

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήματα Βιολογίας και Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Πρωτεϊνικής Βιοτεχνολογίας



UNIVERSITY OF CRETE
Depts. of Biology & Chemistry

Joint Graduate Program in
Protein Biotechnology

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Χρήση της πρωτεΐνης Ror ως νέο
βιοϋλικό και δομική ανάλυση της
RorPG με στόχο την κατανόηση
σχέσεων δομής-αλληλουχίας»**

ΑΜΠΡΑΖΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Μ. ΚΟΚΚΙΝΙΔΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
2007

Ευχαριστίες

Τον τελευταίο χρόνο πέρασα πολλές ώρες στο Πανεπιστήμιο τσι Κρήτης (Voutes Campus) για την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Κατά τη διάρκεια αυτής, συνάντησα, γνώρισα και συνεργάστηκα με πολλούς ανθρώπους τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Πρώτον απ' όλους τον κ. Μ. Κοκκινίδη που μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ σε αυτόν το χώρο (εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας 1 - Α' όροφος) αλλά και «χώρο» (Δομική Βιολογία). Ήταν πάντα εκεί για να με καθοδηγήσει, να με συμβουλέψει και να ωθήσει τη σκέψη μου προς επιστημονικά μονοπάτια. Ήταν πάντα πρόθυμος για ένα μάθημα κρυσταλλογραφίας, για ένα αστεϊάκι...για ένα σχόλιο πως είναι «όλα λάθος».

Ακολουθως θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Α. Μητράκη, η οποία ήταν το δεύτερο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής. Με μύησε στον τομέα των βιολικών και μαζί χτίσαμε ένα νέο project. Ελπίζω η καλή μας συνεργασία να συνεχιστεί και κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου.

Σειρά έχουν οι «κατά Φελλά» *μαμάδες* του εργαστηρίου Μαίρη και Ντίνα. Τις ευχαριστώ τόσο για την υποστήριξη, τις συμβουλές και τη βοήθεια τους σε επιστημονικά ζητήματα όσο και για τη φιλική σχέση που δεν περιορίστηκε στο χώρο του εργαστηρίου.

Στη συνέχεια ένα μεγάλο «ευχαριστώ» θα πω στο Γιώργο Φελλά, τον πρώτο μου συνεργάτη. Μοιράστηκε μαζί μου τις μέχρι τότε γνώσεις του και με βοήθησε στα πρώτα βήματα αυτής της εργασίας. Πέρασαμε ευχάριστες ώρες επιστημονικής συζήτησης και φιλικής κουβεντούλας. Παρόλη τη προσπάθεια του να φαίνεται "supervisor" ... κανείς δεν τον πίστεψε!

Ευχαριστώ επίσης τη Βάνια με την οποία συνεργάστηκα στο πιο δύσκολο για μένα, τμήμα της εργασίας, στον προσδιορισμό της δομής. Από το ταξίδι μας στο Αμβούργο μέχρι την τελική δομή, μου εξηγούσε υπομονετικά το κάθε μας βήμα...ξανά και ξανά! Προσέφερε την πολύτιμη βοήθειά και τις γνώσεις της για ό,τι και αν τη χρειάστηκα.

Δεν θα παραλείψω όμως την Τάνια, τη Βίκυ την Αλέκα και τα υπόλοιπα άτομα που πέρασαν από το εργαστήριο για την καλή συνεργασία μας. Ιδιαίτερως, το Νικολάκη για τις ευχάριστες ώρες εντός και εκτός εργαστηρίου... στο παγκάκι του διαδρόμου, στο κυλικείο, στη λέσχη, στον καφέ και τη συνοδοιπόρο Κλητώ (συμφοιτήτρια στην Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία) με την οποία μοιράστηκα όχι μόνο ευχάριστες σκέψεις αλλά και προβληματισμούς.

Το επόμενο «ευχαριστώ» ανήκει στο συμφοιτητή μου αλλά και καλό μου φίλο Τζόννη. Γνωριστήκαμε την περίοδο της πτυχιακής μας εργασίας, ξανα-συναντηθήκαμε στην Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία και τελικά δουλέψαμε στο ίδιο εργαστήριο, με τη «θρυλική» Pop αναπτύσσοντας μία φιλία που τα είχε όλα... πολύωρες συζητήσεις, ευχάριστες στιγμές, εκπλήξεις αλλά και παρεξηγήσεις.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα πω στους φίλους μου Σταυρούλα Μ., Δημήτρη Π., Χριστίνα Δ., Ειρήνη Γ., Γιώργο Κ. και Χριστίνα Π. γιατί με εκδρομές, ξενύχτια, κουβεντούλες, ανησυχίες, συμπαράσταση και κέφι, περνάμε παρέα τη ζωή μας στην Κρήτη. Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω την «παλιόΈενα» (Βλ. Έλενα) γιατί...απλά είναι φίλη μου. Από την περίοδο που κάναμε ακόμα την πτυχιακή μας εργασία μέχρι σήμερα, με το χαμόγελο και τη θετική της ενέργεια κάνει πιο ευχάριστες τις μέρες στο Ηράκλειο! Ελπίζω η καλή μας παρέα να είναι στήριγμα για τη συνέχεια των σπουδών μας και όχι μόνο.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όλων οφείλω στους γονείς μου. Ό,τι κι αν γίνει, είναι δίπλα μου, σε κάθε μου βήμα ακόμα κι αν γίνεται μακριά τους! Με την οικονομική υποστήριξη και κυρίως με την αγάπη τους με έχουν στηρίξει σε κάθε στάδιο των σπουδών μου. Ξέρω πως θα με βοηθούν πάντα για να φτάνω πιο κοντά στους στόχους μου...τους αγαπώ.

Περίληψη

Στον τομέα της νανο-τεχνολογίας, το πεδίο της τεχνολογίας υλικών είναι ραγδαίως αναπτυσσόμενο. Για την εξέλιξή του είναι απαραίτητη η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της αναδίπλωσης πρωτεϊνών. Η Rop είναι μία πρωτεΐνη που έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον προς λύση του προβλήματος της «αναδίπλωσης των πρωτεϊνών». Είναι ένα παράδειγμα ομοδιμερούς, αντιπαράλληλου, 4-α-ελικοειδούς δεματίου και, φυσιολογικά, συμμετέχει στο μηχανισμό ελέγχου του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων της ColE1 οικογένειας, του *E.coli*. Όπως όλα τα α-ελικοειδή δεμάτια, εμφανίζει την «περιοδικότητα της επτάδας» στην αλληλουχία της, η οποία διαταράσσεται στην περιοχή της στροφής, που αποτελείται από τρία αμινοξέα. Ποικίλες μελέτες έχουν αποδώσει δευτερεύοντες ή περισσότερο πρωταρχικούς ρόλους στη στροφή, σε ό,τι αφορά στην αναδίπλωση και σταθερότητα των πρωτεϊνών. Ωστόσο, ο ρόλος τους σε αυτή τη διαδικασία παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος.

Ένα από τα μεταλλάγματα της Rop, που έδωσε αρκετά στοιχεία όσον αφορά αυτό τον προβληματισμό ήταν το Rop A31P, στο οποίο με τη σημειακή μετάλλαξη ενός μόνο αμινοξέος της στροφής, άλλαξε δραματικά η διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία έγινε μία προσπάθεια περαιτέρω διαφώτισης αυτού του ρόλου με το σχεδιασμό του μεταλλάγματος Rop D30P/A31G.

Η πρωτεΐνη μελετήθηκε ως προς τις φασματοσκοπικές και θερμοδυναμικές της ιδιότητες και κατέστη δυνατή η κρυστάλλωση και η λύση της δομής της. Τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν ότι το μετάλλαγμα αυτό έχει παρόμοια δομή με αυτή της wt Rop και όχι με την A31P.

Συμπερασματικά, η προλίνη είναι ένα κρίσιμο αμινοξύ αλλά μόνο στη θέση 31 (A31P) ενώ η γλυκίνη στη θέση 31 πιθανότατα οδηγεί την πρωτεΐνη σε μία λιγότερο θερμοσταθερή δομή λόγω των πιο χαλαρών δεσμών που δημιουργεί με τα γειτονικά της αμινοξέα. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, η σημασία των καταλοίπων της στροφής στην επιλογή του μονοπατιού αναδίπλωσης της πρωτεΐνης και επισημαίνεται πως ο ρόλος της στροφής εξαρτάται από την αλληλουχία σε αυτή την περιοχή.

Στην παρούσα εργασία, έγινε επίσης μία προσπάθεια δημιουργίας μεταλλαγμάτων της Rop που θα είναι κατάλληλα να χρησιμοποιηθούν ως δομικοί λίθοι για τη δημιουργία νανο-δομών – βιοϋλικών. Τα πρώτα στοιχεία από έναν καθαρισμό μικρής κλίμακας αυτών των μεταλλαγμάτων, δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαλυτές. Ένας καθαρισμός σε μεγάλη κλίμακα, με τη χρήση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης θα δώσει περισσότερα στοιχεία για τον ολιγομερισμό τους. Τέλος, η ηλεκτρονική μικροσκοπία και η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού θα διαφωτίσουν τη πιθανή τους αυτό-συγκρότηση σε σχέση με την αλλαγή διαφόρων συνθηκών, όπως το pH και ο χρόνος.

Summary

Development of novel biomaterials is a rapidly developing field of nanotechnology. A detailed and comprehensive understanding of protein folding will greatly contribute to the development of new biomaterials. Rop (Repressor Of Primer) is a protein that has been mutated many times in order to give an answer at the “folding problem”. It is the paradigm of a canonical 4- α -helical bundle and is involved in the regulation of copy number of the ColE1 plasmids of *E.coli*. Like all 4- α -helical bundles, it exhibits a ‘heptad pattern’ in its sequence, that is disturbed only in the loop region which is formed by three amino acids. Several studies has demonstrate the role of turn, in the folding process and the stability of proteins, although the precise nature of this role is not clearly understand.

Rop A31P, one of the extensively studied loop-mutants of Rop results in drastic structural changes. In this study, we try to further explore the role of loops in the folding pathway, through the design of Rop mutant D30P/A31G. Spectroscopic and thermodynamic studies were carried out and protein crystallization and structure determination were set up. Results of this work suggest that this mutant has a wt Rop-like structure which is different from the A31P structure.

In summary, proline is a crucial amino acid but drastic structural effects by Pro have been so far observed only at the crucial 31 position (A31P); a glycine at position 31 may contribute to a less stable structure, as it makes less tight bonds with both helices. This confirms the role of turn residues in the choice of folding pathway and the deservation that the effects of the loop region on the folding pathway are complex and both sequence- and position-dependent.

In this study, there is also an effort to design two Rop mutants, in order to use them as building blocks for nano-structures – biomaterials. These mutants are soluble, as it is indicated by a small-scale purification. Further characterisation including Gel Filtration is necessary for concluding their oligomerization state. Electron microscopy and circular dichroism will demonstrate the possible self-assembly of these mutants, with respect to different conditions, like pH and time.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες

Περίληψη

Summary

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών	1
1.1.1 Ενεργειακές μεταπτώσεις κατά την πορεία αναδίπλωσης πρωτεϊνών	2
1.1.2 Μονοπάτια αναδίπλωσης πρωτεϊνών – «Εύπλαστες σφαίρες» και ενδιάμεσα	3
1.1.3 Ο ρόλος της στροφής στην πορεία αναδίπλωσης πρωτεϊνών	7
1.2 Αυτό-συγκρότηση (self-assembly) πρωτεϊνών – Βιοϋλικά	8
1.2.1 Τα «έξυπνα» υλικά	9
1.2.2 Δομικοί λίθοι κατάλληλοι για αυτο-συγκρότηση	9
1.2.3 Εφαρμογές βιοϋλικών	12
1.3 Η πρωτεΐνη Rop	13
1.3.1 Η Rop μοντέλο για τη μελέτη της αναδίπλωσης πρωτεϊνών	16
1.3.2 Η Rop μοντέλο για τη δημιουργία βιοϋλικών	19
1.4 Σκοπός της εργασίας	21
2. Αποτελέσματα	
2.1 Η μετάλλαξη RopPG	25
2.1.1 Μεταλλαξογένεση και υπερέκφραση	25
2.1.2 Απομόνωση και καθαρισμός	26
2.1.3 Κρυστάλλωση	27
2.1.4 Συλλογή δεδομένων και λύση δομής	28
2.1.5 Κυκλικός Διχρωϊσμός (CD)	31
2.2 Οι μεταλλάξεις Rop RM6-T19P και Rop RM6-P30	36
2.2.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου Rop RM6 και μεταλλαξογενεση	36
2.2.2 Καθαρισμός σε μικρή κλίμακα	38

3. Συζήτηση	
3.1 Η μετάλλαξη RopPG	39
3.2 Οι μεταλλάξεις Rop RM6-T19P και Rop RM6-P30	41
4. Υλικά και Μέθοδοι	
4.1 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης	42
4.2 Μεταλλαξογενεση	43
4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	43
4.4 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> (competent cells)	43
4.5 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> με πλασμιδιακών DNA	44
4.6 Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	44
4.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep)	45
4.8 Σύνδεση των τμημάτων dna (γονίδιο, πλασμιδιακός φορέας) για τη δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής (ligation)	45
4.9 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	45
4.10 Υπερέκφραση των μεταλλαγμάτων της Rop	46
4.11 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας και μοριακής διήθησης σε μεγάλη κλίμακα	46
4.12 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας σε μικρή κλίμακα	48
4.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	49
4.14 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο bradford	49
4.15 Πρωτεϊνικές μελέτες με τη χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωσισμού (CD)	49
4.16 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών	51
4.17 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X – Μέθοδος μοριακής αντικατάστασης	54
4.17.1 Γενικές αρχές-Ορισμοί	54
4.17.2 Επεξεργασία αρχικών δεδομένων	54
4.17.3 Μοριακή αντικατάσταση	55
4.17.4 Βελτιστοποίηση του μοντέλου και ο παράγοντας R	56
5. Βιβλιογραφία	57

1 Εισαγωγή

1.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες παράγονται ως γραμμικές αμινοξικές αλληλουχίες οι οποίες αναδιπλώνονται δημιουργώντας τοπικές δευτεροταγείς δομές, όπως α-έλικες, β-πτυχωτά φύλλα και βρόγχους. Ακολούθως, αυτά τα δομικά στοιχεία πακετάρονται σε μία ή περισσότερες συμπαγείς σφαιρικές μονάδες που ονομάζονται επικράτειες (domains), οδηγώντας στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Οι σωστά δομημένες πρωτεΐνες πιθανότατα αυτό-συγκροτούνται (self-assemble) και σχηματίζουν λειτουργικά σύμπλοκα πρωτεϊνών. Από την τρισδιάστατη δομή, λοιπόν, εξαρτώνται και οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Η διαδικασία με την οποία μία πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκτά τη σωστή τρισδιάστατη δομή, για να επιτύχει τη βιολογικά ενεργή, φυσική κατάσταση ονομάζεται *πρωτεϊνική αναδίπλωση* (protein folding). Η διαδικασία της αναδίπλωσης είναι εξαιρετικά γρήγορη, καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες αναδιπλώνονται στην τριτοταγή τους δομή σε λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο, με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες να χρειάζονται περισσότερο χρόνο (Tooze, 1999). Παρ' ότι μερικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες αναδιπλώνονται αυθόρμητα στη φυσική τους δομή, άλλες απαιτούν τη βοήθεια ενζύμων ή μιας κατηγορίας πρωτεϊνών που ονομάζονται σαπερόνες (chaperones, «μοριακοί συνοδοί»).

Η κατανόηση του μηχανισμού της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών δεν έχει επιτευχθεί ακόμη, παρά τις μελέτες των τελευταίων τριάντα ετών. Η λύση στο γνωστό ως «*πρόβλημα της αναδίπλωσης*» (folding problem) θα παρείχε την πληροφορία για το πώς η αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης καθορίζει την τριτοταγή της δομή. Επίσης, θα έθετε τη βάση για τη δημιουργία αλγορίθμων για την πρόβλεψη τρισδιάστατων δομών των πρωτεϊνών από την αμινοξική τους ακολουθία· ένα εργαλείο χρήσιμο στα πεδία της φαρμακευτικής, της νανοτεχνολογίας και της τεχνολογίας υλικών.

1.1.1 ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μια πρωτεΐνη στη φυσική της κατάσταση δεν είναι στατική. Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής των επικρατειών, όπως επίσης και ολόκληρες οι επικράτειες, επιτελούν διαρκώς μικρές κινήσεις στο χώρο, που αντιστοιχούν είτε σε ταλαντώσεις μεμονωμένων ατόμων είτε σε συλλογικές κινήσεις ομάδων ατόμων. Με μικρές αλλαγές στο pH ή τη θερμοκρασία οι πρωτεΐνες μπορούν να μεταπέσουν από τη φυσική αναδιπλωμένη τους κατάσταση σε αποδιαταγμένη κατάσταση. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ αυτών των καταστάσεων είναι πολύ μικρή, περίπου 5-10 kcal/mol, κάτι που ισοδυναμεί με την ενεργειακή εισφορά μερικών, μόνο, δεσμών υδρογόνου (Lattman and Rose, 1993; Tooze, 1999; Fersht and Daggett, 2002). Οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ της αναδιπλωμένης και της αποδιαταγμένης κατάστασης είναι η *ενθαλπία*(H) και η *εντροπία*(S).

Η ενθαλπία προέρχεται από την ενέργεια των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals και ιοντικοί δεσμοί) μεταξύ των ατόμων της πρωτεΐνης. Σε αντίθεση με τους ομοιοπολικούς δεσμούς, που είναι, με εξαίρεση τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι ίδιοι τόσο στη μη διπλωμένη όσο και στη διπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης, οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί διαφέρουν σημαντικά στις δυο αυτές καταστάσεις της ίδιας πρωτεΐνης. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι πιο ισχυρές στην αναδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης καθώς είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό ενός συμπαγούς σφαιρικού μορίου και η ενεργειακή τους συνεισφορά (ενθαλπία) είναι πολύ μεγαλύτερη σε αυτή την κατάσταση. Το αποτέλεσμα είναι η διαφορά ενθαλπίας (ΔH) μεταξύ των δυο καταστάσεων να φτάνει μέχρι και μερικές εκατοντάδες kcal/mol (Tooze, 1999).

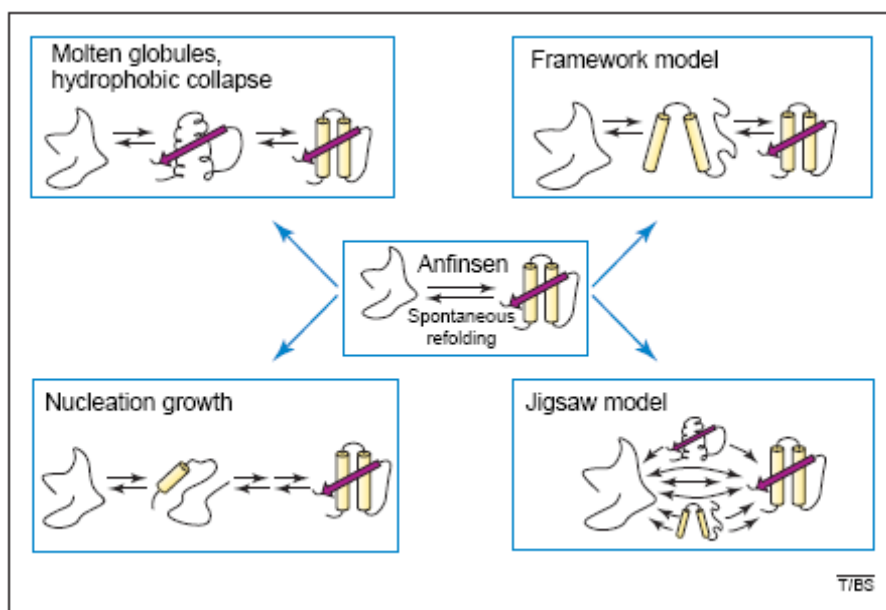
Η εντροπία σχετίζεται με την απαιτούμενη προσφορά ενέργειας προκειμένου να δημιουργηθεί τάξη (Δεύτερος Νόμος Θερμοδυναμικής). Σύμφωνα με τη Θερμοδυναμική, η εντροπία ενός συστήματος τείνει να αυξάνει, δηλαδή η μεταβολή της εντροπίας ενός συστήματος θα είναι πάντα $\Delta S > 0$. Η διαφορά εντροπίας μεταξύ της μη διπλωμένης και της διπλωμένης μορφής της πρωτεΐνης είναι αρνητική (μεγαλύτερη η εντροπία της μη

διπλωμένης κατάστασης) και μπορεί να φτάσει και αυτή σε μερικές εκατοντάδες kcal/mol.

Η διαφορά της μεταβολής αυτών των δυο παραγόντων (ΔH και ΔS) αποτελεί τη συνολική διαφορά ενέργειας μεταξύ της αποδιαταγμένης και της αναδιπλωμένης μορφής μιας πρωτεΐνης και είναι γνωστή ως διαφορά ελεύθερης ενέργειας (ΔG). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η διαφορά αυτή είναι πολύ μικρή, με αποτέλεσμα ο υπολογισμός της κατάστασης ελάχιστης ενέργειας να μην είναι πάντα εύκολος, κάτι που καθιστά περισσότερο πολύπλοκη τη μελέτη της διαδικασίας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η πορεία που ακολουθείται κατά την αναδίπλωση είναι αρκετά περίπλοκη καθώς η μη διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα λαμβάνει μια πληθώρα διαφορετικών, μη διακριτών και συνεχώς μεταβαλλόμενων δομών μέχρι να καταλήξει στην τελική της κατάσταση.

1.1.2. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ – «ΕΥΠΛΑΣΤΕΣ ΣΦΑΙΡΕΣ» ΚΑΙ ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ

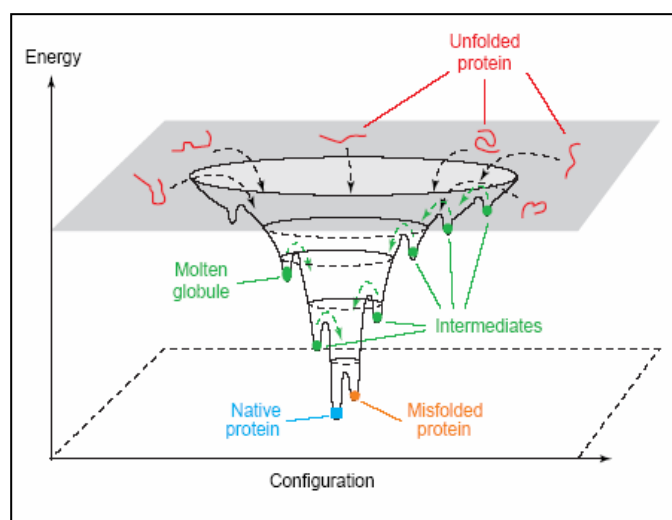
Κατά την προσπάθεια λύσης του προβλήματος της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών έχουν προταθεί πολλά μοντέλα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Προτεινόμενα μοντέλα για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. (Σχήμα από Radford, 2000)

Μερικά από αυτά ήταν το «μοντέλο του πυρήνα» (nucleation model) (Levinthal, 1968), το μοντέλο της «διάχυσης και σύγκρουσης» (diffusion-collision model) (Karplus and Weaver, 1976), το «μοντέλο του πλαισίου» (framework model) (Kim and Baldwin, 1982), το «μοντέλο συναρμολόγησης» (jigsaw puzzle model) (Harrison and Durbin, 1985) και το «μοντέλο της υδρόφοβης κατάρρευσης» (hydrophobic collapse model) (Levitt and Warshel, 1975).

Την τελευταία δεκαετία και με τη συμβολή νέων μεθόδων στον τομέα της δομικής βιολογίας έγινε γνωστό και ευρέως αποδεκτό ότι δεν είναι μόνο ένα το μονοπάτι που μπορεί να ακολουθήσει μια πρωτεΐνη κατά την αναδίπλωσή της (Radford, 2000). Αντίθετα, η διαδικασία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί καλύτερα ως ένα πολυδιάστατο ενεργειακό τοπίο (multidimensional energy landscape), που απεικονίζεται ως ένα, συνήθως, αδρό χωνί (folding funnel) (Εικόνα 2). Αυτά τα ενεργειακά τοπία βασίζονται στη γενικευμένη λογική όλων των χημικών αντιδράσεων, κατά την οποία η ταχύτητα είναι συνάρτηση της ενέργειας αλληλεπίδρασης των αντιδρώντων ατόμων με τη σχετική τους θέση στο χώρο. Στην περίπτωση της διαδικασίας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, η ενέργεια αυτή αφορά στην ελεύθερη ενέργεια και τις μεταβολές της.

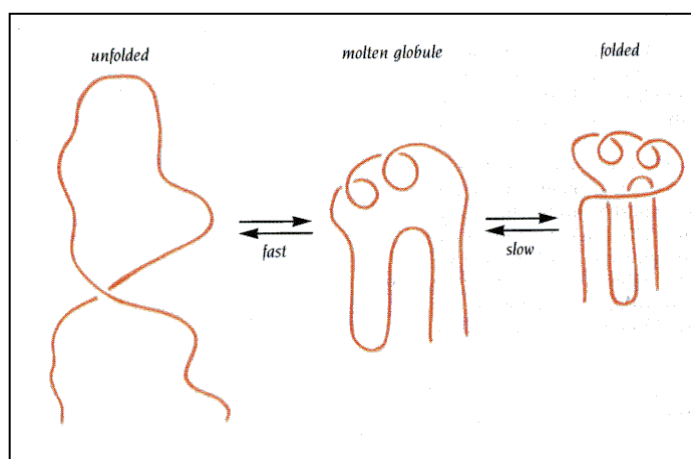


Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση ενός ενεργειακού τοπίου κατά την αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης. Τα αποδιαταγμένα μόρια που βρίσκονται στην κορυφή του χωνιού μπορούν να οδηγηθούν στην αναδιπλωμένη κατάσταση μέσω πολλών διαφορετικών οδών. Κάποιες από αυτές τις οδούς περιέχουν διακριτές ενδιάμεσες καταστάσεις, που αποτελούν τοπικά ελάχιστα, ενώ άλλες περιέχουν κινητικές παγίδες (misfolded states). Για πρωτεΐνες που αναδιπλώνονται χωρίς διακριτά ενδιάμεσα η επιφάνεια ενός τέτοιου τοπίου θα είναι λεία (Σχήμα από Radford, 2000).

Μέσα από αυτό το πρίσμα, γίνεται αντιληπτό ότι προκειμένου να κατανοηθεί ο μηχανισμός της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, θα πρέπει να χαρακτηριστούν τόσο δομικά όσο και θερμοδυναμικά όλες οι καταστάσεις που

μεσολαβούν από μια αποδιαταγμένη πεπτιδική αλυσίδα ως την αναδιπλωμένη πρωτεΐνη.

Στο παραπάνω σχήμα, παρουσιάζονται δυο σημαντικές ενδιάμεσες καταστάσεις της πορείας αναδίπλωσης. Η κατάσταση «εύπλαστης σφαίρας» (molten globule state) και τα διάφορα ενδιάμεσα (intermediates). Αυτό που είναι γνωστό για την «molten globule» κατάσταση είναι ότι εμφανίζεται στην πορεία αναδίπλωσης ορισμένων, τουλάχιστον, πρωτεϊνών και είναι μια εν μέρει, οργανωμένη, σφαιρική κατάσταση (Tooze, 1999) (εικόνα 3).



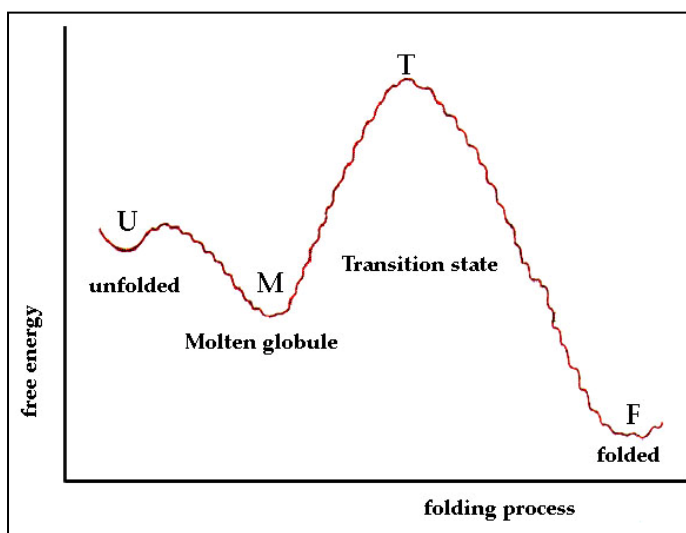
Εικόνα 3. Η κατάσταση molten globule είναι μια σημαντική ενδιάμεση κατάσταση κατά την μετατροπή μιας αποδιαταγμένης αλυσίδας στην αναδιπλωμένη της μορφή. (Σχήμα από Branden and Tooze, 1999)

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

Οι ενδιάμεσες καταστάσεις (folding intermediates) αποτελούν χαρακτηριστικά σημεία τοπικού ελάχιστου στα ενεργειακά τοπία και μπορεί να περιέχουν αναδιπλωμένα τμήματα της τελικής δομής. Ο ρόλος που έχουν στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης είναι αμφισβητήσιμος. Σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται να αποτελούν σημαντικά στοιχεία της πορείας της

πολυπεπτιδικής αλυσίδας προς την αναδίπλωσή της, ενώ άλλες αναφορές υποδεικνύουν ότι είναι καταστάσεις που προκαλούνται από τη μη ειδική κατάρρευση της πεπτιδικής αλυσίδας ή λόγω κινητικής παγίδευσής τους. Η φύση των ενδιαμέσων αυτών δεν επιτρέπει το δομικό τους χαρακτηρισμό, καθώς αποτελούν συνεχώς εναλλασσόμενες καταστάσεις με μικρούς, μη ανιχνεύσιμους πληθυσμούς.

Μια καλύτερα χαρακτηρισμένη κατάσταση στην πορεία της αναδίπλωσης είναι η λεγόμενη μεταβατική κατάσταση (transition state). Η κατάσταση αυτή αποτελεί το υψηλότερο ενεργειακό σημείο σε ένα μονοπάτι αναδίπλωσης (Εικόνα 4) και εμφανίζει δύο χαρακτηριστικά. Πρώτον, ένα μόριο που βρίσκεται σε μεταβατική κατάσταση μπορεί να επιστρέψει στην κατάσταση από την οποία προήλθε (unfolded state) με την ίδια συχνότητα με την οποία μετακινείται στην τελική κατάσταση (native state) (Fersht and Daggett, 2002) και δεύτερον, αποτελεί μια εξαιρετικά συμπαγή κατάσταση, που δεν επηρεάζεται από διαταραχές λόγω μεταλλάξεων ή συμπεριφοράς του διαλύτη (Oliveberg, 2001).



Εικόνα 4. Η μετάβαση από την μη αναδιπλωμένη κατάσταση προς την αναδιπλωμένη κατάσταση χαμηλής ενέργειας περιλαμβάνει το πέρασμα από μια μη αναδιπλωμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας (transition state). (Σχήμα από Tooze, 1999).

1.1.3 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΤΡΟΦΗΣ ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι περισσότερες πρωτεϊνικές δομές σχηματίζονται από συνδυασμούς στοιχείων δευτεροταγούς δομής, α-έλικες και β-κλώνους, που συνδέονται

μεταξύ τους με βρόγχους-στροφές διαφόρων μηκών και ακανόνιστων σχημάτων. Εκτός από αυτή τους τη λειτουργία οι βρόγχοι συχνά συμμετέχουν τόσο στο σχηματισμό θέσεων πρόσδεσης σε διάφορες πρωτεΐνες όσο και στη δημιουργία των ενεργών κέντρων ενζύμων.

Οι έρευνες για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών εστιάζουν περισσότερο σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής όπως είναι οι α-έλικες και τα β-πτυχωτά φύλλα και πολύ λιγότερο στις αλληλουχίες που συνδέουν αυτά τα στοιχεία μεταξύ τους. Έτσι, ο ρόλος των στροφών και των βρόχων στην αναδίπλωση και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Είναι απλά συνδετικοί κρίκοι μεταξύ των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής ή έχουν έναν πιο ενεργό ρόλο στον καθορισμό του μονοπατιού της αναδίπλωσης και της τελικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης; (Nagi and Regan, 1997).

Προς απάντηση αυτού του ερωτήματος έχουν γίνει μελέτες σε πολλές πρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές αποδίδουν στις στροφές σημαντικό ρόλο στην πορεία της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης (Nagi et al., 1999), ενώ άλλες, τους αποδίδουν δευτερεύοντα ρόλο. Ακόμη όμως και αν δεν επηρεάζουν την τελική δομή των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάζουν την κινητική της αναδίπλωσης. Αυτό που φαίνεται να ισχύει, περισσότερο, είναι ότι ο ρόλος των στροφών και βρόχων εξαρτάται από τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη στην οποία ανήκουν, από την τοπολογική τους θέση μέσα σε αυτήν και από το μικροπεριβάλλον τους (Nagi et al., 1999).

1.2 Αυτό-συγκρότηση πρωτεϊνών – Βιοϋλικά

Η μοριακή αυτό-οργάνωση ή *αυτό-συγκρότηση* (self-assembly) είναι μία διαδικασία με την οποία η φύση δημιουργεί πολύπλοκες, πολυσύνθετες τρισδιάστατες, δομές με καλά καθορισμένες λειτουργίες, αρχίζοντας από δομικούς λίθους όπως νουκλεϊκά οξέα, φωσφολιπίδια και αμινοξέα. Στη διαδικασία αυτή κυριαρχούν ασθενείς ενδομοριακοί δεσμοί, όπως δεσμοί van der Waals, δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και stacking αλληλεπιδράσεις.

Σκεπτόμενοι τη σπουδαιότητα και τις εφαρμογές που μπορεί να έχει η αυτό-συγκρότηση πεπτιδίων για τον επιστημονικό και τεχνολογικό κόσμο, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για το σχεδιασμό και τη

σύνθεση νέων δομών με ποικίλα προβλέψιμα και λειτουργικά χαρακτηριστικά, χρησιμοποιώντας ως φυσικούς δομικούς λίθους τα πεπτίδια. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, είναι απαραίτητη η καλύτερη κατανόηση αρχικά της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και εν συνεχεία, της βιοφυσικής και βιοχημικής φύσης της διαδικασίας της αυτό-συγκρότησης. Γι' αυτό το λόγο, αναπτύσσονται πολλοί νέοι δομικοί λίθοι που προέρχονται είτε από φυσικά είτε από συνθετικά αμινοξέα, με κυκλική ή γραμμική διαμόρφωση. Η αφθονία των πλευρικών ομάδων καθιστά δυνατό τον έλεγχο τόσο της διαμόρφωσης όσο και της λειτουργικότητας. Αυτές οι μελέτες θα οδηγήσουν στην ικανότητα για χειρισμό της διαδικασίας αυτό-συγκρότησης στα τεχνητά συστήματα (Rechtes and Gazit, 2006).

Τα πεπτίδια προτιμώνται από τους άλλους δομικούς λίθους λόγω της απλής δομής τους, της χημικής ποικιλότητας, της αφθονίας σχημάτων, της σχετικής φυσικής και χημικής σταθερότητας και της δυνατότητας σύνθεσής τους σε μεγάλη ποσότητα. (Colombo et al., 2007) Μπορούν να σχεδιαστούν για να υιοθετήσουν καλά καθορισμένες δομές α-ελίκων, β-φουρκετών ή β-πτυχωτών φύλλων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τοπολογικά καθορισμένοι δομικοί λίθοι για το σχηματισμό νανο-σωληνίσκων, νανο-σφαιρών, νανο-ινιδίων, νανο-ταινιών καθώς και μακροσκοπικών δομών όπως υδρογέλες (hydrogels) (Gazit, 2006). Η χημική τους σύνθεση είναι γρήγορη και επιτρέπει μία σχεδόν απεριόριστη παλέτα δομών και λειτουργιών κάνοντας χρήση και τεχνητών αμινοξέων εκτός των φυσικών. Πρωτεΐνες που βρίσκονται στη φύση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημείο έναρξης για την κατασκευή υλικών (Schneider, 2004).

1.2.1 ΤΑ «ΕΞΥΠΝΑ» ΥΛΙΚΑ

Μία μείζων ώθηση στον τομέα του σχεδιασμού βιο-υλικών είναι ο σχεδιασμός προβλέψιμων δομών αυτό-συγκρότησης των οποίων οι μορφολογίες και οι συνδεδεμένες λειτουργίες μπορούν να αλλάξουν ανταποκρινόμενες στο περιβάλλον. Αυτή η ανταπόκριση είναι γνωστή ως «εξυπνάδα» (smartness) και τα υλικά αυτά ως «έξυπνα» (smart) υλικά. Κάποια πεπτίδια σχεδιάζονται έτσι ώστε να αναδιπλώνονται ανταποκρινόμενα σε συγκεκριμένα εξωτερικά ερεθίσματα, υιοθετώντας μία διαμόρφωση

υπαγόμενη σε αυτό-συγκρότηση. Αυτά τα υλικά ανταποκρίνονται στις συνθήκες (pH ή/και θερμοκρασία) του περιβάλλοντος και μπορούν να αποδιαταχθούν, όταν απομακρυνθεί το κατάλληλο ερέθισμα. Με αυτό τον τρόπο έχουν δημιουργηθεί υδρογέλες με γρήγορο και τελείως αναστρέψιμο τρόπο (Schneider, 2004). Ας σημειωθεί ότι η δυνατότητα που προσφέρουν τα πεπτίδια για ενσωμάτωση μη φυσικών αμινοξέων ή μη πεπτιδικών τμημάτων, βοηθούν στην «έξυπνη» συμπεριφορά των υλικών που σχηματίζουν. Όσον αφορά τη δομική «έξυπνάδα», οι δομές που δημιουργούνται από α-έλικες είναι πιο εύκολα αντιστρεπτές από τις δομές με μονάδες β-φύλλων (Fairman and Akerfeldt, 2005).

1.2.2 ΔΟΜΙΚΟΙ ΛΙΘΟΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΙ ΓΙΑ ΑΥΤΟ-ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ

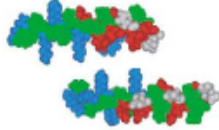
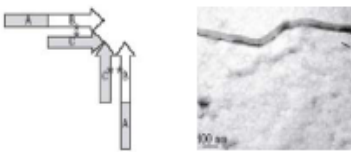
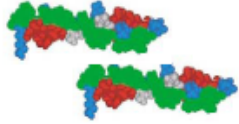
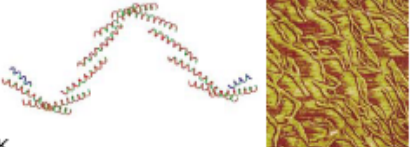

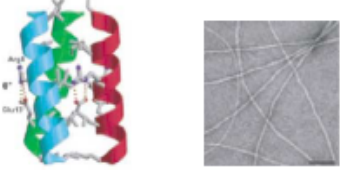


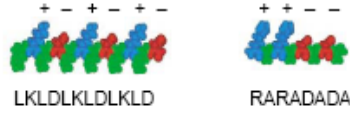

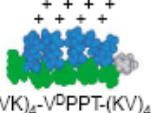
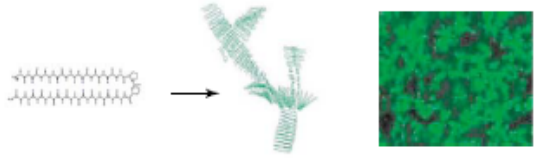
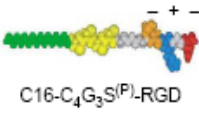



Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα πεπτιδίων που παίζουν σημαντικό δομικό και ρυθμιστικό ρόλο στο σχηματισμό βιο-υλικών όπως ινιδίων και σωληνίσκων, υδρογελών (hydrogels) και 'surfactants'.

ΙΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΣΩΛΗΝΙΣΚΟΙ. Έχουν γίνει πολλές έρευνες για το σχηματισμό ινιδίων από β-φύλλα σε αντίθεση με το σχηματισμό από α-έλικες. Εκεί οι προσπάθειες εστιάζονται στη χρήση δομών coiled-coils με δύο ή πέντε έλικες (Pandya et al., 2000; Potekhin et al., 2001). Έχει παρατηρηθεί ότι σχηματίζοντας εναλλάξ ζευγάρια αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα πεπτίδια των ελίκων γίνεται αυτό-συγκρότηση σε μεγάλη κλίμακα. Ο Woolfson και οι συνεργάτες του δημιούργησαν ινίδια και μικροσωληνίσκους εκμεταλλευόμενοι την εναλλάξ διευθέτηση των ελίκων δύο διαφορετικών πεπτιδίων 28 αμινοξέων. Για να σταθεροποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το ογκώδες αμινοξύ της ασπαραγίνης, το οποίο μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με το ζευγάρι του στην άλλη έλικα. Επίσης έδειξαν ότι προσθήκη αλατιού εμποδίζει την αύξηση του πολυμερισμού και ότι η μορφολογία των ινιδίων μπορεί να ελεγχθεί με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων πεπτιδίων που εισάγουν κάμπεις, διακλαδώσεις και cross-links (εικόνα 5α) (Ryadnov et al., 2003; Smith et al., 2004) Οι Fairman και Akerfeldt έδειξαν πως η αξονική και επίπεδη ανάπτυξη της συγκρότησης είναι πολύ ευαίσθητη στο αλάτι και στη θερμοκρασία και τέλος πως η προσθήκη μικρών πεπτιδίων (έλικες με μόνο

δύο επτάδες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλύμματα (caps) στα άκρα των ινιδίων κι έτσι να σταματήσουν τον πολυμερισμό και να γίνει ρύθμιση του μεγέθους των δομών (Fairman and Akerfeldt, 2005).

ΥΔΡΟΓΕΛΕΣ. Οι γέλες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως «έξυπνα» υλικά διότι μπορούν να ανταποκριθούν σε μία ποικιλία χημικών και φυσικών αλλαγών. Η μετάβαση από υγρό σε γέλη μπορεί να ελεγχθεί με την ιδιότητα του διαλύτη να είναι δότης ηλεκτρονίων, με το pH, τη θερμοκρασία και το αλάτι. Μια σειρά από *de novo* σχεδιασμούς έχει γίνει με αλληλουχίες πλούσιες σε γλουταμίνη (εικόνα 5d) καθώς έχει δειχθεί ότι έχουν ιδιότητες κατάλληλες για το σχηματισμό γελών. Οι υδρογέλες έχουν μεγάλη εφαρμογή στη μηχανική ιστών.

“SURFACTANTS”. Τα πεπτίδια που αυτό-συγκροτούνται μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί για την ανάπτυξη ανόργανης ύλης. Ο Stupp και οι συνεργάτες του σχεδίασαν surfactants πεπτιδικά υβρίδια που αυτό-συγκροτούνται για τη δημιουργία κυλινδρικών μικκυλίων, με διάμετρο 6-8 nm (εικόνα 5g), τα οποία είναι ικανά να κατευθύνουν την επασβεστοποίηση του υδροξυαπατήτη, του κυριότερου συστατικού των οστών, πάνω στην επιφάνειά του. Η διαδικασία της αυτό-συγκρότησης είναι αντιστρεπτή κυρίως με τις αλλαγές του pH. Περαιτέρω έλεγχος μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή τεσσάρων αμινοξέων κυστεΐνης τα οποία χρησιμοποιούνται για ομοιοπολική κάλυψη της δομής επί της οξειδωσης (Hartgerink et al., 2001). Ο Zhang και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν πεπτίδια που αυτό-συγκροτούνται στο νερό παράγοντας νανο-φορείς και νανο-αγωγούς, (εικόνα 5h) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για τη μεταφορά DNA (Zhang et al., 2003)

	Peptide	Model/image
Filaments and fibrils		
(a)	 <p>KIAALKQKIASLKQEIDALEYENDALEQ KIRALKALNAHLKQEIAALEQEIAALEQ</p>	
(b)	 <p>CKQLEDKIEELLSKAACKQLEDKIEELLSK CKQLEDKIEELLSKAACKQLEDKIEELLSK</p>	
(c)	 <p>SIERELEMRIRELEXRIG (i) helix (ii) extended β strand</p>	
Hydrogels		
(d)	 <p>QQKQQQQDQQ QQKFQWQFDQQ</p>	
(e)	 <p>LKLDLKLKLD RARADADA</p>	
(f)	 <p>(VK)₂-V^DPPPT-(KV)₂</p>	
Surfactants		
(g)	 <p>C16-C₄G₃S^(P)-RGD</p>	
(h)	 <p>LLLLLLKK</p>	

Εικόνα 5. Παραδείγματα δομικών λίθων κατάλληλων για αυτο-συγκρότηση (από Fairman and Akerfeldt, 2005)

1.2.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ

Η νανοτεχνολογία αποσκοπεί στην κατασκευή υλικών και λειτουργικών συστημάτων σε νανο-διαστάσεις. Αυτά μπορούν να βρουν εφαρμογές στα συστήματα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων, στη μεταφορά DNA, στη μηχανική ιστών (συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης χόνδρου και της προώθησης της ανάπτυξης νευρικών κυττάρων) και τους βιοαισθητήρες. Η θεμελιώδης πρόκληση της νανοτεχνολογίας είναι η κατασκευή συστημάτων με ποικίλα προβλέψιμα, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. (Rajagopal and Schneider, 2004)

Μία από τις πιο σημαντικές εφαρμογές είναι αυτή στον τομέα χειρουργικής αναδόμησης και της μηχανικής ιστών (tissue engineering) καθώς ένα σημαντικό πλεονέκτημα των συνθετικών υλικών είναι ότι μειώνουν τον κίνδυνο βιολογικής επιμόλυνσης. Συχνά έχουν επιθυμητές ιδιότητες όσον αφορά τη βιοσυμβατότητα, την ανοσογονικότητα και τη βιοαποικοδόμηση καθώς παράγουν μη τοξικά υπολείμματα. Τα πεπτιδικά ικριώματα (peptide scaffolds) φαίνεται να είναι εξαιρετικά εκμαγεία (templates) για την ανάπτυξη λειτουργικών δικτύων νευρικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν ακόμη και ενεργές συνάψεις (Colombo et al. 2007). Ένα άλλο πλεονέκτημα των πεπτιδικών δομών είναι η ικανότητά τους να ενσωματώνουν ποικίλα πεπτιδικά μοτίβα μοριακής αναγνώρισης, τα οποία καθοδηγούν τη χωρική οργάνωση των κυττάρων μέσα στον ιστό (Silva et al., 2004). Επίσης οι νανοδομές παρέχουν ένα περιβάλλον που επιτρέπει την αξονική αναγέννηση του κεντρικού νευρικού συστήματος μετά από τραύμα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι ο σχεδιασμός των υλικών ξεκινάει με τη μελέτη μηχανικής συμπεριφοράς, αναγνωρίζοντας και βελτιστοποιώντας τις ιδιότητες που χρειάζονται για τη δημιουργία σταθερού ικριώματος για αντικατάσταση ή αναγέννηση ιστών. Ακολούθως, οι βιολογικές ιδιότητες των υλικών τροποποιούνται για να ενισχύσουν την ιστο-ειδικότητα, την κυτταρική λειτουργία και τη βιο-συμβατότητα (Maskarinec and Tirrell, 2005).

Άλλες μελέτες χρησιμοποιούν τις νανοδομές για ποικίλες εφαρμογές στον τομέα των βιοαισθητήρων. Τροποποιημένοι πεπτιδικοί νανοσωληνίσκοι χρησιμοποιούνται ευρέως για την κατασκευή ποικίλων αισθητήρων υψηλής

ευαισθησίας. Επίσης, η βιο-συμβατότητα και η χημική ευελιξία αυτών των δομών τα καθιστά χρήσιμα εργαλεία σε τομείς όπως η αναγνώριση ύλης ως αντιγόνου (immunoassays) αλλά και η ηλεκτροχημική ανίχνευση (electrochemical detection) (Colombo et al., 2007). Επιπλέον, είναι σε θέση να αναγνωρίσουν συγκεκριμένους τύπους κυττάρων και να αυτό-οργανωθούν πάνω στην επιφάνεια των βιοαισθητήρων για να σχηματίσουν μονοστιβάδες (Fairman and Akerfeldt, 2005).

Τέλος, αξίζει να προστεθεί ότι τεχνητές πρωτεΐνες που έχουν ELPs (elastin-like polypeptides) αποτελούν μία ομάδα υλικών με φυσικές ιδιότητες που είναι σημαντικά όμοιες με αυτές της φυσικής ελαστίνης (Maskarinec and Tirrell, 2005) και ότι οι κυκλικοί, πεπτιδικόι νανο-σωληνίσκοι, επειδή είναι τοξικοί στα βακτήρια, χρησιμοποιούνται ως νέοι αντιβιοτικοί παράγοντες. Μπορούν επίσης να βρουν εφαρμογή στη μεταφορά φαρμάκων καθώς και την επιστήμη υλικών διότι μπορούν να δημιουργηθούν νέα υλικά με την πυρήνωση ανόργανων υλικών πάνω στις πεπτιδικές δομές (Reches and Gazit, 2006).

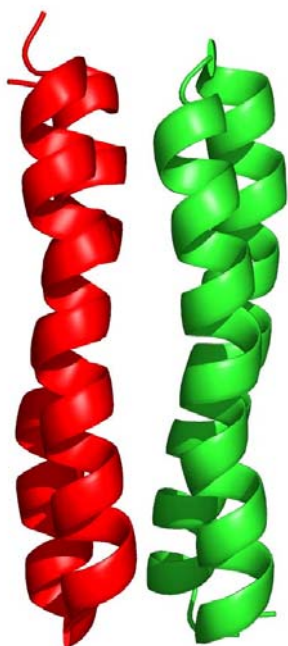
1.3 Η πρωτεΐνη Rop

Η Rop (Repressor of primer) είναι μια μικρή ομοδιμερής πρωτεΐνη. Κάθε μονομερές αποτελείται από 63 κατάλοιπα και το μοριακό βάρος του ομοδιμερούς είναι 14.456Da (Lacatena et al., 1984; Castagnoli et al., 1989). Το γονίδιο *rop* βρίσκεται στα περισσότερα πλασμίδια της οικογένειας των ColE1 πλασμιδίων της *E.coli* και το προϊόν του συμμετέχει στο μηχανισμό που ελέγχει τον αριθμό των αντιγράφων των πλασμιδίων αυτών (Banner et al., 1987; Castagnoli et al., 1989).

Συγκεκριμένα, η Rop αλληλεπιδρά με τα RNA I και RNA II μόρια ελέγχοντας αρνητικά τη συχνότητα των γεγονότων έναρξης της αντιγραφής. Αρχικά το RNA II μόριο υβριδίζεται σε συγκεκριμένη θέση στο DNA, κάτι που είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής και στη συνέχεια το RNA I μόριο και η Rop δρουν ανασταλτικά: Το μεν πρώτο αλληλεπιδρά με το RNA II και δεν επιτρέπει τη συνέχιση της αντιγραφής, η δε Rop λειτουργεί έμμεσα βοηθώντας στη σωστή τοποθέτηση των δυο RNA μορίων (Castagnoli et al., 1989). Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η Rop ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων σε μια θέση υποκινητή όπου προσδένεται ένας RNA εκκινητής

(RNA II) και για αυτό ονομάστηκε Rop (Repressor Of Primer). Ωστόσο, η Rop δε δρα ως κλασικός καταστολέας, αλλά ως ενισχυτής της δράσης του RNA I μορίου, για αυτό συναντάται και με το όνομα Rom (RNA I Modulator) (Castagnoli et al., 1989).

Η δομή της Rop έχει προσδιοριστεί με μεθόδους κρυσταλλογραφίας (Banner et al., 1987) και NMR (Eberle et al. 1991) και παρουσιάζεται στην εικόνα 6. Το μόριο είναι ομοδιμερές και κάθε μονομερές αποτελείται από δυο α-έλικες που συνδέονται με ένα βρόχο (loop) τριών αμινοξέων (Asp30, Ala31 και Asp32). Τα δυο μονομερή σχετίζονται, μεταξύ τους, με έναν διπλό άξονα συμμετρίας. Η Rop είναι ένα παράδειγμα αριστερόστροφου, αντιπαράλληλου 4-α-ελικοειδούς δεματίου (4- α -helix bundle). Άλλες πρωτεΐνες στις οποίες εμφανίζεται το πρότυπο του 4-ελικοειδούς δεματίου είναι η αιμερυθρίνη, η μυοαιμερυθρίνη, το κυτόχρωμα c, το κυτόχρωμα b₅₆₂ και η φερριτίνη (Tooze, 1999).

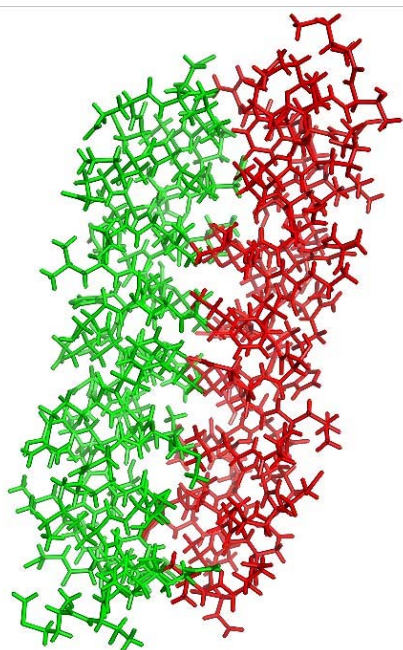


Εικόνα 6. Η δομή της Rop (Banner, Kokkinidis et al., 1987). Τα δυο μονομερή είναι χρωματισμένα κόκκινο και μπλε, αντίστοιχα.. (PDB ID: 1ROP).

Τα α-ελικοειδή δεμάτια, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης Rop, είναι αμφιπαθή, πακετάρονται με αντιπαράλληλο τρόπο και εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο υδρόφοβων και υδρόφιλων αμινοξέων που επαναλαμβάνεται κάθε επτά αμινοξέα. Το μοτίβο αυτό ονομάζεται «μοτίβο επανάληψης της επτάδας» (heptad's pattern repeat) και συνήθως τα αμινοξέα συμβολίζονται με τα γράμματα a-g [(a, b, c, e, f, g)_n] (Cohen, 1986). Το πρώτο

(a) και το τέταρτο (d) κατάλοιπο της επτάδας είναι υδρόφοβα και οι πλευρικές τους ομάδες πακετάρονται προς το εσωτερικό της δομής σύμφωνα με το μοντέλο «κουμπιά σε τρύπες» (“knobs in holes” model) σχηματίζοντας τον υδρόφοβο πυρήνα (Banner et al., 1987). Τα κατάλοιπα που βρίσκονται στη θέση f είναι, κυρίως, υδρόφιλα και περισσότερο εκτεθειμένα στο διάλυμα.

Η επανάληψη της επτάδας στη Rop έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται 8 διακριτές φέτες (slices) (κάθετα στον κατακόρυφο άξονα του ομοδιμερούς) από τις θέσεις a και d που σχηματίζουν τον υδρόφοβο πυρήνα και να δίνεται η εντύπωση της δημιουργίας σκάλας (Εικόνα 7). Η επανάληψη της επτάδας στο μόριο της Rop διακόπτεται μόνο στην περιοχή της στροφής (Πίνακας 1). Αυτή ακριβώς η απόκλιση από το πρότυπο της επτάδας έχει υποτεθεί ότι είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό της στροφής στο μόριο της Rop (Banner et al., 1987; Glykos et al., 2006) και αποτελεί τη βάση για τη δημιουργία ποικίλων μεταλλαγμάτων (Castagnoli et al., 1989; Vlassi et al., 1994; Lassalle and Hinz, 1998; Lassalle et al., 1998; Glykos et al., 2006). Ωστόσο, η Rop δεν είναι η μόνη πρωτεΐνη στην οποία παρατηρείται αυτή η διαταραχή της επτάδας. Άλλες πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες, όπως η μυσίνη και ενδιάμεσα ινίδια εμφανίζουν παρόμοιες αποκλίσεις από το πρότυπο των επαναλήψιμων επτάδων (Banner et al., 1987). Τέλος, αν συμπληρωθεί πως οι δομικές μελέτες στη Rop έχουν δείξει ότι τα τελευταία επτά καρβοξυ-τελικά κατάλοιπα του μονομερούς, είναι πολύ ευκίνητα και δεν εντοπίζονται στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας (Banner et al., 1987) .



Εικόνα 7. Οι 8 φέτες (slices) του υδρόφοβου πυρήνα, που σχηματίζονται από τις θέσεις ‘a’ και ‘d’, δίνουν την εντύπωση σκάλας.

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

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

1.3.1 Η ROP ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η πρωτεΐνη Rop έχει μελετηθεί εκτεταμένα ως προς τον τρόπο με τον οποίο λειτουργεί σε μοριακό επίπεδο και αποτελεί μέρος ενός μηχανισμού-μοντέλου της αντιγραφής των πλασμιδίων. Ωστόσο, μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η δομή της.

Η Rop, όπως περιγράφηκε παραπάνω, είναι το απλούστερο 4-α ελικοειδές δεμάτι με γνωστή δομή σε υψηλή διακριτικότητα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το μικρό της μέγεθος και την ιδιαίτερα κανονική δομή της το καθιστούν ένα ιδανικό φυσικό μοντέλο για τη μελέτη της δομής του δεματίου. 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. Πλήθος μεταλλάξεων έχουν δημιουργηθεί κι έχουν αναλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, NMR, θερμιδομετρία και αντιδράσεις κινητικής. Σε αυτή την παράγραφο, θα εστιάσουμε στις μεταλλάξεις που έγιναν με σκοπό τη μελέτη του ρόλου της στροφής στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης.

Όπως προαναφέρθηκε, η στροφή (ή βρόχος) που σχηματίζεται στο μόριο της Rop αποτελείται από τρία, κυρίως, κατάλοιπα: Asp30, Ala31 και Asp32. Το κατάλοιπο Ala31 ξεχωρίζει όχι μόνο για την ασυνήθιστη γεωμετρία του

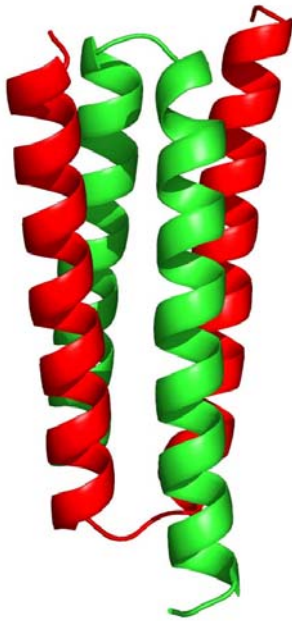
($\phi = -94^\circ$, $\psi = 89^\circ$), αλλά και για το γεγονός ότι είναι το μοναδικό κατάλοιπο που σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και με τις δυο έλικες.

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

Την έρευνα αυτή ήρθε να συμπληρώσει μία προσπάθεια αντικατάστασης του αμινοξέος Asp30 με όλα τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα (Predki et al., 1996). Κρυσταλλογραφικά λύθηκε μόνο η δομή του μεταλλάγματος D30G και φάνηκε να διαφέρει ελάχιστα από τη δομή της wtRop. Το μετάλλαγμα αυτό, καθώς και άλλα 11 μεταλλάγματα ήταν πιο θερμοσταθερά από την wtRop. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι όλα τα μεταλλάγματα είχαν παρόμοια ικανότητα πρόσδεσης RNA με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, κάτι που υποδηλώνει πως η θέση 30 είναι πολύ ανεκτική σε αλλαγές αμινοξέων.

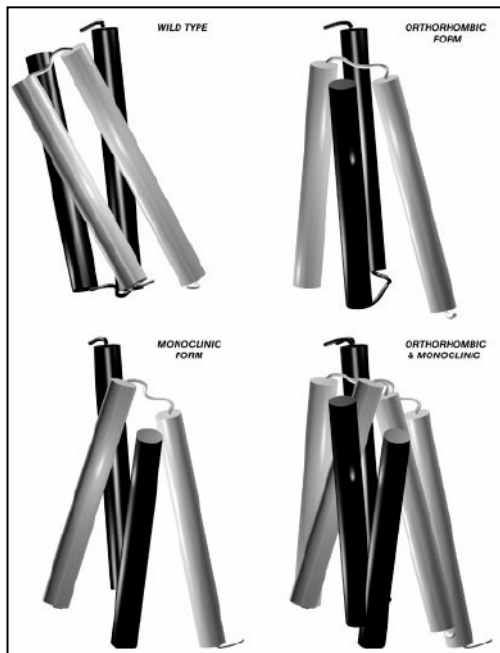
Ωστόσο, μια σημειακή μετάλλαξη στη θέση 31 έδωσε νέες διαστάσεις στο ρόλο των καταλοίπων της στροφής. Η μετάλλαξη A31P σχεδιάστηκε με βάση τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της προλίνης, που είναι πολύ διαφορετικά από αυτά της αλανίνης και δε θα της επέτρεπαν να υιοθετήσει την ιδιαίτερη γεωμετρία αυτής (Glykos and Kokkinidis, 2004). Το μετάλλαγμα αυτό διατηρεί, εν μέρει, την ικανότητα να δεσμεύει το RNA υπόστρωμά του, ωστόσο είναι τελείως διαφορετικό από την wtRop σε άλλους τομείς, είναι για παράδειγμα πολύ πιο ασταθές μόριο από την wtRop. Η δομή της A31P προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά (Glykos et al., 1999) και παρουσιάζεται στην εικόνα 8. Όπως φαίνεται, η διευθέτηση των α-ελίκων έχει αλλάξει τελείως σε σχέση με την wtRop και το μόριο έχει αποκτήσει διχοτόμο U τοπολογία (bisecting U topology) (Glykos et al., 1999). Η πρωτεΐνη έχει μετατραπεί από αριστερόστροφο, αντιπαράλληλο δεμάτιο σε δεξιόστροφο δεμάτιο, με κάθε

έλικα να περιβάλλεται από μία παράλληλη και μία αντιπαράλληλη έλικα. Εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στην A31P έχει αλλάξει και η στροφή: Στο νέο μόριο, η γωνία ανάμεσα στις δύο έλικες του κάθε μονομερούς έχει αυξηθεί κατά 16° και η στροφή ξεκινά από το κατάλοιπο Asn27 και τελειώνει στο Asp30, ενώ η Pro31, που βρίσκεται σε trans διαμόρφωση, δε συμμετέχει άμεσα στο σχηματισμό της στροφής (Glykos et al., 1999).



Εικόνα 8. Η δομή της A31P Rop (Glykos et al., 1999). Η τοπολογία της πρωτεΐνης έχει αλλάξει δραστικά με μια σημειακή μετάλλαξη. (PDB ID: 1B6Q, 1GMG).

Το μετάλλαγμα αυτό παρουσιάζει δυο, μερικώς, διαφορετικές διαμορφώσεις (εικόνα 9) και φαίνεται να αποτελεί μια κατάσταση “molten globule”, στην οποία έχει παγιδευτεί, ενεργειακά, το δεμάτιο της Rop. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από τις θερμοδυναμικές μελέτες του μεταλλάγματος, από την ύπαρξη ενός χαλαρά πακεταρισμένου υδρόφοβου πυρήνα, μίας μεγάλης και συνεχόμενης υδρόφοβης κοιλότητας στο μέσο του εσωτερικού της πρωτεΐνης και από τη μεγάλη μείωση της σταθερότητας του μορίου σε σχέση με την wtRop (Glykos and Kokkinidis, 2004). Οι μελέτες πάνω σε αυτό το μετάλλαγμα δείχνουν ότι μία, μόνο, σημειακή μετάλλαξη είναι ικανή να αλλάξει πλήρως τη διαμόρφωση ενός μορίου και ότι, στην περίπτωση της Rop, υπάρχει κάποια δομική πληροφορία στην περιοχή της στροφής.



Εικόνα 9. Η A31P Rop κρυστάλλωσε σε δυο διαφορετικές συνθήκες και σε δυο διαφορετικές διαμορφώσεις (ορθορομβική και μονοκλινής), οι οποίες διαφέρουν τόσο ώστε όταν διατηρείται σταθερή μια έλικα (ο κύλινδρος στο βάθος) οι υπόλοιπες έλικες δεν συμπίπτουν (Εικόνα από Glykos and Kokkinidis, 2004).

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

1.3.2 Η ROP ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε, η Rop έχει αποτελέσει μοντέλο για τη μελέτη της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και γι' αυτό το λόγο έχει τύχει πολλών μεταλλάξεων. Τρεις από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν δώσει μόρια με τελείως διαφορετικές διαμορφώσεις και σημαντικές διαφορές στους υδρόφοβους πυρήνες (εικόνα 10). Αυτά είναι: το μετάλλαγμα A31P, το μετάλλαγμα RM6 στο οποίο αφαιρέθηκαν πέντε αμινοξέα (30-34) από την περιοχή της στροφής με σκοπό την αποκατάσταση της επτάδας σε εκείνο το σημείο (Glykos et al., 2006) και το μετάλλαγμα A₂I₂-6 στο οποίο μεταλλάχθηκαν όλα τα αμινοξέα

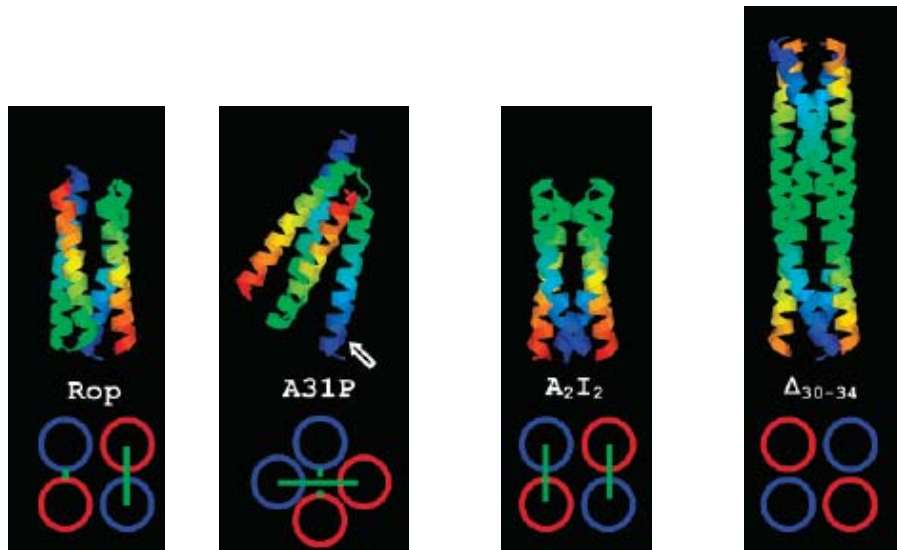
που βρίσκονται στη θέση 'a' με Ala και όλα τα αμινοξέα της θέσης 'd' με Ile (Willis et al., 2000).

Στην παράγραφο 1.3 σημειώθηκε πως στη δομή της wtRop σχηματίζονται οκτώ διακριτές φέτες από τα αμινοξέα στις θέσεις 'a' και 'd' τα οποία παρουσιάζουν συμμετρία ανά ζευγάρια (το 4^ο με το 5^ο, το 3^ο με το 6^ο κ.τ.λ.). Στην δομή της A31P, παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν μόνο έξι διακριτές φέτες και από αυτές, οι δύο «ακριανές» (κοντινές στη στροφή) αποτελούνται μόνο από τρία αμινοξέα. Επίσης, τα επίπεδα των φύλλων είναι πολύ γυρτά (tilted) σε σχέση με τον άξονα του δεματίου (στην wtRop τα επίπεδα είναι κάθετα στον άξονα). Επιπροσθέτως, αν και υπάρχει η περιοδικότητα της επτάδας, η κατανομή των αμινοξέων στα φύλλα είναι πολύ διαφορετική από αυτή στη wtRop ('adad'). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η ύπαρξη μιας μεγάλης, συνεχόμενης κοιλότητας στο εσωτερικό της δομής.

Το μετάλλαγμα RM6 έχει μετατραπεί από ομοδιμερές σε ομοτετραμερές μόριο χωρίς στροφές. Σε αυτή τη δομή υπάρχουν δεκατέσσερις διακριτές φέτες οι οποίες διατηρούν την κατανομή "adad", ωστόσο είναι άξιο παρατήρησης ότι οι εσωτερικές φέτες είναι πλούσιες σε ογκώδεις πλευρικές ομάδες οι οποίες προκαλούν μία διόγκωση στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Τέλος η μέση του δεματίου είναι αρνητικά φορτισμένη, ενώ οι άκρες του θετικά φορτισμένες, κάτι τελείως διαφορετικό από την wtRop όπου παρατηρείται η ύπαρξη δύο ξεχωριστών επιφανειών (μπροστά και πίσω), μία θετικά φορτισμένη και μία αρνητικά.

Το μετάλλαγμα A₂I₂-6 είναι διμερές που σχηματίζει ένα αντιπαράλληλο 4-α-ελικοειδές δεμάτιο, όμως υπάρχει μία στροφή του ενός μονομερούς κατά 180^ο τοποθετώντας και τις δύο στροφές από την ίδια πλευρά. Σε αυτή τη δομή, οι οκτώ επίπεδες φέτες μετατράπηκαν σε οκτώ κλιμακωτές (staggered) φέτες προκαλώντας πιο σφιχτό πακετάρισμα του υδρόφοβου πυρήνα.

Λαμβάνοντας υπόψη όλες τις δομικά μελετημένες μεταλλάξεις της Rop και κυρίως τις τρεις που παρουσιάστηκαν παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι αυτή η πρωτεΐνη παρουσιάζει μία σημαντική δομική ευπλασία. Η συνεχώς αυξανόμενη βάση δεδομένων των μεταλλάξεων της Rop δημιουργεί τη βάση για τη χρήση αυτής της «εύπλαστης» πρωτεΐνης ως ένα νέο βιοϋλικό για το σχεδιασμό nano-νηματίων (nano-filaments) και άλλων nano-δομών.



Εικόνα 10. Οι δομές των: wtRop (PDB entry 1rop), A31P (PDB entry 1b6a), A₂I₂-6 (PDB entry 1f4n) και RM6 (PDB entry 1qx8). Η χρωματική διαβάθμιση κυμαίνεται από μπλε για το N-τελικό άκρο και κόκκινο για το C-τελικό άκρο. Στα τοπολογικά σχήματα, κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε μία έλικα με το χρώμα να υποδηλώνει τη σχετική διεύθυνση των ελίκων. Οι στροφές αναπαριστώνται με τις πράσινες γραμμές. (Από Glykos et al., 2006)

1.4 Σκοπός της εργασίας

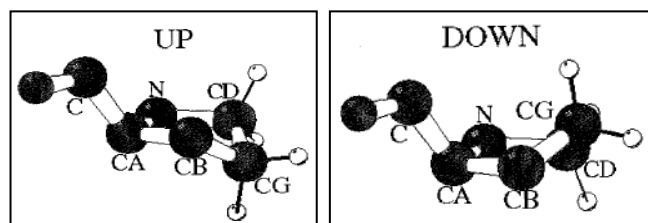
Στο πεδίο της νανο-τεχνολογίας, ο τομέας της τεχνολογίας υλικών είναι γοργά εξελισσόμενος και για την εξέλιξή του είναι σημαντική η κατανόηση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Σε αυτή την εργασία έγινε μία προσπάθεια προσέγγισης του προβλήματος της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα διαλεύκανσης του ρόλου των στροφών-βρόγχων σε αυτή τη διαδικασία. Είναι μία ακόμη προσπάθεια να απαντηθεί το ερώτημα: Παίζουν οι στροφές κάποιο ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, φέρνοντας κοντά αναδιπλωμένα τμήματα των πρωτεϊνών ή ο ρόλος τους είναι πιο παθητικός;

Η μελέτη του μεταλλάγματος A31P αποτέλεσε τη βάση για το σχεδιασμό της μετάλλαξης αυτής της εργασίας. Για να διαφωτιστεί λοιπόν, ακόμη περισσότερο ο ρόλος της στροφής, σχεδιάστηκαν στο εργαστήριό μας δυο μεταλλάξεις στη στροφή της Rop: Η μετάλλαξη D30PA31P (Rop PP) και η D30GA31P (Rop GP). Συμπληρωματική σε αυτές είναι η μετάλλαξη που σχεδιάστηκε και μελετήθηκε σε αυτή την εργασία, η **D30PA31G (Rop PG)**.

Η προλίνη είναι ένα ιδιαίτερο αμινοξύ, καθώς η πλευρική της ομάδα ενώνεται με την κύρια αλυσίδα σχηματίζοντας έναν πυρρολιδικό δακτύλιο.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η προλίνη να είναι το αμινοξύ με τη μικρότερη ελευθερία διαμόρφωσης, περιορίζοντας κατά πολύ τις δυνατές διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει. Το κατάλοιπο Asp30 στην αγρίου τύπου Rop έχει γωνίες $\phi = 57.32^\circ$ και $\psi = 37.65^\circ$, οι οποίες είναι αρκετά διαφορετικές από αυτές της α -έλικας. Στην A31P Rop, το ίδιο κατάλοιπο υιοθετεί τελείως διαφορετικές γωνίες ($\phi = -74.02^\circ$ και $\psi = 157.08^\circ$). Οι παραπάνω τιμές απέχουν αρκετά από αυτές που μπορεί να υιοθετήσει η προλίνη, της οποίας η γωνία ϕ περιορίζεται, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, σε τιμές $\sim -60^\circ$. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι η προλίνη συναντάται πολύ συχνά σε cis διαμόρφωση. Αν και, θεωρητικά, η cis διαμόρφωση είναι δυνατή και για τα υπόλοιπα αμινοξέα, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται. Ας συμπληρωθεί πως ο πυρρολιδικός δακτύλιος της προλίνης μπορεί να λάβει δύο διαμορφώσεις (Εικόνα 11), την «UP», αν ο C^γ και ο C δεν βρίσκονται από την ίδια πλευρά του επιπέδου που σχηματίζει ο δακτύλιος, και «DOWN» αν βρίσκονται από την ίδια πλευρά του επιπέδου (Chakrabarti and Chakrabarti, 1998). Βρέθηκε πως η προλίνη, όταν βρίσκεται στο εσωτερικό μίας α -έλικας δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου, του τύπου C-H...O, με τα γειτονικά της αμινοξέα, μέσω του C^δ. Η επιλογή της «UP» ή «DOWN» διαμόρφωσης ελέγχεται από την ανάγκη ιδανικής γεωμετρίας του δεσμού C-H...O.

Εικόνα 11. «UP» και «DOWN» διαμόρφωση της προλίνης. (από Chakrabarti and Chakrabarti, 1998)



Η γλυκίνη έχει ως πλευρική ομάδα ένα μόνο υδρογόνο και σε αντίθεση με την προλίνη, είναι το αμινοξύ με τη μεγαλύτερη ελευθερία διαμόρφωσης, επιτρέποντας ένα μεγάλο αριθμό στερεοχημικών διαμορφώσεων.

Καθώς, όπως έχει υποθεθεί, η πρωτεΐνη A31P Rop αποτελεί μια κατάσταση «molten globule», στην οποία έχει παγιδευτεί ενεργειακά το μόριο, το ερώτημα στο οποίο αναμένεται να δώσουν απάντηση τα νέα μεταλλάγματα και το Rop PG είναι αν η γλυκίνη σε «συνεργασία» με την προλίνη, θα μπορούσαν να επιτρέψουν στην πρωτεΐνη να υπερβεί την «ενεργειακή παγίδα» (τοπικό ελάχιστο) στην οποία έχει μεταπέσει και, έτσι, το μόριο να

οδηγηθεί σε άλλα μονοπάτια και σε πιο εγγενείς διαμορφώσεις. Επίσης, σε συνδυασμό με τη μελέτη του μεταλλάγματος D30GA31P θα δοθούν στοιχεία για το αν η επίδραση της στροφής στην πορεία αναδίπλωσης της Rop εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων ή/και από τη συγκεκριμένη θέση τους.

Επιπροσθέτως, η «ευπλασία» που παρατηρήθηκε στο μόριο της Rop, μας έδωσε το ερέθισμα να δοκιμάσουμε αυτή την πρωτεΐνη ως βασικό δομικό υλικό για τη δημιουργία νανο-δομών.

Χρησιμοποιώντας το μετάλλαγμα RM6 της Rop που αποτελείται από τέσσερις αλυσίδες συνεχόμενων α-ελίκων (χωρίς στροφές) και στηριζόμενοι στο ότι ο πολυμερισμός των πρωτεϊνών διευκολύνεται από την ύπαρξη «κολλωδών άκρων» (Pandya et al., 2000), προσπαθήσαμε να τα δημιουργήσουμε στο RM6. Ένας ασφαλής τρόπος σχηματισμού αυτών των άκρων είναι η ύπαρξη κάμψης στις α-έλικες ούτως ώστε να μη δημιουργηθεί ένας ενιαίος υδρόφοβος πυρήνας του μορίου. Το ένα τμήμα της α-έλικας να δημιουργεί υδρόφοβο πυρήνα με άλλες τρεις α-έλικες και το υπόλοιπο, αυτό που συνεχίζει μετά την κάμψη, να δημιουργεί υδρόφοβο πυρήνα με τρεις άλλες α-έλικες. Αυτές με τη σειρά τους θα έχουν τμήματα της αλυσίδας τους, μετά την κάμψη, που θα είναι «ελεύθερα» να προσελκύσουν άλλες τρεις α-έλικες για τη δημιουργία υδρόφοβου πυρήνα κ.ο.κ.

Για το σχηματισμό κάμψης στις αλυσίδες του RM6, δημιουργήθηκαν μεταλλάξεις με την εισαγωγή καταλοίπων προλίνης, καθώς είναι γνωστό πως προκαλούν κάμψη των α-ελίκων όταν βρεθούν μέσα σε αυτές. Στο πρώτο μετάλλαγμα εισήχθη ένα κατάλοιπο προλίνης σε ένα σημείο της πρωτεΐνης ώστε να δημιουργηθεί το μοτίβο SxP, το οποίο προκαλεί μεγαλύτερη και πιο σταθερή κάμψη (Deuri, 2004). Αυτό το σημείο ήταν στη θέση 19 (Ser17, x18, Pro19). Στη θέση 19 υπήρχε μία θρεονίνη η οποία κατείχε θέση 'a' στο μοτίβο της επτάδας. Για να μην επηρεαστεί αυτό το μοτίβο έγινε σημειακή μετάλλαξη της Thr19→ Pro. Το μετάλλαγμα ονομάστηκε **RM6-T19P**. Με αυτό το μετάλλαγμα όμως η κάμψη δεν θα ήταν ακριβώς στη μέση της αλυσίδας και ίσως αυτό προκαλούσε πρόβλημα καθώς δε θα υπήρχε μέγιστη συμπληρωματικότητα μεταξύ των τμημάτων (πριν και μετά την κάμψη) κατά τον πολυμερισμό.

Αυτή η πιθανότητα οδήγησε στη δημιουργία ενός ακόμη μεταλλάγματος κατά το οποίο εισήχθηκε ένα κατάλοιπο προλίνης ακριβώς στο μέσο της αλυσίδας. Συγκεκριμένα εισήχθηκε μία προλίνη μετά τη Leu29 και πριν την Ala30 (για το RM6 και Ala35 για την wtRop) η οποία κατείχε θέση 'e' στο μοτίβο της επτάδας. Το μετάλλαγμα αυτό ονομάστηκε **RM6-P30**, αφού η προλίνη που εισήχθηκε κατέχει πλέον τη θέση 30 στο νέο μετάλλαγμα.

2 Αποτελέσματα

2.1 Η μετάλλαξη Rop PG

Το μετάλλαγμα RopPG σχεδιάστηκε με σκοπό τη συμβολή στη διαλεύκανση του ρόλου της στροφής στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Μετά τη δημιουργία της μετάλλαξης, την απομόνωση και τον καθαρισμό του μεταλλάγματος, επιτυχήθηκε η κρυστάλλωση και τελικά δομική μελέτη του.

2.1.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ

Η μετάλλαξη Rop PG έγινε με το κιτ μεταλλαξογένεσης της Stratagene, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την ήδη υπάρχουσα μετάλλαξη Rop PP. Το γονίδιο του Rop PP ήταν κλωνοποιημένο στο φορέα κλωνοποίησης pET26b(+). Για τη μεταλλαξογένεση, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

5'-3' GAG AAA CTC AAC GAG CTG CCC GGT GAT GAA CAG GCA GAC

5'-3' GTC TGC CTG TTC ATC ACC GGG CAG CTC GTT GAG TTT CTC

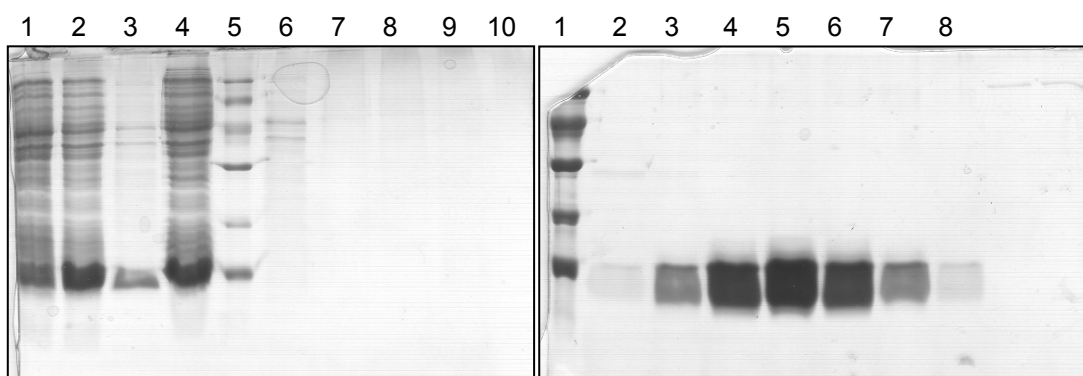
Με τα μεταλλαγμένα πλέον γονίδια έγινε μετασχηματισμός κυττάρων XL1-blue. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν απομονώθηκε DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep) και ελέγχθηκε η αλληλούχισή τους για να πιστοποιηθεί ότι η μετάλλαξη ήταν επιτυχής. Με τους επιτυχημένους κλώνους μετασχηματίστηκαν κύτταρα BL21(DE3) (*E. coli*) και ακολούθησε έκφραση (παράγραφος 4.10) και παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα.

Ας σημειωθεί ότι ο φορέας κλωνοποίησης pET26b(+), προσθέτει ένα εξαϊστιδινικό επίτοπο (6-His tag) στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Όπως έχει προαναφερθεί, τα τελευταία επτά καρβοξυ-τελικά κατάλοιπα του μονομερούς της Rop είναι πολύ ευκίνητα και δεν εντοπίζονται στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Έτσι, το καρβοξυ-τελικό τμήμα της Rop κρίνεται ως το πλέον κατάλληλο για την ενσωμάτωση του εξαϊστιδινικού επιτόπου.

2.1.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ

Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός σε μεγάλη κλίμακα με χρωματογραφία συγγένειας (κολώνα Ni-NTA) και χρωματογραφία στήλης με συνθήκες που είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στα μεταλλάγματα Rop PP και Rop GP (παράγραφος 4.11). Ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης αποθηκεύθηκε στους 4°C (όπου παραμένει σταθερή για αρκετές εβδομάδες), ενώ το υπόλοιπο πρωτεϊνικό δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C για μακρόχρονη φύλαξη.

Στις εικόνες 12 φαίνεται η ηλεκτροφορητική ανάλυση με SDS-PAGE των βημάτων καθαρισμού της 6His-Tag Rop PG, από την κολώνα Ni-NTA. Όπως φαίνεται, η Rop PG παράγεται σε μεγάλες ποσότητες (~35mg/ml). Η προσθήκη του εξαϊστιδινικού επιτόπου και των δυο καταλοίπων του φορέα (λόγω του τρόπου κλωνοποίησης) οδηγεί στην παραγωγή ενός μορίου με 71 κατάλοιπα, που έχει μοριακό βάρος μονομερούς ~ 8.000 Da.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των διαφόρων σταδίων καθαρισμού σε 15% SDS-PAGE. 1. Κυτταρικό εκχύλισμα πριν την προσθήκη IPTG (non-induced), 2. Κυτταρικό εκχύλισμα μετά την προσθήκη IPTG (induced), 3. Δείγμα από το μη διαλυτό μέρος των κυττάρων, 4. Δείγμα από το υπερκείμενο που φορτώθηκε στην κολώνα Ni-NTA, 5. Μάρτυρας, 6. Δείγμα από το εκλουόμενο διάλυμα μετά το φόρτωμα της κολόνας (FT), 7. Δείγμα από το διάλυμα έκπλυσης 1 (W1), 8. Δείγμα από το διάλυμα έκπλυσης 2 (W2), 9. Δείγμα από το κλάσμα έκλυσης 1 (E1), 10. Δείγμα από το κλάσμα έκλυσης 2 (E2), 1. Μάρτυρας (αριστερά τα Μοριακά Βάρη σε kDa), 2-8. Δείγμα από τα κλάσματα έκλυσης 3-9 (E3-E9).

Στη συνέχεια τα πιο καθαρά και με μεγαλύτερη συγκέντρωση κλάσματα καθαρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (βαθμονομημένη κολώνα μοριακής διήθησης- Gel Filtration).

2.1.3. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

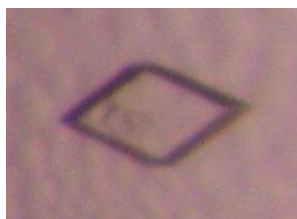
Για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διάχυσης ατμών με τη χρήση της τεχνικής της κρεμαστής σταγόνας (παράγραφος 4.16). Αρχικά εξετάστηκαν οι συνθήκες στις οποίες έχουν κρυσταλλώσει διάφορα μεταλλάγματα της Rop, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες έχει κρυσταλλώσει η wtRop (Kokkinidis et al., 1993). Χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη που είχε διατηρηθεί στους 4°C και τα πιάτα κρυσταλλώσεων διατηρήθηκαν στους 18°C, χωρίς να διαταραχθούν.

Στις επόμενες προσπάθειες, δοκιμάστηκαν συνθήκες με αυξανόμενη συγκέντρωση μεθανόλης (25-50%) σε σχέση με αυξανόμενη τιμή pH (4.0-8.0). Μετά από τρεις μέρες παρατηρήθηκαν μικροί κρύσταλλοι σε συνθήκες: pH 7.4 (0,05M HEPES) και 35, 40, 45, 50% μεθανόλη και 0,1M NaCl. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10mg/ml.

Ακολούθησαν προσπάθειες βελτίωσης των συνθηκών αυτών με διαφορετική συγκέντρωση πρωτεΐνης, διαφορετικό αλάτι και διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού. Τελικά οι καλύτερες συνθήκες ήταν:

1. 10 mg/ml πρωτεΐνη	2. 14 mg/ml πρωτεΐνη	3. 14 mg/ml πρωτεΐνη
pH 7.2 και 7.4	pH 6.4 και 6.6	pH 6.6
0,05 M HEPES	0,05M MES, HEPES	0,05M HEPES
40 και 50% MeOH	45% MeOH	35 και 40% MeOH
100mM NaCl	100mM NaCl	100mM Li ₂ SO ₄

Οι κρύσταλλοι από τις δύο πρώτες συνθήκες ήταν πιο μικροί αλλά και πιο σταθεροί (εικόνα 13). Οι κρύσταλλοι από Li₂SO₄ έβγαιναν σε τρεις μέρες άλλα μέσα σε οκτώ μέρες άρχισαν να χαλούν.



Εικόνα 13.
Κρύσταλλοι της Rop PG από τις δύο πρώτες συνθήκες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι βρέθηκαν κρύσταλλοι μετά από τέσσερις μήνες σε συνθήκες:

10 mg/ml πρωτεΐνη

pH 5.6 (acetate), 6.0 και 6.4 (MES)
0,05 M
40 και 50% MeOH
100mM NaCl

2.1.4 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΛΥΣΗ ΔΟΜΗΣ

Για τη λύση της δομής συλλέχθηκαν δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ από κρύσταλλο στις συνθήκες '2' (παράγραφος 2.1.3). Χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία συγχροτρονίου στο ευρωπαϊκό συγχροτρόνιο DESY, του EMBL, στο Αμβούργο και συγκεκριμένα η γραμμή ακτινοβολίας X11. Οι κρύσταλλοι ψύχονταν, κατά την ακτινοβολία, με συνεχές ρεύμα αζώτου στους -170°C , χρησιμοποιώντας 35%PEG για την προστασία τους (cryo-protection). Λήφθηκαν 240 εικόνες με περιστροφή $0,75^{\circ}$, ανάλυση $1,4 \text{ \AA}$ και σε μήκος κύματος $0,817 \text{ \AA}$.

Space group	P2 ₁
Cell dimensions (Å)	$a = 22,6$ $b = 38,8$ $c = 56,6$ $\beta = 100,8^{\circ}$
Resolution range (Å)	50 – 1,4
Wilson B-factor (Å²)	22.123
No. of observations	413.525
No. of unique reflections	22.394
Completeness (%)	99,5 (97,7)
Rsym (%)	5.4 (39,1)
I/σ (I)	21.6 (2,3)
No. of molecules/a.u	2

Πίνακας 2. Στατιστικά στοιχεία από τη συλλογή δεδομένων. Στην παρένθεση βρίσκονται οι τιμές από το πιο υψηλό shell διακριτικότητας (1,45-1,4)

αλλά τελικά η δομή του μεταλλάγματος Rop PG λύθηκε χρησιμοποιώντας ως μοντέλο τη δομή της wt Rop.

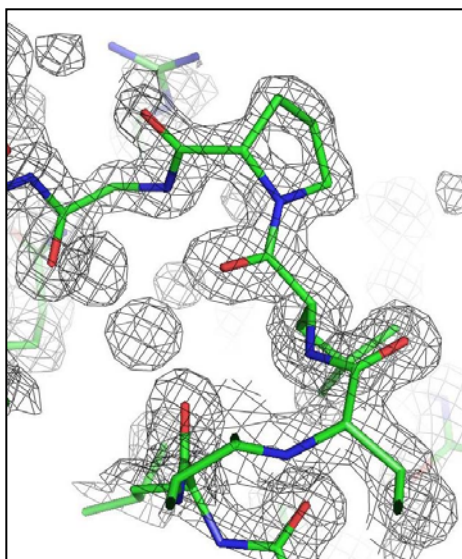
Ο υπολογισμός των εντάσεων (διαδικασία integration, merging, scaling) με τα προγράμματα του HKL (XdisplayF, Denzo, Scalepack). Το πρόγραμμα TRUNCATE (από CCP4i) χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή των εντάσεων σε παράγοντες δομής και το MATTHEWS_COEFF για τον καθορισμό του συντελεστή Matthews. Οι αρχικές φάσεις καθορίστηκαν με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης με το πρόγραμμα PHASER (CCP4i). Η δομή πολλών μεταλλάξεων καθώς και της wt Rop δοκιμάστηκαν ως μοντέλα

Στη συνέχεια η δομή βελτιώθηκε με το πρόγραμμα REFMAC (CCP4i) και τα μοντέλα οπτικοποιήθηκαν με τα προγράμματα XtalView και PyMol. Η ποιότητα της δομής ελέγχθηκε με το πρόγραμμα PROCHECK και τέλος σύγκριση των δομών έγινε χρησιμοποιώντας τον server SSM (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>).

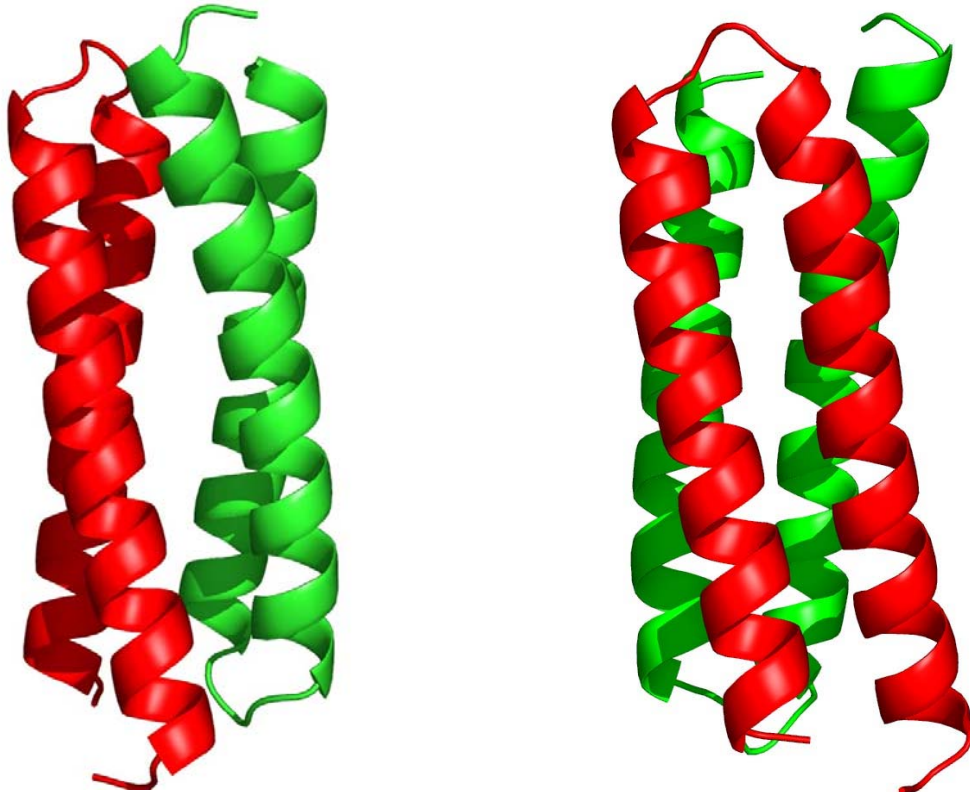
Resolution range (Å)	18.5 - 1.4
No. of reflections in working set	22,506
No. of reflections in test set (5%)	1,125
Protein atoms	904
Water molecules	156
R/Rfree (%)	17,5 / 19,1

Πίνακας 3. Στατιστικά στοιχεία από τη βελτιστοποίηση της δομής

Στην εικόνα 14 φαίνεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας όπου εικονογραφείται η καλή ποιότητα του καθορισμού των φάσεων και της τελικής δομής του μεταλλάγματος Rop PG (εικόνα 15).



Εικόνα 14. Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην στροφή της Α αλυσίδας του μεταλλάγματος Rop PG. Καθορίζεται πολύ καλά μέχρι και η θέση του πυρολιδικού δακτυλίου της προλίνης.

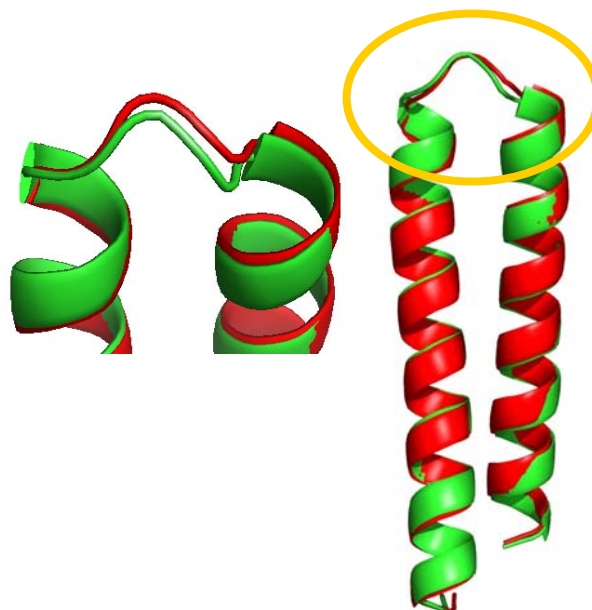


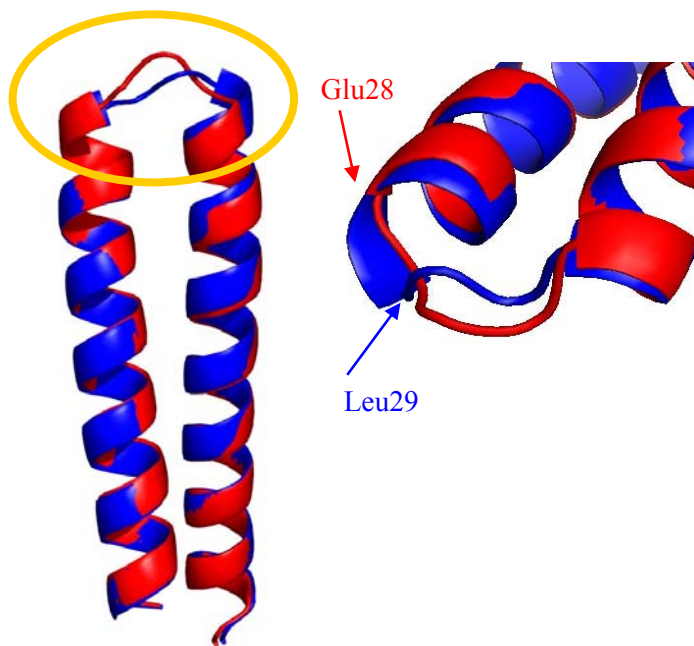
Εικόνα 15. Απεικόνιση της δομής του διμερούς μορίου της Rop PG. Δύο όψεις. Με κόκκινο είναι χρωματισμένη η αλυσίδα A και με πράσινο η αλυσίδα B.

Η δομή του διμερούς Rop PG είναι σε ένα μεγάλο ποσοστό ίδια με αυτή της wt Rop. Η διαφορά τους έγκειται στο ότι:

- 1) οι δύο αλυσίδες της Rop PG δεν είναι πανομοιότυπες (εικόνα 16) και
- 2) η στροφή της Rop PG είναι πιο χαλαρή και μεγαλύτερη κατά ένα αμινοξύ (εικόνα 17).

Εικόνα 16. Απεικόνιση της σύγκρισης των δύο αλυσίδων της Rop PG.
 α) Με κόκκινο είναι χρωματισμένη η A αλυσίδα και με πράσινο η B.
 β) Εστίαση στην περιοχή της στροφής όπου υπάρχει η μεγαλύτερη διαφορά στις δύο έλικες.





Εικόνα 17. Απεικόνιση της σύγκρισης των δύο A αλυσίδων των Rop PG και wtRop.
 α) Με κόκκινο η A αλυσίδα της Rop PG και με μπλε η A αλυσίδα της wt Rop.
 β) Εστίαση στη στροφή. Η στροφή της Rop PG αρχίζει με το Glu 28 ενώ της wt Rop στο Leu 29.

2.1.5 ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΣ (CD)

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

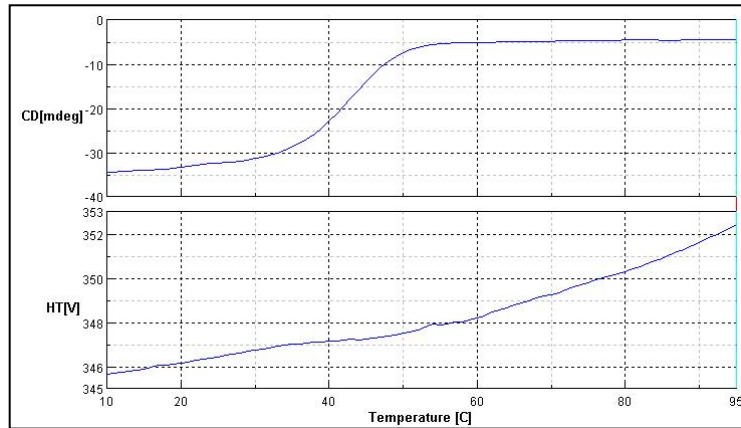
α. Ο λόγος σήμα/θόρυβος (signal/noise ratio, S/N) θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερος. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με τη χρήση κατάλληλου πρωτεϊνικού διαλύματος. Τα συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα απορροφούν αρκετά έντονα στο άπω-υπεριώδες με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου S/N. Έτσι, είναι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

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

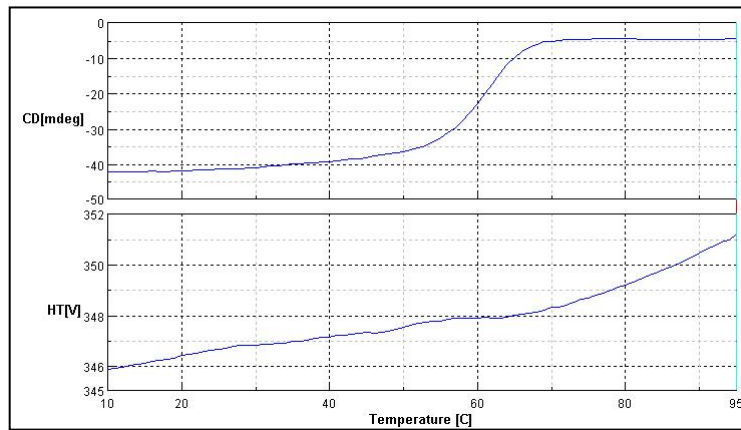
χαμηλές περιοχές του άπω-υπεριώδους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, τα φάσματα του κυκλικού διχρωισμού περιέχουν πληροφορία δευτεροταγούς δομής μέχρι και τα 185-190nm.

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

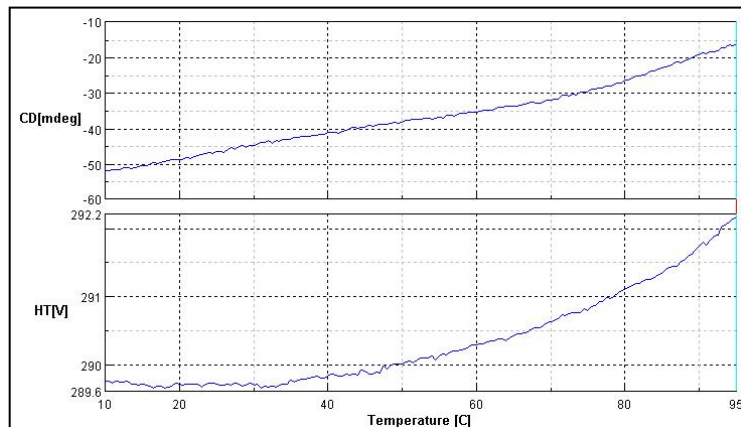
Στη συγκεκριμένη εργασία, για τη μελέτη σταθερότητας του μεταλλάγματος, η θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών (Rop PG, wtRop) έγινε με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 10°C μέχρι τους 95°C με ταχύτητα 80°C/h και συνεχή μέτρηση του φάσματος στα 222nm, καθώς το συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι χαρακτηριστικό για την α -έλικα και χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Οι μετρήσεις έγιναν σε κυψελίδα μήκους 0.1cm και τα πρωτεϊνικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 0,3 mg/ml σε 10mM PO_4^- pH 7.0, 10mM Na_2SO_4 , 1mM EDTA pH 8.0. Τα φάσματα από τη θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών φαίνονται παρακάτω, στην εικόνα 18. Όλες οι μετρήσεις της A31P, που παρουσιάζονται παρακάτω, έγιναν στις ίδιες συνθήκες με τις παραπάνω, κατά τη μεταπτυχιακή εργασία του Γ. Φελλά.



Rop PG



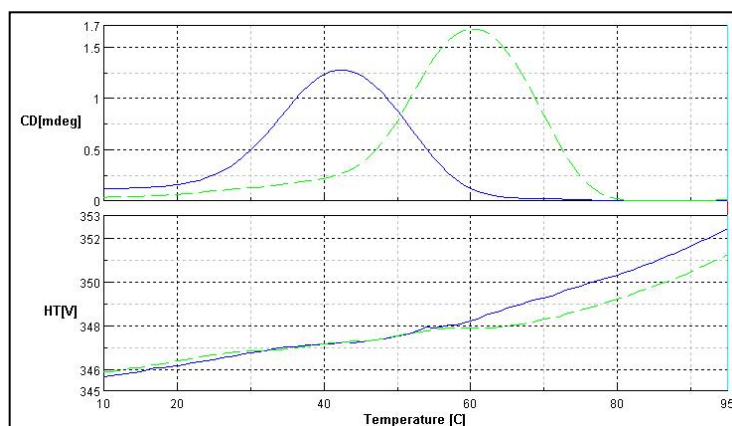
wt Rop



A31P

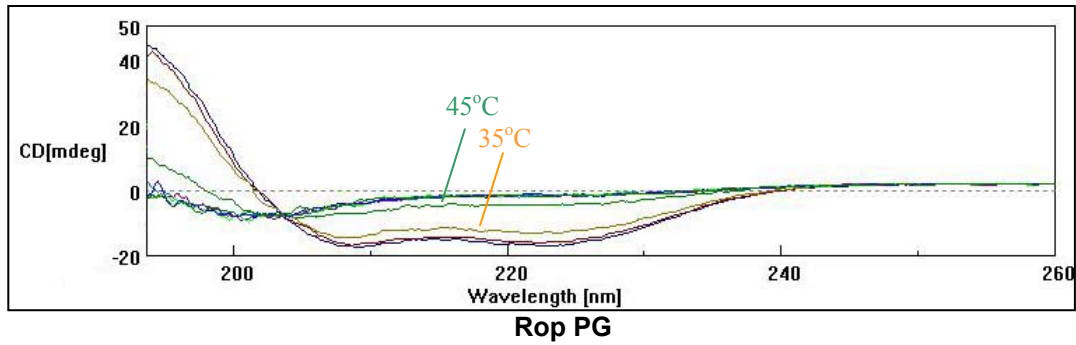
Εικόνα 18. Γραφήματα από τη θερμική μετουσίωση των Rop PG, wt Rop και A31P. Η αύξηση της θερμοκρασίας έγινε από τους 10°C στους 95°C με ταχύτητα 80°C/h. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η καταγραφή του φάσματος στα 222nm σε μονάδες mdeg. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η μεταβολή της υψηλής τάσης που εφαρμόζεται στην κυψελίδα. Αυτή η τιμή πρέπει να είναι <600V .

Το φάσμα της Rop PG καταγράφεται ως σιγμοειδής καμπύλη, όπως και της wtRop. Αυτή η καμπύλη είναι χαρακτηριστική για τη μεταφορά από την αναδιπλωμένη στη μετουσιωμένη πρωτεΐνη, με άλλα λόγια γίνεται μετουσίωση της πρωτεΐνης σε δύο στάδια, χωρίς ενδιάμεσες καταστάσεις. Η επίλυση ως προς τις παραγώγους 1^{ου} βαθμού παράγει τη θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης και στη συγκεκριμένη περίπτωση η θερμοκρασία τήξης της wtRop είναι T_m= 60°C, που είναι συγκρίσιμη με προηγούμενα αποτελέσματα (Steif et al., 1993; Steif et al., 1995). Ενώ της Rop PG είναι T_m= 42°C (εικόνα 19). Αντίθετα, το φάσμα της A31P καταγράφεται ως μονοτονική καμπύλη, χωρίς καμία διακριτή μεταφορά από την αναδιπλωμένη κατάσταση στη μετουσιωμένη. Η μορφή αυτού του φάσματος είναι χαρακτηριστική για τα μόρια που βρίσκονται σε “molten globule” κατάσταση και δεν επιτρέπει την ανάλυσή του για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη θερμοκρασία αποδιάταξης της πρωτεΐνης.

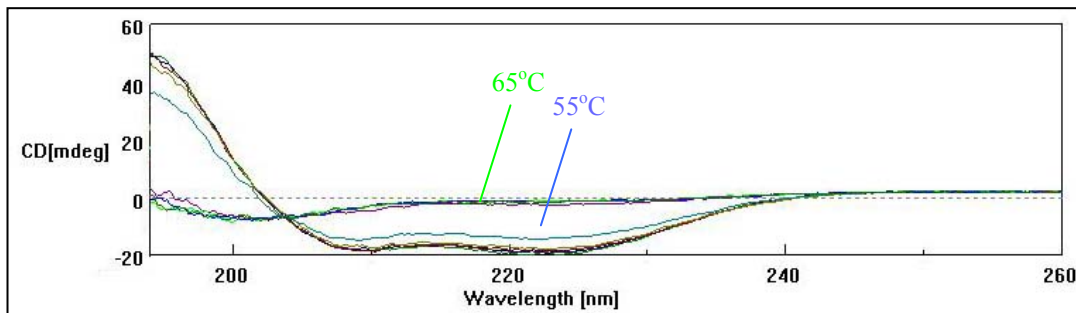


Εικόνα 19. Το γράφημα από την επίλυση ως προς την πρώτη παράγωγο της καμπύλης μετουσίωσης. Η κορυφή υποδεικνύει το T_m. Μπλε είναι το γράφημα της Rop PG, με πράσινο το γράφημα της wtRop.

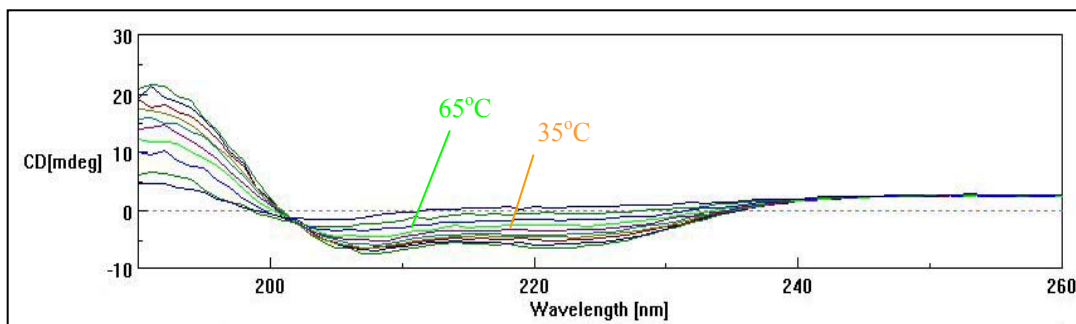
Για τις μετρήσεις των φασμάτων στο άπω-υπεριώδες χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά διαλύματα με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,15mg/ml σε 10mM PO₄⁻ pH 7.0, 10mM Na₂SO₄, 1mM EDTA pH 8.0. Οι μετρήσεις έγιναν στην περιοχή 260-186nm του άπω-υπεριώδους (όπου οι α-έλικες εμφανίζουν χαρακτηριστικό φάσμα- παράγραφος 4.15) ανά 10°C (από 15°C μέχρι 95°C με ταχύτητα 80°C/h) και χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες με μήκος 0.1cm. Τα διαδοχικά φάσματα στο άπω-υπεριώδες, που ελήφθησαν κατά τη μετουσίωση των πρωτεϊνών, παρουσιάζονται στην εικόνα 20 για την RopPG, wtRop και A31P.



Rop PG



wt Rop



A31P

Εικόνα 20. Φάσματα (ανά 10°C, από τους 15°C μέχρι τους 95°C) στο άπω-υπεριώδες κατά τη θερμική μετουσίωση των Rop PG, wt Rop και A31P.

Από τα παραπάνω φάσματα, φαίνεται ότι η Rop PG αποδιατάσσεται με ανάλογο τρόπο όπως η wtRop και δε μοιάζει καθόλου με την A31P. Σε ότι αφορά την wt Rop το φάσμα στους 55°C δείχνει ότι η πρωτεΐνη εξακολουθεί να έχει κάποια δευτεροταγή δομή. Η μετάβαση στους 65°C έχει ως αποτέλεσμα την απότομη απώλεια σήματος α-έλικας, κάτι που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη έχει αποδιαταχθεί. Αυτό είναι σε συμφωνία με τη θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης στους 60°C. Το ίδιο παρατηρείται και για την Rop PG, όπου χάνεται το σήμα α-έλικας στη μετάβαση από τους 35°C στους 45°C, καθώς το σημείο τήξης είναι 43°C. Αντίθετα, το φάσμα της A31P δε δείχνει κάποια διακριτή μετάβαση από την αναδιπλωμένη στη μετουσιωμένη πρωτεΐνη. Η

διαδοχή των φασμάτων είναι πολύ ομαλή, σε συμφωνία με τα φάσματα της εικόνας 18.

2.2 Οι μεταλλάξεις Rop RM6-T19P και Rop RM6-P30

Οι μεταλλάξεις Rop RM6-T19P και Rop RM6-P30 σχεδιάστηκαν με σκοπό να τροποποιηθεί η δομή της Rop RM6 ούτως ώστε να μπορεί να αυτό-συγκροτηθεί και να χρησιμοποιηθεί ως δομικός λίθος για βιυλικά. Αφού απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της Rop RM6 σε νέο φορέα, έγιναν οι μεταλλάξεις. Λόγω περιορισμένου χρόνου δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν και να καθαριστούν τα νέα μεταλλάγματα σε μεγάλη κλίμακα. Έγινε απομόνωση και καθαρισμός σε μικρή κλίμακα με Ni-NTA spin columns (QIAGEN) ώστε να διαπιστωθεί αρχικά αν είναι δυνατή η παραγωγή των μεταλλαγμάτων και αν οι παραγόμενες πρωτεΐνες βρίσκονται σε διαλυτή ή μη μορφή.

2.2.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Rop RM6 ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

Το αρχικό υλικό, που υπήρχε διαθέσιμο ήταν το κλωνοποιημένο, στο φορέα pEX43 (Castagnoli et al., 1989), γονίδιο Rop RM6 και ο φορέας που επιλέχθηκε για την υπερέκφραση του γονιδίου είναι ο pET26b(+) (Novagen). Καθώς όμως παρουσιάστηκαν προβλήματα κατά τη μεταλλαξογένεση στον φορέα pET26b(+), το γονίδιο Rop RM6 κλωνοποιήθηκε αρχικά στο φορέα pF1K T7 (Flexi vector system- Promega).

Συγκεκριμένα, ενισχύθηκε η ποσότητα αυτού του γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποιώντας τους εκκινητές:

5'-3' GGGCGCGATCGCCATGACCAAACAGGAAAAAACCG

5'-3' GCGCGTTTAAACTCAGAGGTTTTTCACCGTCAT

οι οποίοι προσδίδουν εκατέρωθεν του γονιδίου, θέσεις κοπής για τα ένζυμα SgfI και PmeI. Αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούνται στο kit του «Flexi vector system» για την κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου στον pF1K πλασμιδιακό φορέα. Η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχθηκε με πηκτική αγαρόζη. Στο επιθυμητό προϊόν καθώς και στον πλασμιδιακό φορέα pF1K

δημιουργήθηκαν κολλώδη άκρα με πέψη από τα ένζυμα SgfI και PmeI ούτως ώστε να επιτευχθεί η κλωνοποίηση (ligation) με τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών. Εν συνεχεία, κύτταρα DH5α (*E.coli*), μετασχηματίστηκαν με κάθε μία από τις νέες πλασμιδιακές κατασκευές. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν απομονώθηκε DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep) και ελέγχθηκε η αλληλούχισή τους για να πιστοποιηθεί ότι η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής. Ακολούθησε η μεταλλαξογένεση χρησιμοποιώντας τους εκκινητές:

5'-3' TTT ATC AGA AGC CAG CCA TTA ACG CTT CTG GAG

5'-3' CTC CAG AAG CGT TAA TGG CTG GCT TCT GAT AAA

για τη μετάλλαξη RM6-T19P και τους

5'-3' AAA CTC AAC GAG CTG CCG GCA GAC ATC TGT GAA

5'-3' TTC ACA GAT GTG TGC CGG CAG CTC GTT GAG TTT

για τη μετάλλαξη RM6-P30.

Με τα μεταλλαγμένα πλέον γονίδια έγινε μετασχηματισμός κυττάρων XL1-blue. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν απομονώθηκε DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep) και ελέγχθηκε η αλληλούχισή τους για να πιστοποιηθεί ότι η μετάλλαξη ήταν επιτυχής.

Ακολούθως, ενισχύθηκε η ποσότητα των μεταλλαγμένων γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποιώντας τους εκκινητές:

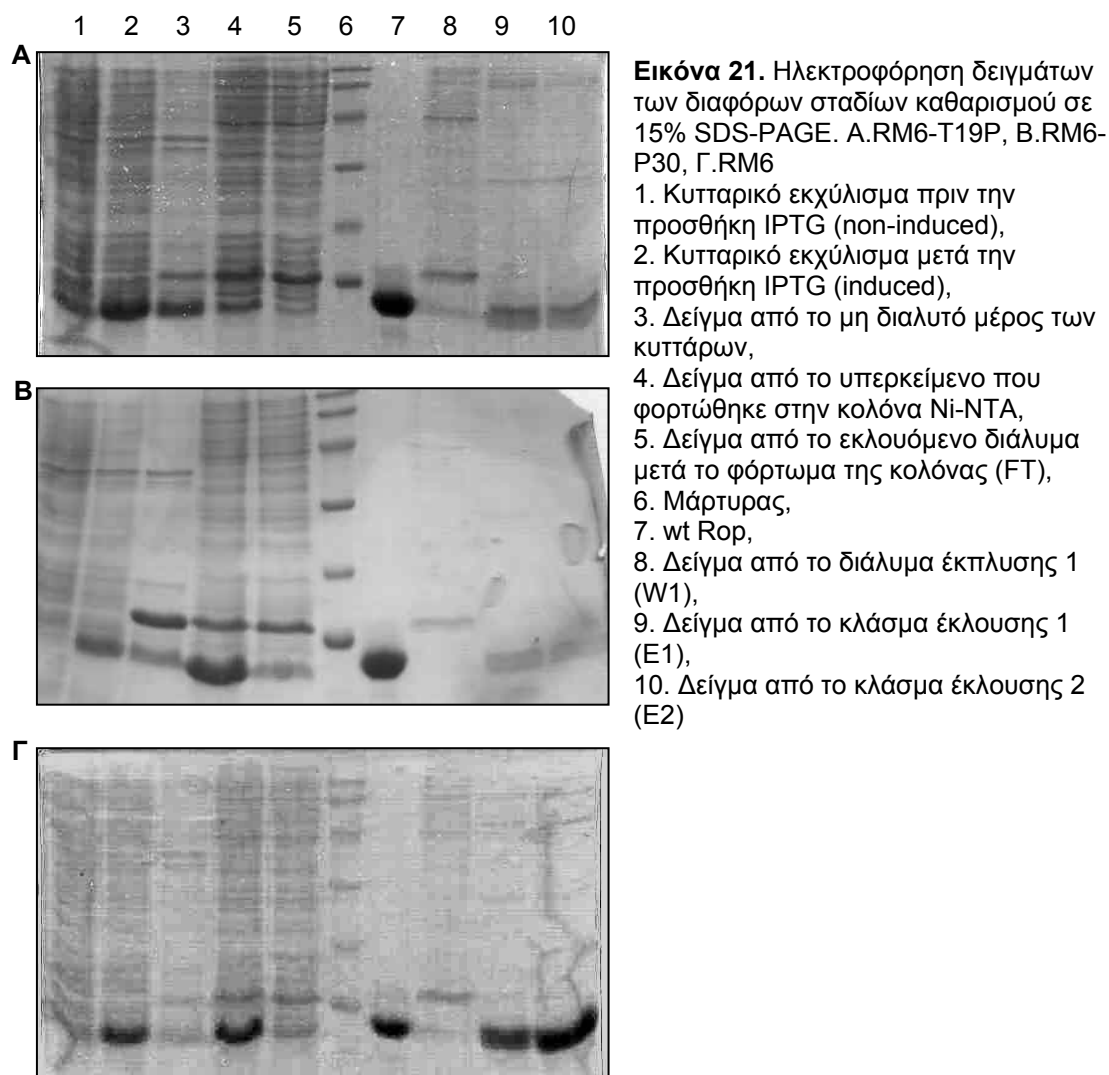
5'-3' CGCGACGGCCATATGACCAAACAGGAAAAAACCGCC

5'-3' CCGCTCGAGGAGGTTTTACCGTCATCACC

οι οποίοι προσδίδουν εκατέρωθεν του γονιδίου, θέσεις κοπής για τα ένζυμα NdeI και XhoI. Η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχθηκε με πηκτική αγαρόζης. Στο επιθυμητό προϊόν καθώς και στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+) δημιουργήθηκαν κολλώδη άκρα με πέψη από τα ένζυμα NdeI και XhoI έτσι ώστε να επιτευχθεί η κλωνοποίηση (ligation) με τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών. Εν συνεχεία, κύτταρα DH5α (*E.coli*), μετασχηματίστηκαν με κάθε μία από τις νέες πλασμιδιακές κατασκευές. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν απομονώθηκε DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep) και ελέγχθηκε η αλληλούχισή τους για να πιστοποιηθεί ότι η κλωνοποίηση των μεταλλαγμάτων στους νέους φορείς έκφρασης ήταν επιτυχής. Με τους επιτυχημένους κλώνους μετασχηματίστηκαν κύτταρα BL21(DE3) (*E.coli*) και ακολούθησε έκφραση και παραγωγή των πρωτεϊνών σε μικρή κλίμακα.

2.2.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Τα μεταλλάγματα Rop RM6-T19P και Rop RM6-P30 καθαρίστηκαν σε μικρή κλίμακα (παράγραφος 4.12). Παρακάτω φαίνονται τα στάδια από τον καθαρισμό σε SDS-PAGE. (εικόνα 21)



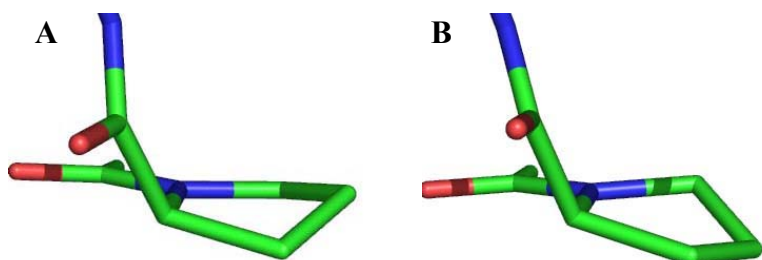
Όπως διαπιστώνεται, οι παραγόμενες πρωτεΐνες παράγονται σε μεγάλη ποσότητα και σε διαλυτή μορφή όπως και οι wt Rop και Rop RM6. Μικρή ποσότητα των μεταλλαγμάτων εμφανίζεται, με μία αχνή μπάντα και στο δείγμα από το μη διαλυτό μέρος των κυττάρων όμως αυτό οφείλεται σε μη καλό σπάσιμο των κυττάρων.

3 Συζήτηση

3.1 Η μετάλλαξη Rop PG

Σε μια προσπάθεια απάντησης στο ερώτημα αν η στροφή ανάμεσα σε δύο έλικες (ενός 4-α ελικοειδούς δεματίου) επηρεάζει τη διαδικασία αναδίπλωσης της πρωτεΐνης, σχεδιάστηκε το μετάλλαγμα Rop A31P. Μετά την λύση της δομής του, παρατηρήθηκε ότι αλλάζει τελείως η διαμόρφωση της τελικής δομής της πρωτεΐνης Rop. Για περαιτέρω διαλεύκανση του ρόλου της στροφής στην αναδίπλωση πρωτεϊνών σχεδιάστηκαν τα μεταλλάγματα Rop PP, Rop GP και το Rop PG που μελετήθηκε σε αυτή την εργασία.

Με τη λύση της δομής του μεταλλάγματος Rop PG, διαπιστώθηκε πως η διαμόρφωση δεν έχει αλλάξει δραματικά σε σχέση με τη δομή της wtRop. Δημιουργήθηκε ένα έτερο-διμερές (σε αντίθεση με το όμο-διμερές της wtRop). Τα δύο μονομερή διαφέρουν ελάχιστα στην περιοχή της στροφής (στις γωνίες ϕ , ψ των αμινοξέων) διότι η προλίνη στο θέση 30 έχει 'UP' διαμόρφωση στο ένα και 'DOWN' διαμόρφωση στο άλλο. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε να δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου του τύπου C-H...O μέσω του C^δ με τα γειτονικά αμινοξέα. Πιθανότατα αυτό συμβαίνει μόνο όταν η προλίνη βρίσκεται στο εσωτερικό της α -έλικας και όχι όταν βρίσκεται στην στροφή. Παρατηρήθηκαν όμως, ασθενείς δεσμοί με μόρια νερού που βρίσκονται κοντά στο κατάλοιπο της προλίνης.



Εικόνα 22. **A.** Η Pro30 στην A αλυσίδα της RopPG, φαίνεται ότι έχει "DOWN" διαμόρφωση. **B.** Η Pro 30 στην αλυσίδα B φαίνεται ότι έχει "UP" διαμόρφωση.

Είναι λοιπόν αντιληπτό, πως η Rop PG δεν παγιδεύει την πρωτεΐνη σε κάποιο τοπικό ενεργειακό ελάχιστο, δηλαδή σε μία διαφορετική δομή, όπως η A31P. Επιπλέον, από τα πειράματα με τη φασματοσκοπία κυκλικού

διχρωισμού, προέκυψε ότι το μετάλλαγμα Rop PG είναι λιγότερο θερμοσταθερό σε σχέση με αυτό της wt Rop.

Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η προλίνη στη θέση 30, επηρεάζει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης μέχρι ενός ορισμένου σημείου κι καθώς παίρνει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις ('UP' και 'DOWN'), δημιουργεί δύο διαφορετικά μονομερή χωρίς όμως να αλλάζει την τελική διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

Αξίζει να σημειωθεί πως το μετάλλαγμα Rop D30P, που μελετήθηκε από τη Regan και τους συνεργάτες της, είναι λιγότερο θερμοσταθερό (~55°C) σε σχέση με την wt Rop (~60°C), όμως με την προσθήκη της γλυκίνης στη θέση 31 (Rop PG), η θερμοσταθερότητα μειώνεται ακόμη περισσότερο (~43°C). Η γλυκίνη με τους πολλούς βαθμούς ελευθερίας διαμόρφωσης, επιτρέπει στο μονομερές να πάρει μία πιο χαλαρή διαμόρφωση καθώς κάνει λιγότερο ισχυρούς δεσμούς με τις δύο έλικες, σε σχέση πάντα με την Ala31, της wtRop. Έτσι το μόριο έχει έναν λιγότερο ισχυρό υδρόφοβο πυρήνα μειώνοντας και την αντοχή του μορίου στην αύξηση της θερμοκρασίας.

Συμπερασματικά, η προλίνη είναι ένα σημαντικό αμινοξύ αλλά προκαλεί δραστικές αλλαγές μόνο στη θέση 31, λόγω της μικρής ελευθερίας διαμόρφωσης που διαθέτει, και η γλυκίνη στη θέση 31 πιθανότατα είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία μίας λιγότερο θερμοσταθερής πρωτεΐνης. Προς αναμονή των αποτελεσμάτων της δομικής μελέτης των μεταλλαγμάτων Rop PP και Rop GP, καθώς και της θερμοδυναμικής και κινητικής μελέτης της αναδίπλωσης του μεταλλάγματος Rop PG μπορούμε μόνο να επιστημονούμε πως ο ρόλος της στροφής στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών δεν έγκειται τόσο στο να καθορίζει την τελική δομή του μορίου, όσο στο να αποκλείει πιθανά μονοπάτια αναδίπλωσης, στα οποία θα μπορούσε να εισέλθει η πρωτεΐνη. Η σχέση στροφής/αναδίπλωσης είναι πολύπλοκη και εξαρτάται τόσο από τα αμινοξέα που βρίσκονται στη στροφή όσο και από την συγκεκριμένη αλληλουχία με την οποία συναντώνται σε αυτή.

3.2 Οι μεταλλάξεις Rop RM6-T19P και Rop RM6-P30

Με αφορμή τη νέα πρόκληση του τομέα της νανο-τεχνολογίας, για δημιουργία βιοϋλικών, και στηριζόμενη στην δομική «ευπλασία» του μορίου της Rop σχεδιάστηκαν δύο μεταλλάγματα του ήδη μεταλλαγμένου γονιδίου Rop RM6, τα Rop RM6-T19P και Rop RM6-P30 για να χρησιμοποιηθούν ως δομικοί λίθοι. Στο πρώτο, έγινε σημειακή μετάλλαξη της θρεονίνης στη θέση 19 με μία προλίνη, ούτως ώστε να σχηματιστεί μία σταθερή κάμψη στην α-έλικα ενώ στο δεύτερο έγινε μία προσθήκη προλίνης μετά το αμινοξύ λευκίνη στη θέση 29, για να προκληθεί κάμψη της α-έλικας ακριβώς στο μέσο αυτής.

Μετά από την κλωνοποίηση του Rop RM6 στον πλασμιδιακό φορέα pF1K, κατέστη δυνατή η δημιουργία των δύο νέων μεταλλαγμάτων. Τα δύο μεταλλαγμένα γονίδια επανακλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+). Έγινε ένας καθαρισμός σε μικρή κλίμακα και τα πρώτα στοιχεία, δείχνουν πως οι πρωτεΐνες παράγονται σε μεγάλη ποσότητα και είναι διαλυτές όπως τα υπόλοιπα μεταλλάγματα της Rop.

Το επόμενο βήμα είναι ο καθαρισμός σε μεγάλη κλίμακα, όπου θα καθοριστεί ο oligομερισμός των μεταλλαγμάτων μέσω της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης και στη συνέχεια θα παρακολουθηθεί η πορεία πιθανής αυτό-συγκρότησης σε σχέση με το χρόνο, τη διαφορά pH στο διάλυμα της πρωτεΐνης και αλλαγής άλλων συνθηκών. Πιθανά σύμπλοκα θα μελετηθούν με τη βοήθεια ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού.

4 Υλικά και Μέθοδοι

4.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο φορέας κλωνοποίησης pET26b(+) (Novagen)

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

Ο φορέας κλωνοποίησης pF1K T7 Flexi Vector (Promega)

Ο φορέας αυτός χρησιμοποιεί το ίδιο σύστημα με τον pET26b(+) για την υπερέκφραση του γονιδίου-στόχου και την υπερπαραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Διαφέρει στο ότι απουσιάζει ο ColE1 μηχανισμός αντιγραφής των πλασμιδίων και η πρωτεΐνη-στόχος παράγεται εγγενώς, χωρίς επιπλέον κατάλοιπα ή επίτοπους. Ο pF1K φέρει γονίδιο αντίστασης στην καναμικίνη.

4.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

Για τη μεταλλαξογένεση χρησιμοποιήθηκε το QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit της Stratagene. Πρόκειται για ένα σύστημα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, το οποίο επιτρέπει την απευθείας μετάλλαξη του γονιδίου-στόχου, χωρίς την ανάγκη περαιτέρω κλωνοποίησης του γονιδίου. Περιλαμβάνει τρία στάδια, όπου αρχικά μια πολυμεράση υψηλής ακρίβειας (PfuUltra High-Fidelity polymerase) δημιουργεί νέα αντίγραφα του πλασμιδίου, που φέρουν τη μετάλλαξη, με περιορισμένο αριθμό κύκλων αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την πέψη του DNA-μήτρας, που είναι μεθυλιωμένο, με το ένζυμο Dpn I. Το τελικό στάδιο αφορά το μετασχηματισμό κατάλληλων επιδεκτικών κυττάρων (XL1-Blue) με τα μεταλλαγμένα αντίγραφα του πλασμιδίου.

4.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

(Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η τεχνική PCR αποτελεί έναν εύκολο τρόπο για την κλωνοποίηση μίας επιθυμητής αλληλουχίας. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Για να αρχίσει όμως τη σύνθεση, χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Χρησιμοποιώντας λοιπόν δύο επιθυμητά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, που υβριδίζονται εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας, έτσι ώστε ο καθένας να είναι συμπληρωματικός με τον ένα κλώνο και οι δύο μαζί να καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος, μπορεί να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA. Ο κύκλος αντιγραφής περιλαμβάνει τρία στάδια. Πρώτον, διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος, δεύτερον, υβριδισμός των εκκινητών και τέλος ο πολυμερισμός. Μετά από πολλές επαναλήψεις αυτών των κύκλων επικρατεί μόνο το επιθυμητό προϊόν.

4.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* (competent cells)

1. Μια μοναδική αποικία βακτηρίων, από στερεή καλλιέργεια LB agar, ενοφθαλμίζεται σε 5ml LB και η καλλιέργεια επωάζεται, ολονύκτια, στους 37°C, υπό ανάδευση.

2. 1ml από αυτή την καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 100ml LB και η καλλιέργεια επωάζεται, υπό ανάδευση, στους 37°C μέχρι η οπτική της πυκνότητα να γίνει $O.D._{550nm} = 0.6-0.8$.
3. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 2500rpm για 10min. στους 4°C.
4. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 30ml παγωμένου διαλύματος TfbI και επώαση στον πάγο για 30min.
5. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 3500rpm για 10min. στους 4°C.
6. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 4ml παγωμένου διαλύματος TfbII.
7. Τα κύτταρα χωρίζονται σε aliquots των 100μl σε παγωμένους σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης.
8. Τελικά, τα κύτταρα ψύχονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

<u>TfbI (per 100ml)</u>	<u>TfbII (per 100 ml)</u>
3ml 1M CH ₃ COOK	1ml 1M MOPS pH=7.0
5ml 1M MnCl ₂	7,5ml 1M CaCl ₂
10ml 1M KCl	1ml 1M KCl
1ml 1M CaCl ₂	15ml Glycerol
15ml Glycerol	75,5ml H ₂ O

4.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ DNA

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

4.6 ΠΕΨΕΙΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Η πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού έγινε σε δυο περιπτώσεις. Πρώτον, για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA (γονιδίων) από

τους πλασμιδιακούς φορείς και δεύτερον, για τον έλεγχο των αποικιών των μετασχηματισμένων βακτηρίων για την ύπαρξη του τμήματος του DNA που επιλέξαμε να εισάγουμε.

Οι πέψεις έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας των ενζύμων N.E.B. (New England Biolabs), Minotech και PROMEGA (για το Flexi vector system) συνήθως σε τελικό όγκο 20μl.

4.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (miniprep)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα έγινε με το “miniprep kit” της QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

4.8 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA (γονίδιο, πλασμιδιακός φορέας) ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ (ligation)

Για τη σύνδεση των γονιδίων με τον φορέα pET26b(+), χρησιμοποιήθηκε η λιγάση της εταιρίας MINOTECH και η αντίδραση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας.

Για τη σύνδεση των γονιδίων με τον φορέα pF1K, χρησιμοποιήθηκε η λιγάση του “Flexi vector system-kit” της PROMEGA. Η αντίδραση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας.

4.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Σε αυτή την τεχνική εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος της πηκτής αγαρόζης και τα νουκλεϊκά οξέα, λόγω του αρνητικού τους φορτίου, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο. Με αυτό τον τρόπο, τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Στην πηκτή αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει στο υπεριώδες φως. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να διακριθούν οι ζώνες του DNA σε συσκευή με UV light. Η αγαρόζη, που διατίθεται σε μορφή σκόνης αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5x σε κωνική φλάσκα. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων (~3min. στα 900W) μέχρι διαλύσεως της αγαρόζης και αφήνεται να κρυώσει. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος είναι περίπου 50° C, προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση και το διάλυμα χύνεται σε ειδική ηλεκτροφορητική συσκευή. Αμέσως τοποθετείται η ειδική χτένα, η οποία δημιουργεί τα πηγαδάκια στα

οποία φορτώνονται τα δείγματα. Μετά την πήξη του διαλύματος αγαρόζης, αφαιρείται η χτένα. Τα δείγματα αναμειγνύονται με 5x agarose gel-loading buffer και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V. Οι πηκτές αγαρόζης που παρασκευάστηκαν είναι 1-1.5%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA, που έπρεπε να διαχωριστούν.

4.10 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΤΗΣ Rop

Μετά το μετασχηματισμό των BL21DE3 επιδεκτικών κυττάρων με τον κατάλληλο κλώνο, μια μοναδική αποικία από τη στερεή καλλιέργεια ενοφθαλμίζεται σε 100ml LB, που περιέχει καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με ανάδευση (250rpm) ολονύκτια. Από αυτή την καλλιέργεια, 40ml ενοφθαλμίζονται σε ένα λίτρο LB με αντιβιοτικό και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με έντονη ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητά της να γίνει $O.D._{600nm} = 0.6-0.8$. Σε αυτό το σημείο προστίθεται ο επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1mM και η καλλιέργεια επωάζεται περαιτέρω για 4h. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 30min, στις 6000rpm, στους 4°C. Τα κυτταρικά ιζήματα διατηρούνται στους -20°C.

4.11 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Η χρωματογραφία συγγένειας στηρίζεται στην προσρόφηση του επιθυμητού βιομορίου σε κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (ρητίνη), που φέρει ειδικό δεσμευτή. Οι υπό μελέτη πρωτεΐνες παράχθηκαν με επίτοπο έξι ιστιδινών, το οποίο προσδένεται ισχυρά σε άτομα Ni^{2+} . Η ρητίνη της κολώνας αυτού του συστήματος περιέχει, ως προσροφητικό υλικό, αγαρόζη, που συνδέεται με τα ιόντα νικελίου μέσω νίτριλο-τριοξικού οξέος (NTA), το οποίο φέρει τρία καρβονύλια. Λόγω της σύνδεσης με το νίτριλο-τριοξικό οξύ (δεσμεύει τέσσερις θέσεις υποκαταστάτη), δυο θέσεις σύνδεσης του νικελίου παραμένουν ελεύθερες για να αλληλεπιδράσουν με την ουρά των ιστιδινών. Τελικά, 3 ιόντα νικελίου αρκούν για τη δέσμευση των έξι ιστιδινών που φέρει κάθε μόριο. Κατά το πέρασμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κολόνα Ni^{2+} -NTA, κατακρατείται μόνο η πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο των ιστιδινών, ενώ οι τυχόν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες

εξαλείφονται με εκπλύσεις της κολόνας με ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει κατάλληλη ποσότητα ιμιδαζολίου. Με την παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου εκλούεται από την κολόνα και η επιθυμητή πρωτεΐνη. Το ιμιδαζολίο ανταγωνίζεται τη δέσμευση του επιτόπου ιστιδινών στο νικέλιο.

Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel Filtration Chromatography). Σύμφωνα με αυτή ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών εξαρτάται από την υδροδυναμική τους ακτίνα. Η οποία είναι ανάλογη του μοριακού βάρους για σφαιρικές πρωτεΐνες. Το χρωματογραφικό υλικό (Sephadex, Sephacryl, Sepharose) αποτελείται από σφαιρίδια που φέρουν πόρους. Τα μικρού μεγέθους μόρια κινούνται στο χώρο εντός των πόρων των σφαιριδίων, ενώ τα μεγάλα μεγέθους μόρια αποκλείονται από αυτόν, κινούμενα στο χώρο εκτός των σφαιριδίων. Ως νεκρός όγκος, χαρακτηρίζεται ο όγκος εκτός των σφαιριδίων. Με αυτόν τον τρόπο, η έκλυση των πρωτεϊνών γίνεται σταδιακά, οι μεγάλα μοριακού βάρους πρωτεΐνες εκλούνται πρώτες από τη στήλη και ακολούθως εκείνες με διαδοχικά μικρότερα μοριακά βάρη.

Τα κυτταρικά ιζήματα (~8gr από 1Lt καλλιέργειας) επαναδιαλύονται σε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM NaCl, 12,2mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 5mM ιμιδαζόλιο) και προστίθενται αναστολείς πρωτεασών PMSF και βενζαμιδίνη. Ακολουθεί το σπάσιμο των κυττάρων με ηχοβολισμό (20x30sec.), διατηρώντας το κυτταρικό διάλυμα συνεχώς μέσα σε πάγο και, έπειτα, φυγοκέντρηση για 1h. στις 13000rpm στους 4°C, προκειμένου να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και το μη διαλυτό μέρος των κυττάρων. Ταυτόχρονα, η κολόνα χρωματογραφίας Ni-NTA εξισορροπείται με 40 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (ο ένας όγκος αντιστοιχεί στον όγκο της ρητίνης – 5ml). Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης φορτώνεται στην εξισορροπημένη κολόνα και επωάζεται με, την περιέχουσα ιόντα Ni^{2+} , ρητίνη για ~30min. Στη συνέχεια, συλλέγεται το διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη (*Flow Through*) και φορτώνονται 40 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 1 (*Wash buffer 1*) με σύσταση 50mM PO_4^- pH 8.0, 300mM NaCl, 12,2mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 10mM ιμιδαζόλιο. Το διάλυμα αυτό συλλέγεται και φορτώνονται στην κολόνα 40 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 2 (*Wash buffer 2*) με σύσταση 50mM PO_4^- pH 8.0,

300mM NaCl, 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 20mM ιμιδαζόλιο. Αφού συλλεχθεί κι αυτό το διάλυμα, ακολουθεί η έκλουση της πρωτεΐνης με 5 όγκους διαλύματος έκλουσης (*Elution buffer*) με σύσταση 50mM PO₄⁻ pH8.0, 300mM NaCl, 12,2 mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 250mM ιμιδαζόλιο. Η πρωτεΐνη συλλέγεται σε κλάσματα των 2,5ml.

Όλα τα στάδια του καθαρισμού ελέγχονται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τα καθαρότερα κλάσματα αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε ολονύκτια διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει 25mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 12,2mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 1mM EDTA pH 8.0. Με τη χρήση συγκεντρωτικών σωλήνων Amicon Ultra (5000MW cutoff) το διάλυμα της πρωτεΐνης συγκεντρώνεται μέχρι ~3ml και φορτώνεται σε κολόνα μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (Amersham Pharmacia Biotech) (Gel filtration) η οποία είναι κατάλληλη για τη μελέτη πρωτεϊνών με μοριακό βάρος <70000Da. Η βαθμονόμηση της κολόνας και ο υπολογισμός των μοριακών βαρών και των μεγεθών των διαφόρων πρωτεϊνών έγιναν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Amersham Pharmacia Biotech. Πριν τη χρήση της, είχε εξισορροπηθεί με έναν όγκο διαλύματος 25mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 12,2 mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 1mM EDTA pH 8.0. Τα κλάσματα που περιέχουν την περισσότερη πρωτεΐνη αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε ολονύκτια διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει 20mM Tris-HCl pH 7.5 και 20mM NaCl. Στη συνέχεια, προστίθενται στο δείγμα EDTA pH 8.0 και DTT σε τελικές συγκεντρώσεις 1mM και τα δυο. Το δείγμα συγκεντρώνεται με χρήση συγκεντρωτικών σωλήνων Amicon Ultra (5000MW cutoff) σε τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης ~10-15mg/ml (Bradford). Κάποια ποσότητα φυλάσσεται στους 4 °C, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα χωρίζεται σε aliquots των 50μl, τα οποία ψύχονται σε υγρό άζωτο και διατηρούνται στους -80 °C. Η συνολική απόδοση σε πρωτεΐνη είναι ~35mg/Lt καλλιέργειας και η τελική καθαρότητα είναι >95%.

4.12 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Ο καθαρισμός των μεταλλαγμάτων P30 και P19, έγινε με “Ni-NTA spin columns” της QIAGEN. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της παρασκευάστριας εταιρίας.

4.13 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΔΩΔΕΚΥΛΘΕΪΚΟΥ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ, ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)

Η ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE αποτελεί μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και τον καθορισμό της υπερέκφρασής τους. Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις προσδίδει αρνητικό φορτίο, επιτρέποντας έτσι να κινηθούν μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο και να διαχωριστούν μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους. Η κίνηση των πρωτεϊνών γίνεται μέσω των πόρων της πηκτής του δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές 15%. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε βασιζόμενη στα πρωτόκολλα της BIORAD.

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

4.14 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

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

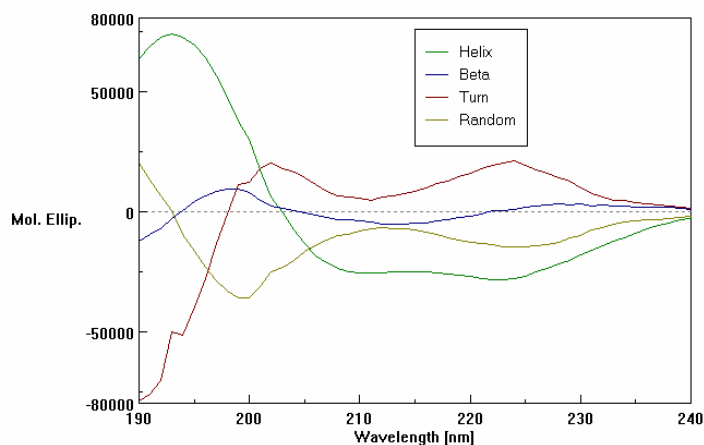
4.15 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ (CD)

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

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

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

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



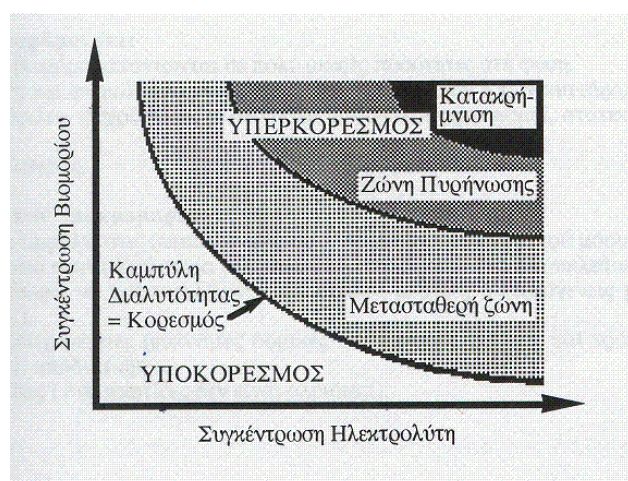
Σχήμα 1. Χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης του πολωμένου φωτός στο άπω-υπεριώδες για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο J-810 της Jasco. Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε το PTC-423S/L Peltier Type Temperature Control System της Jasco. Η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με τη χρήση του άλατος αμμωνίου του d-10-καμφορσουλφονικού οξέος. Η ροή του αζώτου (απαραίτητο για την καλή λειτουργία του φασματοφωτομέτρου, καθώς απομακρύνει το O₂ από τα εσωτερικά συστήματά του) ήταν 3-5l/min, ενώ αυξανόταν στα 10-15l/min για μετρήσεις κάτω από τα 190nm. Για τη λήψη των φασμάτων δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (0,15-0,5 mg/ml) και διαφορετικές κυψελίδες. Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με τα προγράμματα Spectra Analysis και Interval Analysis της Jasco.

4.16 ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η κρυσταλλογραφία είναι μια μέθοδος επιλογής για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής χημικών μορίων και δη των πρωτεϊνών και βασίζεται στην περίθλαση ακτίνων X από κρυστάλλους της, υπό μελέτη, πρωτεΐνης. Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι μια υποκατηγορία της κατακρήμνισης των βιομορίων. Η κρυσταλλική κατάσταση χαρακτηρίζεται από υψηλή τάξη και συμμετρία στο πακετάρισμα των μορίων και το κρυσταλλικό πλέγμα προϋποθέτει επαναλήψεις όμοιων δομικών μονάδων. Αυτό σημαίνει ότι ανομοιογενή δείγματα είναι εξαιρετικά δύσκολο να κρυσταλλώσουν και για αυτό στην κρυσταλλογραφία είναι απαραίτητη η μέγιστη δυνατή καθαρότητα και ομοιογένεια του δείγματος. Για να κρυσταλλώσει ένα βιομόριο, θα πρέπει το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται να υπερκορεσθεί. Ο υπερκορεσμός του

διαλύματος ενός βιομορίου είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση της διαλυτότητάς του. Η διαλυτότητα των βιομορίων περιγράφεται από τα λεγόμενα διαγράμματα διαλυτότητας, τα οποία συσχετίζουν την διαλυτότητα ενός βιομορίου με τη συγκέντρωσή του, τη συγκέντρωση των παραγόντων κατακρήμνισης, το pH, τη θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ κτλ. Στο σχήμα 2, παρουσιάζεται ένα τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας.



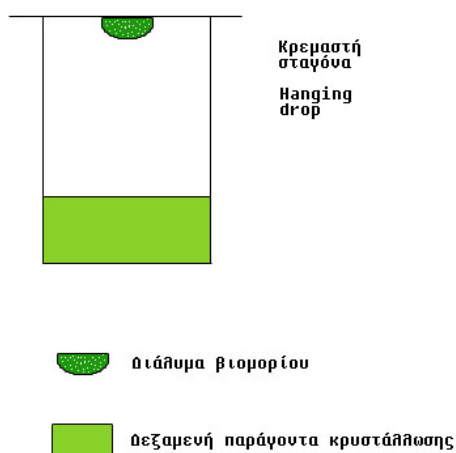
Σχήμα 2. Τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας ενός βιομορίου.

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

διαλύματος, η φύση των κατακρημνιστών και των αλάτων, καθώς και η θερμοκρασία είναι μερικές από αυτές.

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

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



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της κρεμαστής σταγόνας.

4.17 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

4.17.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ-ΟΡΙΣΜΟΙ

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ είναι μία μέθοδος ανάλυσης σκεδαζόμενων ακτίνων-Χ από κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι περιέχουν πολλά διατεταγμένα μόρια σε πανομοιότυπο προσανατολισμό, έτσι κάθε μόριο σκεδάζει όμοια, και οι περιθλώμενες ακτίνες από όλα τα μόρια συζευγνύονται ώστε τελικά παράγονται ισχυρές δέσμες ακτίνων-Χ, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν και να αναλυθούν. Από το μοτίβο των περιθλώμενων ακτινών (diffraction pattern) μπορεί να ανακύψει η δομή του μορίου.

Οι κρύσταλλοι περιγράφονται από το *κρυσταλλικό τους πλέγμα*, το οποίο δομείται από επαναλήψεις τις στοιχειώδους κυψελίδας. Η *στοιχειώδης κυψελίδα* είναι το βασικό ελάχιστο παραλληλεπίπεδο το οποίο με την εφαρμογή μεταθέσεων είναι σε θέση να πληρώσει ολόκληρο το κρυσταλλικό πλέγμα. Η στοιχειώδης κυψελίδα δύναται να διαθέτει περισσότερα του ενός όμοια αντικείμενα. Η *ασύμμετρη μονάδα* είναι το βασικό επαναλαμβανόμενο αντικείμενο που σχετίζεται με τα άλλα πανομοιότυπα αντικείμενα μέσω πράξεων συμμετρίας.

Κάθε άτομο σε έναν κρύσταλλο σκεδάζει την ακτίνα-Χ προς όλες τις διευθύνσεις και ο κρύσταλλος δίνει διακριτές ανακλάσεις με βάση *το νόμο του Bragg* οπότε και εμφανίζονται σε στίγμα πάνω στον ανιχνευτή. Κάθε ανάκλαση χαρακτηρίζεται από δύο ιδιότητες: το πλάτος, το οποίο υπολογίζεται από την ένταση του στίγματος και τη φάση, που είναι μία πληροφορία, η οποία «χάνεται» κατά τη διαδικασία της συλλογής δεδομένων. Η φάση υπολογίζεται με διάφορες έμμεσες ή άμεσες μεθόδους όπως είναι η *Μοριακή Αντικατάσταση* που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία για τον προσδιορισμό της δομής του μεταλλάγματος Rop PG.

4.17.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΡΧΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Αρχικά προσδιορίζεται ο προσανατολισμός του κρυστάλλου και η σχετική θέση των αξόνων του κρυσταλλικού πλέγματος. Καθορίζεται επίσης, η χωρομάδα (space group) συμμετρίας του κρυστάλλου και αποδίδονται στις

ανακλάσεις οι δείκτες Miller, hkl . Η ένταση των ανακλάσεων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *profile fitting*. Ακολουθεί, η συγχώνευση (*merging*) ανακλάσεων που σχετίζονται λόγω συμμετρίας και η αναγωγή τους σε κοινή κλίμακα (*scaling*).

4.17.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Κατά τη μοριακή αντικατάσταση απαιτείται η χρήση ενός πρωταρχικού μοντέλου, συνήθως από μία ομόλογη πρωτεΐνη. Η ομόλογη δομή τοποθετείται μέσα στη στοιχειώδη κυψελίδα του κρυστάλλου, ώστε να υπολογιστούν οι αρχικές φάσεις. Αρχικά ερευνάται ο σωστός προσανατολισμός του μορίου μέσω αναζήτησης περιστροφής (τρεις γωνίες περιστροφής κατά Euler) και στη συνέχεια η θέση του στον χώρο της στοιχειώδους κυψελίδας (τρεις συντεταγμένες θέσης x, y, z).

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί τη *συνάρτηση Patterson*, η οποία υπολογίζεται χωρίς τη χρήση των φάσεων και αναπαριστά τη συνέλιξη της κατανομής της ηλεκτρονικής πυκνότητας με την αντίστροφη αυτής. Μια κορυφή στο χάρτη Patterson με στοιχεία (u, v, w) δηλώνει την παρουσία ανύσματος με σημείο έναρξης την αρχή του χάρτη και σημείο κατάληξης τη θέση (u, v, w) . Τοποθετώντας το υπό μελέτη μοντέλο πάνω στο πρωταρχικό μοντέλο, προκύπτει μία *συνάρτηση Patterson*. Αυτή μπορεί να συγκριθεί με την *Patterson* που προκύπτει από το πείραμα. Όταν το μοντέλο, έχει τοποθετηθεί στην σωστή θέση ή κοντά σε αυτή, οι δύο συναρτήσεις θα είναι παρόμοιες.

Από τις ανεκτιμμένες συντεταγμένες που φαίνεται να πλησιάζουν τις πραγματικές τιμές υπολογίζονται οι φάσεις. Από τις υπολογισμένες φάσεις και τα πλάτη χαρακτηρίζεται ο παράγοντας δομής. Με τη χρήση των παραγόντων δομής και μέσω του *μετασχηματισμού Fourier*, προκύπτουν οι ανακλάσεις hkl κάθε σημείου x, y, z του πραγματικού χώρου με τις οποίες σχετίζεται η ηλεκτρονική πυκνότητα σε κάθε σημείο. Με βάση τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας, γίνεται πλέον ορατή η αλληλουχία των αμινοξέων της υπό μελέτη πρωτεΐνης, και άρα η δομή της.

4.17.4 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΚΑΙ Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ R

Η βελτιστοποίηση του μοντέλου είναι το τελευταίο στάδιο προσδιορισμού μιας δομής. Το μοντέλο που έχει προκύψει έπειτα από τον προσδιορισμό των φάσεων τροποποιείται κατάλληλα ώστε να προκύψει η καλύτερη δυνατή συμφωνία μεταξύ των εξ' υπολογισμού (από το τρέχον ατομικό μοντέλο) παραγόντων δομής και των πειραματικών.

Η μεταξύ τους συμφωνία ελέγχεται σε όλα τα βήματα μέσω του παράγοντα R (ο οποίος πρέπει να πλησιάζει το μηδέν). Επιπλέον χρησιμοποιείται και ο παράγοντας R_{free} ως ανεξάρτητος έλεγχος της αξιοπιστίας του μοντέλου. Το αρχικό σύνολο δεδομένων διαχωρίζεται σε δύο άνισα υποσύνολα. Το υποσύνολο εργασίας και το υποσύνολο ελέγχου. Το υποσύνολο ελέγχου διαθέτει το 5% των δεδομένων ενώ το υποσύνολο εργασίας το υπόλοιπο 95%. Το υποσύνολο ελέγχου δε συμμετέχει στη βελτιστοποίηση και από αυτό υπολογίζεται ο παράγοντας R_{free} . Αν η βελτιστοποίηση που λαμβάνει χώρα επιτυγχάνει τη μείωση και των δύο παραγόντων (δεχόμενοι μία διαφορά της τάξης του 5% μεταξύ των δύο παραγόντων), τότε το βήμα της βελτιστοποίησης γίνεται αποδεκτό.

5 Βιβλιογραφία

- Banner, D.W., M. Kokkinidis, and D. Tsernoglou, *Structure of the ColE1 rop protein at 1.7 Å resolution*. J Mol Biol, 1987. **196**(3): p. 657-75.
- Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- Castagnoli, L., et al., *Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein*. Embo J, 1989. **8**(2): p. 621-9.
- Castagnoli, L., C. Vetriani, and G. Cesareni, *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, 1994. **237**(4): p. 378-87.
- Chakrabarti, P. and S. Chakrabarti, *C--H...O hydrogen bond involving proline residues in alpha-helices*. J Mol Biol, 1998. **284**(4): p. 867-73.
- Cohen, C., *"α-helical coiled coils- A widespread motif in proteins*. Trends Biochem. Sci, 1992. **11**: p. 245-248.
- Colombo, G., P. Soto, and E. Gazit, *Peptide self-assembly at the nanoscale: a challenging target for computational and experimental biotechnology*. Trends Biotechnol, 2007. **25**(5): p. 211-8.
- Deupi, X., et al., *Ser and Thr residues modulate the conformation of pro-kinked transmembrane alpha-helices*. Biophys J, 2004. **86**(1 Pt 1): p. 105-15.
- Eberle, W., et al., *The structure of ColE1 rop in solution*. J Biomol NMR, 1991. **1**(1): p. 71-82.
- Fairman, R. and K.S. Akerfeldt, *Peptides as novel smart materials*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(4): p. 453-63.
- Fersht, A.R. and V. Daggett, *Protein folding and unfolding at atomic resolution*. Cell, 2002. **108**(4): p. 573-82.

- Gazit, E., *Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization*. Chemical Society Reviews, 2007. **36**: p. 1263-1269.
- Gazit, R.a., *Molecular self- assembly of peptide nanostructires: Mechanism of association and potencial uses*. Current Nanoscience, 2006. **2**: p. 105-111.
- Glykos, N.M., G. Cesareni, and M. Kokkinidis, *Protein plasticity to the extreme: changing the topology of a 4-alpha-helical bundle with a single amino acid substitution*. Structure, 1999. **7**(6): p. 597-603.
- Glykos, N.M. and M. Kokkinidis, *Structural polymorphism of a marginally stable 4-alpha-helical bundle. Images of a trapped molten globule?* Proteins, 2004. **56**(3): p. 420-5.
- Glykos, N.M., et al., *Loopless Rop: structure and dynamics of an engineered homotetrameric variant of the repressor of primer protein*. Biochemistry, 2006. **45**(36): p. 10905-19.
- Greenfield, N.J., *Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data*. Anal Biochem, 1996. **235**(1): p. 1-10.
- Harrison, S.C. and R. Durbin, *Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4028-30.
- Hartgerink, J.D., E. Beniash, and S.I. Stupp, *Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1684-8.
- Karplus, M. and D.L. Weaver, *Protein-folding dynamics*. Nature, 1976. **260**(5550): p. 404-6.
- Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(2): p. 119-39.
- Kelly, S.M. and N.C. Price, *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*. Curr Protein Pept Sci, 2000. **1**(4): p. 349-84.
- Kim, P.S. and R.L. Baldwin, *Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 459-89.

- Kokkinidis, M., et al., *Correlation between protein stability and crystal properties of designed ROP variants*. Proteins, 1993. **16**(2): p. 214-6.
- Lacatena, R.M., et al., *Control of initiation of pMB1 replication: purified Rop protein and RNA I affect primer formation in vitro*. Cell, 1984. **37**(3): p. 1009-14.
- Lassalle, M.W. and H.J. Hinz, *Unfolding of the tetrameric loop deletion mutant of ROP protein is a second-order reaction*. Biochemistry, 1998. **37**(23): p. 8465-72.
- Lassalle, M.W., et al., *Dimer-to-tetramer transformation: loop excision dramatically alters structure and stability of the ROP four alpha-helix bundle protein*. J Mol Biol, 1998. **279**(4): p. 987-1000.
- Lattman, E.E. and G.D. Rose, *Protein folding--what's the question?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 439-41.
- Levitt, M. and A. Warshel, *Computer simulation of protein folding*. Nature, 1975. **253**(5494): p. 694-8.
- Maskarinec, S.A. and D.A. Tirrell, *Protein engineering approaches to biomaterials design*. Curr Opin Biotechnol, 2005. **16**(4): p. 422-6.
- Nagi, A.D., K.S. Anderson, and L. Regan, *Using loop length variants to dissect the folding pathway of a four-helix-bundle protein*. J Mol Biol, 1999. **286**(1): p. 257-65.
- Nagi, A.D., K.S. Anderson, and L. Regan, *Using loop length variants to dissect the folding pathway of a four-helix-bundle protein*. J Mol Biol, 1999. **286**(1): p. 257-65.
- Nagi, A.D. and L. Regan, *An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein*. Fold Des, 1997. **2**(1): p. 67-75.
- Oliveberg, M., *Characterisation of the transition states for protein folding: towards a new level of mechanistic detail in protein engineering analysis*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(1): p. 94-100.
- Pandya, M.J., et al., *Sticky-end assembly of a designed peptide fiber provides insight into protein fibrillogenesis*. Biochemistry, 2000. **39**(30): p. 8728-34.

- Potekhin, S.A., et al., *De novo design of fibrils made of short alpha-helical coiled coil peptides*. Chem Biol, 2001. **8**(11): p. 1025-32.
- Predki, P.F., et al., *Amino-acid substitutions in a surface turn modulate protein stability*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(1): p. 54-8.
- Radford, S.E., *Protein folding: progress made and promises ahead*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(12): p. 611-8.
- Rajagopal, K. and J.P. Schneider, *Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(4): p. 480-6.
- Rajagopal, K. and J.P. Schneider, *Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(4): p. 480-6.
- Reches, M. and E. Gazit, *Molecular self-assembly of peptide nanostructures: Mechanism of association and potential uses*. current nanoscience, 2006. **2**: p. 105-111.
- Ryadnov, M.G., et al., *"Belt and braces": a peptide-based linker system of de novo design*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(31): p. 9388-94.
- Ryadnov, M.G. and D.N. Woolfson, *Introducing branches into a self-assembling peptide fiber*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(26): p. 3021-3.
- Silva, G.A., et al., *Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers*. Science, 2004. **303**(5662): p. 1352-5.
- Smith, A.M., et al., *Polar assembly in a designed protein fiber*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **44**(2): p. 325-8.
- Steif, C., H.J. Hinz, and G. Cesareni, *Effects of cavity-creating mutations on conformational stability and structure of the dimeric 4-alpha-helical protein ROP: thermal unfolding studies*. Proteins, 1995. **23**(1): p. 83-96.
- Steif, C., et al., *Subunit interactions provide a significant contribution to the stability of the dimeric four-alpha-helical-bundle protein ROP*. Biochemistry, 1993. **32**(15): p. 3867-76.

Tooze, *Introduction to Protein Structure*, ed. S. Edition. 1999: Garland Publishing.

Vlassi, M., et al., *Restored heptad pattern continuity does not alter the folding of a four-alpha-helix bundle*. *Nat Struct Biol*, 1994. **1**(10): p. 706-16.

Willis, M.A., et al., *Dramatic structural and thermodynamic consequences of repacking a protein's hydrophobic core*. *Structure*, 2000. **8**(12): p. 1319-28.

Zhang, S. and X. Zhao, *design of molecular biological materials using peptide motifs*. *J Mater Chem*, 2004. **14**: p. 2082-2086.

Zhao, X. and S. Zhang, *Fabrication of molecular materials using peptide construction motifs*. *Trends Biotechnol*, 2004. **22**(9): p. 470-6.