

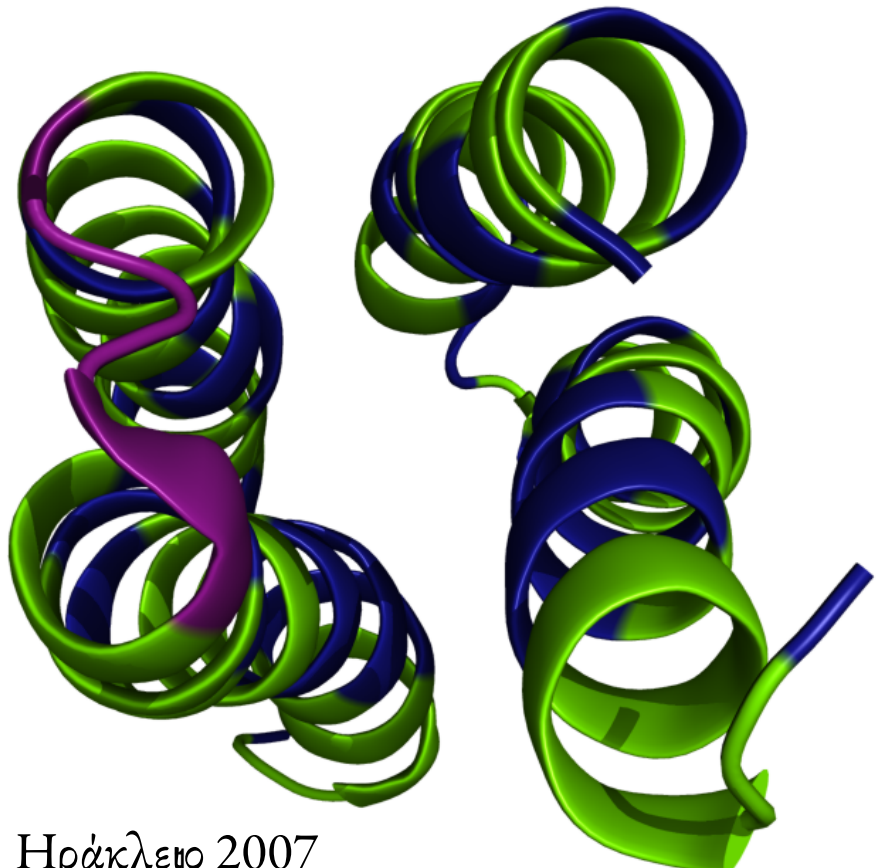
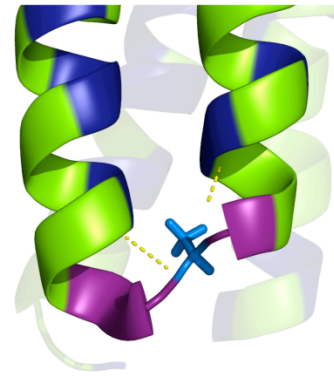
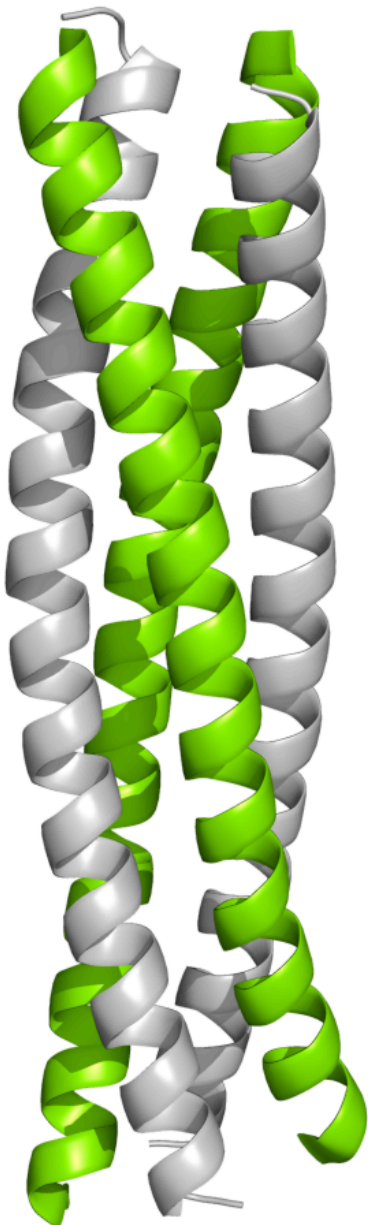


Πανεπιστήμιο
Κρήτης Διατμηματικό
Μεταπτυχιακό
Πρόγραμμα:
Πρωτεϊνική
Βιοτεχνολογία

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

Κυριαζίδης Γιάννης

Επιβλέπων καθηγητής: Κοκκινίδης Μιχάλης



Ηράκλειο 2007

*Στις δύο γυναίκες που δεν λείπουν στιγμή από κοντά μου και μου δίνουν
δύναμη και φαντασία...*

Ρούλα και Χριστίνα

Ευχαριστίες

Πιστεύω πως η συγκεκριμένη είναι η ευκολότερη σελίδα να γράψει κανείς σε ένα MSc. Μετά από αναρίθμητες απογοητεύσεις τελικά έχεις τελειώσει (πιθανότατα χωρίς να αντηχεί στο χώρο η φράση “όλα λάθος!”) και νιώθεις τόσο χαρούμενος και γενναιόδωρος που πρακτικά θέλεις να τους ευχαριστήσεις όλους! Ορίστε λοιπόν η λίστα μου...

Κατ' αρχήν θέλω να ευχαριστήσω τον Κ. Κοκκινίδη που μου έδωσε την ευκαιρία και τιμή να δουλέψω στο εργαστήριό του, και πάνω από όλα μου έδειξε εμπιστοσύνη! Είναι σημαντικό να ξέρεις πως οι άνθρωποι που δουλεύεις μαζί σε εμπιστεύονται! Θέλω να τον ευχαριστήσω για τον ένα χρόνο άψογης συνεργασίας, συμπαράστασης και άφθονου χιούμορ που προσωπικά αύξανε την αποδοτικότητά μου καθώς και την κατανόηση στις δύσκολες στιγμές που χτύπησαν την πόρτα του εργαστηρίου για να με βρουν! Καθηγητής που με βοήθησε και με υποστήριξε με κάθε τρόπο.

Με ιδιαίτερη τιμή τον δεύτερο εξεταστή μου, τον Κ. Πανόπουλο, ο οποίος πάντα με εξέπληττε με τη διαφορετικότητα της σκέψης του και τις παρατηρήσεις, τόσο στο Msc όσο και στα μαθήματα του μεταπτυχιακού, που ποτέ δε θα μπορούσα να είχα σκεφτεί, και φυσικά ούτε κανείς άλλος!

Εν συνεχεία, (ναι έρχεται και αυτή η στιγμή) που θέλω να ευχαριστήσω τον Γιώργο για την βοήθειά του και πως εκτίμησα πάρα πολύ που το γεγονός πως οποτεδήποτε τον χρειάστηκα ήταν εκεί με μεγάλο ενδιαφέρον.

Μαίρη και Ντίνα (αλφαβητικά!), ήρθε η σειρά σας. Ευχαριστώ αληθινά για το ξελάσπωμα μέσω χείρας βοήθειας τότε που τη χρειάστηκα καθώς και τα “common” buffers που δεν ήταν ακριβώς κοινά. Δε χρειάζεται να ευχαριστήσω για την ψυχολογική υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια των σπουδών! Είναι αυτονόητο.

Special thanks go to Βάνια και Τάνια γιατί δεχόντουσαν πάντα με χαμόγελο το πρήξιμο που τους επιφύλασσα. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Κλητώ, εκτός των αυτονόητων, για τις μετρήσεις στο Αμβούργο που δεν μπορούσα να πάω εγώ. Τα αδελφά εργαστηριακά Μπουριωτομέλη, για τις ωραίες συζητήσεις μας (και τα ωραία μαγειρευτά τους!).

Τους φίλους μου Γιάννη, Γιώργο, Χριστίνα, Ελενα για τις όμορφες στιγμές!
Ολη μου οικογένειά μου και κυρίως τη Ρούλα, που δε φοβάμαι τίποτα στον κόσμο χάρη σε αυτήν.

Μαράκι θα μου λείψεις, ελπίζω να διαβάζεις αυτές τις γραμμές που και που και να θυμάσαι τον Johny.

***Εσένα που με παρασύρης όσος χρόνος και αν περάσει... *

Η διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της σύγχρονης βιολογίας. Η Rop είναι μία μικρή πρωτεΐνη που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενέστατα για την κατανόηση μέρους του προβλήματος της «αναδίπλωσης των πρωτεϊνών». Η βιολογική της μορφή είναι ένα ομοδιμερές, αντιπαράλληλο, 4-α-ελικοειδές δεμάτιο και ενέχεται στο μηχανισμό ελέγχου του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων της ColE1 οικογένειας, του *E.coli*. Η Rop εμφανίζει ένα συγκεκριμένο πρότυπο υδρόφοβων και πολικών αμινοξέων, το «μοτίβο της επτάδας» σε όλο το μήκος της αλληλουχία της, η οποία διαταράσσεται στην περιοχή της στροφής. Ο ρόλος της στροφής στη διαδικασία της αναδίπλωσης, παρόλη την έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός.

Ορισμένες μελέτες προσέδιδαν στη στροφή έναν περισσότερο ενεργό ρόλο στη διαμόρφωση της δομής, ενώ άλλες δευτερεύοντα. Μία σημειακή και μόνο μετάλλαξη του καταλοίπου A31 σε προλίνη, οδήγησε σε δραματική αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου. Το διπλό μετάλλαγμα που ερευνήθηκε στην εργασία αυτή D30GA31P δημιουργήθηκε ώστε να διαπιστωθεί εάν παρουσία της γλυκίνης, η το μετάλλαγμα RopA31P, θα μπορέσει να ακολουθήσει ένα θερμοδυναμικά σταθερότερο μονοπάτι προς την εγγενή διαμόρφωσή της και θα μπορέσει να διαφύγει από την κατάσταση εύπλαστης σφαίρας στο οποίο είχε μεταπέσει.

Το μετάλλαγμα μελετήθηκε ως προς τις φασματοσκοπικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες και τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά προς την εγγενή μορφή της πρωτεΐνης παρά αυτή του μεταλλάγματος A31P. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως πιθανότατα το διπλό μετάλλαγμα να έχει μεταπηδήσει από την κατάσταση εύπλαστης σφαίρας σε μία πιο εγγενή διαμόρφωση. Διαφαίνεται λοιπόν πως η σύσταση της στροφής σε αμινοξέα επηρεάζει την αναδίπλωση του μορίου με το να επιτρέπει ή να αποτρέπει πιθανά θερμοδυναμικά μονοπάτια που δύναται να ακολουθήσει το μόριο προς την τελική του διαμόρφωση.

Επιπλέον το μετάλλαγμα Rop2aL σχεδιάστηκε με στόχο την «επιδιόρθωση» του μοτίβου της επτάδας στην περιοχή της στροφής. Σε αντίθεση με το μετάλλαγμα Rop2a, το οποίο είχε δημιουργηθεί

παλαιότερα και είχε δομή παρόμοια με αυτή της αγρίου τύπου Rop, το μετάλλαγμα Rop2aL, με την αντικατάσταση της γλουταμίνης στη θέση 34 με μία λευκίνη, αποκαθιστά και το μη σωστό πρότυπο υδροφοβικότητας της Rop2a. Η His-Rop2aL εκλούεται από τη στήλη μοριακής διήθησης σε 2 διαφορετικούς πληθυσμούς, έναν διμερή και έναν τετραμερή και φαίνεται πως απουσία αναγωγικού ευνοείται ο σχηματισμός της τετραμερούς μορφής. Οι τετραμερείς πληθυσμοί εμφανίζουν υψηλότερη θερμοκρασία τήξης από την αγρίου τύπου Rop, κάτι που μπορεί να οφείλεται στη δημιουργία ενός νέου πιο εκτεταμένου υδρόφοβου πυρήνα.

Κρύσταλλοι έχουν προκύψει για την περίπτωση της RopD30GA31P και για τους τετραμερείς πληθυσμούς της Rop2aL παρουσία και απουσία αναγωγικού. Η επίλυση της δομής θα μας δώσει ξεκάθαρα αποτελέσματα και πληροφορία για την επίδραση των μεταλλαγών αυτών στη δομή του μορίου.

Summary

The process of protein folding still remains one of the biggest problems of biology. Rop is a small protein that has been extensively used as a model system to study the protein folding problem. Rop is a homodimeric protein and its the paradigm of a canonical 4- α -helical bundle. Its biological role involves the regulation of copy number of the ColE1 plasmids of *E.coli*. Rop exhibits a characteristic pattern of hydrophobic and polar residues (heptad pattern), which is typical for 4- α -helical bundles, and it is disturbed only in the loop region. Despite the extensive research, the precise nature of the role of the the loop region in protein folding still remains elusive.

Earlier studies indicate that the loop regions has a major role in determining the protein structure, while in other cases a minor role of loops has been found. One single mutation of Ala to proline (A31P), resulted in a complete reorganization of the protein topology. In order to clarify the role of loop to the protein folding and in particular the role of the existence of the proline in the loop, the double mutant $\alpha\upsilon\tau\eta$ D30GA31P was produced with the aim to study the effect of glycine in the loop region in the folding pathway of the protein which in the case of A31P was leading to a molten-globule-like state.

Spectroscopic and thermodynamic studies were performed and the results suggest that this mutant has a wt Rop-like structure i.e, which is different from the A31P structure. This confirms the role of turn residues in the choice of folding pathway and the suggests that the effects of the loop region on the folding pathway are complex and both sequence- and position- dependent.

In this study, the design of the mutant Rop2aL is described , which aim restores the heptad repeat at the turn region. In contrast to the Rop2a mutant, which has been previously studied and showed very minor differences in structure according to wt-Rop, in Rop2aL replacing the residue Q34 with a leucine restores also the hydrophobicity pattern present in of Rop2a. His-Rop2aL is eluted from gel-filtration chromatography in two different populations, most likely one dimeric

and one tetrameric. It has been shown that under non-reductive conditions the tetrameric form is favoured. The tetrameric populations show higher melting temperature compared to wt-Rop, which may be due to a formation of a new more extensive hydrophobic core.

Crystals have been obtained for the case of RopD30GA31P and for the tetrameric populations of Rop2aLin the presence and absence of β -mercaptoethanol. Structure determination will reveal undoubtedly the structural effects observed in the above mutations.

Ευχαριστίες
Περίληψη
Summary
Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	
.1 Το πρόβλημα της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών.....σελ. 10	
.2 Η φύση του τυχαίου σπειράματος..... σελ. 11	
.3 Μοντέλα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης..... σελ. 12	
.4 Η πρωτεΐνη Rop..... σελ. 17	
.5 Αναδρομή στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη wtRop..... σελ. 20	
.6 Σκοπός της εργασίας..... σελ. 23	
2 Υλικά και Μέθοδοι	
2.1 Χημικά, βιοχημικά, πλασμιατικοί φορείς και βακτηριακά στελέχη.....σελ. 25	
2.2 Μεταλλαξιγένεση και δημιουργία των γονιδίων ropGP και rop2aL...σελ. 26	
2.3 Κλωνοποίηση των γονιδίων ropgp και rop2aL σε φορέα έκφρασης...σελ. 27	
2.4 Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών RopGP, Rop2aL, Rop2L και RopA31P..... σελ. 27	
2.5 Απομόνωση των μεταλλαγμάτων.....σελ. 29	
2.5.1 Στάδιο χαμηλού καθαρισμού.....σελ. 29	
2.5.2 Στάδιο υψηλού καθαρισμού.....σελ. 29	
2.6 Κυκλικός διχρωσμός.....σελ. 31	
2.7 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης.....σελ. 31	
3 Αποτελέσματα	
3.1 Αποτελέσματα.....σελ. 34	
4 Συζήτηση	
4.1 Περί μεταλλάγματος His-RopGP.....σελ. 46	
4.2 Περί μεταλλάγματος His-Rop2aL.....σελ. 47	
5 Βιβλιογραφία.....σελ. 50	

Εισαγωγή στην πρωτεϊνική αναδίπλωση

Θεωρητικό υπόβαθρο και σκοπός της εργασίας

1.1 Το πρόβλημα της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών

Είναι γνωστό πως η πλειονότητα των λειτουργιών στους ζωντανούς οργανισμούς διεκπεραιώνονται από πρωτεΐνες. Όλες οι πρωτεΐνες ξεκινούν τη ζωή τους, με το που βγαίνουν από το ριβόσωμα ως μία γραμμική αλληλουχία αμινοξέων. Όμως, η λειτουργική διαμόρφωση μίας πρωτεΐνης είναι μία σταθερή τρισδιάστατη δομή, η οποία και καθορίζει τη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης. Η Γνώση αυτή καλείται δώσει απάντηση στο ερώτημα πως αυτά τα αμινοάκυλο-πολυμερή περνούν από την αρχική/αδίπλωτη/μη λειτουργική στην τελική/ αναδιπλωμένη/ λειτουργική καταστασή τους σε ελάχιστο χρόνο. Το αξιοθαύμαστο πίσω από την όλη διαδικασία βρίσκεται στην ικανότητα της πρωτεΐνης να διπλώνεται ικανοποιητικά σε μία προκαθορισμένη διαμόρφωση, παρά το άπειρον των δυνατών διαμορφώσεων που υπάρχουν. Παρά την πληθώρα ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί, δεν έχουν κατανοηθεί με σαφήνεια και επάρκεια οι μηχανισμοί που διέπουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών.

Η πολυπεπτιδικός μίτος άρχισε να ξεδιπλώνεται το 1973, όπου πρώτος ο Anfinsen απέδειξε πως η δομή μίας πρωτεΐνης καθορίζεται αποκλειστικά από την αμινοξική της αλληλουχία (2), και πως η εκάστοτε δομή καθορίζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Ως επακόλουθο, η λειτουργία μίας πρωτεΐνης εξαρτάται εξ' ολοκλήρου από την ικανότητα της πρωτεΐνης να αναδιπλωθεί γρήγορα και ικανοποιητικά στην εγγενή της δομή.

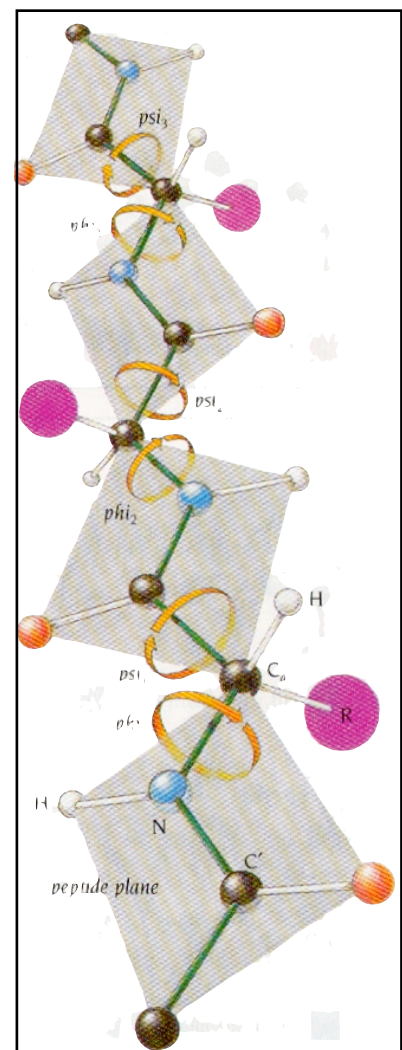
Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως αυτή η διαδικασία αναδίπλωσης θα πρέπει να ικανοποιεί δύο συνθήκες: μία θερμοδυναμική και μία κινητική συνθήκη. Από θερμοδυναμική σκοπιά, η πρωτεΐνη θα πρέπει να υιοθετεί μία διαμόρφωση η οποία θα είναι σταθερή και αναδιπλωμένη. Από κινητική σκοπιά, θα πρέπει να υιοθετήσει τη συγκεκριμένη διαμόρφωση στο απαραίτητο χρονικό διάστημα στο οποίο καθίσταται αναγκαία και λειτουργική. Στο σημείο αυτό όμως εμφανίζεται ένα παράδοξο: Προτάθηκε πως για μια πρωτεΐνη 100 αμινοξέων, ο χρόνος που απαιτείται για να υιοθετήσει τυχαία μια οποιαδήποτε διαμόρφωση ανέρχεται σε 10^{36} δευτερόλεπτα ή περίπου 10^{29} έτη (19). Η πρόταση αυτή αποτελεί παράδοξο, διότι γνωρίζουμε πως οι πρωτεΐνες μπορούν και αναδιπλώνονται σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από εκατοστά του δευτερολέπτου έως μερικά δευτερόλεπτα. Το γεγονός αυτό συνεπώς προϋποθέτει πως κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης εξετάζεται μόνο ένα μικρό μέρος από όλο το φάσμα των δυνατών διαμορφώσεων όπου μπορεί να λάβει η πρωτεΐνη. Αυτό με τη σειρά του υποδηλώνει πως υπάρχουν μόνο μερικά -κινητικώς-ευνοϊκά- μονοπάτια αναδίπλωσης που μπορεί να ακολουθήσει μία πρωτεΐνη στην πορεία προς τελική διαμόρφωσή της, κάτι το οποίο αρχικά είχε προταθεί από τον Levinthal το 1968 (41). Αυτό το παράδοξο, πως δηλαδή οι πρωτεΐνες είναι ικανές να αναδιπλώνονται άμεσα και ικανοποιητικά προς την τελική/ λειτουργική τους διαμόρφωση, είναι γνωστό ως «πρόβλημα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης».

1.2 Η φύση του τυχαίου σπειράματος

Κατά καιρούς πολλά μοντέλα αναπτύχθηκαν έχοντας ως σκοπό να ρίξουν φως στο πρόβλημα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Κάθε μοντέλο που θα επιχειρήσει να «προνοήσει» ένα μονοπάτι αναδίπλωσης, αναπόφευκτα θα πρέπει να ξεκινά από την κατάσταση «τυχαίου σπειράματος» (random coil) και να καταλήγει στην μοναδική, αναδιπλωμένη και λειτουργική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Για τον λόγο αυτό δε θα μπορούσε να παραλειφθεί μία αναφορά στις θεωρίες (άλλες λιγότερο και άλλες περισσότερο υποστηριζόμενες από πειραματικά δεδομένα) που αναπτύχθηκαν για να εξηγήσουν τη φύση αυτή του τυχαίου σπειράματος.

Εξ' ορισμού, η αναδιπλωμένη κατάσταση μιας πρωτεΐνης είναι σταθερή και καλά καθορισμένη, μα αντιθέτως η φύση της μη αναδιπλωμένης κατάστασης είναι λιγότερο προφανής και ακόμη λιγότερο κατανοητή. Με το πέρασμα του χρόνου έχουν διατυπωθεί διάφοροι ορισμοί για να επεξηγήσουν τα χαρακτηριστικά του τυχαίου σπειράματος. Το 1970 ο Tanford όρισε την κατάσταση τυχαίου σπειράματος ενός πολυμερούς ως μία κατάσταση στην οποία γύρω από κάθε δεσμό μπορεί να υπάρξει ελεύθερη περιστροφή, όπως ακριβώς θα γινόταν και στην περίπτωση ενός μικρού μορίου (64). Πιο πρόσφατα, ο Shortle περιέγραψε την κατάσταση τυχαίου σπειράματος ως μία καλά καθορισμένη κατάσταση στην οποία απουσιάζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλάγιων αλυσίδων των αμινοξέων (59). Από την άλλη πλευρά, οι Smith et al. υπέθεσαν πως οι ϕ και ψ γωνίες καθενός καταλοίπου σε κατάσταση τυχαίου σπειράματος είναι ανεξάρτητες από τις ϕ και ψ γωνίες διαμόρφωσης καθενός άλλου καταλοίπου (Εικόνα 1.1). Με την παραδοχή αυτή θα μπορούσαμε να πούμε πως διαχωρίζουν την κατάσταση της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης, στην οποία κάθε κατάλοιπο θα καταλάβει μία συγκεκριμένη ϕ, ψ διαμόρφωση (με μικρές πάντα διακυμάνσεις), με αυτήν του τυχαίου σπειράματος, στην οποία κάθε κατάλοιπο μπορεί να πάρει ένα μεγάλο εύρος ϕ, ψ διαμορφώσεων (60).

Ωστόσο, πιο πρόσφατες έρευνες τόσο σε πρωτεΐνες από την Protein Data Bank (PDB) (4), όσο και σε μετουσιωμένες πρωτεΐνες καθώς και σε μικρά πολυπεπίδια άρχισαν να αποσαφηνίζουν πληρέστερα τη φύση του τυχαίου σπειράματος. Η ιδέα πίσω από τη χρήση της PDB για συλλογή δεδομένων, ήταν πως ο μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που θα συμμετείχαν στην έρευνα, θα συνέβαλαν στο να βγει ένας μέσος όρος της επίδρασης που έχουν μόνο οι μη-γειτονικές αλληλεπιδράσεις στις ξεχωριστές πρωτεϊνικές δομές. Μία ακόμη νεότερη προσπάθεια που βασίζεται στα βήματα της προηγούμενης, ακολουθεί το ίδιο σκεπτικό, μα αναλύει μόνο τα κατάλοιπα στις στροφές των πρωτεϊνών, για παράδειγμα αμινοξέα που δε συμμετέχουν ούτε σε διαμόρφωση α -ελίκων ούτε β -πτυχωτών φύλλων (63). Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να εξεταστούν οι προτιμήσεις των συγκριμένων καταλοίπων για συγκεκριμένες ϕ και ψ διαμορφώσεις, χωρίς ωστόσο να λαμβάνονται υπόψη οι αλληλεπιδράσεις που συμμετέχουν στη σταθεροποίηση δευτεροταγών δομών. Το άκρως ενδιαφέρον συμπέρασμα που εξήλθε από αυτές τις



Εικόνα 1.1. Οι ϕ και ψ γωνίες του κορμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (66).

έρευνες είναι ότι οι ϕ και ψ κατανομές στις περιοχές των στροφών δεν είναι καθόλου τυχαίες, με τις γωνίες του κυρίως κορμού (backbone) να πλησιάζουν αρκετά αυτές των α -ελίκων και των β -πτυχωτών φύλλων (63).

Διαφαίνεται λοιπόν πως συγκεκριμένα κατάλοιπα δείχνουν προτιμήσεις για συγκεκριμένες διαμορφώσεις, και περαιτέρω, πως αυτές οι προτιμήσεις επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τα γειτονικά κατάλοιπα. *Ετσι, συμπερασματικά θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε πως η κατάσταση τυχαίου σπειράματος δεν είναι τόσο τυχαία όπως είχε προηγούμενα προταθεί* (59, 60, 64).

1.3 Μοντέλα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

Το πρώτο μοντέλο που προτάθηκε για να εξηγήσει τη συνενεργητικότητα των μεταβάσεων κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών ήταν η «θεωρία έλικας-σπειράματος» («helix-coil») (43). Το μοντέλο αυτό αναπαριστά πιθανή συνενεργητικότητα μεταξύ γειτνιαζόντων αμινοξέων σε μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και ισχυριζόταν ότι ένα κατάλοιπο έχει υψηλότερη ροπή να βρίσκεται σε μία ελικοειδή διαμόρφωση, εάν τα γειτνιαζόντα κατάλοιπα της αλληλουχίας βρίσκονται επίσης σε ελικοειδή διαμόρφωση.

Συνεπώς, μόλις μερικά γειτνιαζόντα αμινοξέα υιοθετήσουν ελικοειδή διαμόρφωση, μία α -έλικα μπορεί να αναπτυχθεί γρήγορα και με συνενεργητικότητα, οδηγώντας έτσι σε ένα γεγονός πυρήνωσης που θα αποτελέσει την αρχή για την περαιτέρω αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Η δυναμική αυτής της θεωρίας σίγουρα είναι περιορισμένη αρκετά, αλλά αποτελεί μία βάση για τα μοντέλα τα οποία εξηγούν την διαδικασία αναδίπλωσης μεγάλων πρωτεϊνών με πολλές επικράτειες στο μόριό τους καθώς είναι γνωστό πλέον, πως αυτές αναδιπλώνονται μέσω σταθερών ενδιάμεσων (55).

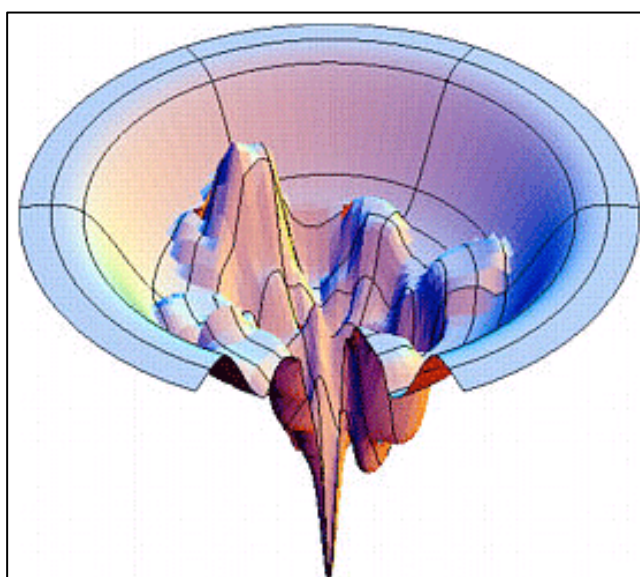
Επακόλουθα προτάθηκαν πολλά μοντέλα που επιχειρούσαν να εξηγήσουν το πρόβλημα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Το «μοντέλο πλαισίου» («framework model») περιγράφει την πρωτεϊνική αναδίπλωση ως ένα σταδιακό μηχανισμό με βάση τον οποίο σχηματίζονται αρχικά όλες οι δευτεροταγείς δομές βάση της πρωτοταγούς αλληλουχίας, οι οποίες όμως ακόμη δε συνιστούν την τριτοταγή διαμόρφωση (33, 36, 57). Αυτές οι δευτεροταγείς δομές εν συνεχεία, μέσω συγκρούσεων, συγχωνεύονται για να δώσουν την τελική τριτοταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Αντιθέτως, το «μοντέλο πυρήνωσης» («nucleation model») προτείνει πως η τριτοταγής δομή σχηματίζεται ως άμεσο επακόλουθο της διαμόρφωσης της δευτεροταγής δομής της πρωτεΐνης (1, 68). Βάση του μοντέλου πυρήνωσης, η πυρήνωση ξεκινά με το σχηματισμό δευτεροταγών δομών που συνιστώνται μόνο από μερικά αμινοξέα (για παράδειγμα μία β -στροφή, ή η πρώτη στροφή μίας α -έλικας), και έπειτα η δομή ξεκινά να «χτίζεται» από αυτόν τον μικρό πυρήνα.

Μία τελείως διαφορετική εκδοχή της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης προτείνεται από το «μοντέλο υδρόφοβης κατάρρευσης» («hydrophobic-collapse model»). Το μοντέλο αυτό υποθέτει πως η λειτουργική δομή μιας πρωτεΐνης διαμορφώνεται μέσω της αναδιοργάνωσης μίας συμπαγούς καταρρεσμένης δομής. (18, 56). Αναλυτικότερα, το μοντέλο υποστηρίζει πως κατά τα πρώιμα στάδια της αναδίπλωσης, οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες πακετάρονται στο εσωτερικό της αρτιγενούς πολυπεπτιδικής αλυσίδας, μακριά από τα μόρια ύδατος. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται μία κατάσταση εύπλαστης σφαίρας (molten globule state) η οποία αποτρέπει έναν τεράστιο αριθμό πιθανών διαμορφώσεων που θα μπορούσε να υιοθετήσει η πρωτεΐνη και η πρωτεϊνική αναδίπλωση ξεκινά με την αναδιοργάνωση της κατάστασης αυτής.

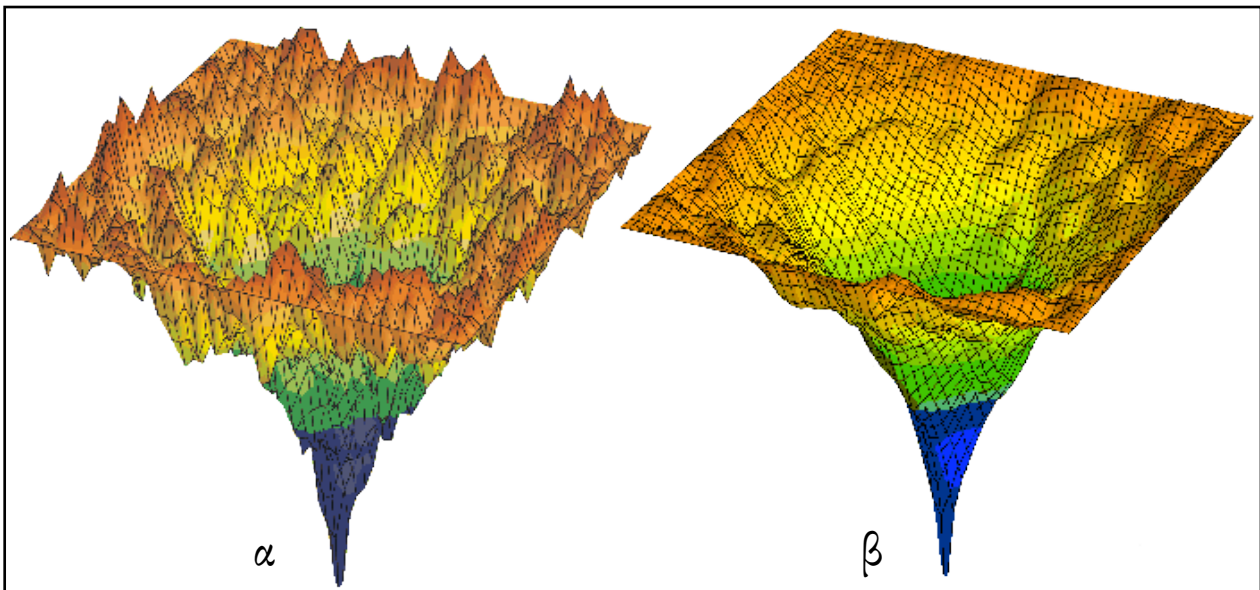
Τα παραπάνω μοντέλα, άλλα περισσότερο και άλλα λιγότερο ακολουθούν μία μονόδρομη πορεία αναδίπλωσης. Τα τελευταία χρόνια όμως φαίνεται να κερδίζει συνεχώς έδαφος μία νέα θεωρία, η θεωρία του «αδρού χωνιού» (Εικόνα 1.2), και η οποία φαίνεται να εξηγεί καλύτερα το μονοπάτι της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και το κεντρικό δόγμα της οποίας είναι πως δεν υπάρχει ένα μόνο μονοπάτι που δύναται να ακολουθήσει μία πρωτεΐνη. Αντί αυτής, μία αρτιγενής πολυπεπτιδική αλυσίδα, για να φτάσει στην τελική της διαμόρφωση, θα περάσει από ένα πολυδιάστατο ενεργειακό τοπίο (multidimensional energy landscape). Η θεωρία αυτή αναπαριστά το ενεργειακό αυτό τοπίο ως ένα χωνί, με ένα διαφορετικό πλήθος μη αναδιπλωμένων διαμορφώσεων στο πλαίσιο, και ένα μοναδικό ολικό ελάχιστο το οποίο αναπαριστά τη τελική αναδιπλωμένη διαμόρφωση. Το μοντέλο βλέπει το γεγονός της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης μέσα από μία νέα σκοπιά, στην οποία υπάρχουν πολλά δυνατά μονοπάτια από την μη αναδιπλωμένη στη αναδιπλωμένη διαμόρφωση, και έτσι ένα πρωτεϊνικό μόριο μπορεί να ακολουθήσει το ευθύτερο μονοπάτι (που συνεπάγεται και την γρηγορότερη αναδίπλωση), ή ένα πιο έμμεσο το οποίο περνά από διάφορα τοπικά ελάχιστα (ενδιάμεσες διαμορφώσεις-folding intermediates) και τοπικά μέγιστα (μεταβατικές καταστάσεις).

Γίνεται συνεπώς αντιληπτό πως για να κατανοηθεί ο μηχανισμός των πρωτεϊνών υπό την οπτική γωνία της θεωρίας του αδρού χωνιού θα πρέπει να χαρακτηριστούν δομικά, θερμοδυναμικά και κινητικά όλες οι καταστάσεις που μεσολαβούν από την αρχική έως την τελική διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης.

Αρχικά οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μη αναδιπλωμένη κατάσταση χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό εντροπίας και σχετικά υψηλή επίπεδα ελεύθερης ενέργειας. Είναι εύλογο πως στη μη αναδιπλωμένη κατάσταση μιας πρωτεΐνης τόσο η εντροπία όσο και η ελεύθερη ενέργεια είναι υψηλότερες. Όσο προχωρά η αναδίπλωση της πρωτεΐνης, τόσο προχωράμε από την ελεύθερη επιφάνεια προς το εσωτερικό του χωνιού, το οποίο δηλώνει ελάττωση στον αριθμό των πιθανών διαμορφώσεων που μπορεί να υιοθετήσει η πρωτεΐνη. Η θεωρία του folding funnel, σχετίζεται άμεσα με την μοντέλο της υδρόφοβης κατάρρευσης, στο οποίο όπως ήδη αναφέρθηκε η κινητήριος δύναμη για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης προέρχεται από τη σταθεροποίηση του υδρόφοβου πυρήνα της πρωτεΐνης μέσω των υδροφοβικών πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Αυτό επιτρέπει το νερό να αυξήσει την εντροπία του, ελαχιστοποιώντας τη συνολική ελεύθερη ενέργεια (Εικόνα 1.3). Ταυτόχρονα η ελεύθερη ενέργεια του πρωτεϊνικού μορίου μειώνεται επιπλέον, ως φυσικό επακόλουθο της ανάπτυξης προτιμητέων ενεργειακών αλληλεπιδράσεων όπως της απομόνωσης των φορτισμένων πλευρικών ομάδων των αμινοξέων που βρίσκονται εκτεθειμένες στο διαλύτη και της εξουδετέρωσης των γεφύρων άλατος στο εσωτερικό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση της θεωρίας του folding funnel. Η πρωτεΐνη κατά τη διαδικασία αναδίπλωσής της μπορεί να ακολουθήσει διάφορα θερμοδυναμικά μονοπάτια περνώντας από περισσότερες ή λιγότερες ενδιάμεσες διαμορφώσεις (χαράδρες) και μεταβατικές καταστάσεις (βουνά).



Εικόνα 1.3. Σχηματικό διάγραμμα ενός folding tunnel για την πορεία αναδίπλωσης μιας πρωτεΐνης χωρίς ή με την παρουσία ύδατος. Στην πρώτη περίπτωση (α) υπάρχουν πολλά τοπικά ελάχιστα τα οποία μπορούν να παγιδεύσουν το μόριο σε μια μη λειτουργική διαμόρφωση. Με την ενυδάτωση του μορίου (β), «λιπαίνονται» ο κεντρικός κορμός της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και οι πλάγιες ομάδες των αμινοξέων, μέσω του γρήγορου σχηματισμού και της εναλλαγής των υδρογονικών δεσμών. Έτσι, μειώνονται τα ενεργειακά φράγματα που έχει να αντιμετωπίσει η αναδιπλώζουσα πρωτεΐνη και αποκτά γρηγορότερα και αποτελεσματικότερα την εγγενή της διαμόρφωση.

Στη διαδρομή αυτή, τα τοπικά ελάχιστα και τα τοπικά μέγιστα παγιδεύουν χρονικά την πρωτεΐνη, αφού απαιτείται κάποιος χρόνος ώστε να μπορέσει να μεταπηδήσει εκτός αυτών των καταστάσεων. Οι ενδιάμεσες καταστάσεις (folding intermediates) αποτελούν όπως αναφέρθηκε χαρακτηριστικά σημεία τοπικού ελάχιστου στα ενεργειακά τοπία και μπορεί να περιέχουν αναδιπλωμένα τμήματα της τελικής δομής. Ο ρόλος τους στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης δεν είναι ξεκάθαρος. 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 (6,60). Η φύση των ενδιάμεσων αυτών δεν επιτρέπει τον δομικό τους χαρακτηρισμό, διότι αποτελούν συνεχώς εναλλασσόμενες καταστάσεις με μικρούς, μη ανιχνεύσιμους πληθυσμούς η κάθε μία (51). Η κατάσταση εύπλαστης σφαίρας επίσης αποτελεί τοπικό ελάχιστο στον ενεργειακό χάρτη. Από τα πειράματα των Bychkova και Ptitsyn καθώς και των Ohgushi και Wada (7, 49, 50) φαίνεται πως αποτελεί μία κατάσταση η οποία εμφανίζεται στην πορεία αναδίπλωσης ορισμένων πρωτεϊνών με μερικώς οργανωμένη και σφαιρική διαμόρφωση. Χαρακτηρίζεται ως «μερικώς οργανωμένη και σφαιρική», διότι παρόλο που περιέχει υψηλό ποσοστό των δευτεροταγών δομών της αναδιπλωμένης μορφής, είναι λιγότερο συμπαγής από αυτήν (27, 37, 66). Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως αφενός δεν έχει σχηματιστεί πλήρως ο υδρόφοβος πυρήνας της πρωτεΐνης –ο οποίος είναι και αναγκαία και απαραίτητη συνθήκη για τη σταθερότητα του μορίου-, και αφετέρου οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων που είναι στραμμένες προς το εσωτερικό του μορίου είναι πολύ ευκίνητες, με αποτέλεσμα το εσωτερικό της πρωτεΐνης να είναι ρευστό, σε αντίθεση με αυτό της εγγενούς μορφής.

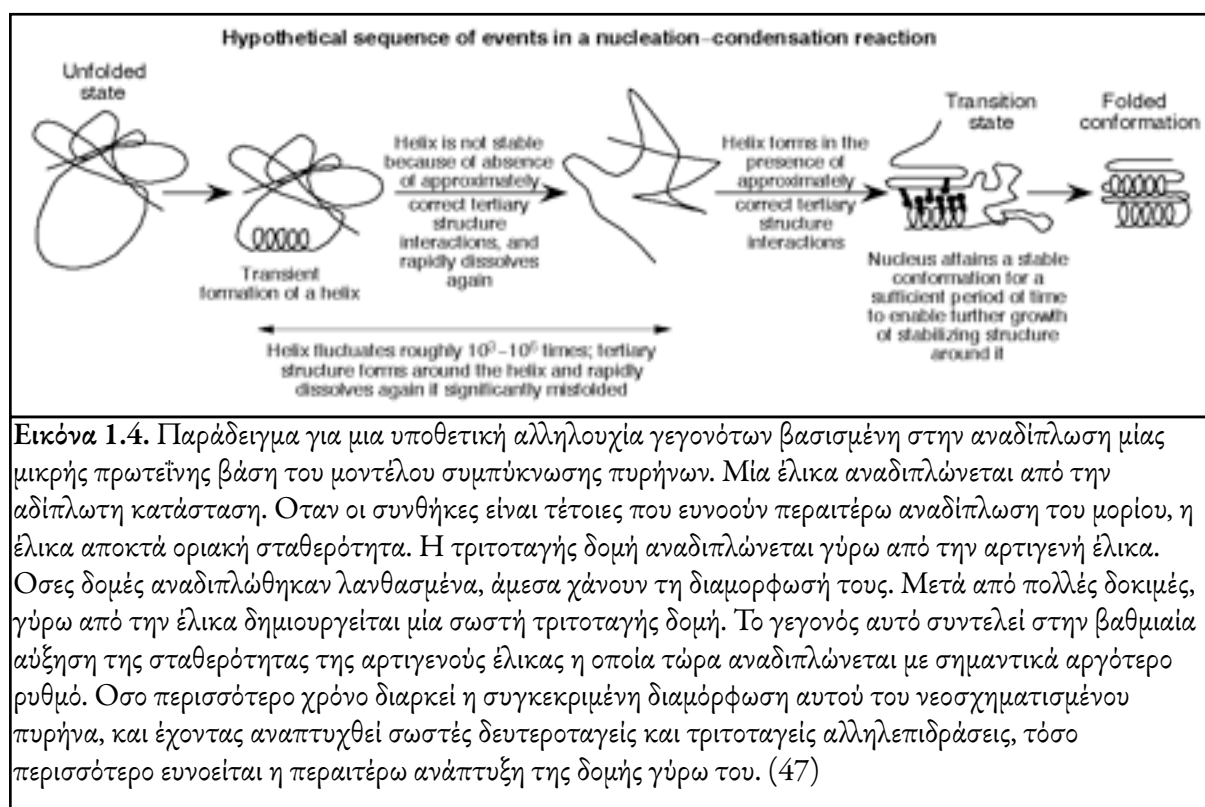
Αντιθέτως, με την αβεβαιότητα που επικρατεί για τον ρόλο και τη φύση των ενδιάμεσων καταστάσεων, οι μεταβατικές καταστάσεις (transition state) είναι καλύτερα χαρακτηρισμένες, εμφανίζοντας τα εξής χαρακτηριστικά:

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 εγγενή του κατάσταση (native state) (15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 42) και

β. αποτελεί μια εξαιρετικά συμπαγή κατάσταση, που δεν επηρεάζεται από διαταραχές λόγω μεταλλάξεων ή συμπεριφοράς του διαλύτη (51).

Ανακεφαλαιώνοντας τα μέχρι τώρα, είδαμε πως τα μοντέλα πλαισίου και υδρόφοβης κατάρρευσης προτείνουν το σχηματισμό κινητικών ενδιάμεσων, κάτι το οποίο υποστηρίζεται από το μοντέλο του αδρού χωνιού, αλλά δεν ισχύει στη περίπτωση του μοντέλου πυρήνωσης (21).

Εν τέλει, οι προηγούμενες θεωρίες και τα μοντέλα οδήγησαν στη δημιουργία ενός νέου, του μοντέλου «συμπύκνωσης πυρήνων», το οποίο προτάθηκε από τον Fersht και αποτελεί μία παραλλαγή του μοντέλου πυρήνωσης. Βάσει του μοντέλου, η αναδίπλωση του μορίου βασίζεται και καταλύεται πάνω στον πρώιμο σχηματισμό ενός πυρήνα (Εικόνα 1.4). Ο πυρήνας πρωταρχικά αποτελείται από μερικά μόνο γειτονικά αμινοξέα τα οποία αναπτύσσουν, λίγες αλλά σωστές, δευτεροταγείς αλληλεπιδράσεις, αλλά το όλο σύστημα σταθεροποιείται μόνο εάν οι συνθήκες για την ανάπτυξη τριτοταγών αλληλεπιδράσεων είναι σωστές. (21, 24, 35).

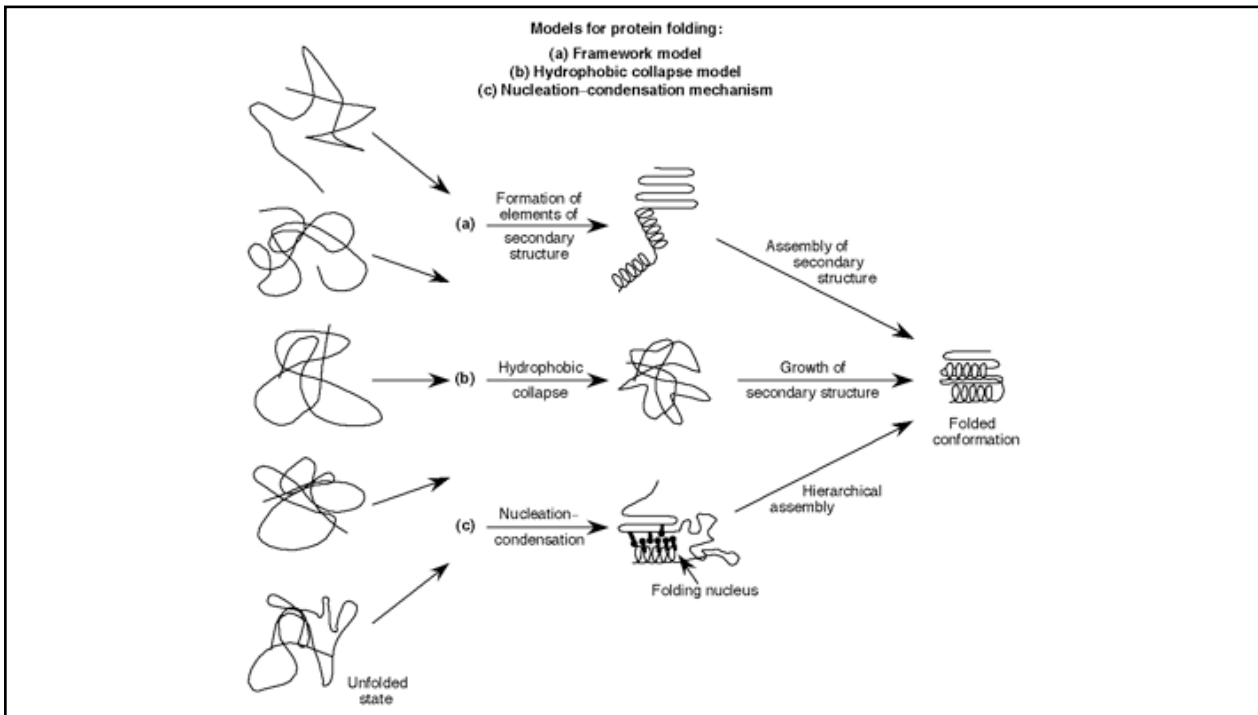


Το μοντέλο υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα από πολλές μικρές-σε-μέγεθος πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου του αναστολέα-II της χυμοθρυψίνης (21, 24, 35) και της barstar (48). Από την άλλη πλευρά, οι Bystkova και Ptitsyn μελέτησαν πάνω από 20 πρωτεΐνες και βρήκαν πως σχεδόν όλες υιοθετούσαν μία κατάσταση εύπλαστης σφαίρας κάτω από ήπιες συνθήκες αποδιάταξης (7). **Η παρατήρηση αυτή, όπως και πολλές άλλες που αφορούν μεγάλες σε μέγεθος πρωτεΐνες, ενισχύει το μοντέλο της υδρόφοβης κατάρρευσης.**

Μία σχετικά πρόσφατη έρευνα Β. Nolting (47), ισχυρίζεται πως τα μοντέλα «συμπύκνωσης πυρήνων» και «πλαισίου» μπορούν να ενωποιηθούν σε ένα «γενικότερο μοντέλο συμπύκνωσης

πυρήνων» το οποίο εφαρμόζεται στην πλειονότητα των μικρών μονομερών πρωτεϊνών, και των οποίων η αντίδραση αναδίπλωσης έχει ως εξής:

1. Το πρωτεϊνικό μόριο αρχίζει να καταρρέει και η δομή αρχίζει να αναπτύσσεται σε έναν ή περισσότερους εν διαμορφώσει πυρήνες οι οποίοι πυροδοτούν την περαιτέρω αναδίπλωση της πρωτεΐνης.
2. Η δομή της κυρίως μεταβατικής κατάστασης περιέχει μία ή περισσότερες συστάδες αμινοξέων οι οποίες σταθεροποιούνται τόσο από τριτοταγείς όσο και από δευτεροταγείς αλληλεπιδράσεις, οι οποίες όμως κατά μέσο όρο περιέχουν υψηλότερο ποσοστό αμινοξέων που ανήκουν σε μία κανονική δευτεροταγή δομή εν συγκρίσει με το υπόλοιπο μόριο. Αυτές οι συστάδες είναι πανομοιότυπες με τους πυρήνες ή έχουν προέλθει από αυτούς
3. Ο σχηματισμός της δομής του κυρίως μεταβατικού σταδίου αποτελεί και την χρονική στενωπό της αντίδρασης και επιτρέπει την μετέπειτα γρήγορη αναδίπλωση προς την τελική κατάσταση.



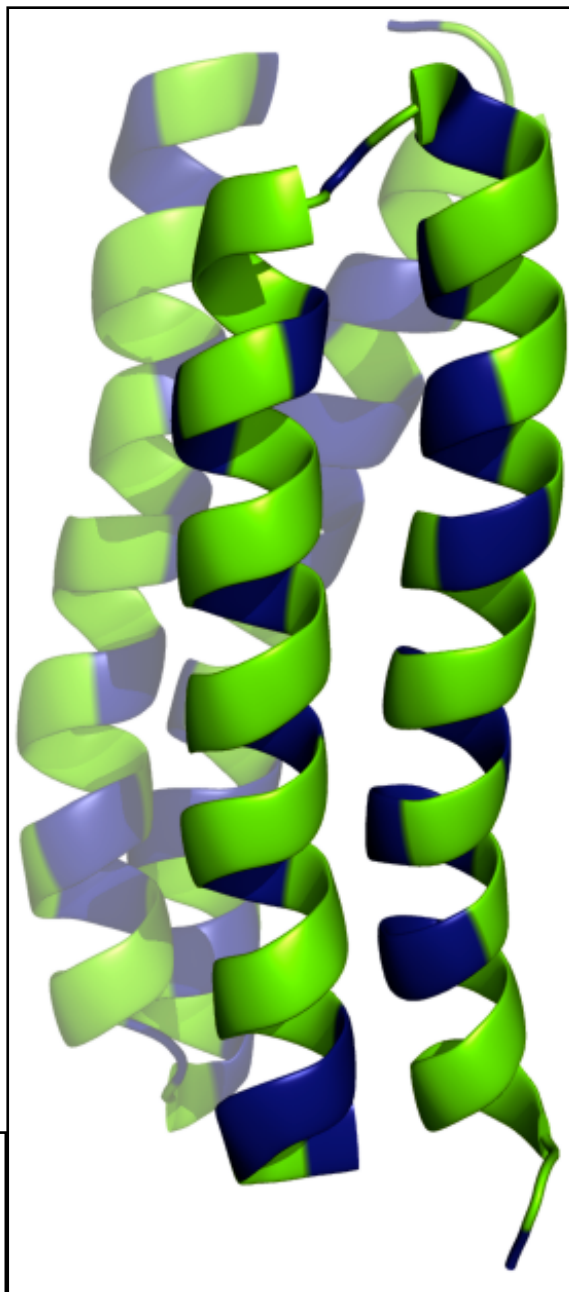
Εικόνα 1.5. Μοντέλα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Α) Μοντέλο πλαισίου. Πιστεύεται πως η πρωτεϊνική αναδίπλωση ξεκινά με τον σχηματισμό στοιχείων δευτεροταγούς δομής ανεξάρτητα από την τριτοταγή δομή, ή έστω πριν η τριτοταγής δομή πάρει την οριστική της διαμόρφωση. Τα στοιχεία αυτά έπειτα συγκροτούνται σε μία αρκετά καλά πακεταρισμένη τριτοταγή λειτουργική δομή είτε μέσω διάχυσης και συνένωσης είτε μέσω μίας διαδοχικής διαμόρφωσης της δομής. Β) Μοντέλο υδρόφοβης κατάρρευσης. Το αρχικό γεγονός της αντίδρασης, με βάση το συγκεκριμένο μοντέλο φαίνεται να είναι μία κατάρρευση του πρωτεϊνικού μορίου, που πυροδοτείται από την υδροφοβικότητα των αμινοξέων της αρτιγενούς πρωτεΐνης. Σταθερή δευτεροταγής δομή αρχίζει να αναπτύσσεται αφ' ότου έχει επέλθει το στάδιο της κατάρρευσης. Γ) Μοντέλο συμπήκνωσης πυρήνων. Η αναδίπλωση του μορίου βασίζεται και καταλύεται πάνω στον πρώιμο σχηματισμό ενός πυρήνα. Ο πυρήνας πρωταρχικά αποτελείται από μερικά μόνο γειτονικά αμινοξέα τα οποία αναπτύσσουν, λίγες αλλά σωστές, δευτεροταγείς αλληλεπιδράσεις, αλλά το όλο σύστημα σταθεροποιείται μόνο εάν οι συνθήκες για την ανάπτυξη τριτοταγών αλληλεπιδράσεων είναι σωστές. Όλα τα παραπάνω μοντέλα μπορούν να επεκταθούν και στην περίπτωση πρωτεϊνών οι οποίες έχουν ενδιάμεσα και πολλαπλές μεταβατικές καταστάσεις. Το τελευταίο βήμα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης περιλαμβάνει το «κλείδωμα» των πλάγιων αλυσίδων (47)

Αδιαμφισβήτητα, η γνώση μας πάνω στο πρόβλημα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης έχει εμπλουτιστεί. Όπως αναφέρθηκε, υπάρχουν πολλές θεωρίες και μοντέλα που προσπαθούν να δώσουν απάντηση σε ένα από τα μεγαλύτερα ερωτήματα της βιολογίας. *Συμπερασματικά*, μία περισσότερο ρεαλιστική και όχι τόσο επικεντρωμένη αναζήτηση για την εύρεση ενός παγκοσμίου κανόνα, ίσως μας οδηγήει να καταλήξουμε στην υπόθεση πως είναι πολύ πιθανό ότι οι μηχανισμοί αναδίπλωσης διαφέρουν σημαντικά βάσει του μεγέθους της πρωτεΐνης, της σταθερότητας και της δομής της, και πως δεν υπάρχει ένας ενιαίος κανόνας που ακολουθείται από όλες τις περιπτώσεις. Σε αυτήν την μακροχρόνια προσπάθεια διαλεύκανσης του επίλυσης ενός από των μεγαλύτερων της βιολογίας, η Rop έχει παίξει τον δικό της, μεγάλο ρόλο, με σημαντική προσφορά.

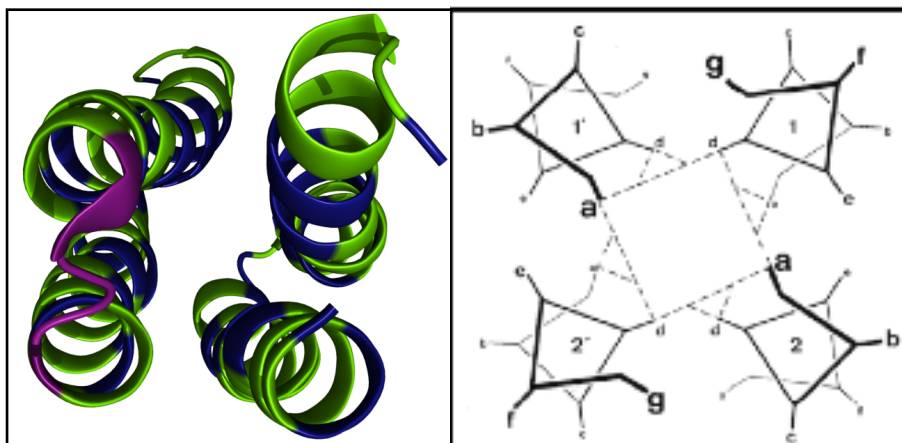
1.4 Η πρωτεΐνη Rop

Η Rop είναι το απλούστερο 4- α -ελικοειδές δεμάτιο με δομή γνωστή σε υψηλή διακριτικότητα (Εικόνα 1.6). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το μικρό της μέγεθος και την ιδιαίτερα κανονική δομή της, την καθιστούν ένα ιδανικό φυσικό μοντέλο για τη μελέτη της δομής του δεματιού. Μέχρι τώρα έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη διερεύνηση των βασικών ιδιοτήτων της τοπολογίας, της δομικής σταθερότητας και του μηχανισμού αναδίπλωσης και αποδιάταξης αυτού του μοτίβου.

Το 4- α -ελικοειδές δεμάτιο είναι ένα απλό δομικό μοτίβο που αποτελεί ένα σύστημα για μελέτες πρωτεϊνικής μηχανικής και de novo σχεδιασμό πρωτεϊνών (5, 32). Αποτελεί ένα απλό και κοινό πρωτεϊνικό δομικό μοτίβο (67). Συνίσταται από τέσσερις α -έλικες που συνδέονται μεταξύ τους συνήθως με τρεις βρόχους. Οι έλικες πακετάρονται αντιπαράλληλα και στην ιδανική περίπτωση διασταυρώνονται υπό μια γωνία 20°. Η αμινοξική αλληλουχία των ελίκων ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό πρότυπο υδρόφιλων και υδρόφοβων αμινοξέων, που επαναλαμβάνεται κάθε επτά αμινοξικά κατάλοιπα. Το πρότυπο αυτό ονομάζεται "επανάληψη επτάδας" (heptad repeat), συμβολίζεται ως (a, b, c, d, e, f, g)_n και χαρακτηρίζεται από μια περιοδική κατανομή υδρόφοβων αμινοξέων στις θέσεις a, d. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται στο εσωτερικό της δομής και είναι ελάχιστα προσβάσιμες στο διαλύτη. Αντίθετα η θέση f καταλαμβάνεται συνήθως από υδρόφιλο αμινοξύ και είναι η περισσότερο εκτεθειμένη στο εξωτερικό περιβάλλον της πρωτεΐνης και (53, Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.6. Η Rop αποτελεί ένα 4- α -ελικοειδές δεμάτιο. Με κυανό αναπαριστώνται τα υδρόφοβα κατάλοιπα, τα περισσότερα από τα οποία είναι βρίσκονται στο εσωτερικό το μορίου.

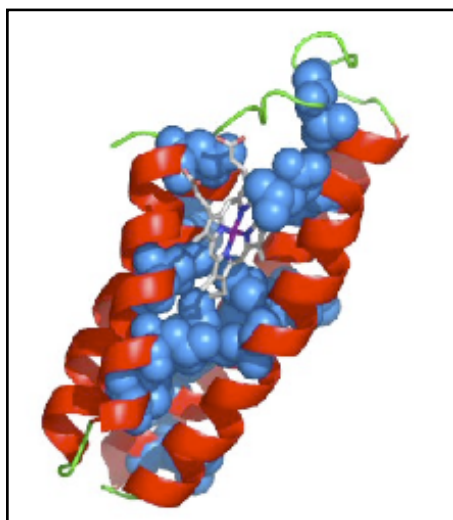


Εικόνα 1.7. Εγκάρσια τομή ενός 4-α-ελικοειδούς δεματιού με πάχος δύο στροφές της έλικας που δείχνει την αλληλεπίδραση των υδρόφοβων αμινοξέων του πυρήνα στα πλαίσια του προτύπου της επτάδας. Φαίνεται η διευθέτηση των επτά θέσεων (a-g) στις τέσσερις έλικες, που συμβολίζονται ως 1, 1', 2, 2'. Οι διακεκομμένες γραμμές ορίζουν προσεγγιστικά επίπεδα («φέτες», (3) στα οποία πετυχαίνεται το βέλτιστο πακετάρισμα των εσωτερικών, υδρόφοβων αμινοξέων (θέσεις a, d), (53).

Το 4-α-ελικοειδές δεμάτιο μπορεί να αναλάβει μια ποικιλία ενεργοτήτων: Δεσμευτής του υποδοχέα (receptor binding) στους αιμοποιητικούς παράγοντες ανάπτυξης, δεσμευτής RNA (RNA-binding) στη Rop, ενώ στη μυοαιμερυθρίνη έχει το ρόλο μεταφορέας μοριακού οξυγόνου. Υπάρχουν δυο μορφές του μοτίβου ανάλογα με τη λειτουργία που επιτελεί. Στην πρώτη, ο υδρόφοβος πυρήνας του δεματιού λειτουργεί ως

υποδοχέας προσθετικής ομάδας (όπως συμβαίνει στα κυτοχρώματα b562 και c όπου η αίμη δεσμεύεται στο εσωτερικό ενός 4-α-ελικοειδούς δεματιού Εικόνα 1.8). Σε αυτή τη περίπτωση η συναρμογή του δεματιού είναι χαλαρή στο ένα του άκρο γιατί οι έλικες εκεί είναι ξεδιπλωμένες. Στη δεύτερη, δεν δεσμεύεται προσθετική ομάδα στο εσωτερικό του δεματιού και η δομή είναι πιο σφιχτά πακεταρισμένη (14).

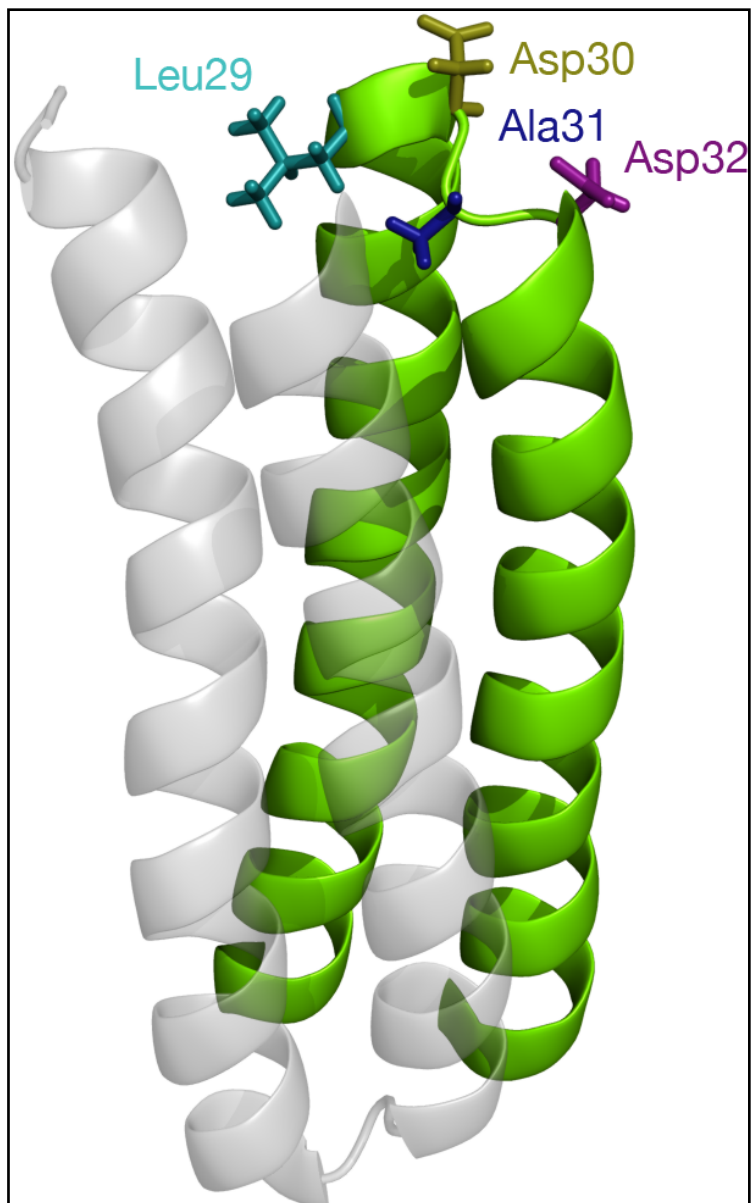
Η πρωτεΐνη Rop είναι το προϊόν του γονιδίου rop που βρίσκεται στο ColE1 και σε συγγενή πλασμιδία του βακτηρίου *Escherichia coli*. Η λειτουργική μορφή της πρωτεΐνης, είναι το σχηματιζόμενο ομοδιμερές το οποίο έχει τη δομή του 4-α-ελικοειδούς δεματιού (με μοριακό βάρος 14kDa). Ο βιολογικός της ρόλος, ως RNA-δεσμευτής (RNA-binding), είναι να ρυθμίζει την πλασμιδιακή αντιγραφή και κατά συνέπεια στον έλεγχο του αριθμού των πλασμιδιακών αντιγράφων (13, 38, 54). Η ρύθμιση της πλασμιδιακής



Εικόνα 1.8. Το κυτόχρωμα b562 έχει δομή 4-α-ελικοειδούς δεματιού. Η αίμη είναι δεσμευμένη στο εσωτερικό του δεματιού.

αντιγραφής επιτυγχάνεται με το να συμβάλει στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα σε δύο ρυθμιστικά RNA μόρια, το RNAI και το RNAII. Κατά το αρχικό στάδιο το RNA II μόριο υβριδίζεται σε συγκεκριμένη θέση στο DNA, κάτι που είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής. Εν 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 (11). Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η Rop ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων σε μια θέση υποκινητή όπου προσδένεται ένας RNA εκκινήτης (RNA II) και για αυτό ονομάστηκε Rop (Repressor Of Primer) (12, 13, 65). Ωστόσο, η Rop δεν δρα ως κλασικός καταστολέας, αλλά ως ενισχυτής της δράσης του RNA I μορίου, για αυτό συναντάται και με το όνομα Rom (RNA I Modulator) (11). Η Rop επίσης φαίνεται να έχει και έναν δευτερεύοντα πιο έμμεσο ρόλο. Αυτός είναι η προστασία του συμπλόκου από τη

δράση ριβονουκλεασών (34). Η τρισδιάστατη δομή του μορίου έχει επιλυθεί τόσο μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ στη διακριτικότητα των 1.7 Å (3), όσο και NMR (20). Η Rop είναι μία απλή, ομοδιμερής πρωτεΐνη. Το κάθε μονομερές αποτελείται από 63 αμινοξέα που σχηματίζουν δύο αντιπαράλληλες α-έλικες οι οποίες συνδέονται με ένα βρόγχο, ο οποίος σχηματίζεται από τα 3 αμινοξικά κατάλοιπα (Asp30, Ala31, Asp32-Εικόνα 1.9). Τα δύο μονομερή σχηματίζουν το 4-α-ελικοειδές δεμάτιο, μέσω ενός αρχικού ενδιαμέσου το οποίο επαναδιευθετείται (44). Η Rop πακετάρεται βάση του προτύπου «κουμπιά σε τρύπες» («knobs in holes»), που ισχύει για όλα τα α-ελικοειδή-δεμάτια: Οι υδρόφοβες πλευρικές ομάδες των αμινοξέων διευθετούνται προς το εσωτερικό του μορίου, δημιουργώντας έτσι τον υδρόφοβο πυρήνα του μορίου ο οποίος είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητά του (Εικόνα 1.7), ενώ οι υδρόφιλες είναι εκτεθειμένες στον διαλύτη. Τέλος, η ύπαρξη ενός τέλειου διπλού άξονα, προσδίδει στο μόριο μία ευκόλως παρατηρήσιμη συμμετρικότητα. Τα δύο μονομερή συσχετίζονται μεταξύ τους αρχικά γρήγορα για να δώσουν ένα διμερές ενδιαμέσο και στη συνέχεια επαναδιευθετούνται αργά και σχηματίζουν τη τελική δομή που είναι ένα υψηλής κανονικότητας 4-α-ελικοειδές δεμάτι (44).



Εικόνα 1.9. Η στροφή της Rop αποτελείται από τα κατάλοιπα Asp30, Ala31, Asp32, και είναι η περιοχή στην οποία διακόπτεται το μοτίβο της επτάδας.

Όπως αναφέρθηκε τα α-ελικοειδή δεμάτια παρουσιάζουν το πρότυπο της επτάδας. Η Rop δεν αποτελεί εξαίρεση. Η επανάληψη αυτή δημιουργεί στη Rop 8 κάθετα επίπεδα ως προς τον κατακόρυφο άξονα της. Κάθε επίπεδο σχηματίζεται από ένα ζεύγος a και d καταλοίπων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του υδρόφοβου πυρήνα της πρωτεΐνης. Η επαναληψιμότητα αυτή διακόπτεται άπαξ, στη περιοχή της στροφής και πιστεύεται πως αυτός είναι ο λόγος δημιουργίας της στροφής στη Rop, όπως συμβαίνει και σε άλλες περιπτώσεις όπως αυτές τις μυσίνης και των ενδιαμέσων ινιδίων (3, 30).

Τόσο η στροφή όσο και τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό του υδρόφοβου πυρήνα υπήρξαν στόχος εκτεταμένης μεταλλαξιγένεσης.

1.5 Αναδρομή στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη wtRop

Οι Steif και Weber αρχικά και οι Rosgen και Rosengarth αργότερα μέσω θερμοδυναμικών μελετών έδειξαν πως η Rop είναι ένα ιδιαίτερα σταθερό μόριο (58, 62), το οποίο κατά την αποδιάταξή τους εμφανίζει κινητική δεύτερης τάξεως και έχει προταθεί πως γίνεται με βάση την εξίσωση: $N_2 \leftrightarrow 2N^* \leftrightarrow 2D$ (N^* είναι τα ενδιάμεσα μονομερή). Επίσης, κατά την αποδιάταξη, η wtRop εμφανίζει $T_m = 71^\circ\text{C}$ και μία μεταβολή ελεύθερης ενέργειας ίση με $\Delta G_{Do} = 71.7 \text{ kJ/mol}$.

Η τελική διαμόρφωση στο χώρο και η σταθερότητα του μοτίβου καθορίζονται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις συναρμογής των υδρόφοβων αμινοξέων του πυρήνα (52). Αυτό διαφάνηκε από τότε που έγινε γνωστή η δομή της Rop (3) και επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με θερμοδυναμικές και φασματοσκοπικές μελέτες (62) καθώς και με πολλές σημειακές ή συνδυασμένες μεταλλάξεις.

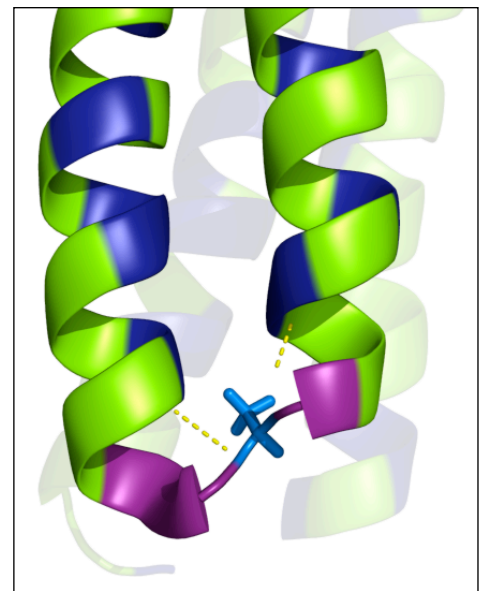
Αλλαγές αμινοξέων που βρίσκονται στη περιοχή του βρόχου ή γενικότερα έχουν πλευρικές ομάδες εκτεθειμένες στο διαλύτη, φάνηκε να αφήνουν αμετάβλητο το μόριο (11). Συνδυασμένες μεταλλαγές των αμινοξέων του πυρήνα που έγιναν έτσι ώστε να παραμένει αμετάβλητο το ολικό πρότυπο υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερότερων, με παραπλήσια ή εντελώς διαφορετική δομή, μορίων από αυτό της wtRop, που διατηρούσαν το βιολογικό τους ρόλο (Munson et al., 1996). Υπήρξαν όμως και μεταλλαγές του υδρόφοβου πυρήνα οι οποίες κατέληγαν σε πιο ασταθή μόρια. Οι αλλαγές αυτές προκύπτουν όταν εισάγονται στον πυρήνα ογκώδεις ομάδες (45) ή αντίθετα όταν δημιουργούνται κενοί χώροι (cavities) από την εισαγωγή μικρών ομάδων (L41V, L41A) που αυξάνουν την πρόσβαση του διαλύτη στο εσωτερικό (61). Η τρισδιάστατη δομή των δύο αυτών μεταλλαγμάτων προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφικά. Το σημαντικό που παρατηρείται είναι πως οι δομές των μορίων είναι κατά πολύ όμοιες με αυτήν της wtRop και μικρές αλλαγές παρατηρούνται μόνο κοντά στην περιοχή των μεταλλάξεων.

Οι παραπάνω μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα πως η σταθερότητα μίας πρωτεΐνης εξαρτάται τόσο από την ανάπτυξη ευνοϊκών στερικών αλληλεπιδράσεων στον υδρόφοβο πυρήνα, όσο και από σωστό-στενό πακετάρισμα του υδρόφοβου πυρήνα.

Ενώ ο καθοριστικός ρόλος των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη διαμόρφωση και τη σταθερότητα της δομής είναι γενικά αποδεκτός δεν συμβαίνει το ίδιο για τη περιοχή του βρόχου και για τις αλληλεπιδράσεις έλικας – βρόχου. Οι Caracci & Chou (8, 9) βασιζόμενοι σ' ένα θεωρητικό μοντέλο υπολόγισαν πως η ενέργεια σταθεροποίησης στη δομή του δεματιού προέρχεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από αλληλεπιδράσεις ελίκων – βρόχων. Πειραματικές μελέτες που ακολούθησαν, αντέκρουσαν αυτή τη θεώρηση και απέδωσαν στους βρόχους δευτερεύοντα ρόλο για τον καθορισμό και τη σταθεροποίηση της δομής (10). Πάντως, οι Predki & Regan (54) επισημαίνουν πως αν και ο σωστός συσχετισμός των ελίκων φαίνεται να κατευθύνεται από το πακετάρισμα του υδρόφοβου πυρήνα, εντούτοις δεν θα πρέπει να αγνοηθεί ο ρόλος των βρόχων, αφού το μήκος τους είναι επίσης κρίσιμης σημασίας για τη σωστή διεύθυνση των ελίκων. Επιπλέον, ο βρόχος αν και παρουσιάζει μεγάλη ανοχή σε μεταλλάξεις δεν μπορεί να υιοθετήσει όλες τις πιθανές αλληλουχίες.

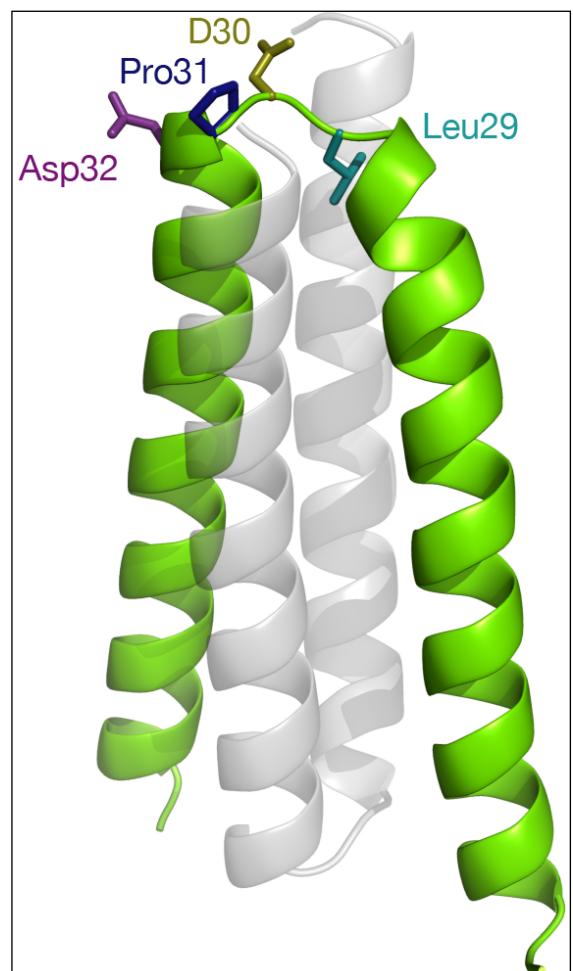
Όπως αναφέρθηκε η στροφή της wtRop συνίσταται από τα κατάλοιπα Asp30, Ala31, Asp32. Αρχικά οι Castagnoli και Vetrani αντικατέστησαν τα τρία αυτά αμινοξέα με άλλα διαφορετικών φυσικοχημικών και στερεοχημικών ιδιοτήτων (10). Από τις μεταλλαγές αυτές προέκυψαν 380 μεταλλάγματα, η πλειοψηφία των οποίων (>99%) φαίνεται να μην είχαν επηρεασμένη διαμόρφωση. Τα

αποτελέσματα της εργασίας αυτής υποστηρίζουν 2 απόψεις. Πρώτον, ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των καταλοίπων της στροφής δε συμβάλουν στο σχηματισμό της δομής και κατά δεύτερον η πληροφορία που περιέχεται στη στροφή είναι ελάσσονος σημασίας. Εκτός από τη σύσταση της στροφής σε αμινοξέα, θεωρήθηκε πως και το μήκος της μπορεί να επηρεάζει την αναδίπλωση του 4- α -ελικοειδούς δεματίου. Οι Nagi και λοιποί αντικατέστησαν τα κατάλοιπα της στροφής με έναν διαδοχικά αυξανόμενο αριθμό καταλοίπων γλυκίνης. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως δεν επηρεάζεται καθόλου η δομή του μορίου, παρόλα αυτά υπάρχουν αλλαγές στην κινητική της αντίδρασης με επιβράδυνση της αναδίπλωσης και επιτάχυνση της αποδιάταξης, τόσο μεγαλύτερες όσο μεγαλύτερος είναι και ο αριθμός των παρεμβαλλόμενων γλυκίλο-καταλοίπων (46).



Εικόνα 1.10. Το κατάλοιπο A31 είναι μείζονος σημασίας για τη σταθερότητα του μορίου.

Από τα αμινοξέα που συστήνουν τη στροφή της wtRop, αξίζει να κάνουμε μια ιδιαίτερη αναφορά στην Ala31. Το κατάλοιπο αυτό είναι το μοναδικό που σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και με τις δύο α -έλικες, ενισχύοντας έτσι τη σταθερότητά του (Εικόνα 1.10). Επίσης εμφανίζει μία αρκετά ασυνήθιστη διαμόρφωση για κατάλοιπο που συμμετέχει σε στροφή ($\phi=-94$, $\psi=89$). Η μετάλλαξη αυτού το συγκεκριμένου αμινοξέος σε προλίνη ήταν ικανή για να ρίξει φως στον ρόλο των καταλοίπων στη στροφή και πως επηρεάζουν επηρεάζουν την αναδίπλωση. Η προλίνη έχει φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τα οποία απέχουν πολύ από αυτά της αλανίνης, με πιο χαρακτηριστικά τους χαμηλούς βαθμούς ελευθερίας του μορίου και τη στερική παρεμπόδιση που δημιουργεί λόγω του μεγάλου όγκου του. (10, 11, 28, 29, 39, 40). Οι μελέτες πάνω στην RopA31P έδειξαν πως εξακολουθεί να εμφανίζει βιολογική ενεργότητα σε χαμηλότερα ποσοστά, ενώ μετρήσεις κυκλικού διχρωσισμού (CD spectra) και πειράματα θερμοδυναμικής έδειξαν μια μείωση του περιεχομένου της δομής σε α -έλικα της τάξης του 7% και μια μείωση της σταθερότητας περίπου 40% σε σύγκριση με τη wtRop. Το εκπληκτικό είναι η δομή του μορίου, η οποία λύθηκε το 1999 από τους Glykos και λοιποί (29), δε φέρει καμία ομοιότητα τοπολογικά με την wtRop (Εικόνα 1.11). Το μόριο έχει πλέον μετατραπεί από την αρχική του κατάσταση (αριστερόστροφο α -ελικοειδές δεμάτιο) σε ένα αντιπαράλληλο δεξιόστροφο δεμάτιο με μείγμα δεξιόστροφων και αριστερόστροφων ελίκων. Ενα άλλο

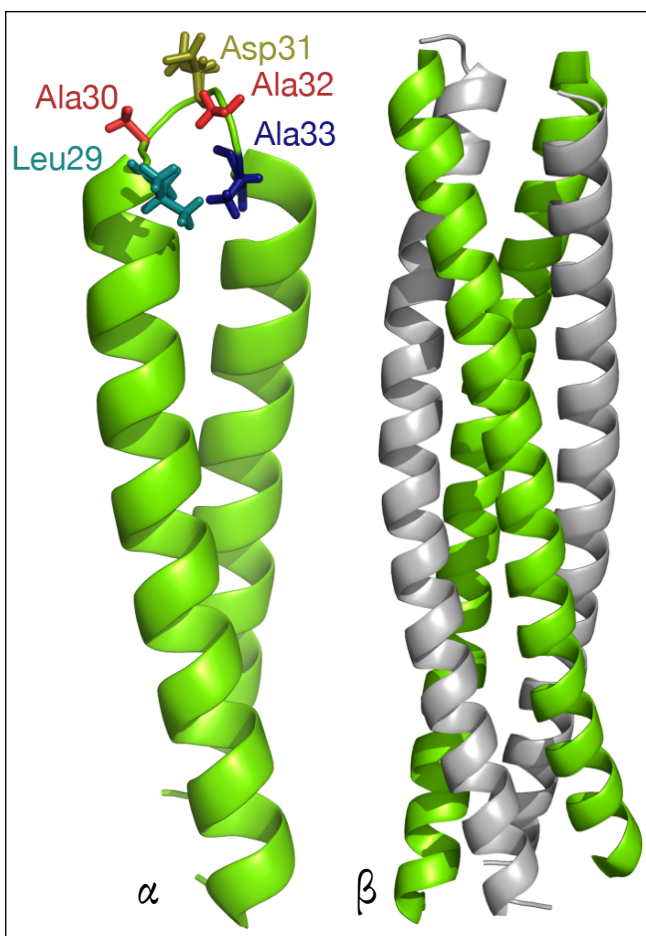


Εικόνα 1.11. Η αλλαγή ενός μοναδικού αμινοξέος προσδίδει στην RopA31P μια τελείως διαφορετική τοπολογία από αυτήν της wtRop.

αξιοσημείωτο γεγονός είναι η μεταβολή της στροφής στην RopA31P. Η στροφή αρχίζει από τον κατάλοιπο Asn27 και τελειώνει στο Asp30, με την Pro31 να μη συμμετέχει στο σχηματισμό της, όντως σε trans διαμόρφωση (29). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός πως η RopA31P φαίνεται να έχει παγιδευτεί ενεργειακά σε μία κατάσταση εύπλαστης σφαίρας (28), κάτι το οποίο ενισχύεται και από αποτελέσματα της παρούσας και προηγούμενων ερευνών (Fellas και λοιποί, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Φαίνεται λοιπόν πως η αλανίνη στη θέση 31 του μορίου ευνοεί στο να ακολουθήσει το μόριο κατά τη διάρκεια της αναδιπλώσής του ένα θερμοδυναμικά σταθερότερο μονοπάτι.

Αναφέρθηκε προηγουμένως πως η διακοπή της επτάδας στο μόριο της wtRop είναι και η αιτία δημιουργίας της στροφής. Η έλλειψη δύο αμινοξέων είναι αυτή που διαταράσσει το μοτίβο της επτάδας στη συγκεκριμένη περιοχή. Αραγε η επτάδα θα μπορούσε να αποκατασταθεί με την προσθήκη των δύο αυτών αμινοξέων, και αν ναι τι επιπτώσεις θα είχε στη δομή του μορίου; Μία εναλλακτική λύση για την αποκατάσταση της επτάδας θα ήταν η απαλοιφή της κολοβούς επανάληψης στην στροφή. Για τον έλεγχο των δύο αυτών υποθέσεων δημιουργήθηκαν τα δύο παρακάτω μεταλλάγματα της Rop: Η παραλλαγή Rop2a, έχει δημιουργηθεί με την προσθήκη 2 αμινοξέων αλανίνης γύρω από το κατάλοιπο Asp30, με σκοπό τη συμπλήρωση της ελλειπούς επτάδας επτάδας (11, 61). Στο άλλο μετάλλαγμα, το οποίο ονομάστηκε RM6, έχουν διαγραφεί τα κατάλοιπα Asp30 έως και Gln34, δίνοντας έτσι ένα μόριο με αποκατεστημένη την επανάληψη της επτάδας, αλλά με επτά αμινοξέα λιγότερα από τον Rop2a (11, 30, 40).

Η Rop2a τόσο στις θερμοδυναμικές παραμέτρους, όσο και στην τριτοταγή δομή ομοιάζει εξαιρετικά με την wtRop με ελάχιστες και μικρές σε έκταση διαφορές. (61).



Εικόνα 1.12. Το μονομερές της Rop2a (α) και το τετραμερές της RM6 (β).

Για την περίπτωση του RM6, τα πράγματα ήταν εντελώς διαφορετικά. Η αποκατάσταση της επτάδας στην περίπτωση αυτή είναι επιτυχής με το μόριο να λαμβάνει δομή ομοτετραμερούς, αριστερόστροφου δεματίου με όλες τις έλικες αντιπαράλληλες μεταξύ τους. Το νέο μόριο έχει επίσης έναν τελείως αναδιοργανωμένο πυρήνα και εμφανίζεται εξαιρετικά σταθερό σε συνθήκες θερμικής αποδιάταξης. Η στροφή του κάθε μονομερούς έχει εξαλειφθεί και πλέον το μονομερές από έλικα-στροφή-έλικα έχει μετατραπεί σε μία επιμηκυμένη α-έλικα.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία ασχολείται με μεταλλάγματα της Rop τα οποία προσπαθούν να ρίξουν φως στο ρόλο της στροφής και του μοτίβου της επτάδας στην αναδίπλωση του μορίου. Τα μεταλλάγματα αυτά, βασίζονται πάνω σε 2 προηγούμενα μεταλλάγματα τα οποία έδωσαν νέες διαστάσεις στον ρόλο της στροφής και του μοτίβου της επτάδας και τα προκειμένα προσπαθούν να διεύρυνουν τη γνώση μας αυτή.

Όπως αναφέρθηκε, πιστεύεται πως η μοναδική σημειακή μετάλλαξη A31P που έχει αλλάξει ριζικά την τοπολογία της δομής της Rop, παγιδεύει ενεργειακά το μόριο σε μία κατάσταση molten globule αποτρέποντάς την εγγενή διαμόρφωσή της. Το διπλό μετάλλαγμα D30GA31P σχεδιάστηκε έτσι ώστε να διερευνηθεί εάν η γλυκίνη με τους απεριόριστους βαθμούς ελευθερίας που έχει μπορεί να επιτρέψει την πρωτεΐνη (RopA31P) να μεταπηδήσει εκτός του τοπικού ελαχίστου στο οποίο έχει παγιδευτεί και να ακολουθήσει ένα θερμοδυναμικά σταθερότερο μονοπάτι προς την εγγενή της μορφή. Επιπλέον, το συγκεκριμένο μετάλλαγμα σε συνδυασμό με ένα παραπλήσιο μετάλλαγμα, το RopD30PA31G το οποίο μελετήθηκε εκτενώς από άλλα μέλη του εργαστηρίου, θα δώσει απάντηση εάν η επίδραση της προλίνης στην αναδίπλωση οφείλεται λόγω της υπαρξής της σε κάποια από τα αμινοξέα της στροφής ή στη συγκεκριμένη θέση 31 της αλληλουχίας.

Το δεύτερο μετάλλαγμα στηρίζεται πάνω στο Rop2a, το οποίο αναμενόταν να αποκαταστήσει το μοτίβο της επτάδας στην περιοχή της στροφής και να δώσει τελικώς ένα μόριο με δομή, πιθανότατα όμοια με αυτή του RM6 μεταλλάγματος. Όμως κάτι τέτοιο δε συνέβη. Μία πιθανή εξήγηση είναι η εξής: Με την αποκατάσταση της επτάδας στη στροφή, με την εισαγωγή των δύο καταλοίπων αλανίνης, τα τελευταία καταλαμβάνουν θέσεις e-g, ενώ στην επόμενη επτάδα που δημιουργείται τα κατάλοιπα ADEQ καταλαμβάνουν τις θέσεις a-d. Όπως αναφέρθηκε, στην επανάληψη της επτάδας οι θέσεις a και d καταλαμβάνονται από υδρόφοβα αμινοξέα, κάτι το οποίο δε φαίνεται να ισχύει για τη θέση d της προαναφερθείσας αλληλουχίας ADEQ, όπου καταλαμβάνεται από ένα καθαρά υδρόφιλο αμινοξύ, την γλουταμίνη (Q). Το δεύτερο μετάλλαγμα που δημιουργήθηκε, το Rop2aL, αντικαθιστά τη γλουταμίνη στη θέση 36 της Rop2a με ένα κατ' εξοχήν υδρόφοβο κατάλοιπο λευκίνης. Η δομή του μεταλλάγματος αυτού αναμένεται να είναι παρόμοια με αυτή του RM6.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι αλληλίες της wtRop και των 2 μεταλλαγμάτων που έχουν ως στόχο την αποκατάσταση του μοτίβου της επτάδας στην περιοχή της στροφής.

wtRop
MTKQEK TALNMARFIRSQTLLTLEKLNEL DA DEQADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGENL
Rop2a
MTKQEK TALNMARFIRSQTLLTLEKLNEL ADA DEQADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGEN
Rop2L
MTKQEK TALNMARFIRSQTLLTLEKLNEL DADLEQ LADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGENL

Επιπροσθέτως έγιναν κάποια συμπληρωματικά πειράματα πάνω στο μετάλλαγμα Rop2L το οποίο αναπτύχθηκε από τον Φελλά Γιώργο, μέλος του εργαστηρίου, το οποίο έχει και αυτό σχεδιαστεί ώστε να αποκαθιστά το μοτίβο της επτάδας στη στροφή με έναν διαφορετικό τρόπο από αυτόν του μεταλλαγμάτος Rop2aL. Στη περίπτωση αυτή η επτάδα αποκαθίσταται με την εισαγωγή δύο καταλοίπων λευκίνης εκατέρωθεν των E33 και Q34.

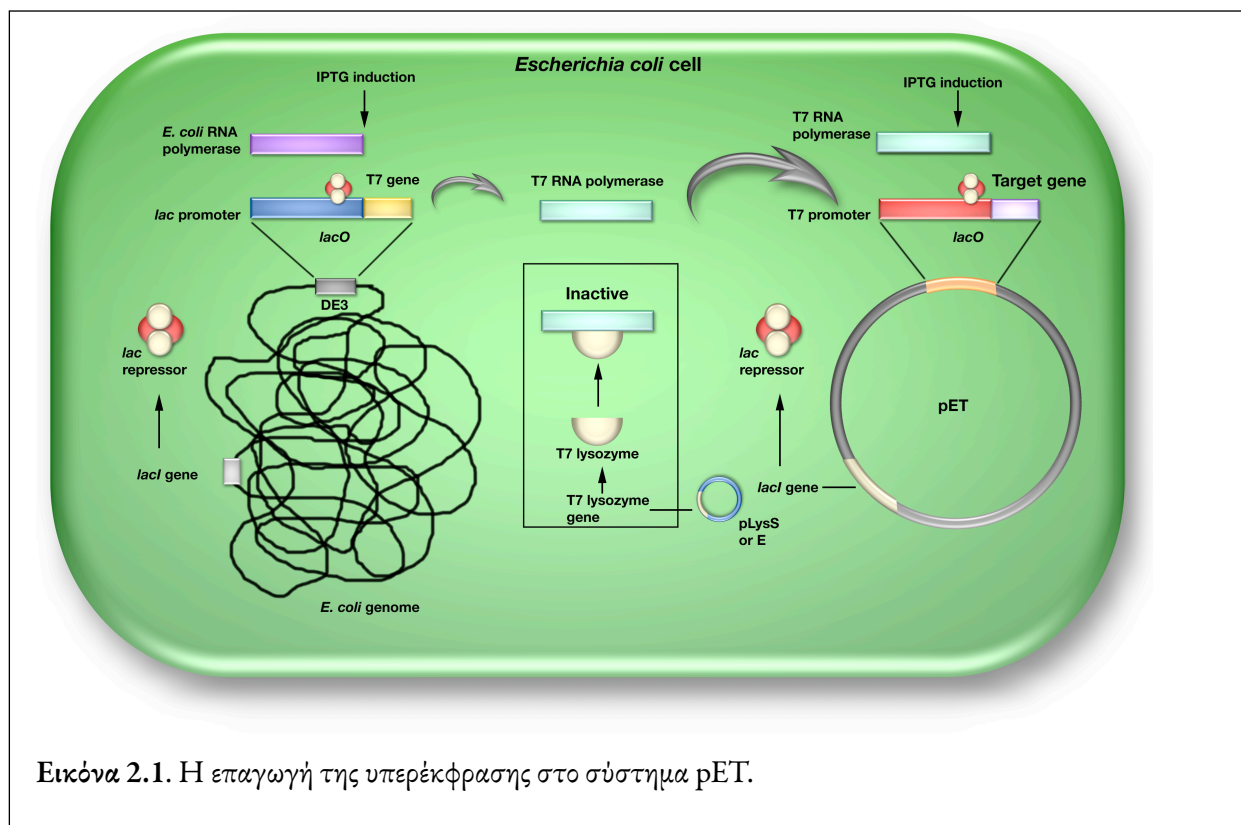
Τέλος κάποια πρωταρχικά πειράματα με το μετάλλαγμα His-RopA31P, τα οποία δεν έχουν όμως ακόμη ολοκληρωθεί, δείχνουν πως πιθανώς μετά από διατήρηση για αρκετό καιρό στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ η πρωτεΐνη εμφανίζει τελείως διαφορετικά φάσματα κατά την θερμική αποδιάταξη στο άνω-υπεριώδες κάτι που μπορεί να υποδηλώνει μία θερμοκρασιακά-επαγόμενη αλλαγή στην τοπολογία του μορίου.

2.1 Χημικά, βιοχημικά, πλασμιδιακοί φορείς και βακτηριακά στελέχη.

Τα χημικά ήταν από τις εταιρείες Sigma και Merck. Οι πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pET26b(+) (Novagen) και pF1K T7 Flexi (Promega).

Ο φορέας pET26b(+) 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 (Εικόνα 2.1). 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 εξαισθητικό επίτοπο (6xHis-Tag). Ο pET26b(+) φέρει γονίδιο αντίστασης στην канаμυκίνη.

Ο φορέας pF1K T7 Flexi 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 канаμυκίνη.



2.2 Μεταλλαξιγένεση και δημιουργία των γονιδίων ropGP και rop2aL.

Τα γονίδια ropGP και rop2aL δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (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 ακριβείας (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 επιλεκτικών κυττάρων (XL1-Blue) με τα μεταλλαγμένα αντίγραφα του πλασμιδίου.

Ως μήτρα για τη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της wtRop το οποίο είχε κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pF1K T7 Flexi (Promega).

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:
2aL1 5'-CTG GAC GCG GAT CTG GAA CAG CTG GCA GAC ATC TGT G-3' και
2aL2 5'-C ACA GAT GTC TGC CAG CTG TTC CAG ATC CGC GTC CAG-3'

Η ορθότητα της μεταλλαξιγένεσης ελέγχθηκε και επικυρώθηκε μέσω αλληλούχισης των πλασμιδίων pF1K T7-ropGP και pF1K T7-rop2aL. Το πλασμιδιακό DNA συλλέχθηκε χρησιμοποιώντας ολονύχτια υγρή προκαλλιέργεια κυττάρων XL1-Blue και το XXXXXX κιτ της XXXX. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης.

2.3 Κλωνοποίηση των γονιδίων ropgp και rop2aL σε φορέα έκφρασης

Τα γονίδια ropGP και rop2aL ενισχύθηκαν μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα τις κατασκευές pF1K T7-ropGP και pF1K T7-rop2aL αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τους εξής εκκινητές:

p1 (forward)

5'-CGC GAC GGC CAT ATG ACC AAA CAG GAA AAA ACC GCC-3' (NdeI site)

p2 (reverse)

5'-CCG CTC GAG GAG GTT TTC ACC GTC ATC ACC-3'

Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι παλίνδρομες θέσεις που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και XhoI αντίστοιχα (New England Biolabs, Inc.). Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο, ώστε το εκάστοτε γονίδιο rop να κλωνοποιηθεί στις θέσεις NdeI και XhoI του Multicloning site του pET26b(+) (Novagen, Inc.). Ο φορέας αυτός προσθέτει στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών που εκφράζονται έναν επίτοπο 6 ιστιδινών ο οποίος έχει μέγιστη χρησιμότητα κατά το πρώτο στάδιο καθαρισμού των μεταλλαγμάτων με χρωματογραφία συγγενείας. Οι πλασμιδιακές κατασκευές εισήχθησαν έπειτα σε επιλεκτικά κύτταρα *E. coli* στελέχους DH5α. Η ορθότητα των κατασκευών ελέγχθηκε και επικυρώθηκε όπως περιγράφηκε και προηγουμένως με αλληλούχιση.

(Οι προαναφερθέντες εκκινητές σχεδιάστηκαν από τον Φελλά Γιώργο).

Όλα τα βήματα που αναφέρθηκαν, από τη μεταλλαξιγένεση έως και την κλωνοποίηση στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης, ακολουθήθηκαν ομοίως και για την περίπτωση του μεταλλάγματος Rop2L, από τον Φελλά Γιώργο ως τμήμα της μεταπτυχιακής του εργασίας και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για κάποια συμπληρωματικά και συγκριτικά πειράματα από την παρούσα εργασία.

2.4 Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών RopGP, Rop2aL, Rop2L και RopA31P

Η πρώτη δοκιμή υπερέκφρασης έγινε για το μετάλλαγμα RopGP χρησιμοποιώντας την κατασκευή pF1K T7-ropGP. Αρχικά, η πλασμιδιακή κατασκευή εισήχθησε σε επιλεκτικά κύτταρα *E. coli*, στελέχους BL21(DE3). Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες για την υπερέκφραση της RopGP:

Ολονύχτια υγρή προ-καλλιέργεια (5 ml LB + 25mg/ml καναμυκίνη) κορεσμένη σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) μετασχηματισμένα με την κατασκευή pF1K T7-ropGP, χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 5 ml LB + 100μg/ml αμπικιλίνης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C μέχρι η απορρόφηση της νέας καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει την τιμή ~0.6. Φυλάσσεται κυτταρική πάστα (18.000g, στους 4°C για 30sec) ενός ml στους -20°C, για να χρησιμοποιηθεί ως control της υπερέκφρασης σε 15% πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS_PAGE). Στην λοιπή καλλιέργεια προστίθεται 1 mM IPTG και η επώαση στους 37°C για 3 ώρες. Κυτταρική πάστα ενός ml από την επαγμένη καλλιέργεια συλλέγεται όπως και προηγούμενως. Ο έλεγχος της υπερέκφρασης έγινε φορτώνοντας ποσότητα των 2 δειγμάτων (επαναδιαλυτοποιημένων σε συγκεκριμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης).

Κάτω όμως από τις συγκεκριμένες συνθήκες δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης. Εν συνεχεία, για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών υπερέκφρασης της πρωτεΐνης RopGP, δοκιμάστηκε το παρακάτω σχήμα υπερέκφρασης (Πίνακας 2.1). Στόχος ήταν τόσο η υπερέκφραση της πρωτεΐνης, διατηρώντας την σε διαλυτή μορφή.

θ επώασης πριν και μετά την επαγωγή	mM IPTG	Ωρες επώασης
17	0,05	ολονύχτια
	0,2	ολονύχτια
25	0,2	ολονύχτια και 8
	0,5	8
	1	8
30	0,5	5
	1	2 και 5
37	0,5	2 και 4
	1	2 και 4
	2	1, 4 και ολονύχτια

Πίνακας 2.1. Σχήμα υπερέκφρασης της His-RopGP σε κύτταρα BL21(DE3) .

Δυστυχώς, σε καμιά από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε έκφραση της επαγωγής. Για τον λόγο αυτό κύτταρα *E. coli* στελέχους JM109pLysS (τα οποία προτείνονταν και από την εταιρεία Promega ως άκρως συμβατά με τον φορέα pF1K T7) μετασχηματισμένα με την κατασκευή pF1K T7-ropGP, χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της υπερέκφρασης της RopGP. Χρησιμοποιήθηκε το αναλυτικό σχήμα, όπως και στην περίπτωση των BL21(DE3) κυττάρων, δίχως και πάλι κανένα θετικό αποτέλεσμα.

Για τον λόγο αυτό, έγινε αλλαγή του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης από τον pF1K T7 στον pET26b (+). Η κατασκευή pET26b(+)-ropGP μετασχημάτισε επιλεκτικά κύτταρα BL21(DE3) και δοκιμάστηκε ένα γενικότερο σχήμα επαγωγής της υπερέκφρασης. Τελικά, παρατηρήθηκε υπερέκφραση της RopGP, η οποία παραμένει 100% σε διαλυτή μορφή, όπως διαπιστώθηκε μετά από λύση των κυττάρων με υπερηχοβόληση (sonication). Το σχήμα που ακολουθήθηκε και επιτεύχθηκε η καλύτερη δυνατή υπερέκφραση της RopGP, ήταν η εξής:

Ολονύχτια υγρή προ-καλλιέργεια (5 ml LB + 25mg/ml καναμυκίνη) κορεσμένη σε κύτταρα BL21 (DE3)/ pET26b(+)-ropGP, χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 5ml LB + 100μg/ml αμπικιλίνης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C μέχρι η απορρόφηση της νέας καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει την

τιμή ~0.6. Η επαγωγή συντελείται 1 mM IPTG και η επώαση συνεχίζεται στην ίδια θερμοκρασία για 4 ώρες.

Οι ίδιες συνθήκες υπερέκφρασης χρησιμοποιήθηκαν επίσης και για τις περιπτώσεις των μεταλλαγμάτων BL21(DE3)/ pET26b(+)-rop2aL και BL21(DE3)/ pET26b(+)-rop2L καθώς και για την BL21(DE3)/ pET26b(+)-ropA31P η οποία χρησιμοποιήθηκε σε μερικά πειράματα στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Ομοιες συνθήκες με πολύ μικρές διαφορές, εκτός και αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό, χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό και των τεσσάρων μεταλλαγμάτων τόσο στο πρώτο χρωματογραφικό στάδιο, όσο και στο δεύτερο, εφ' όσον διαπιστώθηκε πως λειτουργεί σε πάρα πολύ ικανοποιητικό βαθμό.

2.5 Απομόνωση των μεταλλαγμάτων

2.5.1 Στάδιο χαμηλού καθαρισμού

Η κυτταρική πάστα του προηγούμενου βήματος επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης (αναλογία 10ml διαλύματος για κάθε γραμμάριο πάστας) (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM Ιμιδαζόλιο και 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Μετά την επαναδιάλυση της κυτταρικής πάστας προστίθενται οι ακόλουθοι αναστολείς πρωτεασών: 1 mM PMSF (Phenylmethyl-sulphonyl fluoride), 150 µg/ml βενζαμιδίνη και 5 µg/ml λευπεπτίνη. Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπερηχοβόληση (sonication, Soniprep 150) για 10 λεπτά συνολικά με διαλλείματα ενός λεπτού, διατηρώντας τη θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια το δυνατόν χαμηλότερη. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4°C για 1 ώρα και 30 λεπτά.

2.5.2 Στάδιο υψηλού καθαρισμού

Χρωματογραφία στήλης συγγενείας ακινητοποιημένου μετάλλου

Η ακόλουθη διαδικασία λαμβάνει χώρα στους 4°C. Το υπερκείμενο από το προηγούμενο στάδιο, όπου και βρίσκεται η His-RopGP φορτώνεται σε εξισορροπημένη-με 20 όγκους διαλύματος (c.v.) λύσης-στήλη 10 ml Ni²⁺-nitrilotriacetic acid Fast Flow (Qiagen) με ρυθμό 1,5 ml/min. Η έκπλυση της στήλης γίνεται μέσω αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου σε βήματα των 10 mM, 20 mM και 50 mM (Πίνακας 2.2).

Διάλυμα	Όγκος διαλύματος	Ρυθμιστικό διάλυμα	[Ιμιδαζόλιο]	Πρόσθετα
Λύσης-εξισορρόπησης	20 c.v	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl	5 mM	15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη
Έκπλυση 1	20 c.v		10 mM	
Έκπλυση 2	10 c.v		20 mM	
Έκπλυση 3	4 c.v		50 mM	
Έκλουση 1	1 c.v		100 mM	
Έκλουση 2	1 c.v		100 mM	
Έκλουση 3	1 c.v		150 mM	
Έκλουση 4	1 c.v		150 mM	
Έκλουση 5	1 c.v		300 mM	
Έκλουση 6	1 c.v		300 mM	
Έκλουση X	1 c.v		300 mM	

Πίνακας 2.2. Χρωματογραφικό σχήμα καθαρισμού των μεταλλαγμάτων της παρούσας εργασίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα κλάσματα των εκλούσεων ήταν περισσότερα από 6, οπότε και σημειώνονται παραπάνω με X. Ακολουθεί η έκλουση της πρωτεΐνης από την στήλη με αυξημένη ποσότητα ιμιδαζολίου (Πίνακας 2.2). Τα κλάσματα της στήλης, όγκου 10 ml το καθένα, συλλέγονται ξεχωριστά και αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE-Εικόνα 3.2).

Τα κλάσματα των εκλούσεων σε μερικές περιπτώσεις ήταν περισσότερα από 6, αλλά ίδιας συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Η ποσότητα της πρωτεΐνης στα κλάσματα έκλουσης εκτιμάται με τη μέθοδο Bradford. Τα καθαρότερα κλάσματα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι 2 lt διαλύματος 25 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl το οποίο αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της στήλης μοριακής διήθησης όπου θα φορτωθούν έπειτα τα καθαρότερα κλάσματα για περαιτέρω καθαρισμό.

Όμως για την περίπτωση των His-Rop2aL και His-Rop2L, σε νεότερο καθαρισμό που ακολούθησε των αρχικών, το ρυθμιστικό διάλυμα μοριακής διήθησης περιείχε και 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Όπως θα συζητηθεί στην ενότητα των αποτελεσμάτων αυτό είχε σημαντικές επιπτώσεις στη συμπεριφορά των δύο αυτών μεταλλαγμάτων.

Στήλη Μοριακής Διήθησης

Ως δεύτερο στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε στήλη μοριακής διήθησης. Για το μέγεθος των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το χρωματογραφικό υλικό Sephacryl S-100 (Amersham) το οποίο έχει διαχωριστικό εύρος 1 - 100 kD. Το υλικό πακεταρίστηκε σε στήλη XK 16/100 (Pharmacia) με την βοήθεια του συστήματος ÄKTA purifier (Amersham Biosciences) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας. Κάνοντας χρήση διάταξης προσαρμογής (adaptor) στο ένα άκρο της στήλης ο συνολικός όγκος στρώματος ήταν 319 cm³. Η στήλη ελέγχθηκε με δείγμα ακετόνης και ο νεκρός της όγκος προσδιορίστηκε με δείγμα Μπλε Δεξτράνης (GE Healthcare). Ακολούθως η στήλη βαθμονομήθηκε με τη βοήθεια των πρωτεϊνών αναφοράς: Ριβονουκλεάσης A (MW = 13.7 kD, Rh = 16.4 Å), Χυμοθρυψινογόνου A (25 kD, 20.9 Å), Οβαλβουμίνης (43 kD, 30.5 Å) και Αλβουμίνης του ορού των βοοειδών (BSA, Bovine Serum Albumin, 67 kD, 35.5 Å) [GE Healthcare]. Η σχέση μεταξύ του όγκου έκλουσης και του φαινομενικού μοριακού βάρους προσδιορίστηκε έμμεσα μέσω του συντελεστή $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ όπου V_e είναι ο όγκος έκλουσης, V_o ο νεκρός όγκος και V_t ο συνολικός όγκος της στήλης.

Αρχικά η στήλη εξισορροποιήθηκε ολονύχτια με ρυθμιστικό διάλυμα μοριακής διήθησης 25 mM Tris/HCl pH 8.0 και 150 mM NaCl (σε νεότερους καθαρισμούς όπως σημειώθηκε και προηγουμένως προστέθηκε και 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Τα καθαρότερα κλάσματα του πρώτου χρωματογραφικού σταδίου που υποβλήθηκαν σε διαπίδυση με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα, συγκεντρώθηκαν σε τελικό όγκο ~3 ml χρησιμοποιώντας Amicon Ultra-15 (5k cut-off). Το τελικό δείγμα φυγοκεντρήθηκε για την απομάκρυνση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και το υπερκείμενο φορτώθηκε στη στήλη. Η ανάλυση μέσω μοριακής διήθησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στους 20°C. Η ροή ήταν 1.5 ml/min και η απορρόφηση του εκλούσματος καταγραφόταν για δύο μήκη κύματος στα 280 και 255 nm με τη χρήση του λογισμικού UNICORN 3.0 (Amersham). Τα δείγματα φορτωνόντουσαν στη στήλη με λούπα των 2 ml. Τα κλάσματα όπου βρίσκονταν το κάθε μετάλλαγμα, καθώς επίσης και η καθαρότητα του καθενός, ελέγχονταν με 15%

SDS-PAGE. Τα καθαρότερα κλάσματα που παρουσίασαν και την υψηλότερη συγκέντρωση του Rop μεταλλάγματος, υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι 2lt ρυθμιστικού διαλύματος διατήρησης το οποίο αποτελούνταν από 20 mM Tris/HCl pH 8.0 και 20 mM NaCl και συγκεντρώθηκαν με τη χρήση Amicon Ultra-15 (5k cut-off) ή Centriprep YM-10 σε τελική συγκέντρωση ~15 mg/ml.

2.6 Κυκλικός διχρωσμός

Το επίπεδα πολωμένο φως μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυκλικά πολωμένα κύματα²⁵, σε ένα δεξιόστροφο και σε ένα αριστερόστροφο ίδιας φάσης, μήκους κύματος και πλάτους ταλάντωσης. Κατά την διέλευση επίπεδα πολωμένου φωτός από μέσο που έχει την ιδιότητα να απορροφά διαφορετικά το αριστερά κυκλικά πολωμένο φως από το δεξιά κυκλικά πολωμένο φως, παράγεται ένα κύμα που αντί να ταλαντώνεται σε ένα επίπεδο περιστρέφεται ελλειψοειδώς και ονομάζεται ελλειπτικά πολωμένο φως (31). Το φαινόμενο δημιουργείται από την ασύμμετρη μοριακή δομή της ύλης.

Οι πρωτεΐνες είναι ασύμμετρα μόρια καθώς αποτελούνται από L-αμινοξέα ενώ οι δευτεροταγείς δομές που σχηματίζουν είναι επίσης ασύμμετρες και κατά συνέπεια οπτικά ενεργές. Τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού στις πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε τρία εύρη μηκών κύματος: i) Στην περιοχή του άπω – υπεριώδους (κάτω των 250 nm) όπου κυριαρχεί η συνεισφορά των πεπτιδικών δεσμών, ii) στην περιοχή του εγγύς- υπεριώδους (250 – 300 nm) όπου συμβάλλουν κυρίως οι πλευρικές αρωματικές ομάδες και iii) η ορατή περιοχή (300 – 700 nm) όπου συνεισφέρουν τα χρωμοφόρα που δυνητικά φέρουν μερικές πρωτεΐνες.

Στην περιοχή του πεπτιδικού δεσμού το σήμα του κυκλικού διχρωσμού είναι σε θέση να δώσει πληροφορία για το είδος της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Οι α-έλικες και τα β-φύλλα χαρακτηρίζονται από ένα χαρακτηριστικό ζεύγος τιμών των διεδρων γωνιών τους που επαναλαμβάνεται κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Στην περίπτωση των α-ελίκων, καθότι η Rop αποτελείται εξ' ολοκλήρου από α-έλικα, εμφανίζονται αρνητικές κορυφές στα 222 και 208 nm ενώ εμφανίζεται μία θετική κορυφή στα 192 nm.

Τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού συλλέχθηκαν σε φασματοπολαρίμετρο J815 (Jasco Corp.) του Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης. Το φασματοπολαρίμετρο ήταν συνδεδεμένο με όργανο Peltier (PTC-423S/L), για τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Τα δείγματα των μεταλλαγμάτων της Rop που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις ήταν χαμηλής συγκέντρωσης της τάξης των 0.2 – 0.5 mg/ml και προέκυψαν με αραιώση με διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 20mM NaCl για τις μετρήσεις της θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης και με αραιώση με διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 για της μετρήσεις στο άπω υπεριώδες. Για όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα πάχους 1 mm για την καταγραφή του φάσματος κυκλικού διχρωσμού. Η θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της εκάστοτε πρωτεΐνης μελετήθηκε καταγράφοντας το σήμα του κυκλικού διχρωσμού στα 222 nm (όπου ανιχνεύεται η απώλεια α-ελίκας), στο εύρος θερμοκρασιών 10 – 95°C με ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας 80°C/h και απόκριση κάθε 2 sec. Η ανάλυση των δεδομένων για την κάθε περίπτωση έλαβε χώρα χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Spectra Analysis της Jasco.

2.7 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης

Οι μέθοδοι κρυστάλλωσης που έχουν αναπτυχθεί είναι ποικίλες και αποσκοπούν στο να φέρουν το διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού. Μερικές αυτών είναι και αυτές των: α) ολικής ανάμιξης (batch):

όπου το βιομόριο διαλύεται σε συγκεκριμένο διάλυμα, β) εξάτμισης (evaporation), όπου το διάλυμα συμπυκνώνεται μέσω εξάτμισης, γ) διαπίδυσης (dialysis), όπου το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη και μέσω διαπίδυσης υποβάλλεται σε μεταβολή της συγκέντρωσης διαφόρων παραγόντων και δ) η διάχυση ατμών (vapor diffusion) η οποία αποτέλεσε την κύρια μέθοδο με την οποία ερευνήθηκαν διαφορετικές συνθήκες για την κρυστάλλωση των βιομορίων της παρούσης εργασίας.

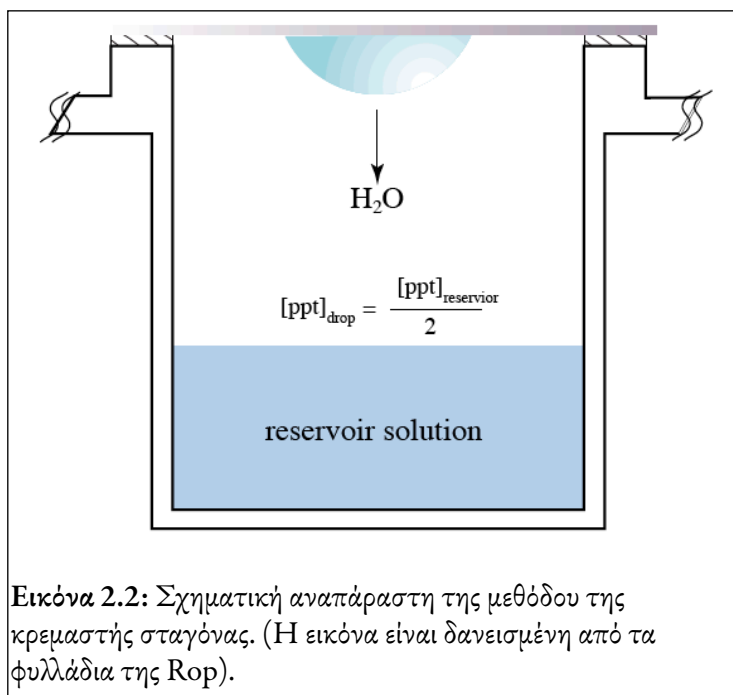
Η μέθοδος της διάχυσης ατμών περιλαμβάνει ένα κλειστό σύστημα δύο υδατικών διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις των συστατικών τους. Τα διαλύματα αυτά εξισορροπούνται μέσω της τάσης των ατμών του νερού και των τυχόν πτητικών ουσιών που περιέχουν. Οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιούνται συχνά είναι αυτές της κρεμαστής σταγόνας, της καθιστής σταγόνας και της εκατέρωθεν περιοριζόμενης σταγόνας (σταγόνα σάντουιτς) (Εικόνα 2.2).

32

Η μέθοδος της κρεμαστής σταγόνας είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης για τα μεταλλάγματα His-RopGP και His-Rop2aL. Στην κρεμαστή σταγόνα το διάλυμα που περιέχει το βιομόριο συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας από το καπάκι του κλειστού συστήματος. Η σταγόνα που περιέχει το πρωτεϊνικό μόριο, αναμυγνείται με ίσο όγκο διαλύματος δεξαμενής (συνήθως από 2 μl). Σε αυτό το διάλυμα περιέχονται και οι απαιτούμενοι παράγοντες

κρυστάλλωσης. Στο κάτω μέρος του συστήματος βρίσκεται το μεγαλύτερο, σε όγκο, διάλυμα της δεξαμενής, που περιέχει τους παράγοντες κρυστάλλωσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, αλλά όχι το προς κρυστάλλωση βιομόριο. Αποτέλεσμα της εξισορρόπησης της τάσης ατμών είναι η μείωση του όγκου της σταγόνας έτσι ώστε η πρωτεΐνη να φτάσει βαθμιαία στον υπερκορεσμό, όπου και θα οδηγήσει σε σχηματισμό κρυστάλλων.

Για την εύρεση κάποιων πρώτων συνθηκών που θα οδηγούσαν σε κρυστάλλωση των μεταλλαγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα διαλύματα διαφόρων συνθηκών που διατίθενται έτοιμα στο εμπόριο από εταιρείες του χώρου. Συγκεκριμένα τα Crystal Screen I και II της Hampton Research καθώς και τα αντίστοιχα τους Structure Screen I και II από την Molecular Dimensions χρησιμοποιήθηκαν για να καλύψουν 100 συνθήκες. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα Bulk Screen της Jena Biosciences που σε ορισμένες περιπτώσεις έδωσαν πολύ θετικά αποτελέσματα. Εν συνεχεία, βάση των πρώτων θετικών συνθηκών, εξετάστηκαν αναλυτικότερα οι συνθήκες αυτές μεταβάλλοντας σε πολύ μικρά βήματα, είτε την ιονική ισχύ, είτε το pH, είτε τον κατακρημνιστή. Η συγκέντρωση του όποιου μεταλλάγματος χρησιμοποιούταν κάθε φορά ήταν ~10 mg/ml. Η θερμοκρασία που επιλέχθηκε για την ανάπτυξη των κρυστάλλων ήταν 16°C.

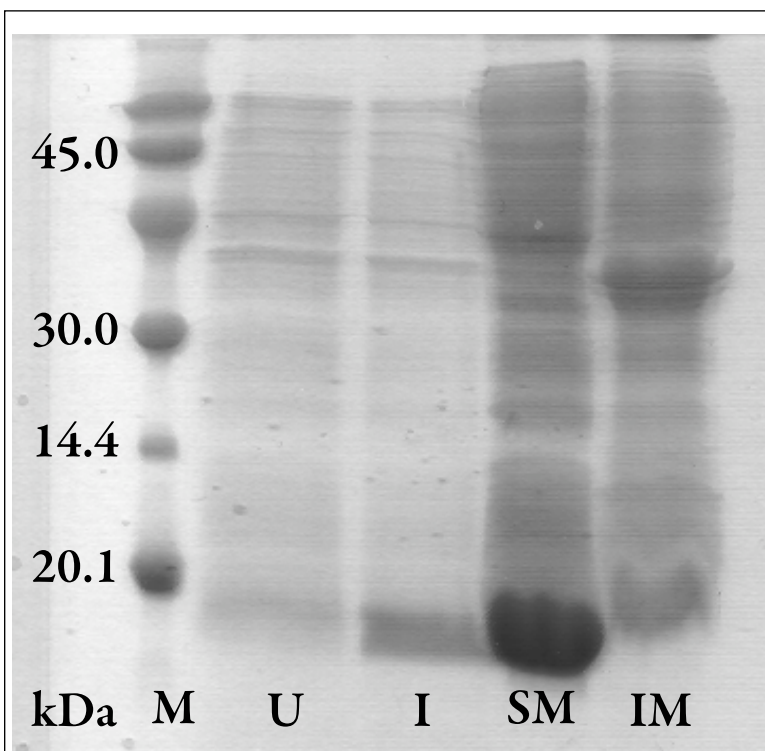


Τα πειράματα κρυστάλλωσης κρεμαστής σταγόνας λαβαίνουν χώρα σε πλαστικά πιάτα Limbro τα οποία καλύπτονται με κατάλληλα σιλικοναρισμένες καλυπτρίδες. Τα αποτελέσματα των κρυσταλλώσεων εξετάζονταν στις 3 ημέρες, 1 εβδομάδες, 2 εβδομάδες, αν και μερικά θετικά αποτελέσματα όπως θα αναφερθεί μετά, προέκυψαν μετά από πάροδο ενός μήνα.

Κεφάλαιο 3- Αποτελέσματα

Η ορθότητα της μεταλλαξιγένεσης, κατά την δημιουργία των μεταλλαγμάτων His-RopGP και His-Rop2aL, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» ελέγχθηκε και επικυρώθηκε μέσω αλληλούχισης των πλασμιδίων pET26b(+)-ropGP και pET26b(+)-rop2aL.

Η κατασκευή pF1K T7-ropGP, εισαγμένη τόσο σε κύτταρα BL21(DE3), όσο και σε JM109, παρά το εύρος των δυνατών συνθηκών που δοκιμάστηκαν, δεν οδήγησε σε υπερέκφραση της RopGP (η οποία δοκιμάστηκε αρχικά). Αντιθέτως, όταν τα μεταλλάγματα υποκλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+) και μετασχημάτισαν κύτταρα BL21(DE3), τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά. Πρώτη η His-RopGP υπερεκφράστηκε σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό διατηρώντας την διαλυτότητα της (Εικόνα 3.1)



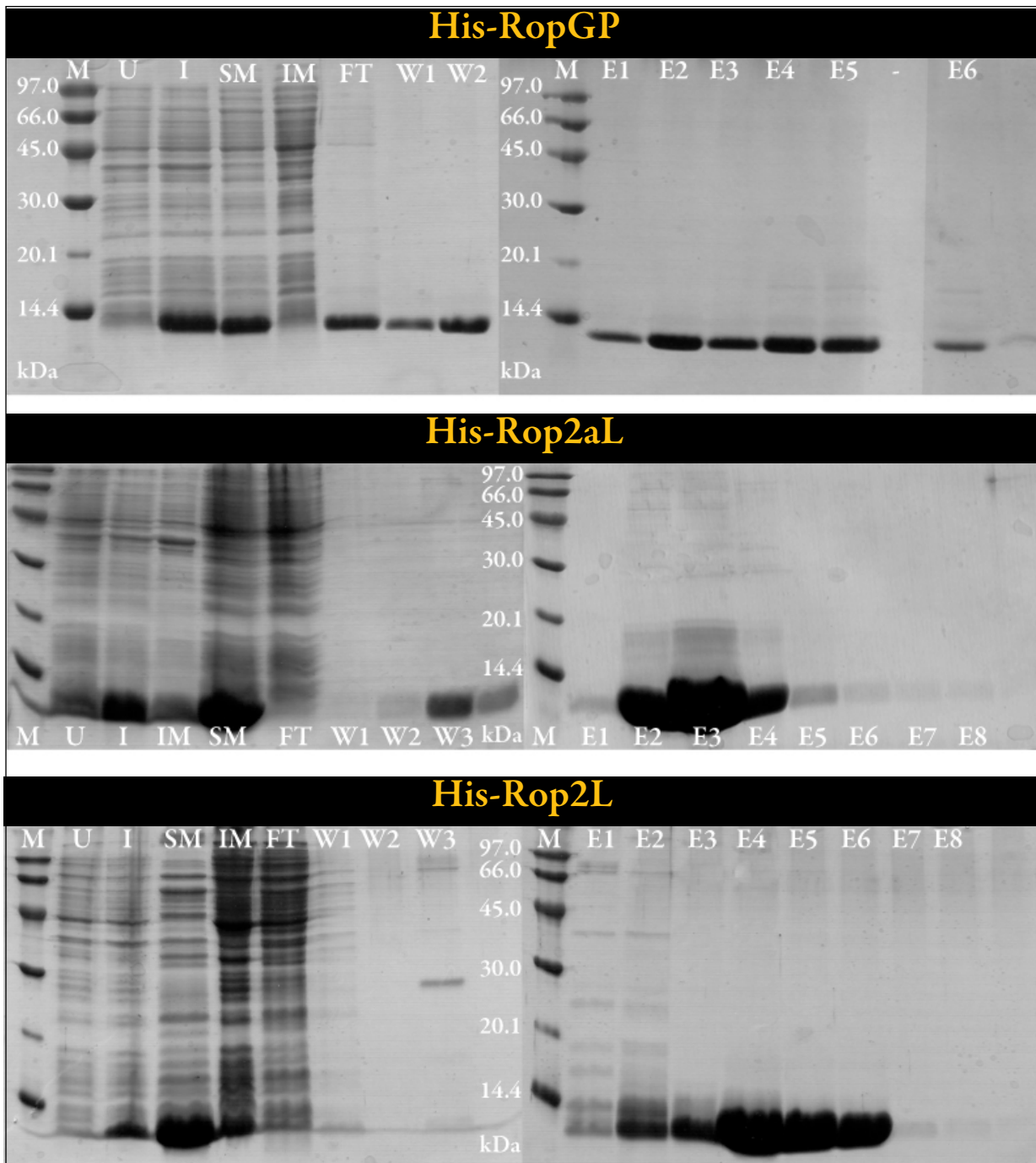
Εικόνα 3.1. SDS-PAGE των κλασμάτων της His-RopGP πριν (U) και μετά (I) την επαγωγή της υπερέκφρασης με προσθήκη IPTG στην καλλιέργεια. Η His-RopGP φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών τρέχει λίγο χαμηλότερα από τη ζώνη των 14.4 kDa του μάρτυρα, όπου και αναμενόταν βάση του θεωρητικού μοριακού βάρους που υπολογίστηκε. Επίσης κυτταρική πάστα μετά την επαγωγή υπερηχοβολήθηκε για την εξέταση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης. SM: Διαλυτό κλάσμα σταδίου χαμηλού καθαρισμού που εισήχθη στη στήλη Ni-NTA Superflow (Qiagen). IM: Μη διαλυτό κλάσμα που κατά το στάδιο χαμηλού καθαρισμού. Συγκρίνοντας τις στήλες SM και IM, παρατηρείται πως η His-RopGP κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παραμένει σε διαλυτή μορφή. M: Δείκτης χαμηλών μοριακών βαρών (LMW, GE Healthcare - Amersham Biosciences).

Οι συνθήκες υπερέκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν και για τις περιπτώσεις των μεταλλαγμάτων His-Rop2aL, His-Ro2L και His-RopA31P ήταν ίδιες (Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι) με τα ίδια ικανοποιητικά επίπεδα υπερέκφρασης και διαλυτότητας.

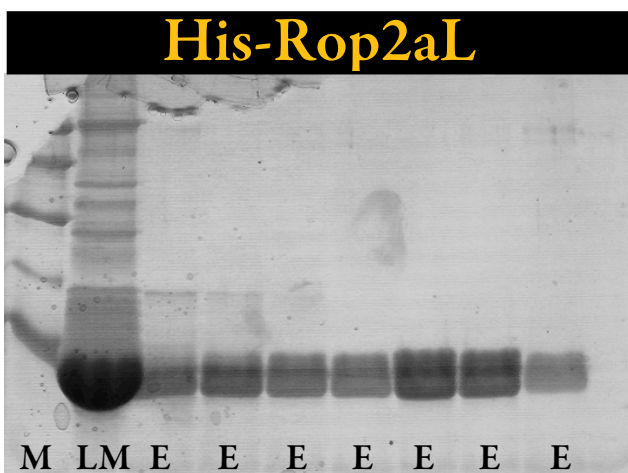
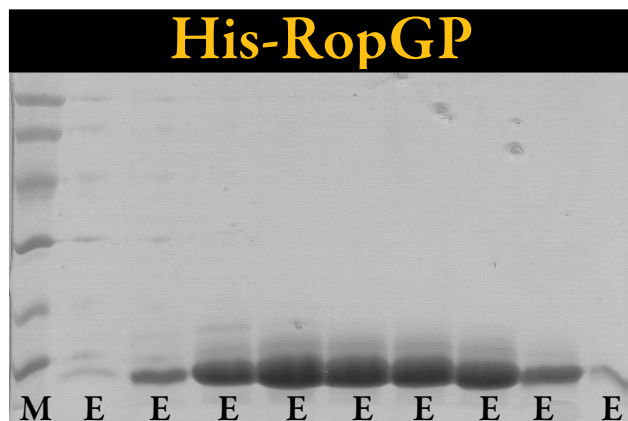
Κατά τη χρωματογραφία σε στήλη Ni-NTA Superflow σε όλα τα μεταλλάγματα της Rop, προέκυψαν κλάσματα στα οποία το κάθε μέταλλο εκλούσθηκε σε πολύ υψηλό βαθμό καθαρότητας (Εικόνα 3.2). Τα κλάσματα αυτά, με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη ενότητα, υπέστησαν περαιτέρω καθαρισμό με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

Τα κλάσματα της στήλης όπου βάση απορρόφησης φανερώνουν ύπαρξη πρωτεϊνικών μορίων αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Εικόνα 3.2). Εκείνα που περιέχουν το εκάστοτε μέταλλο σε καθαρότητα >95% συλλέγονται και συγκεντρώνονται ανεξάρτητα και τελικά υπόκεινται διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα συντήρησης και θα

χρησιμοποιηθούν για πειράματα κρυστάλλωσης και κυκλικού διχρωισμού. Γεγονός είναι πως όλα τα μεταλλάγματα κατάφεραν να απομονωθούν σε πολύ υψηλή καθαρότητα και ποσότητα.



Εικόνα 3.2. SDS-PAGE των κλασμάτων της στήλης νικέλιου για τα διάφορα μεταλλάγματα της Rop. Οι His-RopGP, His-Rop2aL και His-Rop2L φέρουσες ακροφύσιο ιστιδινών τρέχουν λίγο χαμηλότερα από τη ζώνη των 14.4 kDa του μάρτυρα. Υπενθυμίζεται πως η wtRop έχει μοριακό βάρος 14 kDa, πολύ παραπλήσιο με το θεωρητικό μοριακό βάρος που υπολογίστηκε και για τα μεταλλάγματα. U: δείγμα κυττάρων πριν την επαγωγή της υπερέκφρασης με IPTG. I: δείγμα κυττάρων μετά την επαγωγή. SM: Διαλυτό κλάσμα σταδίου χαμηλού καθαρισμού που εισήχθη στη στήλη Ni-NTA Superflow (Qiagen). IM: Μη διαλυτό κλάσμα που κατά το στάδιο χαμηλού καθαρισμού. FT: Το κλάσμα που προέκυψε μετά από το πέρασμα του διαλυτού κλάσματος από τη στήλη Ni-NTA. W: Κλάσματα εκπλύσεων. E: Κλάσματα εκλούσεων. M: Δείκτης χαμηλών μοριακών βαρών (LMW, GE Healthcare - Amersham Biosciences).



Εικόνα 3.2. SDS-PAGE των κλασμάτων της στήλης μοριακής διήθησης για τα διάφορα μεταλλάγματα της Rop. Οι His-RopGP, His-Rop2aL και His-Rop2L εκλούνται σε κλάσματα των 10 ml. Ορισμένα από αυτά περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη σε καθαρότητα >90%. E: Κλάσματα εκλούσεων. LM: Δείγμα που φορτώθηκε στην κολώνα μοριακής διήθησης. M: Δείκτης χαμηλών μοριακών βαρών (LMW, GE Healthcare - Amersham Biosciences).

Συγκεκριμένα, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1) φαίνονται οι τελικές ποσότητες και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις για κάθε ένα από τα μεταλλάγματα.

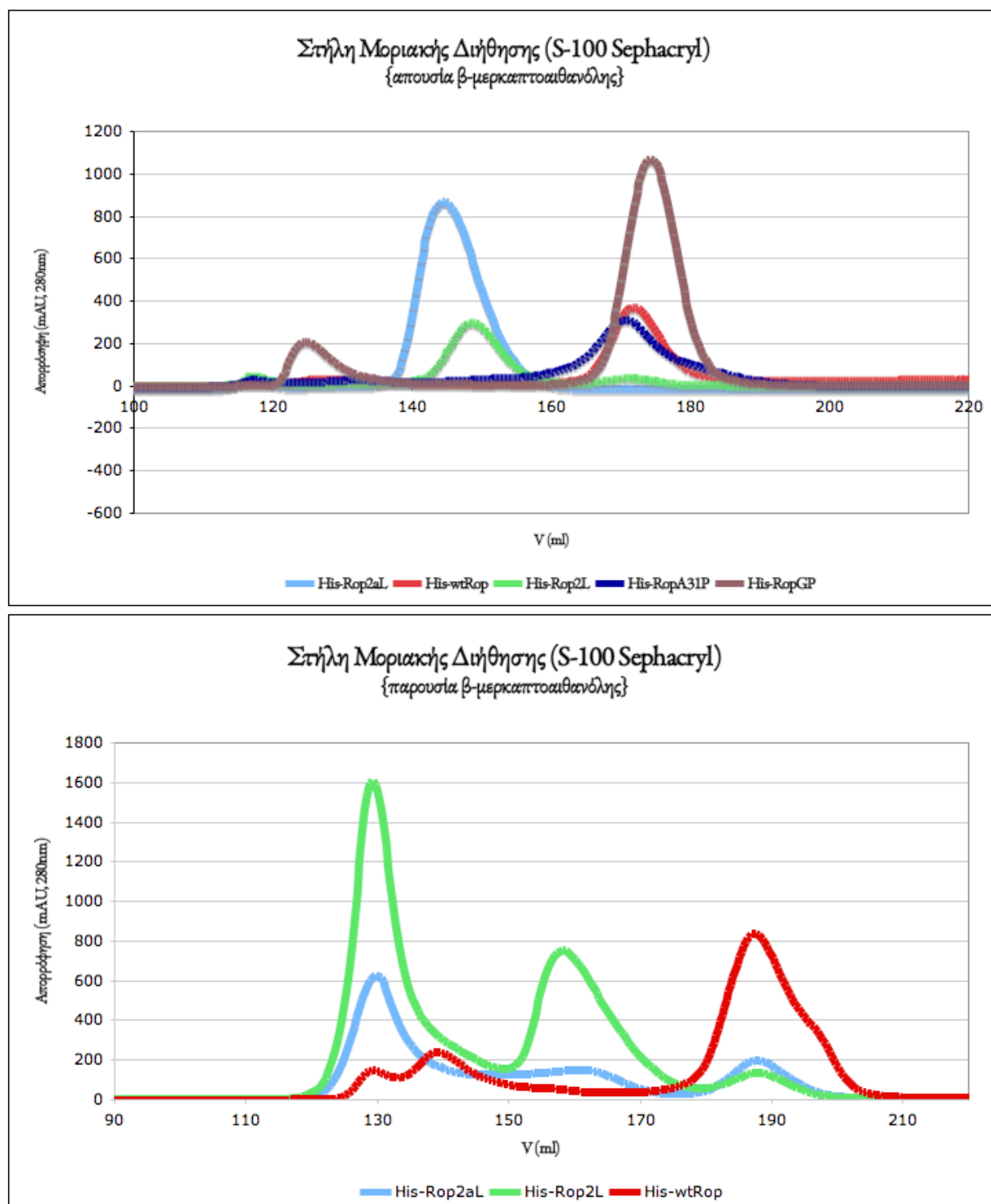
Πρωτεϊνικό Μετάλλαγμα	Συγκέντρωση (mg/ml)	Συνολικός Όγκος (ml)	Συνολική Ποσότητα (mg/ml)
<i>His-RopGP</i>	18	8	144
<i>His-Rop2aL</i>	15	10	150
<i>His-Rop2L</i>	12	9,5	114
<i>His-RopA31P</i>	10	8	80

Πίνακας 3.1. Τελικές συγκεντρώσεις και συνολική ποσότητα των διαφόρων μεταλλαγμάτων που απομονώθηκαν.

Σε αυτό που αξίζει να επικεντρώσουμε ιδιαίτερα την προσοχή μας είναι τα γραφήματα που προέκυψαν από το πέρασμα των μεταλλαγμάτων από την στήλη μοριακής διήθησης. Όλα τα γραφήματα ενοποιήθηκαν σε ένα το οποίο παραβάλεται πιο κάτω (Γράφημα 3.1).

Από τους όγκους έκλουσης των μεταλλαγμάτων, βάση του συντελεστή Kan, υπολογίστηκαν τα φαινομενικά μοριακά τους βάρη. Έτσι, οι His-wtRop, His-RopGP και His-RopA31P εκλούνται σε παραπλήσιο όγκο που αντιστοιχεί σε διμερή μορφή του μορίου. Αντιθέτως, τα μεταλλάγματα His-Rop2aL και His-Rop2L εκλούνται σε όγκους που αντιστοιχούν σε πληθυσμούς υψηλότερου μοριακού βάρους. Η πιο ενδιαφέρουσα παρατήρηση που διεξήχθη και για τις δύο περιπτώσεις παραπάνω

μεταλλαγμάτων, είναι πως οι πληθυσμοί που προκύπτουν είναι διαφορετικού φαινομενικού βάρους αναλόγως της ύπαρξης ή όχι β-μερκαπτοαιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα μοριακής διήθησης.



Γράφημα 3.1α και 3.1β. Στο παραπάνω γράφημα παρουσιάζονται οι όγκοι έκλυσης των διαφόρων μεταλλαγμάτων. Ορισμένα μεταλλάγματα εκλύονται στον ίδιο όγκο όπως η διμερής His-wtRop, άλλα όμως φαίνεται να σχηματίζουν δομές μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

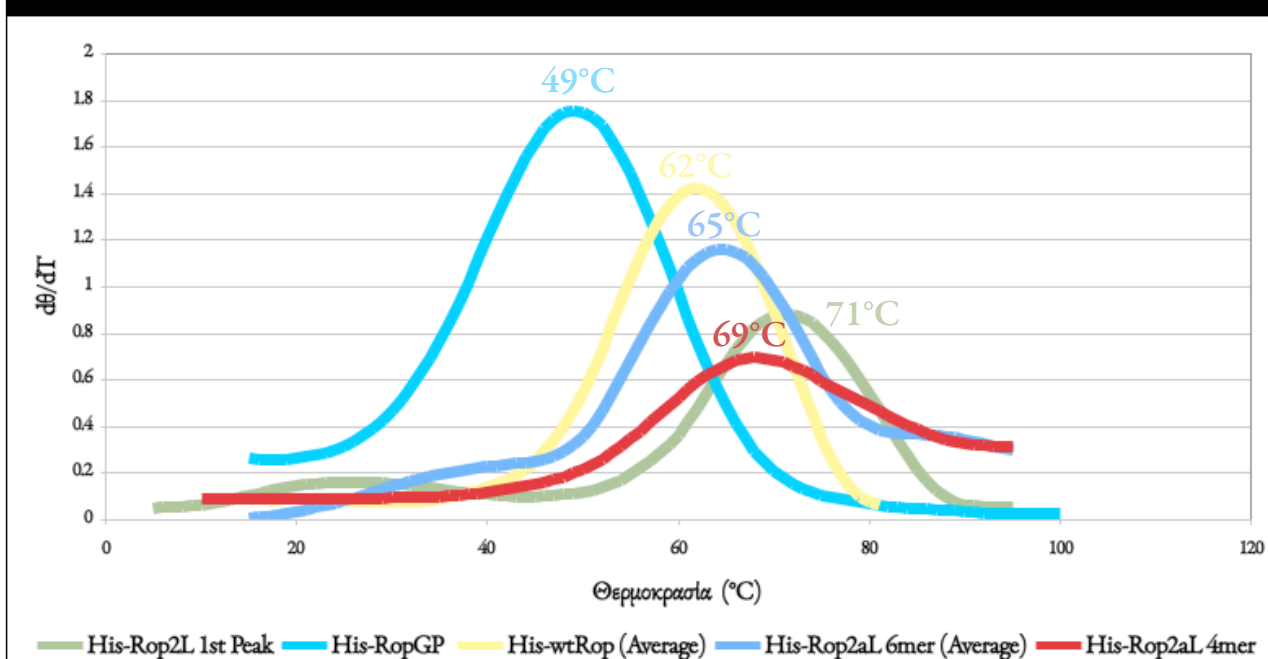
Το μετάλλαγμα His-Rop2aL με την ύπαρξη β-μερκαπτοαιθανόλης εκλύεται σε 2 πληθυσμούς (161 και 188) που αντιστοιχούν σε τετραμερή και διμερή μορφή αντίστοιχα, ενώ η απουσία β-

μερκαπτοαιθανόλης από το δεύτερο χρωματογραφικό στάδιο οδηγεί στην παρατήρηση μόνο ενός πληθυσμού που εκλύεται στα 145 ml, και αντιστοιχεί σε φαινομενικό μοριακό βάρος τετραμερούς. Από την άλλη πλευρά, το μετάλλαγμα His-Rop2L με την ύπαρξη β-μερκαπτοαιθανόλης εκλύεται σε 2 πληθυσμούς (188 και 158) που αντιστοιχούν σε εξαμερή και διμερή μορφή αντίστοιχα. ενώ η απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης οδηγεί και πάλι στην παρατήρηση δύο πληθυσμών που εκλύονται στα 172 και 149 ml, και αντιστοιχούν σε φαινομενικό μοριακό βάρος τετραμερούς και διμερούς αντίστοιχα.

Επιπλέον, οι πληθυσμοί των μεταλλαγμάτων His-Rop2aL και His-Rop2L, εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά τόσο στις συνθήκες κρυστάλλωσής τους όσο και στα φάσματα που λαμβάνονται από μελέτες κυκλικού διχρωισμού.

Οι μελέτες κυκλικού διχρωισμού περιελάμβαναν τόσο θερμική αποδιάταξη των μεταλλαγμάτων, ώστε να

Θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη των Rop μεταλλαγμάτων

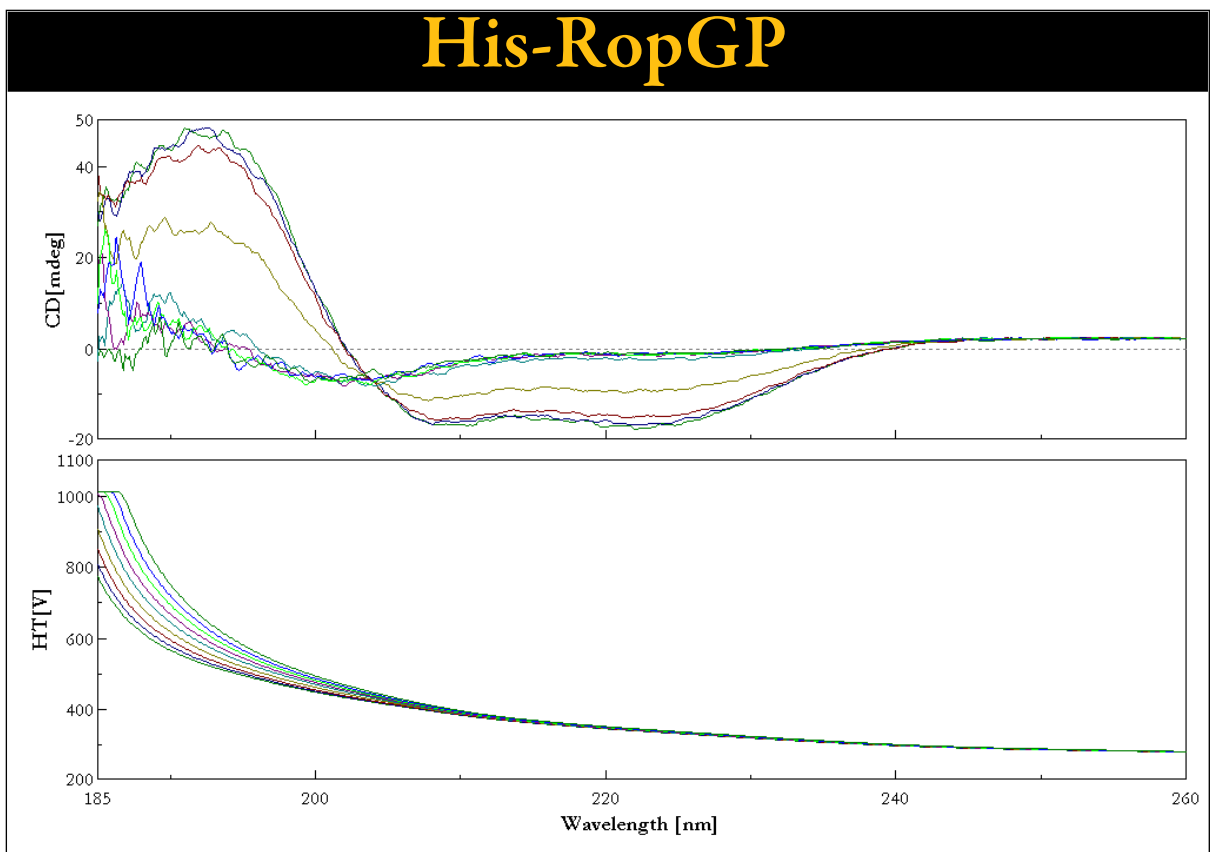
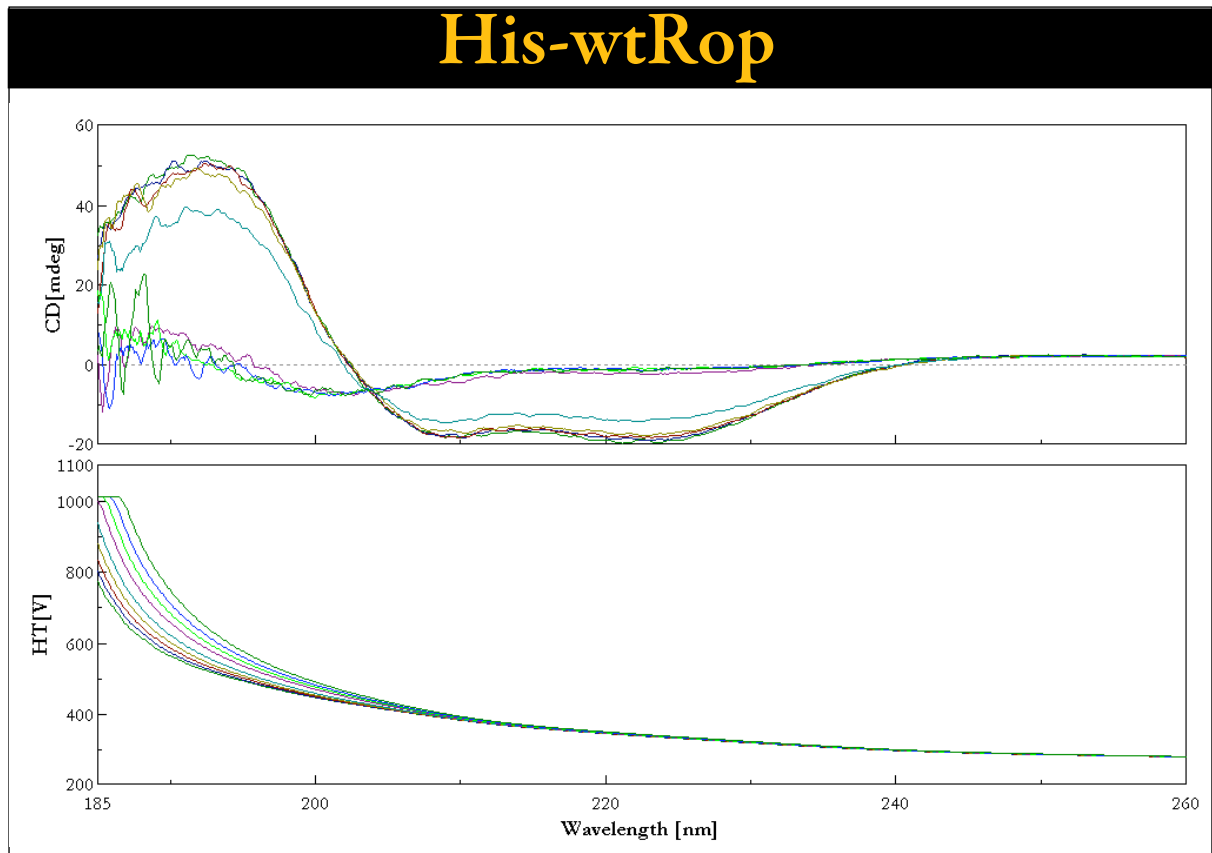


Γράφημα 3.2. Οι θερμοκρασίες τήξης για τα μεταλλάγματα της Rop που εξετάστηκαν. Με μια γενική πρώτη παρατήρηση φαίνεται πως οι πληθυσμοί υψηλότερου μοριακού βάρους παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοκρασία τήξης.

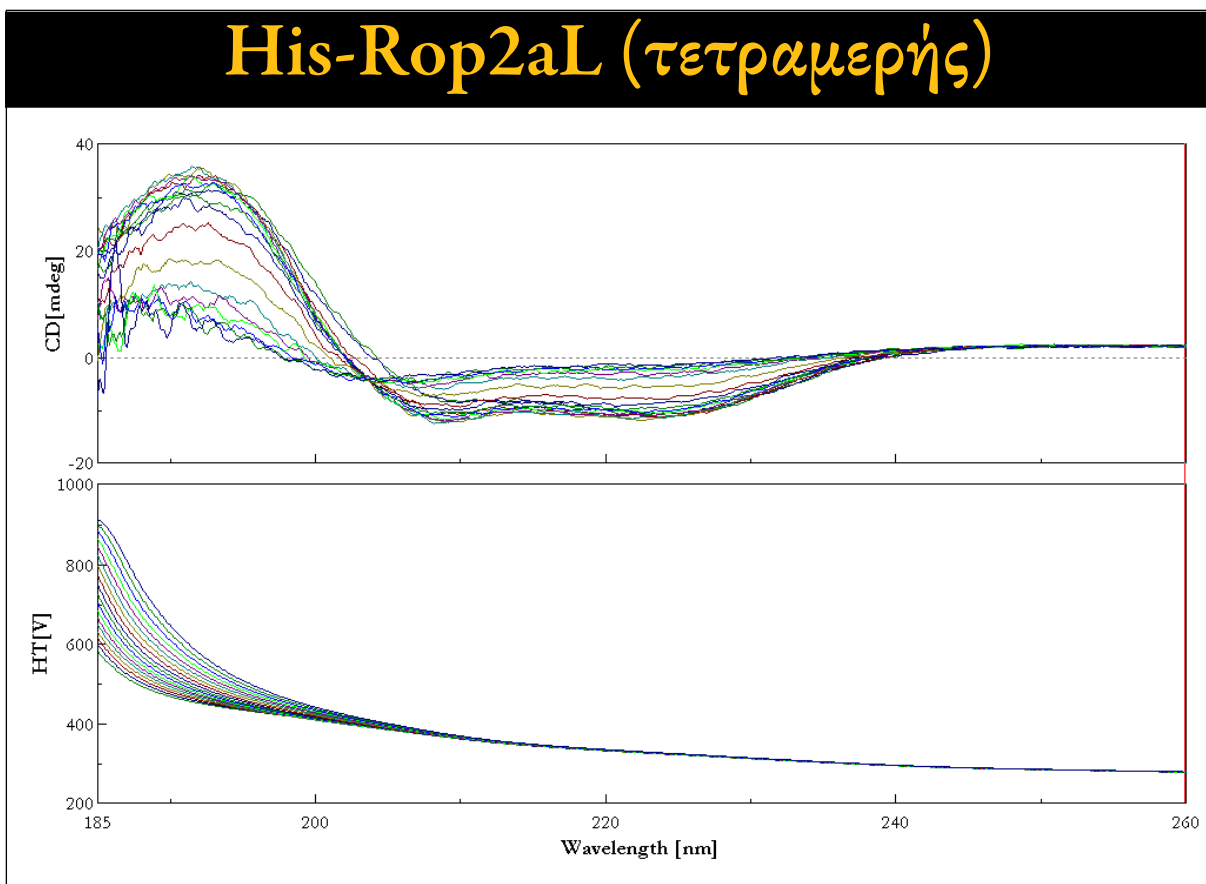
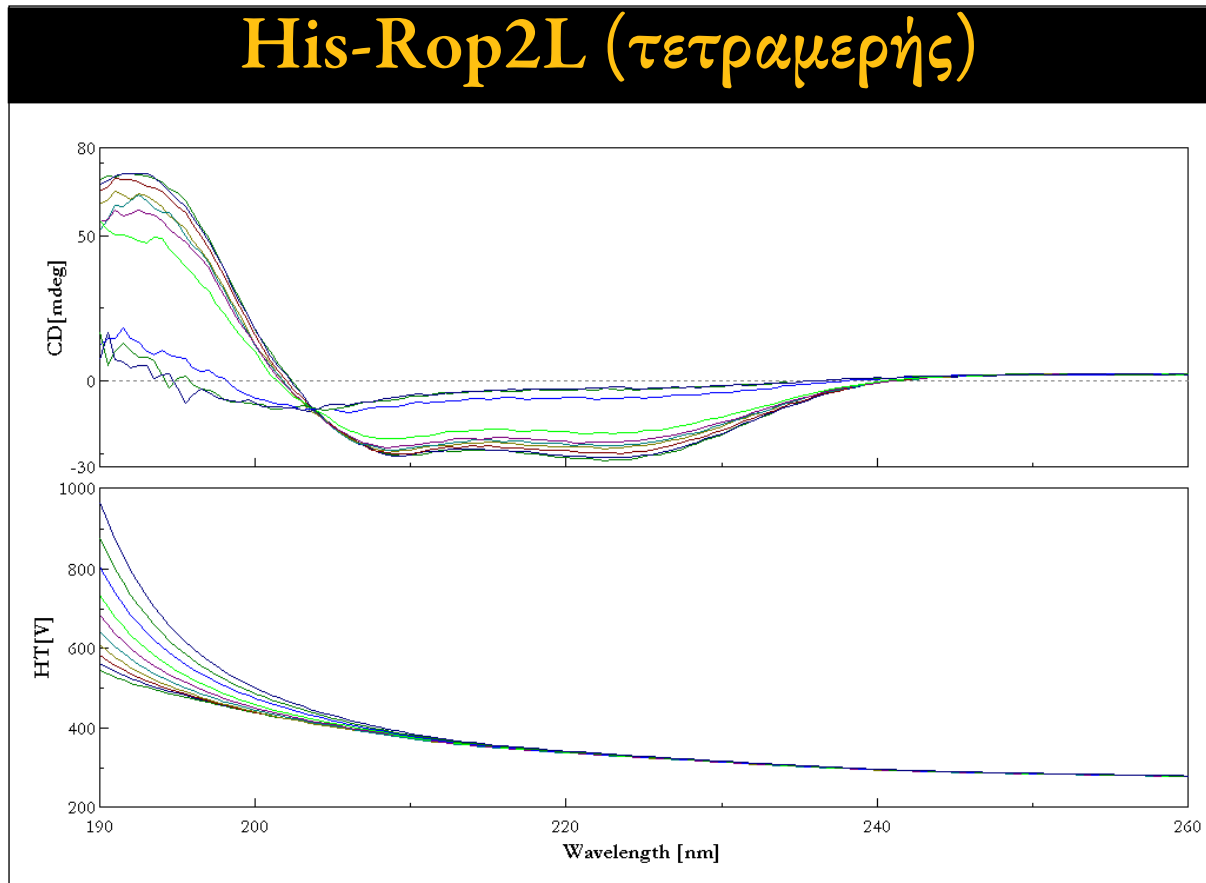
βρεθεί το σημείο τήξης τους (Tm), όσο και καταγραφή των φασμάτων στο άπω υπεριώδες, ώστε να γίνει παρακολούθηση της πορείας αναδίπλωσης της πρωτεΐνης.

Αρχικά, το φάσμα της His-wtRop καταγράφηκε στα 222nm (στο συγκεκριμένο μήκος κύματος όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα απορροφά μόνο ο κύριος κορμός των α-ελίκων), ως μία σιγμοειδής καμπύλη. Η φύση της καμπύλης αυτής εμπεριέχει πληροφορία για την πορεία της αποδιάταξης του μορίου. Η σιγμοειδής καμπύλη υποδηλώνει μετάβαση από την αναδιπλωμένη στην αποδιατεταγμένη μορφή του μορίου χωρίς ενδιάμεσες καταστάσεις. Τα φάσματα των His-RopGP καθώς και των μεγαλομοριακών πληθυσμών των μεταλλαγμάτων His-Rop2aL και His-Rop2L που εξετάστηκαν, εμφανίζουν την ίδιας μορφής σιγμοειδή καμπύλη όπως και η αγρίου τύπου Rop.

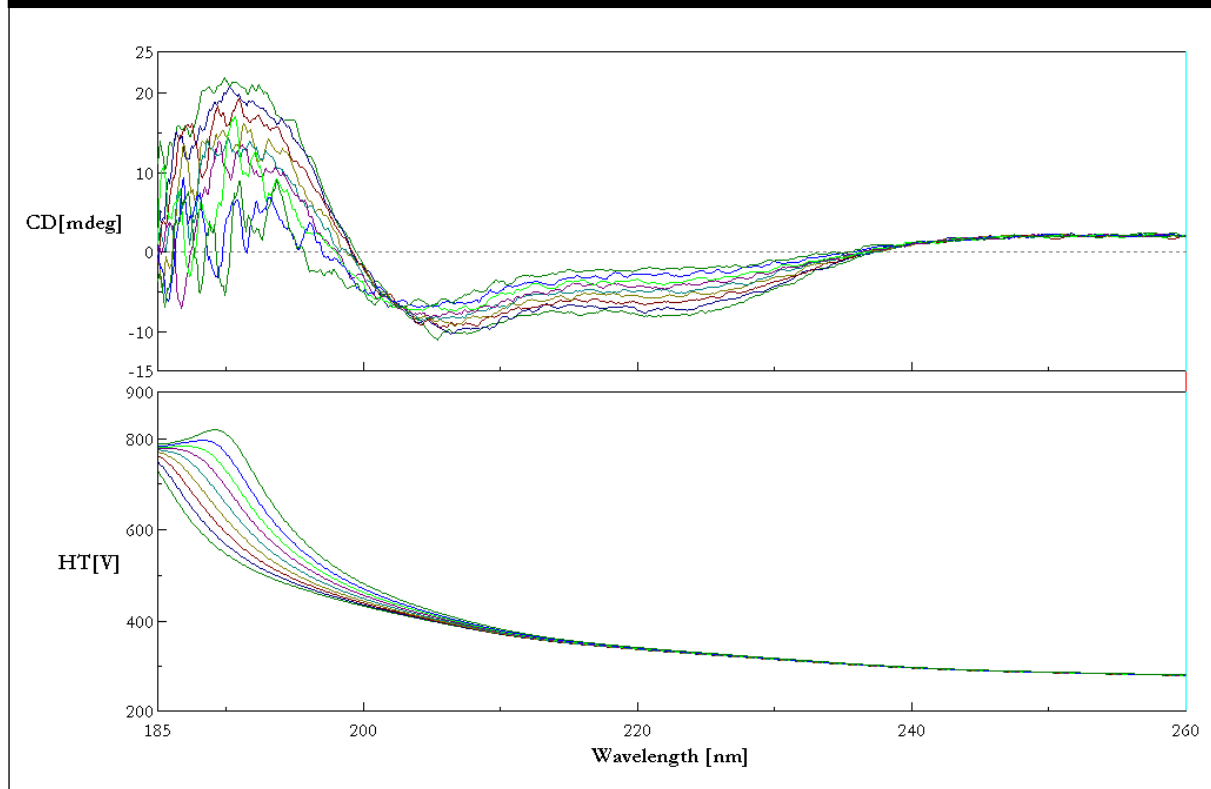
Αντιθέτως, η His-RopA31P εμφανίζει μία μονοτονοειδή καμπύλη κατά την καταγραφή του φασματός της στα 222nm, χωρίς κάποια παρατηρήσιμη διακριτή μετάβαση μεταξύ των δύο καταστάσεων, δεδομένο το οποίο δεν οδηγεί στην εξαγωγή στερεών αποτελεσμάτων για τη θερμοκρασία τήξης του



μεταλλάγματος αυτού. Η θερμοκρασία τήξης για την περίπτωση του κάθε μεταλλάγματος προκύπτει



His-RopA31P



από την πρώτη παράγωγο της σιγμοειδής καμπύλης τους. Το ολικό μέγιστο της προκύπτουσας συνάρτησης, αποτελεί και το σημείο τήξης (T_m). Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 3.2) σημειώνονται οι θερμοκρασίες τήξης των μεταλλάγματων που εξετάστηκαν. Παρακάτω φαίνονται οι θερμοκρασίες τήξης για τα διάφορα μεταλλάγματα που μελετήθηκαν μέσω θερμοεπαγώμενης αποδιάταξης (Γράφημα 3.2).

Η His-wtRop εμφανίζει μια θερμοκρασία τήξης ίση με $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ με πολύ μικρή απόκλιση. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες έρευνες πάνω στη θερμοσταθερότητα του μορίου (61,61). Με τη σειρά της η His-RopGP παρουσιάζει $T_m=49\text{ }^{\circ}\text{C}$, σαφώς χαμηλότερη από αυτή της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, κάτι που φανερώνει ένα λιγότερο θερμοσταθερό μόριο. Απεναντίας, οι θερμοκρασίες τήξης για τους πληθυσμούς των His-Rop2aL και His-Rop2L που εξετάστηκαν ήταν κατά κανόνα υψηλότερες, αντικατοπτρίζοντας έτσι την αυξημένη υψηλότερη θερμοσταθερότητα των μορίων αυτών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”, μετρήθηκαν και τα φάσματα των μεταλλάγματων στο άπω-υπεριώδες με σκοπό την παρακολούθηση της απώλειας της δευτεροταγούς δομής των μορίων σε πραγματικό χρόνο και εύρεση πιθανών ενδιάμεσων. Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα στο άπω-υπεριώδες για τα μεταλλάγματα που μελετήθηκαν (Γραφήματα 3.3-3.7).

Να ξαναθυμήσουμε στο σημείο αυτό πως το αποτύπωμα της α -έλικας (λόγω της “απορρόφησης” των πεπτιδικών δεσμών) στο φάσμα του άπω-υπεριώδους είναι απολύτως συγκεκριμένο: Δυο αρνητικές κορυφές στα 222nm και 208nm και έντονη θετική κορυφή στα 190nm. Η ύπαρξη των στοιχείων, λόγω ύπαρξης ισχυρού σήματος, λόγω της ύπαρξης α -έλικας. Απώλεια δε σήματος υποδηλώνει ελάττωση και ανυπαρξία της δευτεροταγούς αυτής δομής.

Στα φάσματα που προκύπτουν πρέπει να επικεντρώσουμε την προσοχή μας σε 3 σημεία. Πρώτο σημείο είναι να δούμε, μεταξύ ποιων συνεχόμενων θερμοκρασιών χάνεται το σήμα, το οποίο δηλώνει απουσία δευτεροταγούς δομής από τη διαμόρφωση του μορίου, και εάν αυτές οι 2 θερμοκρασίες βρίσκονται εκατέρωθεν του T_m του συγκεκριμένου μορίου, οπότε και θα επαληθεύουν την τιμή αυτή. Δεύτερο σημείο αποτελεί ο τρόπος με τον οποίο καταγράφεται η μετάβαση από τη μία κατάσταση στην άλλη (αναδιπλωμένη-αποδιατεταγμένη μορφή της πρωτεΐνης). Η μετάβαση αυτή για το εύρος και το βήμα των θερμοκρασιών που μετρήθηκαν είναι διακριτή ή αντιθέτως δε φαίνεται να καταγράφεται μία καθαρή μετάβαση από τη μία κατάσταση στην άλλη; Το τελευταίο και πολύ ενδιαφέρον σημείο είναι να δούμε αν τα φάσματα των διαφορετικών θερμοκρασιών περνούν από κάποιο κοινό σημείο κατά τη διαδικασία της μέτρησης του φάσματος στο άπω-υπεριώδες. το οποίο θα υποδηλώνει και ένα κοινό στάδιο στην όλη πορεία.

Παρατηρούμε λοιπόν πως, στην περίπτωση της His-wtRop υπάρχει μία διακριτή μετάβαση από την θερμοκρασία των $55\text{ }^\circ\text{C}$ όπου ανιχνεύεται ακόμη α -έλικα στην θερμοκρασία των $65\text{ }^\circ\text{C}$, όπου δεν παρατηρούνται πλέον οι χαρακτηριστικές κορυφές. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα πειράματα θερμικής αποδιάταξης όπου έδειχναν για την περίπτωση της His-wtRop μία θερμοκρασία τήξης ίση με $62\text{ }^\circ\text{C}$, σχεδόν στη μέση του εύρους σάρωσης μεταξύ των θερμοκρασιών 55 και $65\text{ }^\circ\text{C}$ που παρατηρείται η μετάβαση. Επίσης είναι άμεσα παρατηρήσιμο πως όλα τα φάσματα διέρχονται από ένα κοινό σημείο το οποίο βρίσκεται περίπου στα 203nm , το οποίο ονομάζεται ισοδιχρωικό και είναι χαρακτηριστικό των ελικοειδών δεματίων.

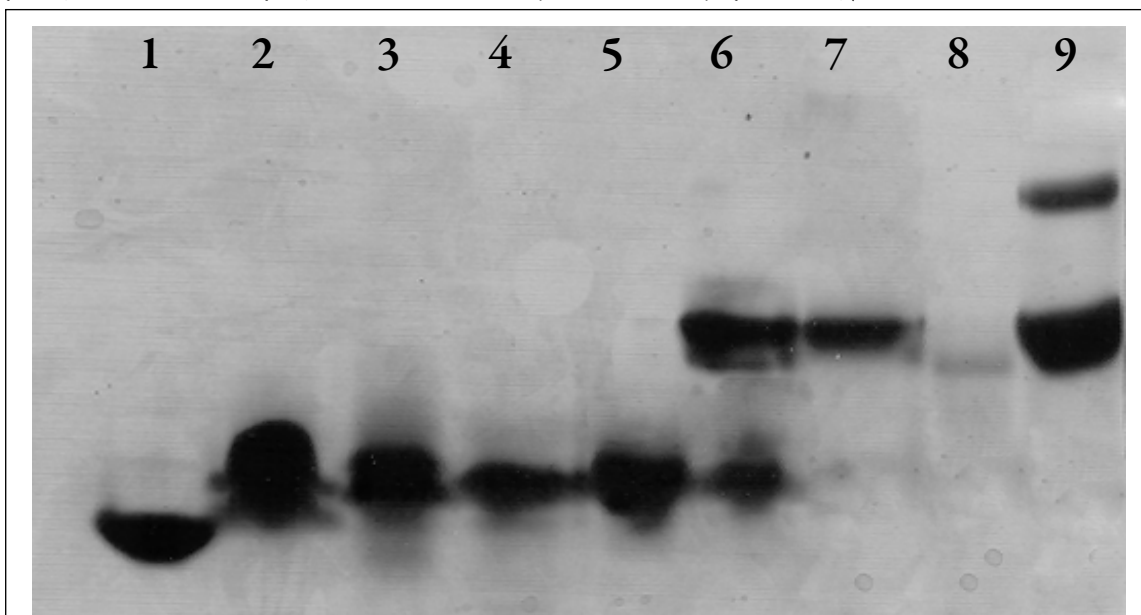
Σχεδόν οι ίδιες παρατηρήσεις διεξάγονται και για την περίπτωση της His-RopGP, με το αποτύπωμα της α -έλικας να εμφανίζεται στο φάσμα των $45\text{ }^\circ\text{C}$ και να απουσιάζει παντελώς από το φάσμα $55\text{ }^\circ\text{C}$. Για ακόμη μία φορά, η θερμοκρασία τήξης για το μετάλλαγμα αυτό ($T_m=49\text{ }^\circ\text{C}$) βρίσκεται εν τω μέσω δύο θερμοκρασιών όπου η πρωτεΐνη έχει υιοθετημένες διαφορετικές διαμορφώσεις, και η μετάβαση είναι διακριτή. Το κοινό σημείο στα 205nm στο οποίο συγκλίνουν όλα τα φάσματα υφίσταται και στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Κάτι διαφορετικό δεν παρατηρείται ούτε στην περίπτωση της His-Rop2L (τετραμερική μορφή). Η θερμοκρασία τήξης του μεταλλάγματος που υπολογίστηκε μέσω θερμοεπαγώμενης αποδιάταξης στα 222nm ($T_m=71\text{ }^\circ\text{C}$) επιβεβαιώνεται από τα φάσματα των 65 και $75\text{ }^\circ\text{C}$ όπου κατέγραψαν αναδιπλωμένη και μετουσιωμένη μορφή αντίστοιχα του μεταλλάγματος.

Μία πολύ διαφορά που εντοπίζεται έως τώρα στα γραφήματα 3.3 έως 3.5 που συζητήθηκαν, και μπορεί να εμπεριέχει σημαντική πληροφορία, έγκειται στην εξής παρατήρηση: Αν εστιάσουμε την προσοχή μας για την κάθε περίπτωση, στα φάσματα εκατέρωθεν του σημείου τήξης, θα παρατηρήσουμε πως για την περίπτωση των His-wtRop και His-RopGP τα φάσματα των 55 και $45\text{ }^\circ\text{C}$ αντίστοιχα, τα οποία είναι και τα τελευταία που καταγράφουν ύπαρξη δευτεροταγούς δομής, είναι πιο “αποκομμένα” από το σύνολο των υπολοίπων φασμάτων χαμηλότερης θερμοκρασίας. Αυτό σημαίνει εξασθένιση του σήματος που μετρείται. Αντιθέτως, το φάσμα των $65\text{ }^\circ\text{C}$ για την περίπτωση της His-Rop2L, το οποίο είναι και το τελευταίο που εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές ύπαρξης α -έλικας, έχει σήμα πολύ κοντινής εντάσεως με τα προηγούμενα φάσματα χαμηλότερων θερμοκρασιών. Αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζει, για τις περιπτώσεις των His-wtRop και His-RopGP, μια ομαλότερη πορεία αποδιάταξης με χαμηλότερη κινητική, ενώ αντιστρόφως μία γρηγορότερη και περισσότερο απότομη αποδιάταξη (πιθανότατα λόγω συνεργητικών δυνάμεων) του His-Rop2L πληθυσμού που εξετάστηκε.

Τα φάσματα των His-Rop2aL και His-RopA31P δε φέρουν ομοιότητες με τα προηγούμενα. Έχει αναφερθεί πως η His-RopA31P, αποτελεί ένα μόριο το οποίο βρέθηκε από προηγούμενες έρευνες πως βρίσκεται σε μια διαμόρφωση “εύπλαστης σφαίρας”. Η θερμική αποδιάταξη του μορίου όπως είδαμε γύρισε μια μονοτονοειδή γραφική παράσταση χωρίς κάποια διακριτή μεταβολή, κάτι το οποίο επαληθεύεται και από τις μετρήσεις στο άπω-υπεριώδες. Δεν υφίσταται το μόριο κάποια εμφανή μετάβαση η οποία θα προκαλέσει και αισθητή αλλαγή στο σήμα που λαμβάνεται. Παρόλα αυτά φαίνεται πως η His-RopA31P παρουσιάζει κάποια δευτεροταγή δομή μέχρι τη θερμοκρασία των 35 °C, ενώ στις πολύ υψηλές (85-95 °C) φαίνεται να την έχει χάσει τελείως.

Ο συγκεκριμένος πληθυσμός της His-Rop2aL που εξετάστηκε δίνει πληροφορίες που δεν το ίδιο εύκολα να αναλυθούν. Η θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη του μορίου φανερώνει μία θερμοκρασία τήξης κοντά στους 62 °C, κάτι το οποίο θα μπορούσε να επαληθευτεί με πάσα επιφύλαξη και από τη φασματομέτρηση στο άπω-υπεριώδες. Όμως ενώ το φάσμα των 55 °C φαίνεται όντως να περιέχει πληροφορία για την ύπαρξη α-έλικας, δε μπορεί να λεχθεί με βεβαιότητα αν η απουσία δευτεροταγής δομής συναντάται από των φάσμα των 60 ή 65 °C. Πάντως και τα δύο θερμοκρασιακά “όρια” είναι αρκετά κοντά, ενισχύοντας έτσι τη θερμοκρασία τήξης που υπολογίστηκε αρχικά. Παρόλα αυτά, η μετάβαση του μορίου στην μετουσιωμένη μορφή δεν είναι ξεκάθαρη. Το φάσμα της θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης της His-Rop2aL του συγκεκριμένου πληθυσμού, ήταν επίσης σιγμοειδής καμπύλη που δηλώνει δύο καταστάσεις. Οπότε αυτό που πιθανότατα να συμβαίνει είναι πως η κινητική της αντίδρασης γίνεται πολύ αργή και γίνεται πολύ ομαλά, σαν το μόριο να τη χάνει σταδιακά.



Εικόνα 3.3. Native-PAGE διαφόρων Rop μεταλλαγμάτων. 1: His-wtRop η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ενδεικτικός μάρτυρας. 2: His-RopA31P. 3: His-RopPP. 4: His-RopGP. 5: His-RopPG. 6: His-Rop2aL (2mer-). 7: His-Rop2aL (4mer). 8: His-Rop2L (4mer). 9: His-Rop2L (4mer). Παρατηρούμε πως τα μεταλλάγματα που είχαν ως στόχο την αποκατάσταση του μοτίβου της επτάδας εμφανίζουν πληθυσμούς που τρέχουν ψηλότερα από τη διμερή His-wtRop.

Μετά την απομόνωση ορισμένων μεταλλαγμάτων και κατόπιν των παρατηρήσεων που προήλθαν από τη στήλη μοριακής διήθησης, τα μεταλλάγματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από μη

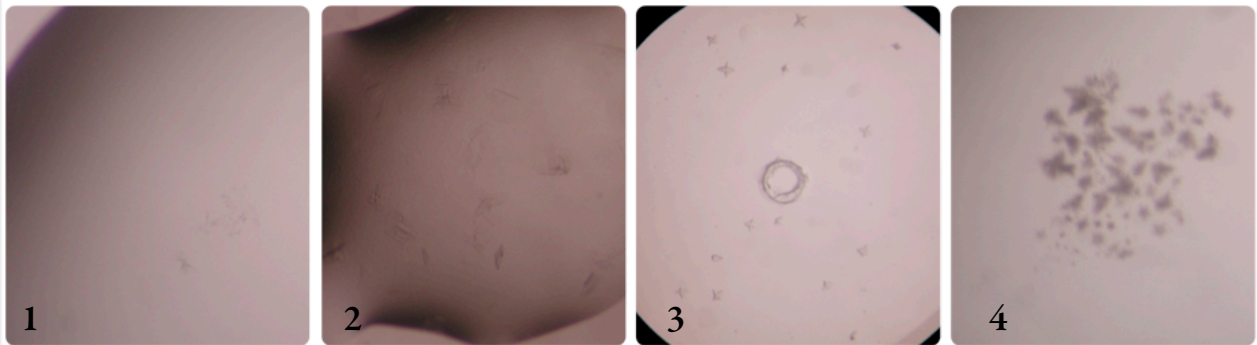
αποδιατακτικές συνθήκες. Οι πρωτεΐνες κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες, τρέχουν βάση του υδροδυναμικού τους μεγέθους και του φορτίου. Ως μάρτυρας για να μια πρώτη σύγκριση χρησιμοποιήθηκε η διμερής His-wtRop. Έτσι, στην περίπτωση των His-Rop2aL και His-Rop2L, εάν έχει επιτευχθεί η αποκατάσταση του μοτίβου της επτάδας, κάτι το οποίο ενισχύεται από τις παρατηρήσεις της στήλης μοριακής διήθησης, τότε θα πρέπει να περιμένουμε τους πληθυσμούς των μεταλλαγμάτων αυτών να τρέχουν διαφορετικά από την His-wtRop. Τα αποτελέσματα φαίνονται αμέσως παραπάνω (Εικόνα 3.3).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3, μια σειρά μεταλλαγμάτων (His-RopA31P έως His-RopPG) τρέχουν σχεδόν στο ίδιο επίπεδο με την His-wtRop. Για δύο μεταλλάγματα από αυτά, τη His-RopA31P και τη His-RopPG (29 και Αμπράζη-αδημοσίευτα αποτελέσματα αντίστοιχα), λύθηκαν οι δομές τους μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, και βρέθηκε πως όταν ήταν επίσης διμερής. Η His-RopGP, τρέχει επίσης στο ίδιο ύψος και εκλούεται σε πολύ κοντινό όγκο με αυτό της His-wtRop και His-RopPG, οπότε θα μπορούσε να αποτελεί διμερές μόριο. Ωστόσο, τόσο στη στήλη μοριακής διήθησης όπως ήδη αναφέρθηκε, όσο και στην εγγενή ηλεκτροφόρηση, φαίνεται πως οι πληθυσμοί των His-Rop2aL και His-Rop2L αποκλείουν από τα δεδομένα των άλλων μεταλλαγμάτων. Να σημειωθεί πως οι πληθυσμοί αυτοί των 2 διαφορετικών μεταλλαγμάτων προκύπτουν με την ύπαρξη β-μερκαπτοαιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα της στήλης μοριακής διήθησης. Αναφέρθηκε παραπάνω, ότι στη στήλη μοριακής διήθησης με προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης για την περίπτωση της His-Rop2aL προκύπτουν δύο πληθυσμοί, ένας που αντιστοιχεί σε διμερή μορφή του μορίου και ένας σε τετραμερή. Στην εγγενή ηλεκτροφόρηση ο τετραμερής πληθυσμός εμφανίζει έναν πληθυσμό ο οποίος τρέχει υψηλότερα από τη His-wtRop, ενώ η διμερής μορφή εμφανίζει 2 πληθυσμούς, ο ένας εκ των οποίων τρέχει στο ίδιο επίπεδο με την διμερή His-wtRop, ενώ ο άλλος στο ίδιο επίπεδο με την τετραμερή μορφή. Κάτι ανάλογο παρατηρείται για την περίπτωση της His-Rop2L όπου από τη στήλη μοριακής διήθησης παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης, εκλούεται σε 2 πληθυσμούς έναν τετραμερή και έναν εξαμερή (Φελλάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στην εγγενή ηλεκτροφόρηση ο τετραμερής πληθυσμός της His-Rop2L τρέχει υψηλότερα από το επίπεδο της His-wtRop και σχεδόν στο ίδιο επίπεδο με τον πληθυσμό της His-Rop2aL που αντιστοιχεί σε τετραμερή μορφή. Τέλος, ο εξαμερής πληθυσμός τρέχει σε 2 επίπεδα, ένα όμοιο με αυτό του πληθυσμού που αντιστοιχεί σε τετραμερή μορφή και έναν ακόμη υψηλότερα.

Αναφέρθηκε στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι” πως οι δοκιμασίες για τις κρυσταλλώσεις για κάθε μετάλλαγμα ξεκίνησαν χρησιμοποιώντας έτοιμες συνθήκες που πωλούνται στο εμπόριο από διάφορες εταιρείες. Οι συνθήκες αυτές καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος δυνατών συνδυασμών άλατος, pH και ρυθμιστικού διαλύματος. Στις αρχικές προσπάθειες επίσης δοκιμάστηκαν και οι συνθήκες κρυστάλλωσης της wtRop καθώς επίσης και οι συνθήκες άλλων Rop μεταλλαγμάτων που είχαν κατά καιρούς κρυστάλλωσει. Οι συνθήκες των προηγούμενων κρυστάλλωσης των προηγούμενων μεταλλαγμάτων δεν έδωσαν κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Ομως, χρησιμοποιώντας τα έτοιμα διαλύματα του εμπορίου, προέκυψαν για την περίπτωση ορισμένων μεταλλαγμάτων κάποια θετικά αποτελέσματα. Οι συνθήκες αυτές εξετάστηκαν περαιτέρω με διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των συστατικών του διαλύματος και στο pH.

Έτσι, μετά από πειραματισμό και βελτιστοποιήσεις αρχικών θετικών συνθηκών προέκυψαν κρύσταλλοι για 2 από τους 3 πληθυσμούς του μεταλλάγματος His-Rop2aL που εκλούνται από τη στήλη μοριακής διήθησης καθώς και για την περίπτωση της His-RopGP. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης αναφέρονται στην Εικόνα 3.4.

Είναι σημαντικό, όσον αφορά τις περιπτώσεις των τετραμερών πληθυσμών της His-Rop2aL παρουσία και απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης, να αναφερθεί πως στις συνθήκες του ενός πληθυσμού δεν κρυστάλλωνε ο άλλος και τούμπαλιν.



Εικόνα 3.4. Συνθήκες κρυστάλλωσης των μεταλλαγμάτων His-RopGP και His-Rop2aL:

1. His-RopGP: 25 % w/v 2-προπανόλη, 100 mM HEPES Sodium Salt 7.5, 100 mM χλωριούχο μαγνήσιο μετά από 15 ημέρες στους 16°C.
2. His-Rop2aL (τετραμερής πληθυσμός παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης): 6% MPD, 50mM οξικό νάτριο pH 5.6, 150mM NaCl και 2% γλυκερόλη μετά από 3 ημέρες στους 16°C.
3. His-Rop2aL (τετραμερής πληθυσμός απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης): 100mM Sodium Cacodylate pH 6.5, 30%v/v ισοπροπανόλη, 200mM άνυδρο κιτρικό τρι-νάτριο μεατ από 5 ημέρες στους 16°C.
4. His-Rop2aL (τετραμερής πληθυσμός παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης): 31% MPD, 200mM κιτρικό νάτριο, 100mM Tris-Cl pH 7.5 μετά από 3 ημέρες στους 16°C.

4.1 Περί μεταλλάγματος His-RopGP

Ο ρόλος της στροφής στην αναδίπλωση των 4-α-ελικοειδών δεματίων υπήρξε θέμα αυξημένης ερευνητικής δραστηριότητας. Πολλές αντικαταστάσεις των καταλοίπων της στροφής κατέληξαν σε μόρια δομικά ανεπηρέαστα. Το ίδιο αποτέλεσμα υπήρξε και στην περίπτωση αύξησης του μήκους της στροφής με εισαγωγή καταλοίπων γλυκίνης. Η κρυσταλλογραφική επίλυση της δομής του μεταλλάγματος της RopA31P φανέρωσε μία εντελώς νέα δομική διαμόρφωση. Για περαιτέρω διαλεύκανση της επίδρασης της προλίνης στην περιοχή της στροφής, και συνεπαγωγικά στην αναδίπλωση του μορίου, σχεδιάστηκαν τα μεταλλάγματα RopPP, RopPG και το RopGP που μελετήθηκε σε αυτή την εργασία.

Η δομή της His-RopPG, λύθηκε κρυσταλλογραφικά από τη συμφοιτήριά μου και μέλος του εργαστηρίου Αμπράζη Μαρία. Η His-RopPG παρουσίαζε δομικά μόνο μικρές αλλαγές στην περιοχή της στροφής. Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα είναι λιγότερο θερμοσταθερό από την αγρίου τύπου Rop, παρουσιάζοντας μια θερμοκρασία τήξης ίση με 43 °C. Είναι λοιπόν αντιληπτό, πως η Rop PG δεν παγιδεύει την πρωτεΐνη σε κάποιο τοπικό ενεργειακό ελάχιστο, δηλαδή σε μία διαφορετική δομή, όπως η A31P. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί βάσει 2 διαφορετικών υποθέσεων. Είτε η η προλίνη στη θέση 30 δεν παγιδεύει το μόριο σε μια κατάσταση εύπλαστης σφαίρας όπως στη θέση 31, είτε η γλυκίνη στη θέση 31 με την ελευθερία που προσδίδει στις διαμορφώσεις της στροφής (καθώς δεν αναπτύσσει τους ισχυρούς δεσμούς της A31 με τις α-έλικες) μπορεί και ξεκολλά το μόριο από το τοπικό ελάχιστο που έχει πέσει. Σημαντικότερη πληροφορία θα μπορούσε να έρθει από τα πειράματα των Reagan και άλλων, αν είχε λυθεί η δομή του μεταλλάγματος D30P που είχαν μελετήσει. Εάν το μετάλλαγμα αυτό, βρισκόταν σε κατάσταση εύπλαστης σφαίρας, τότε θα μπορούσαμε να πούμε πως η γλυκίνη στη θέση 31, απεγκλωβίζει και επιτρέπει το μετάλλαγμα DP να ακολουθήσει ένα διαφορετικό θερμοδυναμικό μονοπάτι.

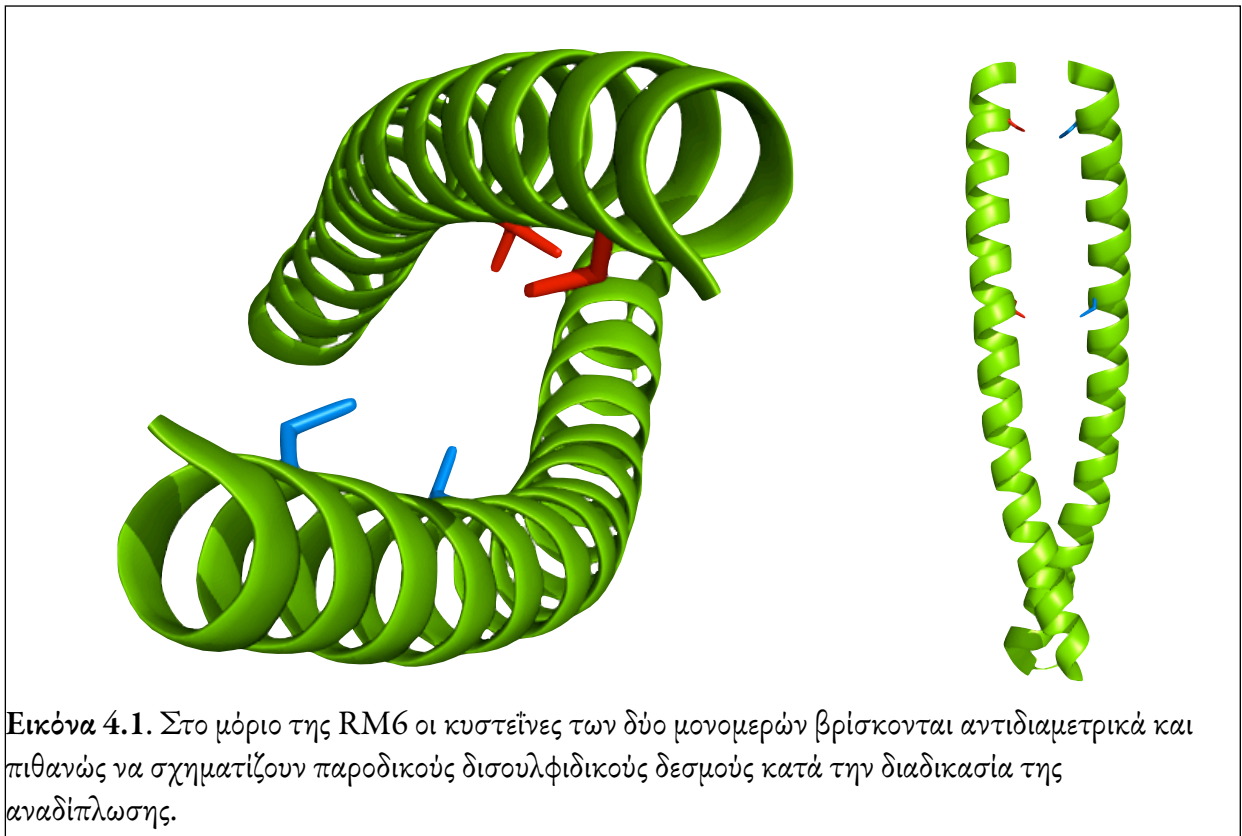
Η His-RopPG, αποτελεί συμπληρωματικό μετάλλαγμα της His-RopGP της εργασίας αυτής. Δυστυχώς, δεν υπάρχει για την περίπτωση της His-RopGP κρυσταλλογραφική "εικόνα", για να δούμε τις επιδράσεις της μετάλλαξης στη δομή του μορίου και να γίνει σύγκριση με His-RopPG και His-RopA31P. Ωστόσο, από τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού προκύπτουν ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Η θερμοκρασία τήξης του μεταλλάγματος βρέθηκε 49 °C, το οποίο δηλώνει πως και η His-RopGP αποτελεί ασταθέστερο μόριο σε σχέση με τη wtRop. Η καταγραφή του φάσματος της θερμικής αποδιάταξης της His-RopGP επιστρέφει μία σιγμοειδή καμπύλη (όπως και στις περιπτώσεις των His-wtRop και His-RopPG), το οποίο δηλώνει μετάβαση μεταξύ των 2 διαμορφώσεων σε ένα στάδιο χωρίς ενδιάμεσα. Αντιθέτως, η His-RopA31P όπως είδαμε εμφανίζει κατά την καταγραφή του φάσματος στα 222nm μονοτονοειδή καμπύλη χωρίς διακριτή μετάβαση. Η εικόνα μεταξύ των φασμάτων των τριών μεταλλαγμάτων (His-wtRop, His-RopGP και His-RopPG) είναι όμοια και για τις μετρήσεις στο άπω-υπεριώδες, η οποία εικόνα είναι εντελώς διαφορετική από την περίπτωση της His-RopA31P. Ερώτηση που θα μπορούσε να τεθεί στο σημείο αυτό είναι η εξής: Αν το μετάλλαγμα His-RopGP βρισκόταν επίσης σε κατάσταση εύπλαστης σφαίρας, τα φάσματα στα 222nm κατά τη θερμική αποδιάταξη και στο άπω-υπεριώδες δε θα πλησίαζαν αυτά της His-RopA31P παρά των His-wtRop και His-RopPG; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό είναι θετική, και τα δεδομένα του κυκλικού διχρωισμού φαίνεται να υποστηρίζουν πως η His-RopGP δεν βρίσκεται παγιδευμένη σε μία κατάσταση εύπλαστης σφαίρας. Βέβαια αυτό θα εξακριβωθεί μόνο με την επίλυση της δομής, αλλά ενδείξεις που υποστηρίζουν και εξηγούν τη σενάριο αυτό υπάρχουν.

Αυτό αυτομάτως σημαίνει πως η γλυκίνη στη θέση 30 έδωσε νέα πορεία στη πρωτεϊνική αναδίπλωση, και οδηγούμαστε σε ένα πρώτο συμπέρασμα πως η αλλουχία των αμινοξέων στη στροφή επηρεάζει τη τελική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του μεταλλάγματος His-RopPG, μπορούμε να ισχυροποιήσουμε πως η επίδραση της στροφής στην πορεία αναδίπλωσης της Rop εξαρτάται τόσο από την αλληλουχία των αμινοξέων που τη συντελούν όσο και από τη συγκεκριμένη θέση τους στη στροφή.

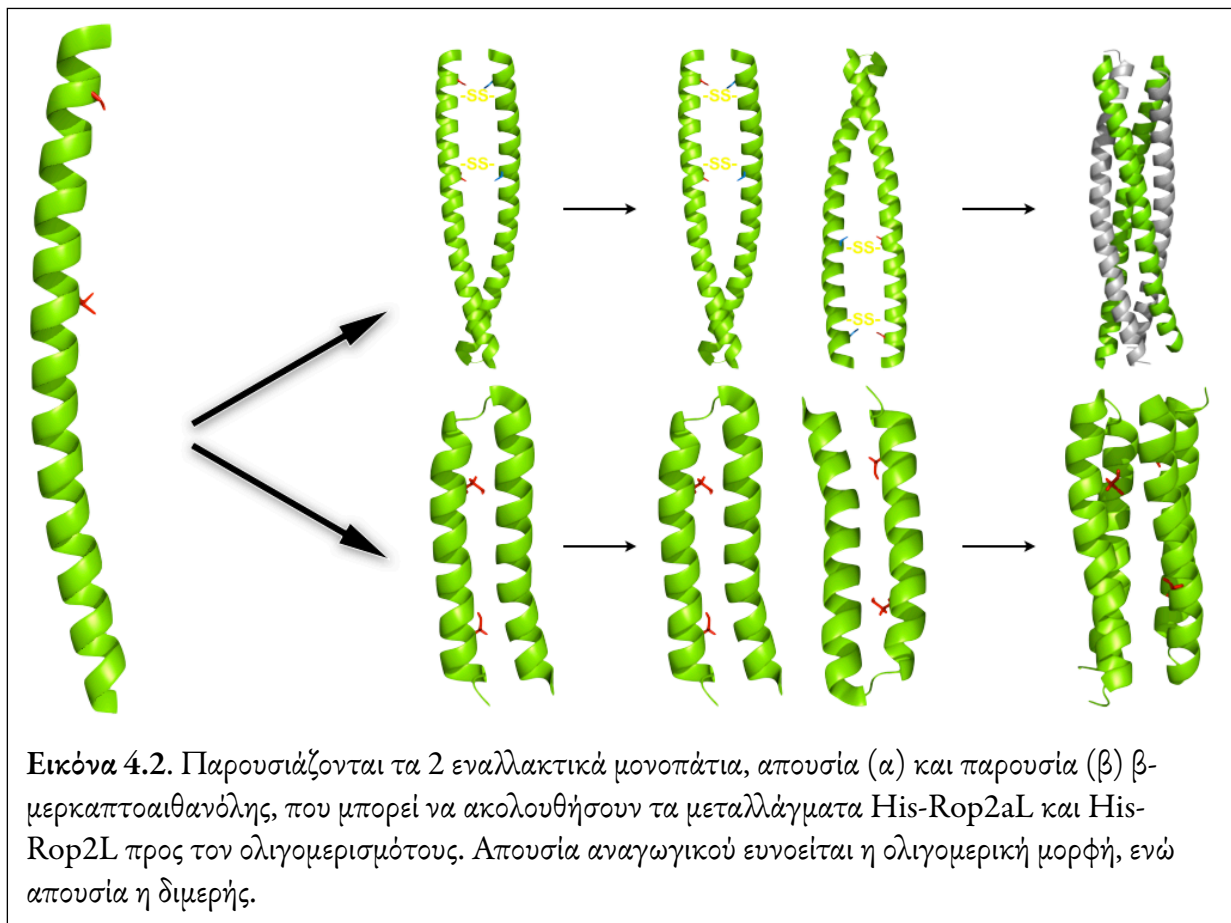
4.2 Περί μεταλλάγματος His-Rop2aL

Το μετάλλαγμα της RM6 επιβεβαίωσε τον ισχυρισμό πως η στροφή είναι επακόλουθο της διαταραχής του μοτίβου της επτάδας στην περιοχή. Ο εκτοπισμός της ημιτελούς επτάδας δίνει γένεση σε ένα νέο, εντελώς διαφορετικό, ομοτετραμερές μόριο, με κάθε μόριο να είναι μια επιμηκυμένη α-έλικα. Τα μεταλλάγματα των His-Rop2aL και His-Rop2L κατευθύνονται προς τον ίδιο στόχο. Τόσο τα

πειράματα της παρούσας εργασίας πάνω και στα 2 μεταλλάγματα, όσο και τα πειράματα που ξεκίνησαν αρχικά από τον Φελλά Γιώργο, μέλος του εργαστηρίου πάνω στη His-Rop2L, δείχνουν πως πιθανότατα ο στόχος της αποκατάστασης της επτάδας μέσω “επιδιόρθωσης” της επτάδας, έχει επιτευχθεί. Αυτό, υποστηρίζεται σχεδόν από κάθε πειραματικό βήμα στη μελέτη των δύο μεταλλαγμάτων. Αρχικά στη στήλη μοριακής διήθησης, απουσίας ή παρουσίας β-μερκαπτοαιθανόλης, το εκάστοτε μετάλλαγμα εμφανίζεται να εκλύεται τουλάχιστο και σε έναν όγκο που αντιστοιχεί σε κάποια ολιγομερική μορφή της πρωτεΐνης Rop. Η ολιγομερική μορφή αυτή για την περίπτωση των πληθυσμών που προέκυψαν από τη στήλη μοριακής διήθησης απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα, φανερώθηκε στην εγγενή ηλεκτροφόρηση που παρουσιάζεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, οι θερμοκρασίες τήξης σχεδόν όλων ολιγομερικών μορφών των δύο μεταλλαγμάτων, εμφάνισαν αυξημένη θερμοκρασία τήξης κάτι το οποίο ίσως να υποδηλώνει τη δημιουργία ενός νέου, πιο εκτεταμένου, υδρόφοβου πυρήνα. Το ίδιο συμβαίνει και τον πληθυσμό που αντιστοιχεί σε τετραμερική μορφή της His-Rop2L, αλλά δεν αναφέρθηκε επειδή ακόμη δεν επαναληφθεί τις απαραίτητες φορές ώστε να είναι στατιστικά αξιόπιστο το αποτέλεσμα. Φαίνεται λοιπόν, πως για την περίπτωση των His-Rop2aL και His-Rop2L ο ολιγομερισμός επηρεάζεται από την ύπαρξη ή όχι αναγωγικού, κάτι που υποδηλώνει πως οι δισουλφιδικοί δεσμοί ίσως να έχουν έναν πολύ ενεργότερο ρόλο στη διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης του μορίου αυτού. Στο μόριο της αγρίου τύπου Rop οι κυστεΐνες βρίσκονται στις θέσεις 38 και 52 της δεύτερης α-έλικας και δε φαίνεται από την κρυσταλλογραφική δομή να σχηματίζουν κάποιο



δεσμό. Απεναντίας, στο μόριο της RM6 τα κυστεϊνικά κατάλοιπα βρίσκονται το ένα απέναντι από το άλλο (Εικόνα 4.1) και πιθανότατα να αναπτύσσονται παροδικοί δεσμοί μεταξύ των 2 αντικρυστών α-ελίκων οι οποίοι ευνοούν το σχηματισμό της ολιγομερικής μορφής. Ένα υποθετικό μονοπάτι θα μπορούσε να είναι αυτό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.2.



Το αρχικό γεγονός είναι είτε ο σχηματισμός ενός ομοδιμερούς με τη βοήθεια των παροδικών δισουλφιδικών δεσμών που αναπτύσσονται απουσία αναγωγικού (μονοπάτι α) είτε η διατήρηση σε μονομερή μορφή του μορίου παρουσία αναγωγικού (μονοπάτι β). Κατόπιν στη περίπτωση του μονοπατιού α επέρχεται ο τετραμερισμός του μορίου με την ένωση 2 όμοιων “διμερών” ενώ στην περίπτωση του μονοπατιού β, καταλήγουμε στο σχηματισμό ενός διμερούς όπως στην περίπτωση της wtRop.

Φυσικά το αίνιγμα του ολιγομερισμού θα λυθεί πλήρως έχοντας την τρισδιάστατη δομή του μορίου. Για την εξακρίβωση του ρόλου των κυστεϊνών στο μονοπάτι της αναδίπλωσης θα μπορούσαν να δημιουργηθούν τα μεταλλάγματα His-Rop2aL και His-Rop2L με μεταλλαγμένα τα κατάλοιπα κυστεϊνης, όπου θα αναμέναμε να ευνοείται ο σχηματισμός της διμερούς μορφής. Αντιθέτως, με πειράματα cross-linking θα υπερτερούσε ο ολιγομερικός πληθυσμός έναντι του διμερούς.

1. Abkevich V. I., A. M. Gutin, and E. I. Shakhnovich. Specific nucleus as the transition-state for protein-folding - Evidence from the lattice model. *Biochemistry*, 1994, **33**, 33, 10026-10036.
2. Anfinsen. C. B., Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 1973, **181**, 223-224.
3. Banner, D. W., Kokkinidis, M. & Tsernoglou, D. (1987). Structure of the ColE1 Rop protein at 1.7Å resolution. *J. Mol. Biol.* **196**, 657-675.
4. Bernstein F. C., T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, J. E. F. Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, 1977, **112**, 535-542.
5. Betz, S. F., Liebman, P. A. & DeGrado, W. F. (1997). De novo design of native proteins: characterization of proteins intended to fold into antiparallel, rop-like, four-helix bundles. *Biochemistry*. **36**, 2450-2458.
6. 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.
7. Bychkova V. E. and O. B. Ptitsyn. The molten globule state of protein molecules is becoming a rule rather than exception. *Biophysics*, 1993, **38**, 1, 58-66.
8. Carlacci, L. & Chou, K.-C. (1990a). Energetic approach to the folding of four α -helices connected sequentially. *Protein Engng.* **3**, 509-514.
9. Carlacci, L. & Chou, K.-C. (1990b). Protocol. Electrostatic interactions between loops and α -helices in four-helix bundle proteins. *Protein Engng.* **4**, 225-227.
10. 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.
11. Castagnoli, L., Scarpa, M., Kokkinidis, M., Banner, D. W., Tsernoglou, D. & Cesareni, G. (1989). Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein. *EMBO J.* **8**, 621-629.
12. 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.
13. Cesareni, G., Muesing, M. A. & Polisky, B. (1982). Control of ColE1 DNA replication: The rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 6313-6317.
14. Cohen, C. & Parry, D. A. D. (1990). α -helical coiled coils and bundles: how to design an α -helical protein. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **7**, 1-15.

15. Daggett, V. (2001). " Validation of protein-unfolding transition states identified in molecular dynamics simulations." *Biochem Soc Symp*(68): 83-93.
16. 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.
17. 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.
18. Dill K. A., S. Bromberg, K. Z. Yue, K. M. Fiebig, D. P. Yee, P. D. Thomas, and H. S. Chan. Principles of protein folding – A perspective from simple exact models. *Protein Sci.*, 1995, **4**, 561-602.
19. Dobson C., A. Sali, and M. Karplus. Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 7, 868-893.
20. Eberle, W., A. Pastore, et al. (1991). " The structure of ColE1 rop in solution. " *J Biomol NMR* **1**(1): 71-82.
21. Fersht A. R.(1997) Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1997, **7**, 1, 3-9.
22. Fersht, A. R. (1995). " Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle." *Curr Opin Struct Biol* **5**(1): 79-84.
23. 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.
24. 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.
25. Fersht, A. R. (2000). "A kinetically significant intermediate in the folding of barnase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14121-6.
26. 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.
27. Gilmanishin, R. I. and O. B. Ptitsyn (1987). " An early intermediate of refolding alpha-lactalbumin forms within 20 ms." *FEBS Lett* **223**(2): 327-9.
28. 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.
29. 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.
30. Glykos, N. M., Y. Papanikolaou, et al. (2006). " Loopless Rop: structure and dynamics of an engineered homotetrameric variant of the repressor of primer protein. " *Biochemistry* **45** (36): 10905-19.
31. Greenfield, N. J. (1996). "Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data." *Anal Biochem* **235**(1): 1-10.
32. Guo, Z., & Thirumalai, D. (1996). Kinetics and thermodynamics of folding of a de novo designed four-helix bundle protein. *J. Mol. Biol.* **263**, 323-343.

33. H. J. Dyson and P. E. Wright. Peptide conformation and protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993, 3, 1, 60-65.
34. Helmer-Citterich, M., Anceschi, M. M., Banner, D. W. & Cesareni, G. (1988). Control of Cole1 replication: low affinity specific binding of Rop (Rom) to RNA I and RNA II. *EMBO J.* 7, 557-566.
35. Jackson S. E. and A. R. Fersht. Folding of chymotrypsin inhibitor-2. 2. influence of proline isomerization on the folding kinetics and thermodynamic characterization of the transition-state of folding. *Biochemistry*, 1991, 30, 43, 10436-10443.
36. Kim P. S., and R. L. Baldwin. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, 59, 631-660.
37. 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.
38. Lacatena, R. M., Banner, D.W., Castagnoli, L. & Cesareni, G. (1984). Control of initiation of pMB1 replication: purified Rop protein and RNA I affect primer formation in vitro. *Cell.* 37, 1009-1014.
39. 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.
40. 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.
41. Levinthal C., Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.*, 1968, 65, 44-45.
42. 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.
43. Lifson S. and A. Roig. On the theory of helix-coil transition in polypeptides. *J. Chem. Phys.*, 1961, 34, 1963-1974.
44. Munson, M., Anderson, K. S. & Regan, L. (1997). Speeding up protein folding: mutations that increase the rate at which Rop folds and unfolds by over four orders of magnitude. *Folding & Design.* 2, 77-87.
45. 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.
46. Nagi, A. D. & Regan, L. (1997). An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein. *Folding & Design.* 2, 67-75.
47. Nolting B., Mechanism of Protein Folding. *Proteins* (2000) 41, 288-298.
48. Nölting B., R. Golbik, J. L. Neira, A. S. Soler-Gonzalez, G. Schreiber, and A. R. Fersht. The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds. *P. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 3, 826-830.
49. 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.
50. Ohgushi, M. and A. Wada (1984). "Liquid-like state of side chains at the intermediate stage of protein denaturation." *Adv Biophys* 18: 75-90.
51. 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.

52. Paliakasis, C. D. and M. Kokkinidis (1992). "Relationships between sequence and structure for the four- α -helix bundle tertiary motif in proteins." *Protein Eng* **5**(8): 739-48.
53. Paliakasis, C. D., & Kokkinidis, M. (1992). Protein Engng. Relationships between sequence for the four- α -helix bundle tertiary motif in proteins. *Protein Engng.* **5**, 739-748.
54. Predki, P. F. & Regan, L. (1995). Redesigning the topology of a four-helix- bundle protein: monomeric Rop. *Biochemistry.* **34**, 9834-9839.
55. Privalov P. L., Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 1979, **33**, 167-241.
56. Ptitsyn O. B., How molten is the molten globule? *Nat. Struct. Biol.*, 1996, **3**, 6, 488-490.
57. Ptitsyn O. B., Sequential mechanism of protein folding. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1973, **210**, 1213-1215.
58. 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.
59. Shortle D., The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J.*, 1996, **10**, 1, 27-34.
60. Smith L. J., K. M. Fiebig, H. Schwalbe, and C. M. Dobson. The concept of the random coil - Residual structure in peptides and denatured proteins. *Fold. Des.*, 1996, **1**, 5, R95-R106.
61. Steif, C., Hinz, H.-J. & Cesareni G. (1995). Effects of cavity-creating mutations on conformational stability and structure of the dimeric 4- α - helical protein Rop: thermal unfolding studies. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **23**, 83-96.
62. Steif, C., P. Weber, et al. (1993). " Subunit interactions provide a significant contribution to the stability of the dimeric four- α -helical-bundle protein ROP. " *Biochemistry* **32**(15): 3867-76.
63. Swindells M. B., M. W. Macarthur, and J. M. Thornton. Intrinsic phi, psi propensities of amino-acids, derived from the coil regions of known structures. *Nat. Struct. Biol.*, 1995, **2**, 7, 596-603.
64. Tanford C., Protein denaturation. *Adv. Prot. Chem.*, 1970, **24**, 1-95.
65. 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.
66. Tooze, B. a. (1999). Introduction to Protein Structure, Second Edition, Garland Publishing.
67. Weber, P. C. & Salemme, F. R. (1980). Structural and functional diversity in 4- α -helical proteins. *Nature.* **287**, 82-83.
68. Wetlaufer D. B. Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *P. Natl Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 697-701.