηση της θερμοκρασίας.

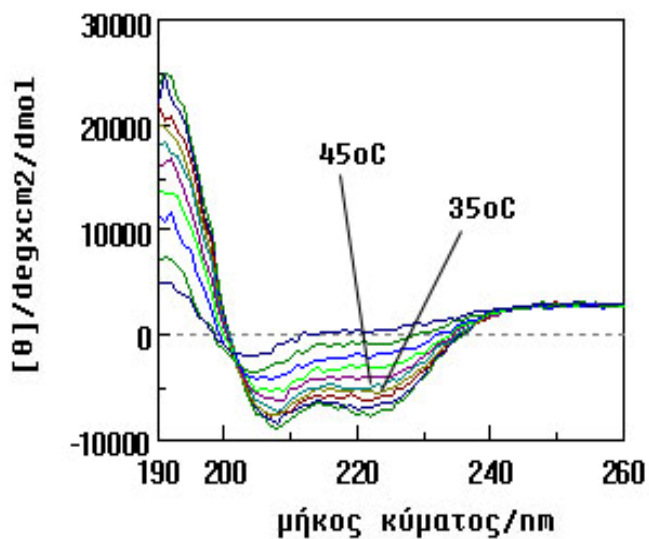


Σχήμα 9. Θερμική μετουσίωση της D30PA31P Rop. Η αύξηση της θερμοκρασίας έγινε από τους 10°C στους 95°C με ταχύτητα 80°C/h. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η καταγραφή του φάσματος στα 222nm σε μονάδες mdeg. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η μεταβολή της απορρόφησης (Abs) του δείγματος κατά την αύξηση της θερμοκρασίας. Μια μικρή διαταραχή της απορρόφησης, παρόμοια με αυτή του φάσματος της αγρίου τύπου Rop, είναι εμφανής σε θερμοκρασία 35°- 40°C.

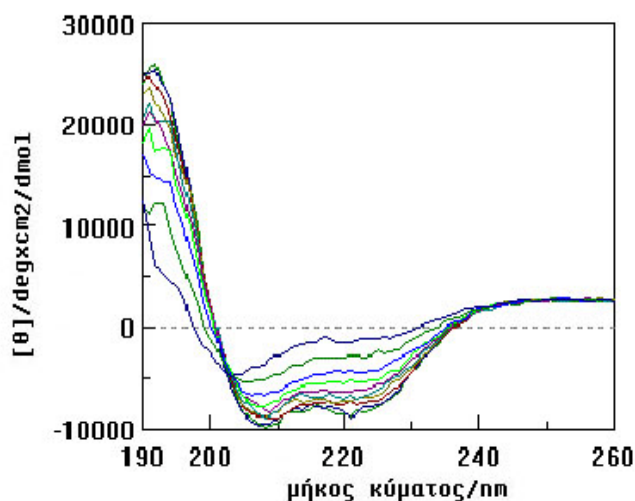
Από τα παραπάνω φάσματα είναι εμφανής η διαφορά ανάμεσα στην αγρίου τύπου Rop και στα δυο μεταλλάγματα. Το φάσμα της αγρίου τύπου Rop καταγράφεται ως σιγμοειδής καμπύλη, χαρακτηριστική για τη μεταφορά από την αναδιπλωμένη στην μετουσιωμένη πρωτεΐνη. Η επίλυση ως προς τις παραγώγους 1^{ου} βαθμού παράγει τη θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης και στη συγκεκριμένη περίπτωση η θερμοκρασία τήξης της αγρίου τύπου Rop είναι $T_m = 59^{\circ}\text{C}$, που είναι συγκρίσιμη με προηγούμενα αποτελέσματα (Steif, Weber et al. 1993; Steif, Hinz et al. 1995). Αντίθετα, τα φάσματα των A31P και D30PA31P καταγράφονται ως μονοτονικές καμπύλες, χωρίς καμία διακριτή μεταφορά από την αναδιπλωμένη κατάσταση στην μετουσιωμένη. Η μορφή αυτών των φασμάτων δεν επιτρέπει την ανάλυσή τους για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη θερμοκρασία αποδιάταξης των πρωτεϊνών.



Σχήμα 10. Φάσματα άπω-υπεριώδους κατά τη θερμική μετουσίωση της αγρίου τύπου Rop από τους 10°C στους 95°C. Τα φάσματα μετρήθηκαν κάθε 10°C. Στο σχήμα έχουν σημειωθεί τα φάσματα σε θερμοκρασία 55°C (φάσμα χρωματισμένο μωβ) και σε θερμοκρασία 65°C (φάσμα χρωματισμένο πράσινο).



Σχήμα 11. Φάσματα άπω-υπεριώδους κατά τη θερμική μετουσίωση της A31P Rop. Η αύξηση της θερμοκρασίας έγινε από τους 10°C στους 95°C. Στο σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα που μετρήθηκαν κάθε 10°C και επισημαίνονται τα φάσματα στους 35°C και στους 45°C.



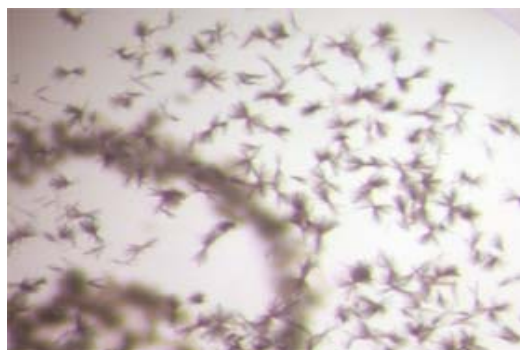
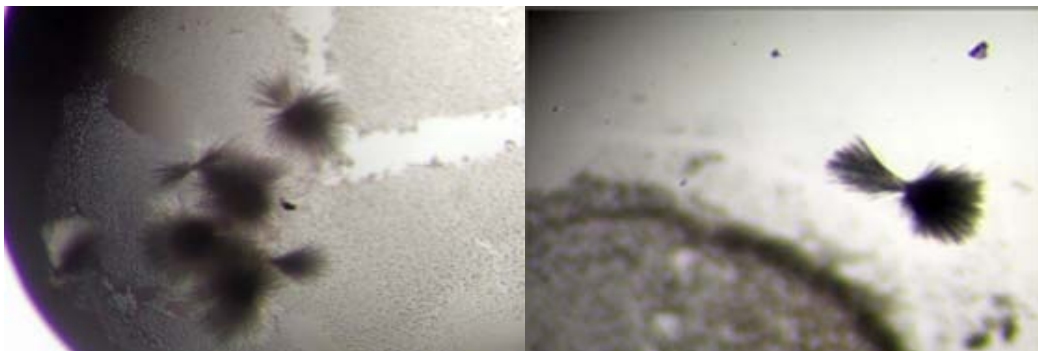
Σχήμα 12. Φάσματα άπω-υπεριώδους κατά τη θερμική μετουσίωση της D30PA31P Rop. Η αύξηση της θερμοκρασίας έγινε από τους 10°C στους 95°C. Στο σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα στο άπω-υπεριώδες που μετρήθηκαν κάθε 10°C.

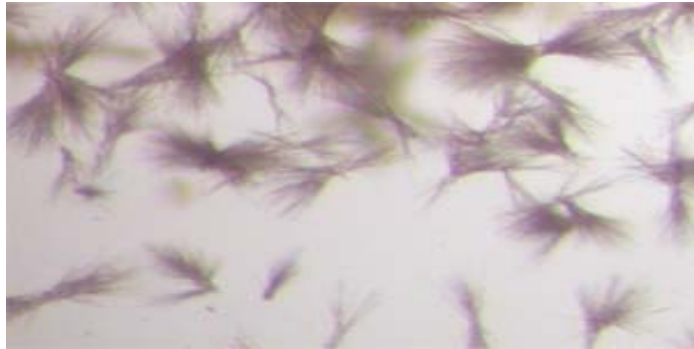
Από τα παραπάνω φάσματα, είναι εμφανής η διαφορά μεταξύ αγρίου τύπου και A31P και D30PA31P ως προς τον τρόπο με τον οποίο αποδιατάσσονται. Σε ότι αφορά την αγρίου τύπου Rop το φάσμα στους 55°C δείχνει ότι η πρωτεΐνη εξακολουθεί να έχει κάποια δευτεροταγή δομή. Η μετάβαση στους 65°C έχει ως αποτέλεσμα την απότομη απώλεια σήματος α-έλικας, κάτι που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη έχει αποδιαταχθεί. Αυτό είναι σε συμφωνία με τη θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης στους 59°C. Αντίθετα, τα φάσματα των A31P και D30PA31P δεν δείχνουν κάποια διακριτή μετάβαση από την αναδιπλωμένη στη μετουσιωμένη πρωτεΐνη. Η διαδοχή των φασμάτων είναι πολύ ομαλή, σε συμφωνία με τα φάσματα των σχημάτων 8 και 9.

2.6 Κρυστάλλωση της D30PA31P Rop

Η πρωτεΐνη, που καθαρίστηκε με το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού, υποβλήθηκε σε πειράματα κρυστάλλωσης με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών και με τη χρήση της τεχνικής της κρεμαστής σταγόνας (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Σε αυτή τη νέα προσπάθεια κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης εξετάστηκαν οι συνθήκες στις οποίες έχουν κρυσταλλώσει διάφορα μεταλλάγματα της Rop, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες έχει κρυσταλλώσει η αγρίου τύπου Rop (Kokkinidis, Vlasi et al. 1993). Στα αρχικά αυτά πειράματα χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη που είχε διατηρηθεί στους 4°C.

Τα πιάτα κρυσταλλώσεων διατηρήθηκαν στους 18°C, χωρίς να διαταραχθούν για 3-4 ημέρες. Μετά από 10 ημέρες εμφανίστηκαν μικροί θύσανοι στις συνθήκες: 45%Μεθανόλη, 50mM Sodium acetate pH 5.2, 200mM NaCl και 50%Μεθανόλη, 50mM Sodium acetate pH 5.2, 200mM NaCl. Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης διερευνήθηκαν συστηματικά η συγκέντρωση της μεθανόλης, του NaCl και οι τιμές του pH. Οι συνθήκες που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα του κεφαλαίου 4. Στις συνθήκες 44-47%Μεθανόλη, 50mM Sodium acetate pH 5.4-5.6, 200mM NaCl σχηματίστηκαν, μετά από 8 ημέρες, δυσδιάστατοι, λεπτοί, βελονοειδείς κρύσταλλοι, οι οποίοι εμφανίζουν κοινό σημείο έναρξης (μαργαρίτες). Συνολικά, αυτές ήταν οι συνθήκες στις οποίες μεγάλωσαν οι μεγαλύτεροι κρύσταλλοι. Στην προσπάθεια βελτίωσης αυτών των κρυστάλλων έγινε περαιτέρω διερεύνηση στη συγκέντρωση του NaCl και στις τιμές του pH. Οι συνθήκες στις οποίες εμφανίστηκαν μικρότεροι ή μεγαλύτεροι κρύσταλλοι έχουν εύρος συγκέντρωσης μεθανόλης 41-50%, pH 4.8-5.8 και συγκέντρωση NaCl 0.1-0.2M. Τα παραπάνω αποτελέσματα επαναλαμβάνονται και με τη χρήση πρωτεΐνης που έχει διατηρηθεί στους -80°C. Στην εικόνα 3 παρουσιάζονται μερικοί από τους κρυστάλλους που σχηματίστηκαν.





Εικόνα 3. Φωτογραφίες κρυστάλλων της D30PA31P.

2.7 Τα υπόλοιπα μεταλλάγματα της Rop

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας δεν κατέστη δυνατή η παραγωγή των υπόλοιπων μεταλλάξεων, που σχεδιάστηκαν. Αν και έγιναν επανειλημμένες προσπάθειες για την κατασκευή τους, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν επετεύχθη σε καμία περίπτωση. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές DNA-μήτρες για τη μεταλλαξιγένεση, διαφορετικές συγκεντρώσεις συστατικών και διαφορετικές θερμοκρασίες των επιμέρους σταδίων της διαδικασίας μεταλλαξιγένεσης. Παρά όλα αυτά, η κατασκευή των μεταλλάξεων αυτών στο φορέα pET26b(+) (Novagen) δεν κατέστη δυνατή. Η κατασκευή του μεταλλάγματος D30GA31P έγινε εφικτή με την μεταλλαξιγένεση του αγρίου τύπου γονιδίου rop στον φορέα pF1K (Promega). Η κατασκευή του επιβεβαιώθηκε με ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και το επόμενο βήμα είναι η παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η ίδια διαδικασία θα ακολουθηθεί και για τα μεταλλάγματα 2aaL και 2L.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτεΐνη Rop έχει μελετηθεί εκτεταμένα και αποτελεί ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της σχέσης αλληλουχίας-δομής. Ωστόσο, η δομική απλότητα της Rop φαίνεται να είναι παραπλανητική (Glykos, Papanikolaou et al. 2006), καθώς η μεγάλη ποικιλία των δομών των διαφόρων παραλλαγών της είναι δύσκολο να αποδοθεί στη σχετικά μικρή διαφορά τους σε επίπεδο αλληλουχίας. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθούν τέσσερις παραλλαγές της Rop, που διακρίνονται σε δυο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει δυο μεταλλάξεις στη στροφή της παραλλαγής A31P της Rop: την D30PA31P και την D30GA31P. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει δυο μεταλλάξεις που αποσκοπούν στην αποκατάσταση της συνεχούς επτάδας, που έχει διαταραχθεί στη στροφή της αγρίου τύπου Rop. Η πρώτη μετάλλαξη (2aaL) σχεδιάστηκε με βάση ένα παλαιότερο μετάλλαγμα της Rop (2aa) (Vlassi, Steif et al. 1994). Στο αρχικό μετάλλαγμα (2aa) υπήρχε σε θέση d της επτάδας ένα μη συμβατό κατάλοιπο (Q34). Στο νέο μετάλλαγμα, το κατάλοιπο αυτό αντικαθίσταται από μια λευκίνη, που είναι περισσότερο συμβατή με αυτή τη θέση. Η δεύτερη παραλλαγή αφορά στην ενσωμάτωση δυο καταλοίπων λευκίνης εκατέρωθεν των E33 και Q34 της αγρίου τύπου Rop.

Από τα τέσσερα αυτά μεταλλάγματα, κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας, κατέστη δυνατή η παραγωγή του D30PA31P. Η συστηματική προσπάθεια να παραχθούν και τα υπόλοιπα μεταλλάγματα, με τη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης στον φορέα pET26b(+), δεν είχε αποτέλεσμα. Τελικά, κρίθηκε αναγκαία η αλλαγή του συστήματος και κατέστη δυνατή η κατασκευή της παραλλαγής D30GA31P στον φορέα pF1K (Promega). Η ίδια διαδικασία θα ακολουθηθεί και για τις παραλλαγές 2aaL και 2L.

Όπως προαναφέρθηκε, το μετάλλαγμα το οποίο παράχθηκε είναι το D30PA31P. Σε αυτή την παραλλαγή της Rop, το Asp30 έχει μεταλλαχθεί σε προλίνη με σκοπό την περαιτέρω έρευνα του ρόλου της στροφής στην αναδίπλωση της Rop. Τα πειράματα που έγιναν σε βαθμονομημένη κολόνα μοριακής διήθησης δείχνουν, αρχικά, ότι το μετάλλαγμα D30PA31P είναι διμερές και ότι παρά το γεγονός ότι, θεωρητικά, έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την αγρίου τύπου Rop (16602,4Da έναντι

16586,2Da, αντίστοιχα), εντούτοις η υδροδυναμική ακτίνα του πρώτου είναι μικρότερη από αυτήν της αγρίου τύπου (21,3Å έναντι 22,2Å, αντίστοιχα). Αντίθετα, η A31P έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την αγρίου τύπου Rop και μεγαλύτερη υδροδυναμική ακτίνα (22,4Å έναντι 22,2Å). Αυτό είναι σύμφωνο με όσα είναι γνωστά για τη διαμόρφωση των δυο μορίων, καθώς έχει δειχθεί (Glykos, Cesareni et al. 1999) ότι η A31P έχει μεγαλύτερο όγκο από την αγρίου τύπου Rop. Ο συσχετισμός αυτός θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη ότι η D30PA31P έχει μικρότερο όγκο και επομένως είναι πιο συμπαγής σε σχέση τόσο με την αγρίου τύπου Rop όσο και με την A31P. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να ληφθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων από τα πειράματα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, καθώς τα οκτώ επιπλέον κατάλοιπα που φέρει η D30PA31P στο καρβοξυ-τελικό της άκρο ενδέχεται να βρίσκονται σε διαφορετική διαμόρφωση, στο χώρο, σε σχέση με τα αντίστοιχα των αγρίου τύπου και A31P. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένες εκτιμήσεις στην προσπάθεια σύγκρισης του μεγέθους των μορίων. Επιπλέον πειράματα προσδιορισμού του μεγέθους της πρωτεΐνης, όπως SAXS (Small Angle X-ray Scattering) και Light Scattering, είναι απαραίτητα, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Τα πειράματα φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού δείχνουν ότι η D30PA31P είναι μια α-ελικοειδής δομή και ταυτόχρονα διατηρεί το πρότυπο του φάσματος της A31P, όπου το σήμα στα 208nm είναι περισσότερο αρνητικό σε σχέση με το σήμα στα 222nm (Cooper and Woody 1990; Zhou 1994; Peters, Hinz et al. 1997). Έχει δειχθεί (Cooper and Woody 1990; Zhou 1994), ότι το εντονότερο σήμα στα 207-208nm σε σχέση με το σήμα στα 222nm είναι ενδεικτικό της απώλειας υπερ-ελικοειδών αλληλεπιδράσεων. Για τις δομές coiled-coil ο λόγος $[\Theta]_{222\text{nm}}/[\Theta]_{208\text{nm}}$ είναι, περίπου, ίσος με 1, ενώ για μεμονωμένες α-έλικες ο λόγος αυτός ισούται με 0.85. Για την αγρίου τύπου Rop ο λόγος $[\Theta]_{222\text{nm}}/[\Theta]_{208\text{nm}}$ είναι ίσος με 1.03, ενώ για την A31P ισούται με 0.96 (Peters, Hinz et al. 1997) και είναι ενδεικτικός της διαταραχής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ελίκων του δεματίου. Για την D30PA31P ισχύει η σχέση: $[\Theta]_{222\text{nm}}/[\Theta]_{208\text{nm}} = 0.90$, κάτι που δείχνει την ακόμη μεγαλύτερη απώλεια υπερ-ελικοειδών αλληλεπιδράσεων στο μόριο αυτό.

Οι μελέτες θερμικής αποδιάταξης των παραπάνω πρωτεϊνών έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η θερμική αποδιάταξη της αγρίου τύπου Rop καταγράφεται ως σιγμοειδής καμπύλη και η θερμοκρασία αποδιάταξής της υπολογίστηκε σε $T_m = 59^\circ\text{C}$. Η τιμή αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες θερμοδυναμικές μελέτες της

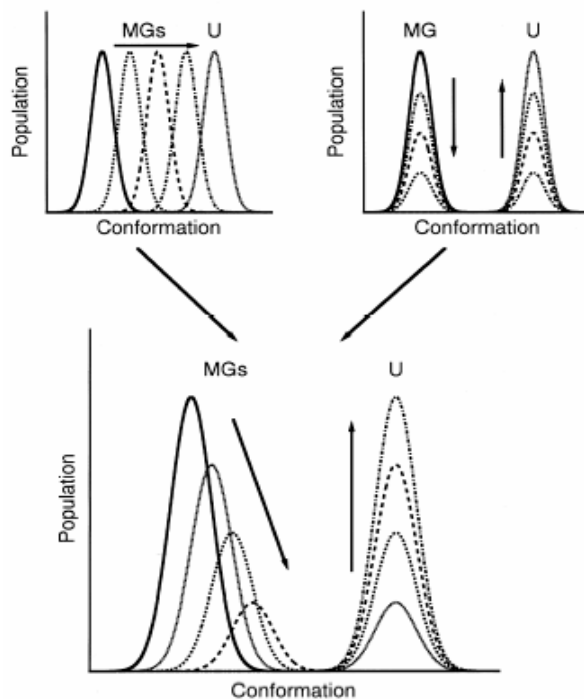
αγρίου τύπου Rop (Steif, Weber et al. 1993; Steif, Hinz et al. 1995), λαμβάνοντας υπόψη την μικρή απόκλιση λόγω σφαλμάτων και λόγω της χρήσης διαφορετικών οργάνων για την καταγραφή των φασμάτων. Η εικόνα των μεταλλαγμάτων A31P και D30PA31P είναι πολύ διαφορετική: Οι καμπύλες θερμικής αποδιάταξης αυτών είναι μονοτονικές και εμφανίζουν διαχεόμενα φάσματα βαθμιαίας θερμικής αποδιάταξης, χωρίς διακριτή μεταβίβαση από την αναδιπλωμένη στην αποδιαταγμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Επιπλέον, η καταγραφή των φασμάτων στο άπω-υπεριώδες κατά την θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών καταδεικνύει τη διαφορετική συμπεριφορά τους: Η αγρίου τύπου Rop δείχνει μια διακριτή μετάβαση από την αναδιπλωμένη στην αποδιαταγμένη μορφή της, με την πρωτεΐνη να έχει χάσει, σχεδόν, ολοκληρωτικά, την δευτεροταγή της δομή στους 65°C. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες A31P και D30PA31P δεν εμφανίζουν διακριτή μετάβαση, με τα φάσματα στο άπω-υπεριώδες να καταδεικνύουν την βαθμιαία απώλεια της δευτεροταγούς δομής. Πώς μπορεί, όμως, να εξηγηθεί η συμπεριφορά αυτών των πρωτεϊνών κατά τη θερμική τους αποδιάταξη.

Γενικά, οι εγγενείς πρωτεΐνες μετουσιώνονται με μια διακριτή μετάβαση από την αναδιπλωμένη στην μετουσιωμένη μορφή τους (Ku wajima 1989; Stephen F. Betz 1993). Αντίθετα, διαχεόμενα φάσματα θερμικής αποδιάταξης αποδίδονται περισσότερο σε καταστάσεις molten globule (Pfeil 1981; Dolgikh, Abaturon et al. 1985; Pfeil, Bychkova et al. 1986; Ku wajima 1989; Daggett and Levitt 1992; Munson, O'Brien et al. 1994). Η κατάσταση molten globule χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά δευτεροταγούς δομής, ρευστό υδρόφοβο εσωτερικό και πιο χαλαρή διαμόρφωση σε σχέση με τις εγγενείς πρωτεΐνες (Gilmanshin and Ptitsyn 1987; Ku wajima 1989).

Υπάρχουν δυο κατηγορίες καταστάσεων molten globule, με βάση τη θερμοδυναμική της αποδιάταξής τους: Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν καταστάσεις molten globule, οι οποίες εμφανίζουν συμπεριφορά θερμικής αποδιάταξης όμοια με αυτή των εγγενών πρωτεϊνών. Οι καταστάσεις molten globule του κυτοχρώματος c (Potekhin and Pfeil 1989; Kuroda, Kidokoro et al. 1992; Hagihara, Tan et al. 1994; Hamada, Moriyama et al. 1994) και της πρωτεΐνης που δεσμεύει ρετινόλη (Bychkova, Berni et al. 1992) αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από καταστάσεις molten globule που εμφανίζουν διαχεόμενα φάσματα θερμικής αποδιάταξης, μονοτονικές καμπύλες, μη διακριτή θερμική απορρόφηση και μηδενική ή ελάχιστη μεταβολή ενθαλπίας κατά τη θερμική τους

αποδιάταξη. Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν οι καταστάσεις molten globule της α -λακταλβουμίνης (Ku wajima 1977; Dolgikh, Abaturon et al. 1985; Baum, Dobson et al. 1989) της καρβονυλικής ανυδράσης B (Brazhnikov, Chirgadze Yu et al. 1985) της β -λακταμάσης (Goto and Fink 1989) και του κυτοχρώματος c του αλόγου (Ohgushi and Wada 1984; Potekhin and Pfeil 1989; Jeng, Englander et al. 1990).

Επιπλέον, οι μελέτες στην κατάσταση molten globule της απομυοσφαιρίνης (Nishii, Kataoka et al. 1995) δείχνουν ότι είναι δυνατόν, ανάλογα με τις συνθήκες, να εμφανίζονται ταυτόχρονα οι ιδιότητες και των δυο παραπάνω κατηγοριών. Έτσι, συνολικά, φαίνεται να υπάρχουν τρεις μηχανισμοί αποδιάταξης των καταστάσεων molten globule: Ο μηχανισμός βαθμιαίας αποδιάταξης, ο μηχανισμός διακριτής μετάβασης και ένας τρίτος μηχανισμός, που συνδυάζει τους δυο παραπάνω. Οι μηχανισμοί αυτοί παρουσιάζονται σχηματικά στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Οι τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί αποδιάταξης των καταστάσεων molten globule. Πάνω αριστερά, ο μηχανισμός βαθμιαίας αποδιάταξης, με την ύπαρξη διαφορετικών διαμορφώσεων κατά τη μετάβαση από την molten globule κατάσταση στην αποδιαταγμένη κατάσταση. Πάνω δεξιά, ο μηχανισμός διακριτής μετάβασης. Είναι εμφανής η διαφορά με τον πρώτο μηχανισμό. Κάτω, ο συνδυαστικός μηχανισμός, που περιέχει στοιχεία από τους άλλους δυο μηχανισμούς. (MG: Molten Globule, U: Unfolded state). (Σχήμα από (Nishii, Kataoka et al. 1995)).

Στο σημείο αυτό θα μπορούσε να γίνει μια υπόθεση. Η απορρόφηση του πρωτεϊνικού δείγματος κατά τη θερμική αποδιάταξη της D30PA31P εμφανίζει μια μικρή διαταραχή, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται κατά τη μετάβαση της αγρίου τύπου Rop στην αποδιαταγμένη μορφή της. Στην περίπτωση της αγρίου τύπου Rop, η διαταραχή της απορρόφησης φαίνεται να οφείλεται στην απότομη απώλεια της δευτεροταγούς δομής στην αντίστοιχη θερμοκρασία. Το ερώτημα που γεννάται, λοιπόν, είναι αν η εικόνα του φάσματος της D30PA31P είναι αντιπροσωπευτικό του τρίτου μηχανισμού αποδιάταξης, που παρουσιάζεται στο σχήμα 1, όπου συνυπάρχουν στοιχεία της διακριτής μετάβασης και της βαθμιαίας απώλειας της δευτεροταγούς δομής. Σε αυτή τη φάση είναι δύσκολο να δοθεί ασφαλής απάντηση σε αυτό. Ένα δεύτερο ερώτημα που προκύπτει από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας είναι το εξής: είναι οι A31P και D30PA31P, molten globule καταστάσεις; Η A31P έχει ήδη υποτεθεί ότι αποτελεί μια κατάσταση molten globule (Glykos and Kokkinidis 2004). Προηγούμενες μελέτες στην A31P (Peters, Hinz et al. 1997) δείχνουν ότι η πρωτεΐνη εμφανίζει μια διακριτή μετάβαση κατά την αποδιάταξή της με Gdn-HCl και ουρία, κάτι που φαινομενικά είναι αντίθετο με τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας. Εντούτοις, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα διαφορετικά αποτελέσματα της χημικής και θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης οφείλονται στη χρήση διαφορετικών μεθόδων. Έχει δειχθεί (Farruggia and Pico 1999) ότι οι μέθοδοι αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές καταστάσεις αποδιάταξης.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι τα πειράματα αυτής της εργασίας συνάδουν με την υπόθεση ότι η A31P είναι μια molten globule κατάσταση. Ισχύει, όμως, το ίδιο και για την D30PA31P; Αν και τα πειράματα της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού συμφωνούν με αυτό, ωστόσο τα πειράματα της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης βρίσκονται σε αντίθεση με κάτι τέτοιο και είναι βέβαιο ότι θα χρειαστούν επιπλέον πειράματα για την επιβεβαίωση μιας τέτοιας θεωρίας. Αυτό που φαίνεται να ισχύει είναι ότι η D30PA31P αποτελεί ένα τοπικό ελάχιστο στην πορεία αναδίπλωσης της Rop, στο οποίο έχει παγιδευτεί ενεργειακά το μόριο. Με την μετάλλαξη A31P έχει δειχθεί ότι η στροφή παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση της Rop, όχι τόσο στο να καθορίζει την τελική δομή του μορίου, όσο στο να αποκλείει πιθανά μονοπάτια αναδίπλωσης, στα οποία θα μπορούσε να εισέλθει η πρωτεΐνη. Επομένως, μπορεί να υποτεθεί ότι, όχι μόνο η θέση 31, αλλά και τα υπόλοιπα κατάλοιπα της στροφής, συμμετέχουν στον καθορισμό των δυνατών μονοπατιών στα οποία μπορεί να εισέλθει η πρωτεΐνη.

Για να κατανοηθούν καλύτερα οι επιπτώσεις των δυο προλινών στη στροφή της Rop, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτού του αμινοξέος. Η παρουσία του πυρρολιδικού δακτυλίου περιορίζει τις δυνατές γωνίες ϕ που μπορεί να υιοθετήσει η trans προλίνη γύρω στις -60° . Από την άλλη, η γωνία ψ της trans προλίνης μπορεί να υιοθετήσει, κυρίως, τιμές γύρω από τις -150° και -20° (Milner-White, Bell et al. 1992). Τα γειτονικά, σε προλίνη, κατάλοιπα υιοθετούν συνήθως τιμές $\phi = 150^\circ$ ή $\phi = -30^\circ$. Οι προλίνες που βρίσκονται σε cis διαμόρφωση δεν διαφέρουν σημαντικά από τις trans, σε ότι αφορά τις προτιμώμενες γωνίες ϕ και ψ . Η κυριότερη διαφορά έγκειται στη μεγαλύτερη στερεοχημική παρεμπόδιση με αποτέλεσμα οι τιμές της γωνίας ψ γύρω από -20° να μην είναι συχνές στις προλίνες με cis διαμόρφωση. Γενικότερα, οι προλίνες θεωρούνται τα καταλληλότερα κατάλοιπα για τη δημιουργία στροφής (Fasman 1990) και υπάρχουν περιπτώσεις όπου στροφές σχηματίζονται από δυο προλίνες, που βρίσκονται σε σειρά (Lang and Schmid 1990). Τέτοιες περιπτώσεις καταδεικνύουν τη σημασία του σωστού ισομερισμού των προλινών στην επιλογή του μονοπατιού αναδίπλωσης και της τελικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας κατέστη δυνατή η κρυστάλλωση της D30PA31P. Οι κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν δεν έχουν βελτιωθεί τόσο ώστε να είναι κατάλληλοι για να υποβληθούν σε περίθλαση ακτίνων X. Στην περίπτωση αυτή, πάντως, είναι φανερή η καταλυτική σημασία της αλλαγής του σχήματος καθαρισμού της πρωτεΐνης. Οι συνθήκες, στις οποίες τελικά σχηματίστηκαν κρύσταλλοι της πρωτεΐνης, είχαν εξεταστεί και στις αρχικές προσπάθειες κρυστάλλωσης, με τη χρήση του αρχικού σχήματος καθαρισμού. Σε εκείνη την περίπτωση, όμως, δεν είχαν σχηματιστεί κρύσταλλοι. Στη διάρκεια αυτής της εργασίας δεν ήταν δυνατή η σημαντική βελτίωση των κρυστάλλων. Αυτό οφείλεται και στη σχετικά αργή εμφάνιση των κρυστάλλων (7-10 ημέρες). Το επόμενο βήμα είναι η συστηματική διερεύνηση και άλλων συνθηκών, που να ευνοούν το σχηματισμό καλύτερων κρυστάλλων του μεταλλάγματος, κατάλληλων για περίθλαση ακτίνων X.

Στην περίπτωση των παραλλαγών της Rop φαίνεται να υπάρχει μια ιδιαίτερη σχέση ανάμεσα στις ιδιότητες των μορίων και στις συνθήκες στις οποίες κρυσταλλώνουν (Kokkinidis, Vlassi et al. 1993). Έτσι, παραλλαγές στις οποίες έχουν μεταλλαχθεί κατάλοιπα του πυρήνα κρυσταλλώνουν σε παρόμοιες συνθήκες, ενώ οι παραλλαγές της στροφής κρυσταλλώνουν σε αρκετά διαφορετικές συνθήκες. Αυτές οι διαφορές φαίνεται να οφείλονται στις διαφορετικές κρυσταλλικές επαφές που σχηματίζουν τα

μόρια στα κρυσταλλικά πλέγματα. Στην περίπτωση της D30PA31P φαίνεται να ισχύει κάτι ξεχωριστό: Η πρωτεΐνη, αν και αποτελεί μια παραλλαγή της στροφής, ωστόσο, δεν κρυσταλλώνει σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές των άλλων παραλλαγών της στροφής (Kokkinidis, Vlassi et al. 1993). Αντίθετα, οι συνθήκες στις οποίες κρυσταλλώνει, τουλάχιστον σε αυτό το στάδιο, είναι πιο κοντά στις συνθήκες στις οποίες κρυσταλλώνουν οι παραλλαγές του υδρόφοβου πυρήνα (L41V, L41A, L48V). Οι πρωτεΐνες αυτές, όμως, χαρακτηρίζονται από τη δημιουργία κοιλοτήτων στο εσωτερικό του υδρόφοβου πυρήνα και η αλλαγή στη διαμόρφωσή τους αφορά στην κάμψη της μιας έλικας προς το εσωτερικό του μορίου, προκειμένου να ‘γεμίσει’ τη σχηματιζόμενη κοιλότητα (Vlassi, Cesareni et al. 1999). Λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι το αποτέλεσμα της εισαγωγής της προλίνης στη θέση 30, δίπλα από την προλίνη31, έχει ως αποτέλεσμα την κλίση των ελίκων (ή μιας από τις έλικες) προς το εσωτερικό του μορίου. Αυτό, βέβαια, παραμένει μια υπόθεση. Η τελική απάντηση θα δοθεί από τον προσδιορισμό της δομής αυτού του μεταλλάγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη DH5a και BL21DE3 της *E.coli*, και οι πλασμιδιακοί φορείς pET26b(+) (Novagen) και pF1K T7 Flexi Vector (Promega).

4.1 Οι φορείς κλωνοποίησης

4.1.1 Ο φορέας κλωνοποίησης pET26b(+) (Novagen)

Ο φορέας αυτός ανήκει στην οικογένεια των ColE1 πλασμιδίων. Χρησιμοποιεί το σύστημα lac, που περιλαμβάνει το γονίδιο lacI, που κωδικοποιεί για τον lac καταστολέα και τον lac χειριστή, που μπορεί να μπλοκάρει τη μεταγραφή. Η υπερέκφραση του γονιδίου-στόχου γίνεται κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του βακτηριοφάγου T7, ο οποίος είναι ειδικός για την T7 RNA πολυμεράση. Στο γονιδίωμα του βακτηριακού στελέχους BL21(DE3) είναι ενσωματωμένος ο προφάγος I του βακτηριοφάγου T7, που φέρει το γονίδιο της T7 πολυμεράσης. Το γονίδιο αυτό βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή lacUV5. Το προϊόν του γονιδίου lac I (lac repressor) προσδένεται στον υποκινητή lacUV5 και εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου της T7 πολυμεράσης. Ο επαγωγέας IPTG είναι χημικό ανάλογο της λακτόζης και η προσθήκη του έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του lac καταστολέα από τον lac χειριστή. Έτσι, μπορεί να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου της T7 πολυμεράσης από την πολυμεράση I του βακτηρίου. Η T7 πολυμεράση μεταγράφει το γονίδιο-στόχο με πολύ γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα μέσα σε λίγες ώρες το προϊόν του να αποτελεί το πολυπληθέστερο συστατικό του κυττάρου. Η πρωτεΐνη που παράγεται με αυτό το σύστημα φέρει στο καρβοξυ-τελικό της άκρο δυο επιπλέον κατάλοιπα (Gly, Leu), που δημιουργούνται λόγω του τρόπου κλωνοποίησης και έναν εξαϊστιδινικό επίτοπο (6xHis-Tag). Ο pET26b(+) φέρει γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη.

4.1.2 Ο φορέας κλωνοποίησης pF1K T7 Flexi Vector (Promega)

Ο φορέας αυτός χρησιμοποιεί το ίδιο σύστημα με τον pET26b(+) για την υπερέκφραση του γονιδίου-στόχου και την υπερπαραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η διαφορετικότητά του έγκειται στην απουσία του ColE1 μηχανισμού αντιγραφής των πλασμιδίων και στο ότι η πρωτεΐνη-στόχος παράγεται εγγενής, χωρίς επιπλέον κατάλοιπα ή επίτοπους. Ο pF1K φέρει γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη.

4.2 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας-Χειρισμός DNA

4.2.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Σε αυτή την τεχνική εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος της πηκτής αγαρόζης και τα νουκλεϊκά οξέα, λόγω του αρνητικού τους φορτίου, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο. Με αυτό τον τρόπο, τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Στην πηκτή αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει στο υπεριώδες φως. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να διακριθούν οι ζώνες του DNA σε συσκευή με UV light. Η αγαρόζη, που διατίθεται σε μορφή σκόνης αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5x σε κωνική φλάσκα. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων (~3min. στα 900W) μέχρι διαλύσεως της αγαρόζης και αφήνεται να κρυώσει. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος είναι περίπου 50° C, προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση και το διάλυμα χύνεται σε ειδική ηλεκτροφορητική συσκευή. Αμέσως τοποθετείται η ειδική χτένα, η οποία δημιουργεί τα πηγαδάκια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα. Μετά την πήξη του διαλύματος αγαρόζης, αφαιρείται η χτένα. Τα δείγματα αναμειγνύονται με 6x agarose gel-loading buffer και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V. Οι πηκτές αγαρόζης που παρασκευάστηκαν είναι 1-1.5%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA, που έπρεπε να διαχωριστούν (Πίνακας 1).

Πηκτή αγαρόζης 1-1.5%	
Αγαρόζη	1-1,5g
TBE 0.5x	100ml
Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)	5μl

Πίνακας 1. Σύσταση πηκτής αγαρόζης

4.2.2 Παρασκευή και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση για διαγνωστικούς σκοπούς

Πρωτόκολλο

1. Μοναδική αποικία από στερεή καλλιέργεια LB agar ή κύτταρα από glycerol stock εμβολιάζονται σε 5ml LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό και η καλλιέργεια επωάζεται ολονύκτια στους 37°C.
2. Από τα 5ml της καλλιέργειας φυγοκεντρώνται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης (eppendorf tube) τα 1,5ml στις 14.000rpm για 30sec. στους 4°C.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl παγωμένου Διαλύματος I (Πίνακας 2).
4. Προστίθενται 200μl φρέσκου Διαλύματος II (Πίνακας 2).
5. Τα δείγματα ανακατεύονται ελαφρά και τα κύτταρα επωάζονται για 2min. στον πάγο.
6. 150μl παγωμένου Διαλύματος III (Πίνακας 2) προστίθενται και τα tubes ανακατεύονται ελαφρά για ~10sec. Τα κύτταρα επωάζονται σε πάγο για 3-5min.
7. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000rpm για 5min. στους 4°C.
8. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλη:χλωροφόρμιο. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 2-4min. στους 4°C.
9. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρώνται στις 13.000rpm για 2-4min. στους 4°C.

10. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθενται 3 όγκοι 100% αιθανόλης. Ακολουθεί ανάμειξη και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 15min. στους 4 °C.
11. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1ml 70% αιθανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10min. στις 13.000rpm στους 4 °C.
12. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (DNA) αφήνεται να στεγνώσει.
13. Τελικά, το DNA επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο νερό και αποθηκεύεται στους -20 °C.

Διάλυμα I	Διάλυμα II	Διάλυμα III
50mM Glucose 25mM Tris-HCl pH 8.0 10mM EDTA pH 8.0	0,2N NaOH 1% SDS	60ml 5M Potassium Acetate 11,5ml Glacial Acetic acid 28,5ml H ₂ O

Πίνακας 2. Σύσταση διαλυμάτων I, II και III.

4.2.3 Παρασκευή και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA, ποιότητας αλληλούχισης, με αλκαλική λύση

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα: QIAGEN Plasmid Mini and Maxi Purification Protocol, Invitrogen Midi Protocol, Macherey-Nagel Nucleospin Plasmid και Promega SV Wizard.

Τα παραπάνω πρωτόκολλα βασίζονται στη χρήση ρητινών ανιοντικής ανταλλαγής, οι οποίες δεσμεύουν το DNA στις κατάλληλες ιοντικές συγκεντρώσεις και στο κατάλληλο pH. Το RNA, οι πρωτεΐνες και οι διάφορες προσμίξεις χαμηλού μοριακού βάρους απομακρύνονται με πλύσεις και το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής συγκέντρωσης ή με νερό.

4.2.4 Εξαγωγή DNA από πηκτή αγαρόζης

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο QIAEX II Agarose Gel Extracion της QIAGEN.

4.2.5 Επανακλωνοποίηση του γονιδίου rop στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+)

Το αρχικό υλικό DNA που ήταν διαθέσιμο ήταν το γονίδιο rop, με τη μετάλλαξη A31P, ενσωματωμένο στη θέση HpaII του πλασμιδιακού φορέα pEX43 (Castagnoli et al., 1989). Για την επανακλωνοποίηση του γονιδίου στον pET26b(+) σχεδιάστηκαν οι εξής εκκινητές: p1 (forward) με αλληλουχία 5'-CGC GAC GGC CAT ATG ACC AAA CAG GAA AAA ACC GCC-3' και p2 (reverse) με αλληλουχία 5'-CCG CTC GAG GAG GTT TTC ACC GTC ATC ACC-3'. Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο, ώστε το γονίδιο rop να κλωνοποιηθεί στις θέσεις NdeI και XhoI του Multicloning site του pET26b(+). Χρησιμοποιώντας τους παραπάνω εκκινητές το γονίδιο της Rop ενισχύθηκε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Η αντίδραση έγινε με τη χρήση του Expand Long Template PCR System (Roche) και χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω μείγμα:

DNA (10pg/μλ)	10μλ
10x Buffer 1	5μλ
dNTPs (10mM)	1,75μλ
p1(10μM)	1,5μλ
p2(10μM)	1,5μλ
H ₂ O (nuclease free)	29,5μλ
Πολυμεράση (5U/μλ)	0,75μλ

Ο συνολικός όγκος του μείγματος ήταν 50μλ και η αντίδραση διεξήχθη σε 10+30 κύκλους, ως εξής:

1. T= 94°C για 5min.
2. T= 94°C για 30sec.
3. T= 40°C για 30sec.
4. T= 68°C για 2min.
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και εκτέλεση 10 κύκλων για τα βήματα 2-4
6. T= 94°C για 30sec.
7. T= 68°C για 30sec.
8. T= 68°C για 2min.
9. Επιστροφή στο βήμα 6 και εκτέλεση 30 κύκλων για τα βήματα 6-8
10. T= 68°C για 10min.

11. Διατήρηση στους 4°C.

Με την παραπάνω αντίδραση παρήχθη το γονίδιο *gor* φέροντας, πλέον, στα άκρα του, τις θέσεις αναγνώρισης των *NdeI* και *XhoI* περιοριστικών ενζύμων. Η ενίσχυση του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5%. Στη συνέχεια ακολούθησε η πέψη του προϊόντος της PCR (γονίδιο *gor*) και του φορέα [pET26b(+)] με τα προαναφερθέντα περιοριστικά ένζυμα, προκειμένου να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα για την αντίδραση σύνδεσής τους. Η πέψη του φορέα έγινε με την εξής αντίδραση:

pET26b (+)	5μλ
10x Buffer NEB4	10μλ
XhoI(20U/μλ)	2μλ
ddH ₂ O	83μλ

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 100μλ και το μείγμα επώαστηκε για 1,5h στους 37°C. Αμέσως μετά προστέθηκαν 4μλ *NdeI*_{10U/μλ} στην αντίδραση και ακολούθησε περαιτέρω επώαση στους 37°C για 3h. Τα αποτελέσματα τη πέψης έγιναν ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Η πέψη του προϊόντος της PCR έγινε με την παρασκευή του παρακάτω μείγματος:

PCR προϊόν	25μλ
10x Buffer NEB4	10μλ
<i>NdeI</i> (10U/μλ)	3μλ
<i>XhoI</i> (20U/μλ)	3μλ
ddH ₂ O	59μλ

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 100μλ και το μείγμα επωάστηκε για 1,5h στους 37°C. Το ένθεμα και ο φορέας, αφού καθαρίστηκαν, υποβλήθηκαν σε αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction) με την T4 λιγάση, με την Παρασκευή του παρακάτω μείγματος:

pET26b(+)	4μλ
PCR προϊόν	2μλ
10x Ligase Buffer	1μλ
T4 Ligase	1μλ
ddH ₂ O	2μλ

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μλ και το μείγμα επωάστηκε στους 16°C για 3h. Το πλασμίδιο που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό DH5α δεκτικών κυττάρων και οι υποψήφιοι κλώνοι στάλθηκαν για ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

4.2.6 Κατασκευή της wtRop

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το αρχικό ένθεμα που εισήχθη στον pET26b(+) είναι το γονίδιο της Rop με μεταλλαγμένη την αλανίνη³¹ σε προλίνη. Για την κατασκευή του wtrop χρησιμοποιήθηκε το QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit της Stratagene. Πρόκειται για ένα σύστημα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, το οποίο επιτρέπει την απευθείας μετάλλαξη του γονιδίου-στόχου, χωρίς την ανάγκη περαιτέρω κλωνοποίησης του γονιδίου. Περιλαμβάνει τρία στάδια, όπου αρχικά μια πολυμεράση υψηλής ακρίβειας (PfuUltra High-Fidelity polymerase) δημιουργεί νέα αντίγραφα του πλασμιδίου, που φέρουν τη μετάλλαξη, με περιορισμένο αριθμό κύκλων αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την πέψη του DNA-μήτρας, που είναι μεθυλιωμένο, με το ένζυμο Dpn I. Το τελικό στάδιο αφορά το μετασχηματισμό κατάλληλων επιδεκτικών κυττάρων (XL1-Blue) με τα μεταλλαγμένα αντίγραφα του πλασμιδίου. Για τη μετάλλαξη αυτή

σχεδιάστηκαν οι εξής εκκινητές: wt1 5'-GAG AAA CTC AAC GAG CTG GAC GCG GAT GAA CAG GCA GAC-3' και wt2 5'-GTC TGC CTG TTC ATC CGC GTC CAG CTC GTT GAG TTT CTC-3'. Χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο, που φέρει το γονίδιο rop με τη μετάλλαξη A31P, ως μήτρα, ετοιμάστηκε το παρακάτω μείγμα για την αντίδραση μεταλλαξιγένεσης:

DNA template (10ng/μλ)	10μλ
10x Reaction Buffer	5μλ
wt1 (100ng/μλ)	1,25μλ
wt2 (100ng/μλ)	1,25μλ
dNTP mix	1μλ
H ₂ O (nuclease free)	31,5μλ
PfuUltra polymerase (2,5U/μλ)	1μλ

Ο συνολικός όγκος του μείγματος ήταν 50μλ και η αντίδραση διεξήχθη ως εξής:

1. T= 95°C για 30sec.
2. T= 95°C για 30sec.
3. T= 70°C για 1min.
4. T= 68 °C για 6min.
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και εκτέλεση 12 κύκλων για τα βημάτων 2-4.
6. Διατήρηση στους 4°C.

Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο του QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Οι υποψήφιοι κλώνοι στάλθηκαν για ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

4.2.7 Κατασκευή του μεταλλάγματος στροφής D30PA31P της Rop

Η κατασκευή του μεταλλάγματος D30PA31P έγινε με την ίδια μέθοδο, που κατασκευάστηκε και η wtRop. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι εξής

εκκινητές: 2p1 5'-GAG AAA CTC AAC GAG CTG CCC CCG GAT GAA CAG GCA GAC-3' και 2p2 5'-GTC TGC CTG TTC ATC CGG GGG CAG CTC GTT GAG TTT CTC-3'. Προετοιμάστηκε μείγμα όπως για την wtRop, με τη διαφορά ότι ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pET26b(+)A31P_{rop} σε ποσότητα 20ng. Η αντίδραση έγινε ως εξής:

1. T= 95°C για 30sec.
2. T= 95°C για 30sec.
3. T= 65°C για 1min.
4. T= 68 °C για 6min.
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και εκτέλεση 14 κύκλων για τα βημάτων 2-4.
6. Διατήρηση στους 4°C.

Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο του QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Οι υποψήφιοι κλώνοι στάλθηκαν για ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

4.2.8 Κατασκευή μεταλλάγματος στροφής D30GA31P και μεταλλαγμάτων αποκατάστασης του προτύπου της επτάδας 2aaL και 2L της Rop.

Για την κατασκευή του μεταλλάγματος D30GA31P χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: dg1 5'-GAG AAA CTC AAC GAG CTG GGC CCG GAT GAA CAG GCA GAC-3' και dg2 5'-GTC TGC CTG TTC ATC CGG GCC CAG CTC GTT GAG TTT CTC-3'. Οι εκκινητές για τη δημιουργία του μεταλλάγματος 2aaL είναι οι: 2aaL1 5'-CTG GAC GCG GAT CTG GAA CAG CTG GCA GAC ATC TGT G-3' και 2aaL2 5'-C ACA GAT GTC TGC CAG CTG TTC CAG ATC CGC GTC CAG-3'. Για την κατασκευή του μεταλλάγματος 2L χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: 2L1 5'-CTC AAC GAG CTG GCG GAC GCA GCG GAT GAA CTG GCA GAC ATC TGT G-3' και 2L2 5'-C ACA GAT GTC TGC CAG TTC ATC CGC TGC GTC CGC CAG CTC GTT GAG-3'. Για την κατασκευή αυτών των μεταλλαγμάτων χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά, παρόμοιες συνθήκες με την wtRop και το μέταλλαγμα D30PA31P. Στην προσπάθεια κατασκευής τους δοκιμάστηκαν ποικίλες άλλες συνθήκες, όπως διαφορετικά πλασμίδια-μήτρες (pET26b(+)wtRop, pET26b(+)A31P_{rop}, pET26b(+)D30PA31P_{rop}) διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών κατά την μεταλλαξίγνεση, διαφορετικοί χρόνοι αποδιάταξης του DNA-μήτρας, υβριδισμού των εκκινητών και επέκτασης στο τελικό στάδιο της μεταλλαξίγνεσης.

4.2.9 Επανακλωνοποίηση του γονιδίου της Rop στον πλασμιδιακό φορέα pF1K T7 Flexi της Promega

Για την εισαγωγή του γονιδίου της Rop στον pF1K φορέα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: flex1 (forward) 5'-G GGC GCG ATC GCC ATG ACC AAA CAG GAA AAA ACC G -3' και flex2 (reverse) 5'-GC GCG TTT AAA CTC AGA GGT TTT CGC CGT CAT-3'. Για να διασφαλιστεί η ενίσχυση του γονιδίου της Rop, που βρίσκεται μέσα στο MCS του pET26b(+), αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές T7 και T7 reverse, οι οποίοι υβριδίζονται εκατέρωθεν του MCS. Για την ενίσχυση του rop χρησιμοποιήθηκε το Expand Long Template PCR System και ετοιμάστηκε το παρακάτω μείγμα:

DNA (100pg/μλ)	10μλ
10x Buffer 2	5μλ
dNTPs (10mM)	1,75μλ
T7 primer (3,2pmol/μλ)	7μλ
T7 reverse primer (3,2pmol/μλ)	7μλ
H ₂ O (nuclease free)	20,75μλ
Πολυμεράση (5U/μλ)	0,5μλ

Ο συνολικός όγκος του μείγματος ήταν 50μλ και η αντίδραση έγινε ως εξής:

1. T= 94°C για 2min.
2. T= 94°C για 15sec.
3. T= 50°C για 30sec.
4. T= 68°C για 2min.
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και εκτέλεση 30 κύκλων για τα βήματα 2-4.
6. T= 68°C για 10min.
8. Διατήρηση στους 4°C.

Τα προϊόντα της PCR έγιναν ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Αφού καθαρίστηκε το προϊόν της PCR ετοιμάστηκε το παρακάτω μείγμα για τη δημιουργία των κατάλληλων άκρων στο γονίδιο, με τη χρήση Taq πολυμεράσης (MINOTECH):

DNA (3ng/μλ)	1μλ
10x Buffer (με MgCl ₂)	5μλ
dNTPs (10mM)	1μλ
Flex1 (10pmol/μλ)	5μλ
Flex2 (10pmol/μλ)	5μλ
H ₂ O (nuclease free)	32,75μλ
Taq (5U/μλ)	0,25μλ

Ο όγκος του μείγματος ήταν 50μλ και η αντίδραση έγινε ως εξής:

1. T= 94°C για 2min.
2. T= 94°C για 30sec.
3. T= 63°C για 30sec.
4. T= 72°C για 1min.
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και εκτέλεση 30 κύκλων για τα βήματα 2-4.
6. T= 72°C για 10min.
8. Διατήρηση στους 4 °C.

Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% και αυτά που αντιστοιχούσαν στο σωστό μήκος DNA καθαρίστηκαν. Ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος και του φορέα pF1K με τα ένζυμα SgfI και PmeI. Ετοιμάστηκαν τα εξής μείγματα:

PCR προϊόν (500ng)	8μλ
5x Flexi Digest Buffer	4μλ
Flexi Enzyme Blend	4μλ
H2O (nuclease free)	4μλ

pF1K φορέας (200ng)	2μλ
5x Flexi Digest Buffer	4μλ
Flexi Enzyme Blend	2μλ
H2O (nuclease free)	12μλ

Ο όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 20μλ. Τα μείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30min. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Promega (Flexi Vector Systems, Promega). Μετά τον καθαρισμό τους, το γονίδιο και ο pF1K φορέας υποβάλλονται σε αντίδραση σύνδεσής τους με T4 DNA λιγάση (Promega). Για την αντίδραση αυτή παρασκευάστηκε το ακόλουθο μείγμα:

pF1K (50ng)	5μλ
PCR προϊόν (100ng)	4μλ
2x Ligase Buffer	10μλ
T4 DNA λιγάση (20U/μλ)	1μλ

Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 20μλ και το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Ακολούθησε μετασχηματισμός DH5a δεκτικών κυττάρων και οι υποψήφιοι κλώνοι στάλθηκαν για ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

4.3 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων (competent cells) *E.coli*

Πρωτόκολλο

1. Μια μοναδική αποικία βακτηρίων, από στερεή καλλιέργεια LB agar, ενοφθαλμίζεται σε 5ml LB και η καλλιέργεια επωάζεται, ολονύκτια, στους 37°C, με ανάδευση.
2. 1ml από αυτή την καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 100ml LB και η καλλιέργεια επωάζεται, με ανάδευση, στους 37°C μέχρι η οπτική της πυκνότητα να γίνει $O.D._{550nm} = 0.6-0.8$.

3. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 2500rpm για 10min. στους 4°C.
4. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 30ml παγωμένου διαλύματος TfbI και επώαση στον πάγο για 30min.
5. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 3500rpm για 10min. στους 4°C.
6. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 4ml παγωμένου διαλύματος TfbII.
7. Τα κύτταρα χωρίζονται σε aliquots των 100μl σε παγωμένους σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης.
8. Τελικά, τα κύτταρα ψύχονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

4.4 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων (competent cells) *E.coli* με πλασμιδιακό DNA

Πρωτόκολλο

1. Ένα aliquot 100μl επιδεκτικών κυττάρων αφήνεται να ξεπαγώσει σε πάγο.
2. Προστίθενται 1-10ng πλασμιδιακού DNA.
3. Τα δείγματα ανακινούνται ελαφρά και επωάζονται σε πάγο για 30min.
4. Ακολουθεί heat shock των κυττάρων στους 42°C για 90sec.
5. Τα δείγματα επωάζονται σε πάγο για 2min.
6. Προστίθενται 400μl LB και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση των κυττάρων στους 37°C για 1h.
7. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία, με LB agar και το κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάζονται στους 37°C, ολονύκτια.

4.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

4.5.1 Προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford

Χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο πρωτόκολλο για τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976).

4.5.2 Προσδιορισμός με τη μέθοδο απορρόφησης (A) στα 280nm

Χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση: $A = \epsilon \times c \times l$

Όπου A η απορρόφηση στα 280nm, ϵ ο συντελεστής απορρόφησης (extinction coefficient), c η συγκέντρωση του δείγματος και l το μήκος της κυβελίδας. Ο συντελεστής ϵ υπολογίστηκε με το πρόγραμμα ProtParam του ExPASy.

4.6 Καθαρισμός των 6xHis-Rop πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγενείας Ni²⁺-NTA και χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Τόσο η αγρίου τύπου Rop όσο και τα μεταλλάγματά της που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εργασία φέρουν στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο μια ουρά έξι ιστιδινών (+2 κατάλοιπα γλυκίνη και λευκίνη, που προέρχονται από το φορέα). Ο εξαϊστιδινικός επίτοπος επιλέχθηκε να συζευχθεί με το καρβοξυ-τελικό άκρο, μιας και το τελευταίο είναι εξαιρετικά ευλύγιστο (Banner, Kokkinidis et al. 1987) και δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Η προσθήκη της ουράς των ιστιδινών στο μόριο της Rop γίνεται για πρώτη φορά σε μελέτες αυτού του μορίου και το μεγάλο πλεονέκτημά της έγκειται στον εύκολο, γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη χρήση χρωματογραφίας συγγενείας Ni²⁺-NTA. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ισχυρή πρόσδεση των εκτεθειμένων ιστιδινών σε άτομα Ni²⁺. Η ρητίνη αυτού του συστήματος περιέχει, ως προσροφητικό υλικό, αγαρόζη, που συνδέεται με τα ιόντα νικελίου μέσω νίτριλο-τριοξικού οξέος (NTA), το οποίο φέρει τρία καρβονύλια. Λόγω της σύνδεσης με το νίτριλο-τριοξικό οξύ (δεσμεύει τέσσερις θέσεις υποκαταστάτη), δυο θέσεις σύνδεσης του νικελίου παραμένουν ελεύθερες για να αλληλεπιδράσουν με την ουρά των ιστιδινών. Τελικά, 3 ιόντα νικελίου αρκούν για τη δέσμευση των έξι ιστιδινών που φέρει κάθε μόριο. Κατά το πέρασμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κολόνα Ni²⁺-NTA, θα κατακρατηθεί μόνο η πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο των ιστιδινών, ενώ οι τυχόν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες εξαλείφονται με εκπλύσεις της κολόνας με ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει κατάλληλη ποσότητα ιμιδαζολίου.

Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel Filtration Chromatography). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των υλικών που χρησιμοποιεί (Sephadex, Sephacryl, Sepharose) να διαχωρίζουν τα διάφορα μόρια ανάλογα με το μέγεθός τους. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου επιτυγχάνεται ο περαιτέρω καθαρισμός του πρωτεϊνικού δείγματος, καθώς και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους και του μεγέθους των πρωτεϊνών.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κολόνα Sephacryl S-100 (Amersham Pharmacia Biotech), η οποία είναι κατάλληλη για τη μελέτη πρωτεϊνών με μοριακό βάρος <70000Da. Η βαθμονόμηση της κολόνας και ο υπολογισμός των μοριακών

βαρών και των μεγεθών των διαφόρων πρωτεϊνών έγιναν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Amersham Pharmacia Biotech.

Η υπερέκφραση του γονιδίου της Rop και η υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης έγιναν με τον παρακάτω τρόπο, ενώ για τον καθαρισμό των διαφόρων πρωτεϊνών υπήρξε βελτιστοποίηση της διαδικασίας.

Μετά το μετασχηματισμό των BL21DE3 επιδεκτικών κυττάρων με τον κατάλληλο κλώνο, μια μοναδική αποικία από τη στερεή καλλιέργεια ενοφθαλμίζεται σε 100ml LB, που περιέχει καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μg/μl και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με ανάδευση (250rpm) ολονύκτια. Από αυτή την καλλιέργεια, 30ml ενοφθαλμίζονται σε ένα λίτρο LB με αντιβιοτικό και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με έντονη ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητά της να γίνει $O.D._{600nm} = 0.6-0.8$. Σε αυτό το σημείο προστίθεται ο επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1mM και η καλλιέργεια επωάζεται περαιτέρω για 4h. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 30min. στις 6000rpm στους 4°C. Τα κυτταρικά ιζήματα διατηρούνται στους -20°C.

4.7 Αρχικό σχήμα καθαρισμού

Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο) και προστίθενται αναστολείς πρωτεασών PMSF, leupeptin και βενζαμιδίνη σε τελικές συγκεντρώσεις , αντίστοιχα. Ακολουθεί το σπάσιμο των κυττάρων με ηχοβολισμό (10x60sec.), διατηρώντας το κυτταρικό διάλυμα συνεχώς μέσα σε πάγο και, έπειτα, φυγοκέντρηση για 1h. στις 13000rpm στους 4°C, προκειμένου να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και το μη διαλυτό μέρος των κυττάρων. Ταυτόχρονα, η κολόνα χρωματογραφίας Ni^{2+} -NTA εξισορροπείται με 40 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (ο ένας όγκος αντιστοιχεί στον όγκο της ρητίνης). Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης φορτώνεται στην εξισορροπημένη κολόνα και επωάζεται με, την περιέχουσα ιόντα Ni^{2+} , ρητίνη για ~30min. Στη συνέχεια, συλλέγεται το διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη (Flow Through) και φορτώνονται 20 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 1 (Wash buffer 1) με σύσταση 50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM NaCl και 10mM ιμιδαζόλιο. Το

διάλυμα αυτό συλλέγεται και φορτώνονται στην κολόνα 10 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 2 (Wash buffer 2) με σύσταση 50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM NaCl και 20mM ιμιδαζόλιο. Αφού συλλεχθεί και αυτό το διάλυμα, φορτώνονται στην κολόνα 5 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος 3 (Wash buffer 3) με σύσταση 50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM NaCl και 50mM ιμιδαζόλιο. Ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (100mM-300mM) με συνολικό όγκο έκλυσης ίσο με 5 όγκους κολόνας. Όλα τα στάδια του καθαρισμού ελέγχονται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τα κλάσματα, που περιέχουν την περισσότερη και καθαρότερη πρωτεΐνη, αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε ολονύκτια διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει σε ολονύκτια διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει 25mM Tris-HCl pH 8.0, Με τη χρήση συγκεντρωτικών σωλήνων Amicon Ultra (5000MW cutoff) το διάλυμα της πρωτεΐνης συγκεντρώνεται μέχρι ~3ml και φορτώνεται σε κολόνα μοριακής διήθησης S-100 (Gel filtration) (Amersham Biosciences), που έχει εξισορροπηθεί με έναν όγκο διαλύματος 25mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl. Τα κλάσματα που περιέχουν την περισσότερη πρωτεΐνη αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε ολονύκτια διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει 25mM Tris-HCl pH 8.0 και 50mM NaCl. Έπειτα, κάποια ποσότητα της πρωτεΐνης διατηρείται στους 4°C και η υπόλοιπη παγώνεται σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους -80°C.

4.8 Βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού

Η διαφορά του βελτιωμένου σχήματος καθαρισμού σε σχέση με το αρχικό, έγκειται στην προσθήκη αναγωγικού (β -μερκαπτοαιθανόλη) σε όλα τα στάδια του καθαρισμού. Έτσι, το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης έχει την ίδια σύσταση με την προσθήκη, ως τελική συγκέντρωση, 15mM β -μερκαπτοαιθανόλης. Το σπάσιμο των κυττάρων, η φυγοκέντρωση, η εξισορρόπηση της κολόνας και το φόρτωμα του υπερκειμένου γίνονται με τον ίδιο τρόπο, όπως και στο αρχικό σχήμα καθαρισμού. Αφού συλλεχθεί το flowthrough, φορτώνονται στην κολόνα 40 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 1 (Wash buffer 1) με σύσταση 50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο και 15mM β -μερκαπτοαιθανόλη. Το διάλυμα αυτό συλλέγεται και στη συνέχεια φορτώνονται στην κολόνα 40 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 2 (Wash buffer 2) με σύσταση 50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM

NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο και 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Ακολουθεί η έκλουση της πρωτεΐνης με 5 όγκους διαλύματος έκλουσης (Elution buffer) με σύσταση 50mM PO₄⁻ pH 8.0, 300mM NaCl, 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 250mM ιμιδαζόλιο. Η πρωτεΐνη συλλέγεται σε κλάσματα των 2,5ml. Όλα τα στάδια του καθαρισμού ελέγχονται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τα καθαρότερα κλάσματα αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε ολονύκτια διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει 25mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 1mM EDTA pH 8.0. Με τη χρήση συγκεντρωτικών σωλήνων Amicon Ultra (5000MW cutoff) το διάλυμα της πρωτεΐνης συγκεντρώνεται μέχρι ~3ml και φορτώνεται σε κολόνα μοριακής διήθησης S-100 (Gel filtration) (Amersham Biosciences), που έχει εξισορροπηθεί με έναν όγκο διαλύματος 25mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 1mM EDTA pH 8.0. Τα κλάσματα που περιέχουν την περισσότερη πρωτεΐνη αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε ολονύκτια διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει 20mM Tris-HCl pH 7.5 και 20mM NaCl. Στη συνέχεια, προστίθενται στο δείγμα EDTA pH 8.0 και DTT σε τελικές συγκεντρώσεις 1mM και τα δυο. Το δείγμα συγκεντρώνεται με χρήση συγκεντρωτικών σωλήνων Amicon Ultra (5000MW cutoff) σε τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης ~10-15mg/ml (Bradford). Κάποια ποσότητα φυλάσσεται στους 4 °C, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα χωρίζεται σε aliquots των 50μl, τα οποία ψύχονται σε υγρό άζωτο και διατηρούνται στους -80 °C. Η συνολική απόδοση σε πρωτεΐνη είναι ~50mg/l καλλιέργειας και η τελική καθαρότητα είναι >95%.

4.9 Ανάλυση καθαρότητας και μεγέθους πρωτεϊνών

4.9.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Η ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE αποτελεί μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και τον καθορισμό της υπερέκφρασής τους. Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις προσδίδει αρνητικό φορτίο, επιτρέποντας έτσι να κινηθούν μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο και να διαχωριστούν μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους. Η κίνηση των πρωτεϊνών γίνεται μέσω των πόρων της πηκτής του δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου. Στη

συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές 15%. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε βασιζόμενη στα πρωτόκολλα της BIORAD.

4.9.2 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου με χρώση Coomassie Blue.

Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, οι πηκτές ακρυλαμιδίου επωάζονται για 20-30min. σε διάλυμα Coomassie Blue. Το διάλυμα αυτό (Staining Solution) περιέχει μια ειδική χρωστική (Coomassie Brilliant Blue), η οποία βάφει μπλε τις πρωτεϊνικές ζωνώσεις. Για την καλύτερη μελέτη των τελευταίων, οι πηκτές, αφού βαφούν, επωάζονται σε διάλυμα αποχρωματισμού (Distaining Solution), το οποίο απομακρύνει το μπλε φόντο και αφήνει βαμμένες μόνο τις πρωτεϊνικές ζωνώσεις. Η σύσταση των διαλυμάτων αυτών παρουσιάζεται στον πίνακα 3.

Coomassie Brilliant Blue (Staining solution) (100ml)	Διάλυμα αποχρωματισμού (Distaining solution) (100ml)
0.25g Coomassie Brilliant Blue R-250	45ml ddsH ₂ O
45ml ddsH ₂ O	45ml Μεθανόλη
45ml Μεθανόλη	10ml Οξικό οξύ
10ml Οξικό οξύ	

Πίνακας 3. Σύσταση διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού των πηκτών ακρυλαμιδίου

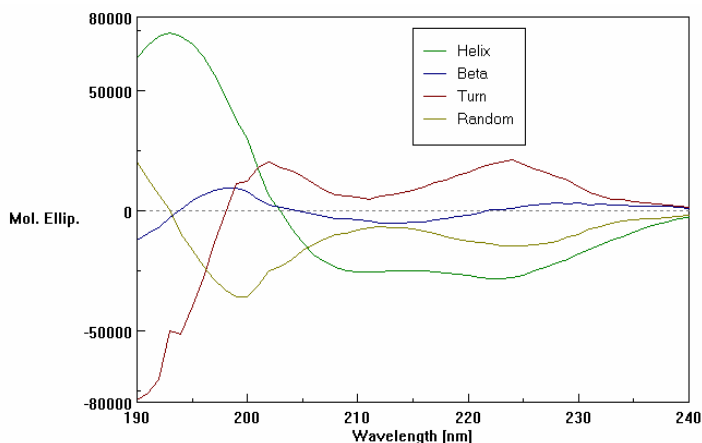
4.10 Πρωτεϊνικές μελέτες με τη χρήση Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωισμού (CD)

Το πολωμένο φως αποτελείται από δυο κυκλικά, πολωμένα, συστατικά του ίδιου μεγέθους από τα οποία το ένα είναι αριστερόστροφο και το άλλο δεξιόστροφο. Η διαφορετική απορρόφηση των δυο αυτών συστατικών προκαλεί το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού. Προκειμένου να δημιουργηθεί αυτό το φαινόμενο θα πρέπει το πολωμένο φως να αντιδράσει με οπτικά ενεργές (χειρικές) ουσίες (Greenfield 1996). Αυτές οι ουσίες είτε περιέχουν εγγενή χειρικότητα, είτε βρίσκονται σε χειρικό περιβάλλον (Kelly and Price 2000). Η διαφορετική απορρόφηση των επιμέρους συστατικών του πολωμένου φωτός οδηγεί στη δημιουργία ελλειπτικά πολωμένου

φωτός, που τελικά μετατρέπεται στο σήμα του κυκλικού διχρωισμού (Kelly, Jess et al. 2005). Τα φασματοφωτόμετρα κυκλικού διχρωισμού μετράνε τη διαφορά της απορρόφησης μεταξύ αριστερόστροφα και δεξιόστροφα, πολωμένης ακτινοβολίας, δηλαδή: $\Delta A = A_L - A_R$. Η σχέση που συνδέει αυτή τη διαφορά απορρόφησης με την έλλειψη θ , που προκαλείται στο πολωμένο φως είναι $\theta = 32.98 \Delta A$. Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού λαμβάνονται όταν η διαφορά απορρόφησης μετريέται σε σχέση με το μήκος κύματος.

Οι, οπτικά, ενεργές ομάδες στις πρωτεΐνες είναι οι πεπτιδικοί δεσμοί της κύριας αλυσίδας και οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Οι πεπτιδικοί δεσμοί απορροφούν το πολωμένο φως στην περιοχή του άπω-υπεριώδους (far UV, 240-180nm), ενώ οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες απορροφούν στο εγγύς-υπεριώδες (near UV, 320-260nm).

Τα φάσματα της απορρόφησης των πεπτιδικών δεσμών είναι χαρακτηριστικά για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής (Σχήμα 1). Έτσι, η α -έλικα εμφανίζει δυο αρνητικές κορυφές στα 222 και 208nm και μια έντονη, θετική, κορυφή στα 190nm. Η β -στροφή εμφανίζει θετικές κορυφές κοντά στα 225nm, στα 200-205nm και 180-190nm και μια αρνητική στα 210-215nm. Μια αρνητική κορυφή στα 215-216nm και μια θετική στα 195-200nm είναι το πρότυπο της β -πτυχωτής επιφάνειας, ενώ τα πεπτίδια χωρίς δομή (random coil) εμφανίζουν μια αρνητική κορυφή στα 197-199nm. Η ανάλυση των φασμάτων αυτών με ειδικούς αλγόριθμους μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες (ποιοτικές και ποσοτικές) για το περιεχόμενο μιας πρωτεΐνης σε δευτεροταγή, δομικά, στοιχεία. Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη της συμπεριφοράς μιας πρωτεΐνης κατά την θερμική, ή χημική της αποδιάταξη και επαναδιάταξη. Η ανάλυση των φασμάτων αυτών δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την πορεία αναδίπλωσης μιας πρωτεΐνης. Επίσης, τα φάσματα αυτά χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών και κινητικών παραμέτρων των αντιδράσεων αποδιάταξης και επαναδιάταξης των, υπό μελέτη, πρωτεϊνών.



Σχήμα 1. Χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης του πολωμένου φωτός στο άπω-υπεριώδες για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

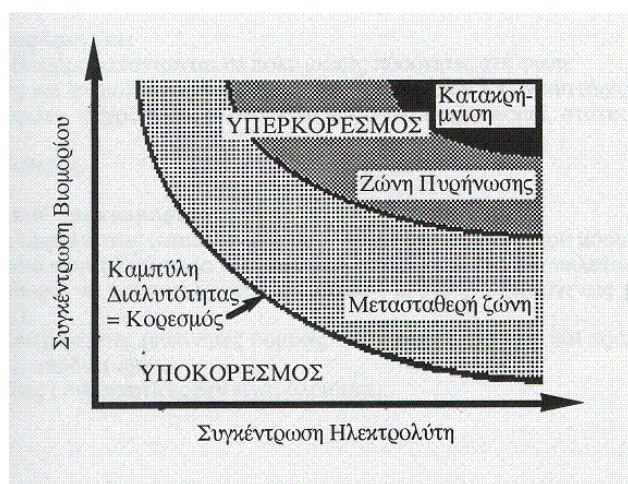
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο J-810 της Jasco. Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε το PTC-423S/L Peltier Type Temperature Control System της Jasco. Η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με τη χρήση του άλατος αμμωνίου του d-10-καμφορσουλφονικού οξέος. Η ροή του αζώτου (απαραίτητο για την καλή λειτουργία του φασματοφωτομέτρου, καθώς απομακρύνει το O₂ από τα εσωτερικά συστήματά του) ήταν 3-5l/min., ενώ αυξανόταν στα 10-15l/min. για μετρήσεις κάτω από τα 190nm. Για τη λήψη των φασμάτων δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και διαφορετικές κυψελίδες (1-10mm). Οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικά διαλύματα πρωτεΐνης 10mM PO₄⁻ pH 7.0 και 10mM PO₄⁻ pH 7.0, 10mM Na₂SO₄, 1mM EDTA pH 8.0. Όλα τα φάσματα διορθώθηκαν με το φάσμα του ρυθμιστικού διαλύματος και η ανάλυση των φασμάτων έγινε με τα προγράμματα Spectra Analysis και Interval Analysis της Jasco.

4.11 Κρυστάλλωση του μεταλλάγματος στροφής D30PA31P της Rop.

4.11.1 Τεχνικές και Μέθοδοι

Η κρυσταλλογραφία είναι μια μέθοδος επιλογής για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής χημικών μορίων και δη των πρωτεϊνών και βασίζεται στην περίθλαση ακτίνων X από κρυστάλλους της, υπό μελέτη, πρωτεΐνης. Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι μια υποκατηγορία της κατακρήμνισης των βιομορίων. Η κρυσταλλική κατάσταση χαρακτηρίζεται από υψηλή τάξη και συμμετρία στο πακετάρισμα των μορίων και το κρυσταλλικό πλέγμα προϋποθέτει επαναλήψεις

όμοιων δομικών μονάδων. Αυτό σημαίνει ότι ανομοιογενή δείγματα είναι εξαιρετικά δύσκολο να κρυσταλλώσουν και για αυτό στην κρυσταλλογραφία είναι απαραίτητη η μέγιστη δυνατή καθαρότητα και ομοιογένεια του δείγματος. Για να κρυσταλλώσει ένα βιομόριο, θα πρέπει το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται να υπερκορεσθεί. Ο υπερκορεσμός του διαλύματος ενός βιομορίου είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση της διαλυτότητάς του. Η διαλυτότητα των βιομορίων περιγράφεται από τα λεγόμενα διαγράμματα διαλυτότητας, τα οποία συσχετίζουν την διαλυτότητα ενός βιομορίου με τη συγκέντρωσή του, τη συγκέντρωση των παραγόντων κατακρήμνισης, το pH, τη θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ κτλ. Στο σχήμα 1, παρουσιάζεται ένα τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας.



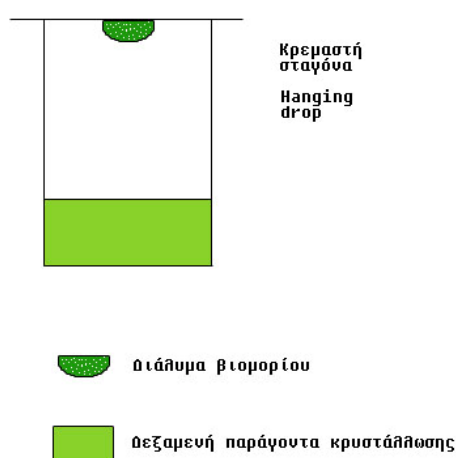
Σχήμα 1. Τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας ενός βιομορίου.

Η ζώνη ενπυρήνωσης (nucleation zone) είναι η περιοχή όπου δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλων. Η εύρεση αυτής της περιοχής είναι ο πρωταρχικός στόχος στα πειράματα κρυστάλλωσης. Η μετασταθερή ζώνη (metastable zone) είναι η περιοχή στην οποία οι ήδη σχηματισμένοι πυρήνες μπορούν να μεγαλώνουν. Ωστόσο, σε αυτή την περιοχή δεν είναι δυνατή η δημιουργία νέων πυρήνων. Η ζώνη ενπυρήνωσης και η μετασταθερή ζώνη είναι διακριτές περιοχές του υπερκορεσμού. Η κατακρήμνιση είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση υπερκορεσμού, κατά την οποία ο υπερκορεσμός του διαλύματος είναι τόσο υψηλός, ώστε η περίσσεια του βιομορίου κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα. Ο υπερκορεσμός ενός διαλύματος βιομορίου βοηθά το σύστημα να ξεπεράσει το ενεργειακό φράγμα της ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης. Αυτό σημαίνει ότι οι κατάλληλες συνθήκες υπερκορεσμού θα οδηγήσουν τα περισσότερα βιομόρια του διαλύματος στην κρυσταλλική φάση (δημιουργία πυρήνων), καθώς θα

είναι αυτή, πλέον, που θα ευνοείται ενεργειακά. Η δημιουργία πυρήνων και το μέγιστο των κρυστάλλων επηρεάζονται από ποικίλες παραμέτρους. Η συγκέντρωση και η ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος, το pH του διαλύματος, η φύση των κατακρημνιστών και των αλάτων, καθώς και η θερμοκρασία είναι μερικές από αυτές.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κρυστάλλωση του μεταλλάγματος είναι η διάχυση ατμών (vapor diffusion). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο φαινόμενο της τάσης ατμών. Όταν δυο διαλύματα τοποθετηθούν σε ένα αεροστεγώς κλειστό σύστημα, τείνουν να εξισορροπήσουν την τάση ατμών τους μέσω διάχυσης. Το διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη έχει πολύ μικρότερο όγκο σε σχέση με το δεύτερο διάλυμα που ονομάζεται δεξαμενή, κάτι που σημαίνει ότι η συγκέντρωση των διαφόρων ουσιών, που υπάρχουν στο διάλυμα της πρωτεΐνης, επηρεάζεται άμεσα από τη συγκέντρωση των συστατικών της δεξαμενής.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κρεμαστής σταγόνας (hanging drop). Σε αυτή την τεχνική, αρχικά προστίθενται όλα τα απαραίτητα συστατικά του διαλύματος της δεξαμενής (ρυθμιστικό διάλυμα, αλάτι, κατακρημνιστής, νερό κτλ.) και αναμειγνύονται. Ο συνολικός όγκος της δεξαμενής είναι 1ml και η σταγόνα δημιουργείται ως εξής: 3μl από το διάλυμα της δεξαμενής αναμειγνύονται με 3μl από το πρωτεϊνικό διάλυμα (10-15mg/ml, Bradford) και η σταγόνα, που σχηματίζεται, τοποθετείται σε σιλικοναρισμένη καλυπτρίδα. Η τελευταία τοποθετείται πάνω από το διάλυμα της δεξαμενής και ανάποδα (σχήμα 2). Η εξισορρόπηση του συστήματος έγινε στους 18°C και στους 4°C.



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της κρεμαστής σταγόνας.

4.11.2 Αρχικές προσπάθειες κρυστάλλωσης

Στις αρχικές προσπάθειες κρυστάλλωσης της D30PA31P χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό δείγμα που παρήχθη με το αρχικό σχήμα καθαρισμού. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής screen, που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο:

Hampton	Grid Screen Ammonium Sulfate	Grid Screen MPD	Grid Screen PEG 6000	Crystal Screen I	Crystal Screen II
Molecular Dimensions	Structure Screen I	Structure Screen II			
Jena	JBScreen 9 Bulk	Natrix			

Επίσης, εξετάστηκαν οι συνθήκες που παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	Αλάτι	Κατακρημνιστής Οργανικοί πτητικοί διαλύτες
pH 4.0, Sodium Acetate 0.05M		EtOH (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 5.0, Sodium Acetate 0.05M		EtOH (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 6.0, MES 0.05M		EtOH (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 7.0, HEPES 0.05M		EtOH (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 8.0, Tris 0.05M		EtOH (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 8.8, Tris 0.05M		EtOH (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 4.0, Sodium Acetate 0.05M		Μεθανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 5.0, Sodium Acetate 0.05M		Μεθανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 6.0, MES 0.05M		Μεθανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 7.0, HEPES 0.05M		Μεθανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%

pH 8.0, Tris 0.05M		Μεθανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 8.8, Tris 0.05M		Μεθανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH 7.8, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (v/v) 22%, 26%, 30%, 34%, 38%
pH 8.2, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (v/v) 22%, 26%, 30%, 34%, 38%
pH 8.4, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (v/v) 15%, 20%, 22%, 25%, 26%, 30%, 34%, 35%, 38%
pH 8.4, Tris 0.1M		2-Προπανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%
pH 8.5, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (v/v) 15%, 20%, 22%, 25%, 26%, 30%, 34%, 35%, 38%
pH 8.5, Tris 0.1M		2-Προπανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%
pH 8.6, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (v/v) 15%, 20%, 22%, 25%, 26%, 30%, 34%, 35%, 38%
pH 8.6, Tris 0.1M		2-Προπανόλη (v/v) 15%, 20%, 25%, 30%, 35%
pH 8.8, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (v/v) 22%, 26%, 30%, 34%, 38%
pH 7.6, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (w/v) 10%, 12%, 14%, 15%, 16%, 18%
pH 8.0, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (w/v) 10%, 12%, 14%, 15%, 16%, 18%
pH 8.5, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (w/v) 10%, 12%, 14%, 15%, 16%, 18%
pH 8.8, Tris 0.1M	Ammonium Acetate 0.2M	2-Προπανόλη (w/v) 10%, 12%, 14%, 15%, 16%, 18%

pH, Ρυθμιστικό διάλυμα	Κατακρημνιστής: Άλατα
pH 4, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M
pH 4.2, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M
pH 4.4, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M
pH 4.6, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M
pH 4.8, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M
pH 5.0, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M, 1.8M, 2.0M, 2.2M, 2.4M
pH 5.4, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M, 1.8M, 2.0M, 2.2M, 2.4M
pH 6.0, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M, 1.8M, 2.0M, 2.2M, 2.4M
pH 6.4, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M, 1.8M, 2.0M, 2.2M, 2.4M
pH 7.0, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M, 1.8M, 2.0M, 2.2M, 2.4M
pH 7.4, Sodium Acetate 0.1M	Ammonium Sulfate 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M, 1.8M, 2.0M, 2.2M, 2.4M

4.11.3 Τελικές προσπάθειες κρυστάλλωσης

Σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό δείγμα που παρήχθη με το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού. Τα πρωτεϊνικά δείγματα, που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν διατηρηθεί στους 4°C και στους -80°C. Εξετάστηκαν οι συνθήκες των παρακάτω, εμπορικά διαθέσιμων, screen:

Crystal Screen 2 (Hampton)

JBScreen Classic 3 (Jena)

JBScreen Classic 9 (Jena)

Οι υπόλοιπες συνθήκες που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

pH, Ρυθμιστικό διάλυμα	Άλατα	Κατακρημνιστής
pH 4.4, Sodium citrate 0.05M	NaCl 0.1M	EtOH 37%, 40%
pH 4.6, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%
pH 4.6, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%
pH 4.8, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%
pH 4.8, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%
pH 5.0, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.0, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.0, Sodium Acetate 0.1M	NaCl 0.4M	Μεθανόλη 10%, 15%
pH 5.2, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 45%, 47%, 50%, 55%
pH 5.2, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 45%, 47%, 50%, 55%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M		Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.3M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.4M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.05M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.1M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.15M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.4, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.2M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.4, MES 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.4, MES 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%,

		47%, 50%, 55%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M		Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.3M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	NaCl 0.4M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.05M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.1M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.15M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.6, Sodium Acetate 0.05M	Ammonium Sulfate 0.2M	Μεθανόλη 44%, 47%
pH 5.6, MES 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.6, MES 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.8, MES 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.8, MES 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 6.0, MES 0.05M	NaCl 0.1M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 6.0, MES 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 5.0, Sodium Acetate 0.05M		Ammonium Sulfate 1.6M
pH 5.0, Sodium Acetate 0.05M		Ammonium Sulfate 1.8M
pH 6.2 MES 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 7.2 HEPES 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 7.4 HEPES 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%
pH 8.0 Tris-HCl 0.05M	NaCl 0.2M	Μεθανόλη 38%, 41%, 44%, 47%, 50%, 55%

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**(96): 223-30.
- Banner, D. W., M. Kokkinidis, et al. (1987). "Structure of the ColE1 rop protein at 1.7 Å resolution." J Mol Biol **196**(3): 657-75.
- Baum, J., C. M. Dobson, et al. (1989). "Characterization of a partly folded protein by NMR methods: studies on the molten globule state of guinea pig alpha-lactalbumin." Biochemistry **28**(1): 7-13.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brazhnikov, E. V., N. Chirgadze Yu, et al. (1985). "Noncooperative temperature melting of a globular protein without specific tertiary structure: acid form of bovine carbonic anhydrase B." Biopolymers **24**(10): 1899-907.
- Brockwell, D. J., D. A. Smith, et al. (2000). "Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas." Curr Opin Struct Biol **10**(1): 16-25.
- Brunet, A. P., E. S. Huang, et al. (1993). "The role of turns in the structure of an alpha-helical protein." Nature **364**(6435): 355-8.
- Bychkova, V. E., R. Berni, et al. (1992). "Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH." Biochemistry **31**(33): 7566-71.
- Bycroft, M., S. Ludvigsen, et al. (1991). "Determination of the three-dimensional solution structure of barnase using nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochemistry **30**(35): 8697-701.
- Bycroft, M., A. Matouschek, et al. (1990). "Detection and characterization of a folding intermediate in barnase by NMR." Nature **346**(6283): 488-90.
- Castagnoli, L., M. Scarpa, et al. (1989). "Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein." Embo J **8**(2): 621-9.
- Castagnoli, L., C. Vetriani, et al. (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**(4): 378-87.
- Cesareni, G., M. Cornelissen, et al. (1984). "Control of pMB1 replication: inhibition of primer formation by Rop requires RNA1." Embo J **3**(6): 1365-9.
- Cesareni, G., M. A. Muesing, et al. (1982). "Control of ColE1 DNA replication: the rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(20): 6313-7.
- Chou, K. C., G. M. Maggiora, et al. (1992). "Role of loop-helix interactions in stabilizing four-helix bundle proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7315-9.
- Cohen, C. a. P., D.A.D. (1986). "α-helical coiled coils- A widespread motif in proteins." Trends Biochem. Sci. **11**: 245-248.
- Cooper, T. M. and R. W. Woody (1990). "The effect of conformation on the CD of interacting helices: a theoretical study of tropomyosin." Biopolymers **30**(7-8): 657-76.
- Crick, F. H. C. (1953). "The packing of α-helices: Simple coiled coils." Acta Crystallographica **6**: 689-697.
- Daggett, V. (2001). "Validation of protein-unfolding transition states identified in molecular dynamics simulations." Biochem Soc Symp(68): 83-93.

- Daggett, V. and A. R. Fersht (2003). "Is there a unifying mechanism for protein folding?" Trends Biochem Sci **28**(1): 18-25.
- Daggett, V. and M. Levitt (1992). "A model of the molten globule state from molecular dynamics simulations." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 5142-6.
- Daggett, V., A. Li, et al. (1996). "Structure of the transition state for folding of a protein derived from experiment and simulation." J Mol Biol **257**(2): 430-40.
- de Prat Gay, G., J. Ruiz-Sanz, et al. (1994). "The structure of the transition state for the association of two fragments of the barley chymotrypsin inhibitor 2 to generate native-like protein: implications for mechanisms of protein folding." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10943-6.
- de Prat Gay, G., J. Ruiz-Sanz, et al. (1995). "Conformational pathway of the polypeptide chain of chymotrypsin inhibitor-2 growing from its N terminus in vitro. Parallels with the protein folding pathway." J Mol Biol **254**(5): 968-79.
- Dinner, A. R., A. Sali, et al. (2000). "Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment." Trends Biochem Sci **25**(7): 331-9.
- Dolgikh, D. A., L. V. Abaturvov, et al. (1985). "Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: bovine alpha-lactalbumin." Eur Biophys J **13**(2): 109-21.
- Dyson, H. J., M. Rance, et al. (1988). "Folding of immunogenic peptide fragments of proteins in water solution. II. The nascent helix." J Mol Biol **201**(1): 201-17.
- Eberle, W., A. Pastore, et al. (1991). "The structure of ColE1 rop in solution." J Biomol NMR **1**(1): 71-82.
- Farruggia, B. and G. A. Pico (1999). "Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin." Int J Biol Macromol **26**(5): 317-23.
- Fasman, G. D., Ed. (1990). Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Plenum Publishing Corporation.
- Fersht, A. R. (1987). "Dissection of the structure and activity of the tyrosyl-tRNA synthetase by site-directed mutagenesis." Biochemistry **26**(25): 8031-7.
- Fersht, A. R. (1995). "Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle." Curr Opin Struct Biol **5**(1): 79-84.
- Fersht, A. R. (1995). "Mapping the structures of transition states and intermediates in folding: delineation of pathways at high resolution." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **348**(1323): 11-5.
- Fersht, A. R. (1995). "Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 10869-73.
- Fersht, A. R. (2000). "A kinetically significant intermediate in the folding of barnase." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14121-6.
- Fersht, A. R. (2000). "Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1525-9.
- Fersht, A. R. (2004). "Phi value versus psi analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(50): 17327-8.
- Fersht, A. R. (2004). "Relationship of Leffler (Bronsted) alpha values and protein folding Phi values to position of transition-state structures on reaction coordinates." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14338-42.
- Fersht, A. R. and V. Daggett (2002). "Protein folding and unfolding at atomic resolution." Cell **108**(4): 573-82.

- Fersht, A. R., J. W. Knill-Jones, et al. (1988). "Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism." Biochemistry **27**(5): 1581-7.
- Fersht, A. R., Leatherbarrow, R.J., and Wells, T.N.C. (1986). "Quantitative analysis of structure activity relationships in engineered proteins by linear free-energy relationships." Nature **322**.
- Fersht, A. R., R. J. Leatherbarrow, et al. (1987). "Structure-activity relationships in engineered proteins: analysis of use of binding energy by linear free energy relationships." Biochemistry **26**(19): 6030-8.
- Fersht, A. R., A. Matouschek, et al. (1992). "The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding." J Mol Biol **224**(3): 771-82.
- Fersht, A. R. and S. Sato (2004). "Phi-value analysis and the nature of protein-folding transition states." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 7976-81.
- Fersht, A. R. and T. N. Wells (1991). "Linear free energy relationships in enzyme binding interactions studied by protein engineering." Protein Eng **4**(3): 229-31.
- Fersht, A. R., A. J. Wilkinson, et al. (1985). "Fine structure-activity analysis of mutations at position 51 of tyrosyl-tRNA synthetase." Biochemistry **24**(21): 5858-61.
- Fersht, A. R. and G. P. Winter (1985). "Redesigning enzymes by site-directed mutagenesis." Ciba Found Symp **111**: 204-18.
- Gilmanshin, R. I. and O. B. Ptitsyn (1987). "An early intermediate of refolding alpha-lactalbumin forms within 20 ms." FEBS Lett **223**(2): 327-9.
- Glykos, N. M., G. Cesareni, et al. (1999). "Protein plasticity to the extreme: changing the topology of a 4-alpha-helical bundle with a single amino acid substitution." Structure **7**(6): 597-603.
- Glykos, N. M. and M. Kokkinidis (2004). "Structural polymorphism of a marginally stable 4-alpha-helical bundle. Images of a trapped molten globule?" Proteins **56**(3): 420-5.
- Glykos, N. M., Y. Papanikolau, et al. (2006). "Loopless Rop: structure and dynamics of an engineered homotetrameric variant of the repressor of primer protein." Biochemistry **45**(36): 10905-19.
- Go, M. and S. Miyazawa (1980). "Relationship between mutability, polarity and exteriority of amino acid residues in protein evolution." Int J Pept Protein Res **15**(3): 211-24.
- Goto, Y. and A. L. Fink (1989). "Conformational states of beta-lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt." Biochemistry **28**(3): 945-52.
- Greenfield, N. J. (1996). "Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data." Anal Biochem **235**(1): 1-10.
- Hagihara, Y., Y. Tan, et al. (1994). "Comparison of the conformational stability of the molten globule and native states of horse cytochrome c. Effects of acetylation, heat, urea and guanidine-hydrochloride." J Mol Biol **237**(3): 336-48.
- Hamada, S., Y. Moriyama, et al. (1994). "Conformational stability of alpha-lactalbumin missing a peptide bond between Asp66 and Pro67." J Protein Chem **13**(4): 423-8.
- Harrison, S. C. and R. Durbin (1985). "Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?" Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4028-30.

- Hedberg, L. and M. Oliveberg (2004). "Scattered Hammond plots reveal second level of site-specific information in protein folding: phi' (beta++)." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7606-11.
- Itzhaki, L. S., J. L. Neira, et al. (1995). "Search for nucleation sites in smaller fragments of chymotrypsin inhibitor 2." J Mol Biol **254**(2): 289-304.
- Itzhaki, L. S., D. E. Otzen, et al. (1995). "The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding." J Mol Biol **254**(2): 260-88.
- Jackson, S. E., N. elMasry, et al. (1993). "Structure of the hydrophobic core in the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2: a critical test of the protein engineering method of analysis." Biochemistry **32**(42): 11270-8.
- Jackson, S. E. and A. R. Fersht (1991). "Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition." Biochemistry **30**(43): 10428-35.
- Jackson, S. E. and A. R. Fersht (1991). "Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 2. Influence of proline isomerization on the folding kinetics and thermodynamic characterization of the transition state of folding." Biochemistry **30**(43): 10436-43.
- Jackson, S. E., M. Moracci, et al. (1993). "Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2." Biochemistry **32**(42): 11259-69.
- Jeng, M. F., S. W. Englander, et al. (1990). "Structural description of acid-denatured cytochrome c by hydrogen exchange and 2D NMR." Biochemistry **29**(46): 10433-7.
- Karplus, M. and D. L. Weaver (1976). "Protein-folding dynamics." Nature **260**(5550): 404-6.
- Karplus, M. and D. L. Weaver (1994). "Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data." Protein Sci **3**(4): 650-68.
- Kelly, S. M., T. J. Jess, et al. (2005). "How to study proteins by circular dichroism." Biochim Biophys Acta **1751**(2): 119-39.
- Kelly, S. M. and N. C. Price (2000). "The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function." Curr Protein Pept Sci **1**(4): 349-84.
- Khan, F., J. I. Chuang, et al. (2003). "The kinetic pathway of folding of barnase." J Mol Biol **333**(1): 169-86.
- Kim, P. S. and R. L. Baldwin (1982). "Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding." Annu Rev Biochem **51**: 459-89.
- Kokkinidis, M., M. Vlassi, et al. (1993). "Correlation between protein stability and crystal properties of designed ROP variants." Proteins **16**(2): 214-6.
- Kuroda, Y., S. Kidokoro, et al. (1992). "Thermodynamic characterization of cytochrome c at low pH. Observation of the molten globule state and of the cold denaturation process." J Mol Biol **223**(4): 1139-53.
- Kuwajima, K. (1977). "A folding model of alpha-lactalbumin deduced from the three-state denaturation mechanism." J Mol Biol **114**(2): 241-58.
- Kuwajima, K. (1989). "The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure." Proteins **6**(2): 87-103.
- Lacatena, R. M., D. W. Banner, et al. (1984). "Control of initiation of pMB1 replication: purified Rop protein and RNA I affect primer formation in vitro." Cell **37**(3): 1009-14.

- Lang, K. and F. X. Schmid (1990). "Role of two proline-containing turns in the folding of porcine ribonuclease." J Mol Biol **212**(1): 185-96.
- Lassalle, M. W. and H. J. Hinz (1998). "Unfolding of the tetrameric loop deletion mutant of ROP protein is a second-order reaction." Biochemistry **37**(23): 8465-72.
- Lassalle, M. W., H. J. Hinz, et al. (1998). "Dimer-to-tetramer transformation: loop excision dramatically alters structure and stability of the ROP four alpha-helix bundle protein." J Mol Biol **279**(4): 987-1000.
- Lattman, E. E. and G. D. Rose (1993). "Protein folding--what's the question?" Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 439-41.
- Leatherbarrow, R. J., A. R. Fersht, et al. (1985). "Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7840-4.
- Leszczynski, J. R., G. (1986). "Loops in globular proteins: a novel category of secondary structure." Science **234**: 849-855.
- Levitt, M. and A. Warshel (1975). "Computer simulation of protein folding." Nature **253**(5494): 694-8.
- Levy, Y., S. S. Cho, et al. (2005). "Symmetry and frustration in protein energy landscapes: a near degeneracy resolves the Rop dimer-folding mystery." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2373-8.
- Li, L. and E. I. Shakhnovich (2001). "Constructing, verifying, and dissecting the folding transition state of chymotrypsin inhibitor 2 with all-atom simulations." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13014-8.
- Matouschek, A., J. T. Kellis, Jr., et al. (1990). "Transient folding intermediates characterized by protein engineering." Nature **346**(6283): 440-5.
- Matouschek, A., J. T. Kellis, Jr., et al. (1989). "Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering." Nature **340**(6229): 122-6.
- Matouschek, A., D. E. Otzen, et al. (1995). "Movement of the position of the transition state in protein folding." Biochemistry **34**(41): 13656-62.
- Matouschek, A., L. Serrano, et al. (1992). "The folding of an enzyme. IV. Structure of an intermediate in the refolding of barnase analysed by a protein engineering procedure." J Mol Biol **224**(3): 819-35.
- Milner-White, E. J., L. H. Bell, et al. (1992). "Pyrrolidine ring puckering in cis and trans-proline residues in proteins and polypeptides. Different puckers are favoured in certain situations." J Mol Biol **228**(3): 725-34.
- Munson, M., S. Balasubramanian, et al. (1996). "What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties." Protein Sci **5**(8): 1584-93.
- Munson, M., R. O'Brien, et al. (1994). "Redesigning the hydrophobic core of a four-helix-bundle protein." Protein Sci **3**(11): 2015-22.
- Nagi, A. D., K. S. Anderson, et al. (1999). "Using loop length variants to dissect the folding pathway of a four-helix-bundle protein." J Mol Biol **286**(1): 257-65.
- Nagi, A. D. and L. Regan (1997). "An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein." Fold Des **2**(1): 67-75.
- Nishii, I., M. Kataoka, et al. (1995). "Thermodynamic stability of the molten globule states of apomyoglobin." J Mol Biol **250**(2): 223-38.
- Ohgushi, M. and A. Wada (1983). "'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains." FEBS Lett **164**(1): 21-4.
- Ohgushi, M. and A. Wada (1984). "Liquid-like state of side chains at the intermediate stage of protein denaturation." Adv Biophys **18**: 75-90.

- Oliveberg, M. (2001). "Characterisation of the transition states for protein folding: towards a new level of mechanistic detail in protein engineering analysis." Curr Opin Struct Biol **11**(1): 94-100.
- Oliveberg, M. and A. R. Fersht (1996). "New approach to the study of transient protein conformations: the formation of a semiburied salt link in the folding pathway of barnase." Biochemistry **35**(21): 6795-805.
- Paliakasis, C. D. and M. Kokkinidis (1992). "Relationships between sequence and structure for the four-alpha-helix bundle tertiary motif in proteins." Protein Eng **5**(8): 739-48.
- Peters, K., H. J. Hinz, et al. (1997). "Introduction of a proline residue into position 31 of the loop of the dimeric 4-alpha-helical protein ROP causes a drastic destabilization." Biol Chem **378**(10): 1141-52.
- Pfeil, W. (1981). "Thermodynamics of alpha-lactalbumin unfolding." Biophys Chem **13**(2): 181-6.
- Pfeil, W., V. E. Bychkova, et al. (1986). "Physical nature of the phase transition in globular proteins. Calorimetric study of human alpha-lactalbumin." FEBS Lett **198**(2): 287-91.
- Plaxco, K. W., K. T. Simons, et al. (1998). "Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins." J Mol Biol **277**(4): 985-94.
- Potekhin, S. and W. Pfeil (1989). "Microcalorimetric studies of conformational transitions of ferricytochrome c in acidic solution." Biophys Chem **34**(1): 55-62.
- Radford, S. E. (2000). "Protein folding: progress made and promises ahead." Trends Biochem Sci **25**(12): 611-8.
- Rose, G. D., Gierash, L.M., and Smith, J.A. (1985). "Turns in peptides and proteins." Adv. Prot. Chem. **37**: 1-109.
- Rosengarth, A., J. Rosgen, et al. (1999). "Slow unfolding and refolding kinetics of the mesophilic Rop wild-type protein in the transition range." Eur J Biochem **264**(3): 989-95.
- Sali, D., M. Bycroft, et al. (1991). "Surface electrostatic interactions contribute little of stability of barnase." J Mol Biol **220**(3): 779-88.
- Salvatella, X., C. M. Dobson, et al. (2005). "Determination of the folding transition states of barnase by using PhiI-value-restrained simulations validated by double mutant PhiIJ-values." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12389-94.
- Sancho, J., J. L. Neira, et al. (1992). "An N-terminal fragment of barnase has residual helical structure similar to that in a refolding intermediate." J Mol Biol **224**(3): 749-58.
- Sanz, J. M., C. M. Johnson, et al. (1994). "The A-state of barnase." Biochemistry **33**(37): 11189-99.
- Sato, S., T. L. Religa, et al. (2004). "Testing protein-folding simulations by experiment: B domain of protein A." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(18): 6952-6.
- Serrano, L., J. T. Kellis, Jr., et al. (1992). "The folding of an enzyme. II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability." J Mol Biol **224**(3): 783-804.
- Serrano, L., A. Matouschek, et al. (1992). "The folding of an enzyme. III. Structure of the transition state for unfolding of barnase analysed by a protein engineering procedure." J Mol Biol **224**(3): 805-18.

- Shaw, G. L., B. Davis, et al. (1995). "Backbone dynamics of chymotrypsin inhibitor 2: effect of breaking the active site bond and its implications for the mechanism of inhibition of serine proteases." Biochemistry **34**(7): 2225-33.
- Steif, C., H. J. Hinz, et al. (1995). "Effects of cavity-creating mutations on conformational stability and structure of the dimeric 4-alpha-helical protein ROP: thermal unfolding studies." Proteins **23**(1): 83-96.
- Steif, C., P. Weber, et al. (1993). "Subunit interactions provide a significant contribution to the stability of the dimeric four-alpha-helical-bundle protein ROP." Biochemistry **32**(15): 3867-76.
- Stephen F. Betz, D. P. R. a. W. F. D. (1993). "De novo protein design: from molten globules to native-like states." Current Opinion in Structural Biology **3**: 601-610.
- Tomizawa, J. and T. Som (1984). "Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein." Cell **38**(3): 871-8.
- Tooze, B. a. (1999). Introduction to Protein Structure, Second Edition, Garland Publishing.
- Vlassi, M., G. Cesareni, et al. (1999). "A correlation between the loss of hydrophobic core packing interactions and protein stability." J Mol Biol **285**(2): 817-27.
- Vlassi, M., C. Steif, et al. (1994). "Restored heptad pattern continuity does not alter the folding of a four-alpha-helix bundle." Nat Struct Biol **1**(10): 706-16.
- Ward, W. H., D. H. Jones, et al. (1987). "Effects of engineering complementary charged residues into the hydrophobic subunit interface of tyrosyl-tRNA synthetase. Appendix: Kinetic analysis of dimeric enzymes that reversibly dissociate into inactive subunits." Biochemistry **26**(13): 4131-8.
- Willis, M. A., B. Bishop, et al. (2000). "Dramatic structural and thermodynamic consequences of repacking a protein's hydrophobic core." Structure **8**(12): 1319-28.
- Ybe, J. A. and M. H. Hecht (1996). "Sequence replacements in the central beta-turn of plastocyanin." Protein Sci **5**(5): 814-24.
- Zhou, H. X., Hoess, R.H. & DeGrado, W.F. (1996). "In vitro evolution of thermodynamically stable turns." Nat. Struct. Biol. **3**: 446-450.
- Zhou, N. E., Kay, C.M., and Hodges, R.S. (1994). "The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability: de novo designed synthetic two-stranded α -helical coiled-coils." Journal of Molecular Biology **237**: 500-512.