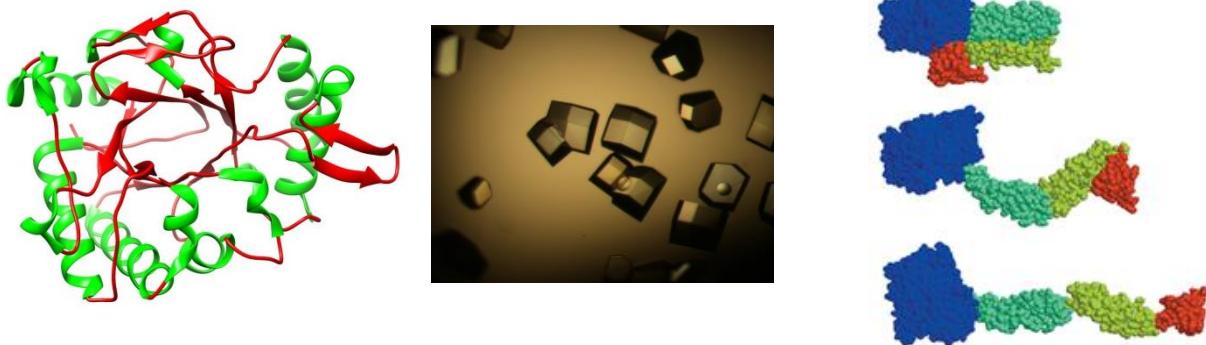


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Διδακτορική Διατριβή Φιλήμονα Σταύρου

**Θερμοδυναμική Σταθερότητα Πρωτεΐνων:
Συσχέτιση με Αρχιτεκτονική Λειτουργικών Περιοχών
& Συνθήκες Κρυστάλλωσης**



Συμβούλευτική επιτροπή:
Ι. Λελίδης, Επίκ. Καθηγητής ΕΚΠΑ (επιβλέπων)
Γ. Τριψέρης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
Γ. Νούνεσης, Διευθυντής Ερευνών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Δεκέμβριος 2014

Στις εικόνες του εξώφυλλου, δεξιά βλέπουμε τις χωροδιατάξεις της *MmChi60* σε διάλυμα, όπως δημοσιεύτηκαν από τους Malecki *et al.*, 2014 και αριστερά η κρυσταλλογραφική δομή του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού της *MmChi60* (Malecki *et al.*, 2013). Η τελενταία είναι καταχωρημένη στην πρωτεΐνική βάση δεδομένων (PDB) με τον κωδικό, 4HMC και για την οπτικοποίησή της χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα UCSF Chimera 1.7. Στο μέσον βλέπουμε τη φωτογραφία κρυστάλλων λυσοζύμης (<http://lysozyme.co.uk/crystallization.php>).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής έγινε εφικτή χάρη σε φορείς και πρόσωπα που αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Καταρχάς ήθελα να ευχαριστήσω το ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του οποίου υλοποιήθηκε το πειραματικό μέρος της διατριβής. Στο χώρο αυτό η παρουσία του Δρ. Γεωργίου Νούνεση, διευθυντή του εργαστηρίου, ήταν καταλυτική, στηρίζοντας λάθη και παραλείψεις στην προσπάθεια αυτή, στα πρώτα της κυρίως βήματα, καθοδηγώντας, εμπνέοντας, αλλά ταυτόχρονα μεταδίδοντας μια αίσθηση ελευθερίας σκέψης και αυτενέργειας. Επιπλέον τον ευχαριστώ και για την οικονομική βοήθεια που εξασφάλισε σε μεγάλο μέρος της διατριβής (ερευνητικό πρόγραμμα «ΘΑΛΗΣ» του Υπουργείου Παιδείας και Θρησκευμάτων με Επιστημονικό Υπεύθυνο τον κ. Γεώργιο Νούνεση και ερευνητικό πρόγραμμα «ΑΡΙΣΤΕΙΑ» της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας με Επιστημονικό Υπεύθυνο τον κ. Γεώργιο Νούνεση). Ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Άγγελο Θανάσουλα, μεταδιδακτορικό ερευνητή, για την προθυμία του να μεταδίδει γνώσεις και εμπειρία, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, και κυρίως για τη φιλία του. Και τέλος τον Δρ. Αθανάσιο Παπαδόπουλο, Ερευνητή Β' βαθμίδας, για την στήριξή του και για τη φιλία του.

Από το ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Ε. Σαρειδάκη (μέλος της επταμελούς επιτροπής), Ερευνητή Γ' βαθμίδας, από το εργαστήριο Υπερμοριακής και Δομικής Χημείας του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας, για την πρωτότυπη ερευνητική προσπάθεια στην κρυστάλλωση των πρωτεΐνων και την ουσιαστική συνδρομή του στην τελική διαμόρφωση του κεφαλαίου 3.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland και το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ (ιδιαιτέρως τον Καθ. Κωνσταντίνο Βοργιά, Διευθυντή του Εργαστηρίου) που έκαναν τη βιολογική έκφραση και το βιοχημικό καθαρισμό της χιτινάσης⁶⁰ και των μεταλλαγμάτων της.

Από το ΕΚΠΑ, Τμήμα Φυσικής, Τομέας Φυσικής Στερεάς Κατάστασης, θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τον Επ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Λελίδη, επιβλέποντά μου στο πλαί-

σιο της διατριβής, ο οποίος ήταν μόνιμος αρωγός της προσπάθειά μου. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Τριμπέρη για την επίσης σημαντική βοήθειά του. Οι επιστολές του ήταν καταλυτικές για την εξασφάλιση εκπαιδευτικής άδειας κατά τη διάρκεια μέρους της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης το ιδιωτικό σχολείο «Εκπαιδευτήρια Καίσαρη» που συναίνεσε στη χορήγηση της εκπαιδευτικής μου άδειας και απρόσκοπτα επίτρεψε την ενασχόλησή μου στον ερευνητικό χώρο και τον ΕΛΙΓΕ (Ειδικό Λογαριασμό Ιδιωτικής Γενικής Εκπαίδευσης) για την οικονομική στήριξη στη διάρκεια της εκπαιδευτικής άδειας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω πάνω από όλους την οικογένειά μου, τη σύζυγό μου Σπυριδούλα και τις κόρες μου Σταματία και Κωνσταντίνα για τον χρόνο που έλειπα από κοντά τους όταν οι υποχρεώσεις της διατριβής το απαιτούσαν.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στη διατριβή αυτή διερευνάται η συσχέτιση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης λυσοζύμη με τις συνθήκες κρυστάλλωσής της και πραγματοποιείται η θερμοδυναμική μελέτη της καταλυτικής περιοχής της πρωτεΐνης χιτινάση⁶⁰, η οποία διαθέτει την αρχιτεκτονική δίπλωσης $(\beta/\alpha)_8$ -βαρέλι.

Η παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων λυσοζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλάτων, από σκόνη λυσοζύμης (της εταιρίας Sigma-Aldrich) έγινε στο εργαστήριο Υπερμοριακής και Δομικής Χημείας του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από τον Δρ. Ε. Σαρειδάκη. Η βιολογική έκφραση και ο βιοχημικός καθαρισμός της χιτινάση⁶⁰, του σημειακού μεταλλάγματός της E153Q, του $(\beta/\alpha)_8$ -βαρελιού της (καταλυτική περιοχή) και του $(\beta/\alpha)_8$ -βαρελιού + τη λειτουργική περιοχή πρόσδεσης στη χιτίνη, που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή έγιναν στο Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ (Υπεύθυνος Καθ. Κ. Βοργιάς).

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών αποτελεί το κλειδί στο χαρακτηρισμό των ατομικών δομών των πρωτεϊνών με μεθόδους περίθλασης των ακτίνων X. Η μεγάλη διαφοροποίηση των πρωτεϊνών ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, καθιστά την πρόβλεψη κρυστάλλωσης μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σχεδόν αδύνατη. Ο προσδιορισμός των συνθηκών κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης απαιτεί τον εμπειρικό έλεγχο συνήθως πολλών διαφορετικών συνθηκών μέχρι να ανακαλυφθούν οι επιτυχείς για την κρυστάλλωση συνθήκες. Αποτελεί ανοικτή πρόκληση η τοποθέτηση του προβλήματος σε μια περισσότερο ορθολογική βάση. Και ως τέτοια προτείνεται στην παρούσα διατριβή η κατανόηση των μεταβολών που συμβαίνουν στις θερμοδυναμικές παραμέτρους μιας πρωτεΐνης, της λυσοζύμης, σε διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης. Για να γίνει αυτό πραγματοποιήθηκε η θερμική μετουσίωση της λυσοζύμης σε διαφορετικές συνθήκες με Αδιαβατική Μικροθερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (DSC). Τα πειράματα έγιναν στο εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», το οποία διευθύνει ο Δρ. Γ. Νούνεσης.

Η αρχιτεκτονική πρωτεΐνικής δίπλωσης (β/α)₈-βαρέλι προβάλει σήμερα ως το πιθανότερο «ικρίωμα» μέσω του οποίου η εξέλιξη των ενζύμων έχει προσδώσει νέες ιδιότητες αλλά και ικανότητες πρόσδεσης. Η κατανόηση της δίπλωσης μεγάλου αριθμού αμινοξικών ακολουθιών σε αυτή την αρχιτεκτονική αναμένεται από τη μία να δώσει απαντήσεις στο γνωστό πρόβλημα της πρωτεΐνικής δίπλωσης και από την άλλη να ανοίξει δρόμους για την δημιουργία νέων ενζύμων με επιθυμητές καταλυτικές δράσεις. Τα (β/α)₈-βαρέλια είναι εδώ και 15 χρόνια αντικείμενο μελέτης του Εργαστηρίου Βιομοριακής Φυσικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» καλύπτοντας έτσι ένα σημαντικό έλλειμμα της διεθνούς βιβλιογραφίας που αφορά στα θερμοδυναμικά προφίλ αυτών των μοτίβων. Οι χιτινάσες της οικογένειας 18 είναι πρωτεΐνες των οποίων η καταλυτική περιοχή είναι ένα (β/α)₈-βαρέλι. Ταυτόχρονα όμως οι χιτινάσες είναι σημαντικές γιατί μεταξύ άλλων η ενζυμική τους δράση – η διάσπαση ενός αδιάλυτου βιοπολυμερούς της χιτίνης – ενδεχομένως βρει τη λύση στη διαχείριση των αποβλήτων χιτίνης που δημιουργεί παγκοσμίως ένα οξύτατο περιβαλλοντικό πρόβλημα. Στην παρούσα διατριβή η θερμοδυναμική μελέτη του (β/α)₈-βαρελιού της χιτινάσης 60, μιας πρωτεΐνης προερχόμενης από το ψυχρόφιλο βακτήριο Moritella Marina, έρχεται να προστεθεί σε αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει για τη χιτινάση A και τη χιτινάση 40, των οποίων η καταλυτική περιοχή είναι επίσης ένα (β/α)₈-βαρέλι. Η κρυσταλλογραφική δομή της χιτινάσης 60 λύθηκε το 2013 και αποκάλυψε μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από τέσσερις λειτουργικές περιοχές. Οι θερμικές μετουσιώσεις της χιτινάσης 60, του (β/α)₈-βαρελιού της (καταλυτική περιοχή) και του (β/α)₈-βαρελιού + τη λειτουργική περιοχή πρόσδεσης στη χιτίνη μελετήθηκαν με DSC. Οι θερμικές μετουσιώσεις των παραπάνω μοριακών συστημάτων πραγματοποιήθηκαν επιπλέον με Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχροϊσμού επίσης στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό που αναδείχθηκε από τα πειράματα αυτά είναι η αυτονομία του βαρελιού ως θερμοδυναμική οντότητα και η διαφαινόμενη επιδεκτικότητά του σε έναν ρόλο “plug and play”. Η προαναφερθείσα μεθοδολογία ακολουθήθηκε και για το σημειακό μετάλλαγμα E153Q της χιτινάσης 60, το οποίο είναι γνωστό ότι στερεί από το ένζυμο τη χιτινολυτική του δράση. Επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον μας στο TIM-βαρέλι της χιτινάσης 60 και λαμβάνοντας υπόψη ότι η θερμική μετουσίωσή του είναι μια κινητικά ελεγχόμενη διεργασία πραγματοποιήθηκε η χημική μετουσίωση (χρησιμοποιώντας υδροχλωρική γουανιδίνη) του βαρελιού με φασματοσκο-

πία φθορισμού και αυτή στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Κατά τη χημική μετουσίωση του βαρελιού αναδείχθηκε ένα δεύτερο ιδιάζων χαρακτηριστικό του που είναι η ανθεκτικότητά του σε χημικούς αποδιατακτές. Σε συνδυασμό με τον “plug and play” ρόλο του το βαρέλι της χιτινάσης60 εμφανίζεται να διαθέτει χαρακτηριστικά που το καθιστούν υποψήφιο βιομετατροπέα αποβλήτων χιτίνης.

Στο πρώτο κεφάλαιο της διατριβής, στην Εισαγωγή, παρουσιάζεται εν συντομίᾳ τι είναι οι πρωτεΐνες, ποια είναι η σημασία τους, ποια είναι η προέλευση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους και το ανοικτό μέχρι τις μέρες μας πρόβλημα της πρωτεϊνικής διπλωσης και τέλος εξηγείται η αναγκαιότητα ορισμού της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεΐνων.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, Μέθοδοι, παρουσιάζονται οι πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και η αρχή λειτουργίας τους. Τονίζεται επίσης ο συμπληρωματικός χαρακτήρας των θερμοδιμετρικών και των φασματοσκοπικών τεχνικών. Αυτές όπως προαναφέρθηκε είναι: α) Αδιαβατική Μικροθερμοδιμετρία Διαφορικής Σάρωσης (DSC), β) Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχροϊσμού (CD) και γ) Φασματοσκοπία Φθορισμού.

Τα δύο επόμενα κεφάλαια αποτελούν το πρωτότυπο μέρος της διατριβής με τις ερευνητικές προκλήσεις που διατυπώθηκαν στην αρχή του προλόγου. Το κεφάλαιο 3 φιλοξενεί τη θερμοδυναμική μελέτη της λυσοζύμης σε συνθήκες κρυστάλλωσης και το κεφάλαιο 4 της χιτινάσης60 και των μεταλλαγμάτων της. Και στα δύο κεφάλαια μετά την παράθεση των αποτελεσμάτων ακολουθεί συζήτηση, όπου γίνεται μια αποτίμηση αυτών και προτείνεται η ερμηνεία τους, αλλά και τα ερωτήματα τα οποία η παρούσα προσπάθεια αφήνει ανοικτά. Τέλος, επιχειρείται η σύνδεσή τους με την ήδη υπάρχουσα γνώση στα πεδία αυτά.

Περιεχόμενα

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Εισαγωγή | 1 |
| 1.1. | Πρωτεΐνες..... | 1 |
| 1.2. | Η δομή των πρωτεϊνών | 3 |
| 1.3. | Πρωτεϊνική δίπλωση..... | 16 |
| 1.4. | Θερμοδυναμική σταθερότητα | 23 |
| 2. | Πειραματικές Τεχνικές & Μεθοδολογία..... | 29 |
| 2.1. | Αδιαβατική θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης..... | 29 |
| 2.1.1. | Αδιαβατικό θερμιδόμετρο διαφορικής σάρωσης υψηλής ευαισθησίας | 31 |
| 2.1.2. | Πειραματική μεθοδολογία DSC | 34 |
| 2.1.3. | Υπολογισμός της ενθαλπίας van't Hoff για διεργασίες δύο-καταστάσεων..... | 39 |
| 2.1.4. | Θερμοδυναμική ανάλυση θερμιδομετρικών δεδομένων..... | 43 |
| 2.1.5. | Καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας πρωτεϊνών..... | 45 |
| 2.1.6. | Εξισώσεις αποσυνέλιξης των δεδομένων DSC | 48 |
| 2.2. | Φασματοσκοπία Φθορισμού | 50 |
| 2.3. | Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχροϊσμού | 58 |
| 3. | Πειραματικά Αποτελέσματα: Θερμοδυναμική Σταθερότητα της Πρωτεΐνης Λυσοζύμη σε συνθήκες κρυστάλλωσης | 67 |
| 3.1. | Εισαγωγή..... | 67 |
| 3.1.1. | Η πρωτεϊνική κρυστάλλωση - Διαγράμματα φάσης,..... | 68 |
| 3.1.2. | Η λυσοζύμη από το λεύκωμα του αυγού της κότας | 70 |
| 3.2. | Πειραματικά αποτελέσματα της θερμικής μετουσίωσης της λυσοζύμης με εφαρμογή DSC 71 | |
| 3.2.1. | Θερμική μετουσίωση απουσία άλατος..... | 72 |
| 3.2.2. | Θερμική μετουσίωση παρουσία NaCl..... | 76 |
| 3.2.3. | Θερμική μετουσίωση παρουσία Na ₂ SO ₄ | 82 |
| 3.2.4. | Θερμική μετουσίωση παρουσία (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 87 |
| 3.2.5. | Θερμική μετουσίωση παρουσία Li ₂ SO ₄ | 91 |
| 3.3. | Συζήτηση αποτελεσμάτων | 96 |
| 4. | Πειραματικά Αποτελέσματα: Θερμοδυναμική Σταθερότητα της Πρωτεΐνης Χιτινάση-60. 105 | |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.1. | Εισαγωγή | 105 |
| 4.1.1. | Η αρχιτεκτονική δίπλωσης «(βα) ₈ -βαρέλι» των ενζύμων | 105 |
| 4.1.2. | Χιτινάσες..... | 109 |
| 4.1.3. | Η χιτινάση-60..... | 111 |
| 4.1.4. | Πειραματικός σχεδιασμός..... | 114 |
| 4.2. | Θερμική μετουσίωση της χιτινάσης-60 | 115 |
| 4.2.1. | Θερμική μετουσίωση με εφαρμογή DSC | 115 |
| 4.2.2. | Θερμική μετουσίωση με χρήση CD..... | 118 |
| 4.2.3. | Θερμική μετουσίωση μεταλλάγματος με εφαρμογή DSC | 122 |
| 4.2.4. | Θερμική μετουσίωση μεταλλάγματος με χρήση CD..... | 126 |
| 4.2.5. | Θερμική μετουσίωση της καταλυτικής περιοχής (βα) ₈ -βαρέλι με εφαρμογή DSC | |
| | 131 | |
| 4.2.6. | Θερμική μετουσίωση της καταλυτικής περιοχής (βα) ₈ -βαρέλι με χρήση CD | 144 |
| 4.2.7. | Θερμική μετουσίωση του σημειακού μεταλλάγματος E153Q με εφαρμογή DSC | |
| | 149 | |
| 4.2.8. | Θερμική μετουσίωση του σημειακού μεταλλάγματος E153Q με χρήση CD | 153 |
| 4.3. | Χημική μετουσίωση της καταλυτικής περιοχής (βα) ₈ -βαρέλι της χιτινάσης-60..... | 157 |
| 4.4. | Συζήτηση αποτελεσμάτων | 171 |
| 5. | Συμπεράσματα..... | 176 |
| | Βιβλιογραφία..... | 182 |

1. Εισαγωγή

1.1. Πρωτεῖνες

Οι πρωτεῖνες είναι οι πλέον εξαίρετοι τύποι βιολογικών μορίων που απαντώνται σε όλα τα ζωντανά συστήματα. Το χαρακτηριστικό που τις καθιστά ουσιώδεις για την κατανόηση της ζωής είναι η εντυπωσιακή ποικιλία δεξιοτήτων που επιδεικνύουν. Σε αντίθεση με τις σχετικά περιορισμένες δομικές αποκλίσεις που συναντώνται σε άλλους τύπους σημαντικών βιολογικών μορίων, όπως οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια ή τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεῖνες επιδεικνύουν μια φαινομενικά απεριόριστη ικανότητα να υιοθετούν διάφορες αρχιτεκτονικές και να δημιουργούν πολύ εξειδικευμένες καταλυτικές περιοχές στην επιφάνειά τους. Ως εκ τούτων οι πρωτεῖνες συνιστούν την κινητήριο δύναμη της χημείας των ζωντανών συστημάτων επιτελώντας σχεδόν κάθε πολύπλοκη λειτουργία (Echenique, 2007).

Οι πρωτεῖνες (Echenique, 2007):

- αποτελούν τους δομικούς λίθους πολλών βιολογικών δομών, όπως είναι οι πρωτεῖνες του περιβλήματος των ιών και του κυτταρικού σκελετού, η κερατίνη της επιδερμίδας ή το κολλαγόνο που βρίσκεται στα κόκκαλα και στους χόνδρους
- μεταφέρουν και αποθηκεύουν άλλα χημικά είδη, από ηλεκτρόνια μέχρι μακρομόρια
- ως ορμόνες, διαδίδουν πληροφορίες και σήματα μεταξύ κυττάρων και οργάνων
- ως αντισώματα, θωρακίζουν την άμυνα του οργανισμού εναντίον εισβολέων
- αποτελούν τα βασικά συστατικά των μυών, μετατρέποντας χημική ενέργεια σε μηχανική και επιτρέποντας στα ζώα να κινούνται και να αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον
- ελέγχουν τη διέλευση ουσιών μέσω των μεμβρανών των κυττάρων και των οργανιδίων
- ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση
- είναι οι κύριοι παράγοντες στη μεταγραφή της γενετικής πληροφορίας

- μαζί με κάποια νουκλεϊκά οξέα σχηματίζουν το ριβόσωμα, το μεγάλο μοριακό οργανίδιο όπου οι πρωτεΐνες συντίθενται
- ως μοριακοί συνοδοί/παιδονόμοι (chaperones), προστατεύουν και επιβλέπουν την έκφραση άλλων πρωτεΐνών βοηθώντας τις να αποκτήσουν τη λειτουργική τρισδιάστατη δομή τους.

Χάρη στη συμμετοχή των πρωτεΐνών σε σχεδόν κάθε ενέργεια που είναι ουσιώδης για τη ζωή, η πρωτεΐνική επιστήμη χρησιμοποιείται ως ένα υποστηρικτικό εργαλείο ολοένα και μεγαλύτερης σημασίας για την ανάπτυξη της σύγχρονης Ιατρικής. Από τη μια μεριά, η απουσία συγκεκριμένων πρωτεΐνών ή η ελαττωματική λειτουργικότητά τους βρίσκεται πίσω από πολλές παθολογικές καταστάσεις. Στους περισσότερους τύπους καρκίνου, για παράδειγμα, υπάρχουν μεταλλάξεις στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 που την οδηγούν στην απώλεια της λειτουργικότητάς της. Από την άλλη, η δημιουργία ακανόνιστων πρωτεΐνικών συσσωματώσεων χαρακτηρίζουν πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου των νόσων Huntington, Alzheimer, Creutzfeld-Jakob και της νόσου του κινητικού νευρώνα. Η επιστράτευση εξειδικευμένων πρωτεΐνών στην αντιμετώπιση παθογόνων (HIV, SARS, ηπατίτιδα, κ.α.) ή το μπλοκάρισμα της σύνθεσης πρωτεΐνών στο βακτηριακό ριβόσωμα έχουν αναδειχθεί σε στρατηγικές επιλογής στο ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο του σχεδιασμού φαρμάκων για την καταπολέμηση των λοιμώξεων (Echenique, 2007).

Πέρα από την Ιατρική, η τεχνολογία γενικότερα ωφελείται από τις καινοτόμους λύσεις που η φύση μετά από χιλιάδες εκατομμυρίων ετών «έρευνας» έχει βρει σε τυπικά πρακτικά προβλήματα. Και αυτές οι λύσεις είναι συχνά οι πρωτεΐνες: νέα υλικά εντυπωσιακών μηχανικών ιδιοτήτων θα σχεδιάζονται με βάση το μετάξι της αράχνης, την ελαστίνη ή το κολλαγόνο. Επίσης, γίνονται προσπάθειες για να συνταιριάζουν αυτά τα νέα βιοϋλικά με ζωντανούς οργανικούς ιστούς και να τα κάνουν να αποκρίνονται σε ερεθίσματα. Η ταχύτητα, η αποτελεσματικότητα και η εξειδίκευση με την οποία οι πρωτεΐνες κόβουν, δένουν, επιδιορθώνουν, συνδέουν ή τροποποιούν άλλα χημικά είδη εντυπωσιάζει. Η κατανόηση και ο έλεγχος της λειτουργίας των συναρπαστικών μοριακών συσκευών που

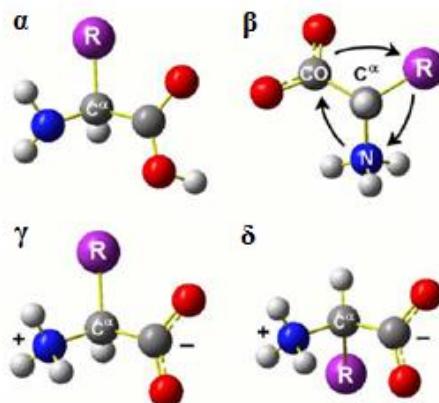
λέγονται πρωτεΐνες αναμένεται να ανοίξει το δρόμο για νανοσυσκευές, όπως νανοκινητήρες, νανογεννήτριες, νανοκόπτες (Echenique, 2007).

1.2. Η δομή των πρωτεΐνών

Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά ετεροπολυμερή. Πριν συνενωθούν για τη δημιουργία πρωτεΐνών, οι μονομερείς μονάδες λέγονται *αμινοξέα* και μπορούν να υπάρχουν ως αυτόνομα σταθερά μόρια. Όλα τα αμινοξέα αποτελούνται από έναν κεντρικό *α-άνθρακα* συνδεδεμένο με τέσσερις ομάδες: μια αμινική ομάδα ($-\text{NH}_2$), μια καρβοξυλική ομάδα ($-\text{COOH}$), ένα άτομο υδρογόνου και μια τέταρτη ομάδα ($-R$) (Σχήμα 1.2). Σε υδατικό διαλύτη και υπό φυσιολογικές συνθήκες οι αμιδικές και οι καρβοξυλικές ομάδες είναι φορτισμένες, οι πρώτες δέχονται ένα πρωτόνιο και αποκτούν ένα θετικό φορτίο και οι δεύτερες δίνουν ένα πρωτόνιο και αποκτούν ένα αρνητικό φορτίο (Σχήματα 1.2α vs 1.2γ). Μιας και η ομάδα $-R$ δεν είναι ίδια με καμία από τις άλλες τρεις ομάδες που είναι προσαρτημένες στον *α-άνθρακα*, τα αμινοξέα είναι χειρόμορφα. Με άλλα λόγια, ο *α-άνθρακας* συνιστά ένα κέντρο ασυμμετρίας και το αμινοξύ μπορεί να υπάρχει ως δύο διαφορετικά εναντιομερή, το *L* (σχήμα 1.2γ) και το *D* (σχήμα 1.2δ). Για λόγους που δεν είναι ως τώρα ξεκάθαροι η τεράστια πλειοψηφία των πρωτεΐνών σε όλα ζωντανά συστήματα αποτελούνται από *L* αμινοξέα και οι $-R$ ομάδες που κωδικοποιούνται στο γενετικό υλικό είναι μόνο είκοσι (Echenique, 2007).

- **Ανθρακας**
- **Υδρογόνο**
- **Αζωτο**
- **Οξυγόνο**
- **Θείο**
- **Γενική ομάδα**

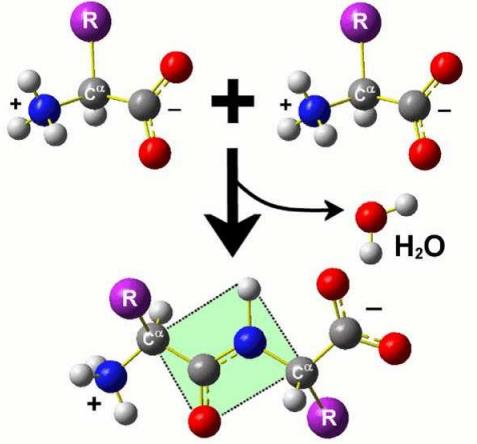
Σχήμα 1.1: Κώδικας χρωμάτων και μεγεθών για τύπους ατόμων που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα σχήματα αυτής της ενότητας.



Σχήμα 1.2: Αμινοξέα. (α) Αφόρτιστο L-εναντιομερές. (β) Ο μνημονικός κανόνας CORN¹ εύρεσης του L-εναντιομερούς. (γ) Φορτισμένο L-εναντιομερές (του επικρατέστερου στα ζωντανά συστήματα). (δ) Φορτισμένο D-εναντιομερές.

Η διαδικασία μέσω της οποίας τα αμινοξέα συνενώνονται για τη δημιουργία πρωτεΐνών λέγεται *γονιδιακή έκφραση* ή *πρωτεϊνική βιοσύνθεση* και χωρίζεται σε δύο βήματα. Στο πρώτο, τη *μεταγραφή*, στον πυρήνα του κυττάρου φτιάχνεται ένα αντίγραφο ενός τμήματος της αλληλουχίας βάσεων του DNA (γονιδίο) σε ένα αγγελιοφόρο μόριο RNA (mRNA). Στο δεύτερο βήμα, τη *μετάφραση*, το mRNA εισέρχεται στο ριβόσωμα και κάθε τριπλέτα βάσεων (*κωδικόνιο*) διαβάζεται από ένα ειδικό μεταφορικό μόριο RNA (tRNA), που διαθέτει τη συμπληρωματική τριπλέτα βάσεων (*αντικωδικόνιο*). Το tRNA συνδέεται με το mRNA φέρνοντας μαζί του το αμινοξύ που κωδικοποιείται από τη συγκεκριμένη ακολουθία των τριών βάσεων. Κάθε αμινοξύ που φτάνει στο ριβόσωμα με αυτόν τον τρόπο συνδέεται ομοιοπολικά με το προηγούμενο και έτσι προστίθεται στη νεοσυσταθείσα πρωτεΐνη. Στην αντίδραση αυτή, σχηματίζεται ο *πεπτιδικός δεσμός* και ένα μόριο νερού απελευθερώνεται (Σχήμα 1.3). Η διαδικασία συνεχίζει μέχρι που διαβάζεται ένα κωδικόνιο παύσης και η μεταγραφή ολοκληρώνεται (Echenique, 2007).

¹ Σύμφωνα με τον κανόνα του CORN πρέπει κανείς να κοιτάξει από το υδρογόνο του α-άνθρακα και οι τρεις υπόλοιπες ομάδες ονομασμένες όπως στο σχήμα να σχηματίσουν τη λέξη CORN κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού.



Σχήμα 1.3: Δημιουργία πεπτιδικού δεσμού. Το πεπτιδικό επίπεδο εικονίζεται με πράσινο.

Η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης από το αμινικό άκρο στο καρβοξυλικό άκρο λέγεται *πρωτοταγής δομή* και τα αμινοξέα που περιλαμβάνονται σε μια τέτοια πολυπετιδική αλυσίδα λέγονται *αμινοξικά κατάλοιπα* ή *απλά κατάλοιπα* για να διαχωρίζονται από τις ελεύθερες μορφές τους. Η κύρια αλυσίδα που σχηματίζεται από την επανάληψη των α-ανθράκων και των ατόμων C και N στον πεπτιδικό δεσμό ονομάζεται *ραχοκοκαλιά* και οι $-R$ ομάδες που διακλαδώνονται έξω από αυτή λέγονται *πλευρικές αλυσίδες* (Echenique, 2007).

Η εξειδίκευση κάθε πρωτεΐνης εξασφαλίζεται από τις διαφορετικές ιδιότητες των είκοσι πλευρικών ομάδων και τη συγκεκριμένη θέση τους στην ακολουθία. Τα αμινοξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες: αυτά με πλευρικές αλυσίδες που είναι πολικές και αυτά με πλευρικές ομάδες που δεν είναι πολικές. Οι πλευρικές αλυσίδες της τελευταίας ομάδας δεν αλληλεπιδρούν με το νερό, το οποίο αποτελείται από πολικά μόρια (κάθε ένα εκ των οποίων έχει δύο θετικούς και δύο αρνητικούς πόλους). Υπάρχουν εννέα μη-πολικά αμινοξέα, από τη γλυκίνη (σημειώνεται με Gly, στην τριών γραμμάτων σύντμηση και G στο σύστημα του ενός γράμματος, βλέπε Πίνακα 1.1) με την πλευρική της αλυσίδα αποτελούμενη από ένα άτομο υδρογόνου, ως την αρκετά πολύπλοκη τρυπτοφάνη, η πλευρική αλυσίδα της οποίας αποτελείται από εννέα άτομα άνθρακα, οκτώ υδρογόνα και

ένα άζωτο. Καμία από τις μη-πολικές πλευρικές ομάδες δεν περιέχει άτομο οξυγόνου (Cotterill, 2002).

Πίνακας 1.1: Ονοματολογία των 20 αμινοξέων

| Αμινοξύ | Συντ. | |
|------------------|-------|---|
| Αλανίνη | Ala | A |
| Αργινίνη | Arg | R |
| Ασπαραγίνη | Asn | N |
| Ασπαρτικό οξύ | Asp | D |
| Κυστεΐνη | Cys | C |
| Γλουταμίνη | Gln | Q |
| Γλουταμινικό οξύ | Glu | E |
| Γλυκίνη | Gly | G |
| Ιστιδίνη | His | H |
| Ισολευκίνη | Ile | I |
| Λευκίνη | Leu | L |
| Λυσίνη | Lys | L |
| Μεθειονίνη | Met | M |
| Φαινυλαναλίνη | Phe | F |
| Προλίνη | Pro | P |
| Σερίνη | Ser | S |
| Θρεονίνη | Thr | T |
| Τρυπτοφάνη | Thp | W |
| Τυροσίνη | Tyr | Y |
| Βαλίνη | Val | V |

Η άλλη ομάδα, με τις πολικές πλευρικές αλυσίδες, μπορεί περαιτέρω να χωριστεί σε τρεις υποομάδες. Η πρώτη, αποτελείται από το ασπαρτικό οξύ και το γλουταμινικό οξύ. Φέρουν αρνητικά φορτία σε φυσιολογικές συνθήκες του pH και ως εκ τούτου είναι οξέα. Τα μέλη της δεύτερης υποομάδας είναι η λυσίνη, η αργινίνη και η ιστιδίνη, όλα εξ αυτών φέρουν θετικά φορτία σε φυσιολογικά pH και είναι επομένως βασικά. Η τελευταία ομά-

δα αποτελείται από τη γλουταμίνη και την κυστεΐνη, είναι ουδέτερα σε φυσιολογικά pH (Cotterill, 2002).

Η κυστεΐνη είναι αξιοσημείωτη εξαιτίας του ότι η πλευρική της αλυσίδα περιλαμβάνει ένα άτομο θείου, το οποίο έχει μεγάλη συσχέτιση με αυτό που είναι γνωστό ως δευτεροταγής ομοιοπολικός δεσμός στις πρωτεΐνες που διαθέτουν το αντίστοιχο αμινοξικό κατάλοιπο. Μια άλλη μάλλον ξεχωριστή πλευρική ομάδα είναι αυτή της προλίνης. Αποτελείται από μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα, και επίσης περιλαμβάνει έξι άτομα υδρογόνου. Είναι μοναδικό μεταξύ των αμινοξικών πλευρικών αλυσίδων ως προς το ότι συνδέεται με το υπόλοιπο αμινοξύ σε δύο θέσεις, αντί για τη συνηθισμένη μια θέση, με τις δύο συνδέσεις να συμβαίνουν στο άτομο του α-άνθρακα και στο άτομο του αζώτου (Cotterill, 2002). Το αποτέλεσμα αυτού είναι το μοναδικό άτομο υδρογόνου που συνήθως συνδέεται με το άτομο αζώτου να έχει αντικατασταθεί σε αυτήν την περίπτωση από μια ομάδα CH₂, και η τελευταία αλληλεπιδρά πιο ισχυρά με το επόμενο αμινοξικό κατάλοιπο στην αλληλουχία. Αν μάλιστα αυτό το κατάλοιπο εμπλέκει μια πλευρική αλυσίδα γλυκίνης προκύπτουν σημαντικοί περιορισμοί στους πιθανούς προσανατολισμούς που τα δύο μονομερή μπορούν να υιοθετήσουν το ένα ως προς το άλλο. Αυτό έχει σημαντική συνέπεια για τη δομή της πρωτεΐνης σε αυτή την περιοχή (Cotterill, 2002).

Η τιμή του pH (υπενθυμίζεται είναι ο αρνητικός λογάριθμος με βάση το 10 της συγκέντρωσης των υδρογονοκατιόντων, δηλαδή είναι $-\log_{10}[H^+]$) στο περιβάλλον υδατικό μέσον είναι μια σημαντική παράμετρος στον προσδιορισμό της δομής της πρωτεΐνης. Το pH καθορίζει την κατάσταση ιονισμού οποιουδήποτε αμινοξέος που είναι παρόν. Έτσι σε χαμηλό pH (δηλαδή, σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων υδρογόνου), το αμινοτελικό άκρο τείνει να αποκτήσει ένα επιπλέον άτομο υδρογόνου και έτσι το άκρο του μορίου τείνει θα καταλήγει τότε σε μια μονάδα NH₃⁺. Αντίστροφα, σε υψηλό pH (και επομένως, σε χαμηλή συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου), το καρβοξυλικό άκρο του αμινοξικού μορίου τείνει να χάσει το άτομο υδρογόνου και έτσι να αφήσει πίσω του μια μονάδα COO⁻. Τελικά, σε φυσιολογικά pH (δηλαδή, pH ~ 7), και τα δύο άκρα του μορίου βρίσκονται να είναι τροποποιημένα με τον παραπάνω τρόπο, δηλαδή θα είναι NH₃⁺ και COO⁻, αντί-

στοιχα. Όταν το αμινοξικό μόριο βρίσκεται σε συνή την κατάσταση λέγεται zwitterionic (Cotterill, 2002).

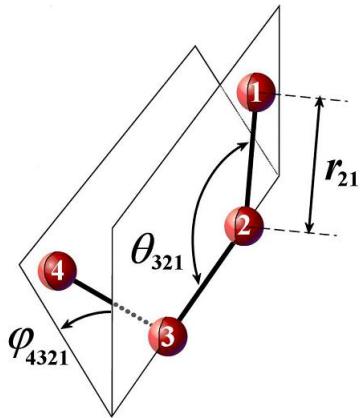
Για πολλές από τις πλευρικές αλυσίδες, η κατάσταση ιονισμού εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος διαλύματος. Είναι επομένως απαραίτητο να γνωρίζουμε το βαθμό οξύτητας στον οποίο η αλυσίδα θα πολωθεί, διότι η φορτισμένη ή μη κατάστασή του θα έχει σημαντική επίπτωση στη συνολική διαμόρφωση της δομής της πρωτεΐνης. Η pK τιμή ορίζεται ως η τιμή του pH για την οποία υπάρχει 50% πιθανότητα η πλευρική ομάδα να είναι πολωμένη. Οι τιμές του pK, στους 25°C, για μερικές από τις συνηθισμένες αμινοξικές πλευρικές ομάδες φαίνονται στον Πίνακα 1.2 (Cotterill, 2002).

Πίνακας 1.2: Τιμές pK για κάποιες από τις πιο συνηθισμένες πλευρικές αμινοξικές αλυσίδες.

| Αμινοξύ | pK (25°C) |
|------------------|-----------|
| Ασπαρτικό οξύ | 3.9 |
| Γλουταμινικό οξύ | 4.3 |
| Ιστιδίνη | 6.0 |
| Κυστεΐνη | 8.3 |
| Τυροσίνη | 10.9 |
| Λυσίνη | 10.8 |
| Αργινίνη | 12.5 |

Οι πρωτεΐνες διαθέτουν βαθμούς ελευθερίας (οι οποίοι λέγονται *χαλαροί*) που απαιτούν μικρά ποσά ενέργειας για να μεταβληθούν, ενώ αλλάζουν δραστικά τη σχετική θέση ομάδων και ατόμων. Σε πρώτη προσέγγιση, όλα τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών και οι διεδρες γωνίες που περιγράφουν στροφές γύρω από τριπλούς, διπλούς και σχεδόν διπλούς δεσμούς (Σχήμα 1.4) θεωρούνται ότι προσδιορίζονται από την ομοιοπολική δομή. Από την άλλη, οι διεδρες γωνίες που περιγράφουν στροφές γύρω από απλούς δεσμούς θεωρούνται ευμετάβλητες και χαλαρές. Οι μη αλληλοεπικαλύψιμες τρισδιάστατες διευ-

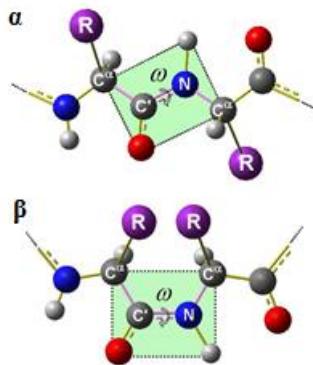
θετήσεις του μορίου που αντιστοιχούν σε διαφορετικές τιμές των χαλαρών βαθμών ελευθερίας λέγονται διαμορφώσεις (Echenique, 2007).



Σχήμα 1.4: Τυπικοί ορισμοί των εσωτερικών συντεταγμένων. \mathbf{r}_{21} είναι το μήκος δεσμού μεταξύ των ατόμων 2 και 1. θ_{321} είναι η γωνία δεσμού που σχηματίζεται από τους δεσμούς (2,1) και (3,2) και κυμαίνεται από 0 ως 180° . φ_{4321} είναι η δίεδρη γωνία που περιγράφει την περιστροφή γύρω από το δεσμό (3,2) ορίζεται ως η γωνία που σχηματίζεται από το επίπεδο που περιέχει τα άτομα 1,2 και 3 και το επίπεδο που περιέχει τα άτομα 2,3 και 4· κυμαίνεται από -180° ως 180° ή από 0 ως 360° , ανάλογα με τη σύμβαση.

Στις πρωτεΐνες κάποιες από αυτές τις δίεδρες γωνίες βρίσκονται στις πλευρικές αλυσίδες και η διαφοροποίησή τους μεταβάλλει μόνο τοπικά τη διαμόρφωση. Αντίθετα, μια μικρή αλλαγή στις δίεδρες γωνίες που βρίσκονται στην ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να μεταβάλλει δραστικά τη σχετική θέση πολλών ζευγαριών ατόμων (Echenique, 2007). Για το λόγο αυτό, οι ιδιότητες του πεπτιδικού δεσμού, που είναι ο βασικός δομικός λίθος της πρωτεΐνικής ραχοκοκαλιάς, είναι πολύ σημαντικές για να κατανοήσουμε τη διαμόρφωση των πρωτεΐνων. Αυτές οι ιδιότητες προκύπτουν από το γεγονός ότι υπάρχει ένα απεντοπισμένο ζεύγος ηλεκτρονίων μεταξύ των δεσμών C-N και C-O (συντονισμός) που έχει ως αποτέλεσμα ότι ο δεσμός δεν είναι ούτε απλός, ούτε διπλός, αλλά σχεδόν διπλός, με ένα μίγμα χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, ο σχεδόν διπλού δεσμού χαρακτήρας του πεπτιδικού δεσμού είναι ο λόγος για το οποίο τα έξι άτομα που φαίνονται στα πράσινα επίπεδα του Σχήματος 1.5, εμφανίζουν ισχυρή τάση να είναι ομοεπίπεδα, σχηματίζοντας το λεγόμενο πεπτιδικό επίπεδο. Αυτή η ομοεπιπεδότητα επιτρέπει μόνο δύο διαφορετικές διαμορφώσεις: την trans (αντιστοιχεί σε $\omega \approx \pm 180^\circ$),

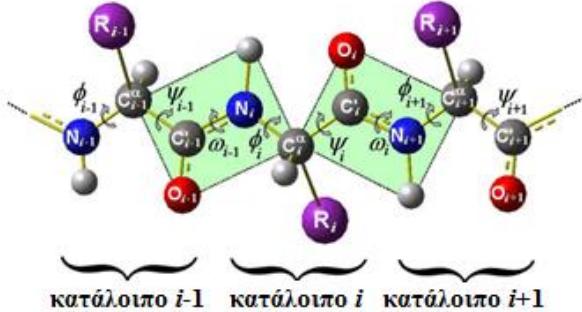
στην οποία οι α-άνθρακες βρίσκονται σε διαφορετικές πλευρές της γραμμής που περιέχει το δεσμό C-N και την cis διαμόρφωση (αντιστοιχεί σε $\omega \approx 0^\circ$), στην οποία βρίσκονται στην ίδια πλευρά αυτού του άξονα (Echenique, 2007).



Σχήμα 1.5: Οι trans και cis διαμορφώσεις του πεπτιδικού επιπέδου. Οι δεσμοί που ορίζουν τη δίεδρη γωνία ω του πεπτιδικού δεσμού απεικονίζονται με μωβ. (α) Trans διαμόρφωση ($\omega \approx \pm 180^\circ$). Η περισσότερο συνηθισμένη στις πρωτεΐνες. (β) Cis διαμόρφωση ($\omega \approx 0^\circ$). Συναντάται κυρίως σε Xaa-Pro δεσμούς.

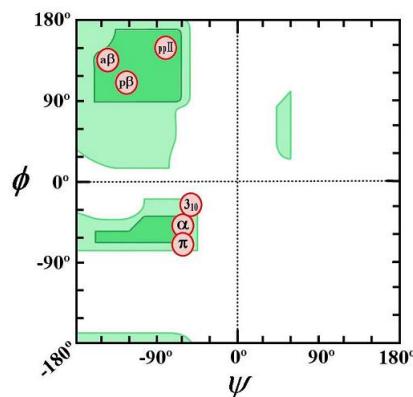
Η μεγάλη πλειονότητα των πεπτιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες είναι στη διαμόρφωση trans. Όταν όμως το δεύτερο κατάλοιπο είναι η προλίνη, η ιδιαίτερη δομή της πλευρικής αλυσίδας της κάνει την πιθανότητα εύρεσης της cis διαμόρφωσης σημαντικά μεγαλύτερη. Το περιστροφικό ενεργειακό φράγμα των δύο καταστάσεων έχει υπολογιστεί ότι είναι της τάξης $\sim 20 \text{ kcal/mol}$, το οποίο είναι περίπου 40 φορές μεγαλύτερο από τη θερμική ενέργεια σε φυσιολογικές συνθήκες, κάτι που κάνει τον αυθόρυμητο ισομερισμό trans \rightarrow cis εξαιρετικά αργό. Παρόλα αυτά υπάρχουν μερικοί πεπτιδικοί δεσμοί που πρέπει να είναι cis για να διπλωθεί σωστά η πρωτεΐνη ή να λειτουργήσει κατάλληλα (Echenique, 2007).

Θεωρώντας ότι όλοι οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι στην trans κατάσταση η διαμόρφωση της πρωτεΐνης καθορίζεται ουσιαστικά από τις τιμές των γωνιών φ και ψ, οι οποίες περιγράφουν την περιστροφή γύρω από τους απλούς δεσμούς δίπλα σε κάθε α-άνθρακα (βλέπε Σχήμα 1.6 για τον ορισμό των δίεδρων γωνιών που σχετίζονται με την ραχοκοκαλιά) (Echenique, 2007).



Σχήμα 1.6: Αριθμηση των βαρέων ατόμων και των δίεδρων γωνιών που περιγράφουν τις περιστροφές γύρω από τη ραχοκοκαλιά. Τα πεπτιδικά επίπεδα απεικονίζεται ως πράσινα τετράγωνα.

Αυτή η υπόθεση εισήχθηκε το 1963 από τους Ramachandran και Ramakrishnan και οι συντεταγμένες φ και ψ λέγονται γωνίες *Ramachandran*. Επιπλέον υπέθεσαν ότι τα μήκη των δεσμών και οι δίεδρες γωνίες στο διπλό και στους σχεδόν διπλούς δεσμούς είναι σταθερές και ανεξάρτητες από τις γωνίες φ και ψ, όρισαν μια τυπική απόσταση στην οποία ζεύγη ατόμων μπορούν να πλησιάσουν και μια ελάχιστη επίσης και σχεδίασαν το πρώτο *Ramachandran* διάγραμμα (βλέπε Σχήμα 1.7): η απεικόνιση των περιοχών στον (φ,ψ) χώρο που επιτρέπονται ενεργειακά ή δεν επιτρέπονται λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ ατόμων που είναι κοντά στον α-άνθρακα (Echenique, 2007).



Σχήμα 1.7: Αυθεντικό Ramachandran διάγραμμα σχεδιασμένο από τους Ramachandran και Ramakrishnan το 1963. Με σκούρο πράσινο, οι απολύτως επιτρεπτές περιοχές, υπολογισμένες με τρόπο που επιτρέπει στα άτομα να πλησιάσουν στη μέση απόσταση· με ανοιχτό πράσινο, οι μερικώς επιτρεπόμενες περιοχές υπολογισμένες έτσι ώστε τα άτομα να επιτρέπεται να πλησιάσουν στην ελάχιστη απόσταση· με λευκό, οι απαγορευμένες περιοχές. Κάποια σημεία που αναπαρι-

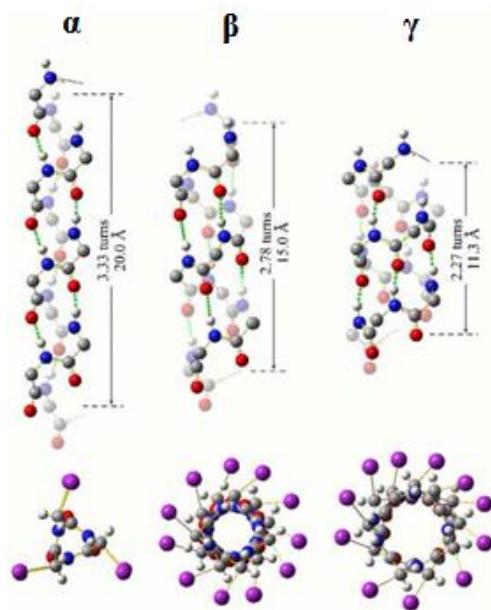
στούν στοιχεία δευτεροταγούς δομής φαίνονται με κόκκινους κύκλους στις ιδεατές (φ , ψ)-θέσεις του Πίνακα 1.3: (α) α-έλικα. (π) π-έλικα. (3_{10}) 3_{10} -έλικα. (αβ) Αντιπαράλληλα β-φύλλα. (pβ) Παράλληλα β-φύλλα. (ppII) Πολυπρολίνη II.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα αυτού του τύπου διαγραμμάτων βρίσκεται στο γεγονός ότι κάποιες πολύ κοινές επαναλαμβανόμενες δομές που βρίσκονται στις πρωτείνες είναι δυνατόν να απεικονιστούν ως ένα και μόνο σημείο στο διάγραμμα. Στην πραγματικότητα, αυτές οι ιδιαίτερες διαμορφώσεις, οι οποίες θεωρούνται ως το επόμενο επίπεδο πρωτεϊνικής οργάνωσης μετά την πρωτοταγή δομή και λέγεται ότι αποτελούν τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής, μπορούν να χαρακτηριστούν ακριβώς έτσι, δηλαδή, αναζητώντας κάποιο αριθμό διαδοχικών καταλοίπων που παρουσιάζουν τις ίδιες τιμές φ και ψ . Εντούτοις, στην πραγματικότητα οι μεταβλητές δεν είναι ακριβώς σταθερές και τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής διαθέτουν κάποιο βαθμό πλαστικότητας. Επιπλέον, οι πλευρικές αλυσίδες μπορούν να αλληλεπιδρούν και να ασκούν διαφορετικές τάσεις σε διαφορετικά σημεία της αλυσίδας μεταβάλλοντας ελαφρώς τις ιδανικές γωνίες Ramachandran. Επομένως, είναι πιο κατάλληλο να χαρακτηρίσει κανείς αυτές τις τοπικές διαμορφώσεις σύμφωνα με την εικόνα των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται σε κάθε περίπτωση, το οποίο στην πραγματικότητα είναι το χαρακτηριστικό που κάνει αυτές τις δομές να επικρατούν, παρέχοντάς τους μεγαλύτερη ενεργειακή σταθερότητα από άλλες επαναλαμβανόμενες διαμορφώσεις που βρίσκονται κοντά στο διάγραμμα Ramachandran (Echenique, 2007).

Πίνακας 1.3: Γωνίες Ramachandran (σε μοίρες) κάποιων σημαντικών στοιχείων δευτεροταγούς δομής σε πολυπεπτίδια.

| | φ | ψ |
|-----------------------|-----------|--------|
| α-έλικα | -57 | -47 |
| 3_{10} -έλικα | -49 | -26 |
| π-έλικα | -57 | -70 |
| πολυπρολίνη II | -79 | 149 |
| παράλληλα β-φύλλα | -119 | 113 |
| αντιπαράλληλα β-φύλλα | -139 | 135 |

Το πρώτο στοιχείο της δευτεροταγούς δομής που ανακαλύφθηκε είναι η α -έλικα. Είναι μια σπειροειδής δομή με ~ 3.6 κατάλοιπα ανά στροφή, στην οποία η καρβοξυλική ομάδα ($C=O$) κάθε i -στού καταλοίπου σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα ($N-H$) του καταλοίπου $i+4$ (βλέπε Σχήμα 1.8β). Σύμφωνα με έναν κοινώς αποδεκτό συμβολισμό, κατά τον οποίο το x_y συμβολίζει μια έλικα με x κατάλοιπα ανά στροφή και y άτομα στο δακτύλιο κοντά στο δεσμό υδρογόνου, οι α -έλικες λέγονται επίσης και 3.6_{13} -έλικες. Αν και μακράν ο πιο κοινός τύπος σπειροειδών δομών οι α -έλικες δεν είναι οι μοναδικές που συναντώνται στις πρωτεΐνες. Αν ο δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας ($C=O$) κάθε i -στού καταλοίπου με την αμινομάδα ($N-H$) του καταλοίπου $i+3$, προκύπτει η 3_{10} -έλικα, η οποία είναι πιο σφιχτή και επομένως μακρύτερη από μια α -έλικα ίδιου αριθμού καταλοίπων (βλέπε Σχήμα 1.8α). Αν ο δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας ($C=O$) κάθε i -στού καταλοίπου με την αμινομάδα ($N-H$) του καταλοίπου $i+5$, προκύπτει η π -έλικα (ή 4.4_{16} -έλικα), η οποία έχει μεγαλύτερο εύρος και μικρότερο μήκος από μια α -έλικα ίδιου αριθμού καταλοίπων (βλέπε Σχήμα 1.8γ) (Echenique, 2007).

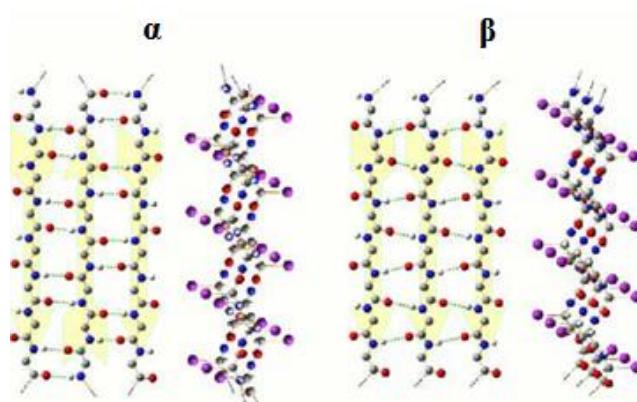


Σχήμα 1.8: Οι τρεις έλικες που συναντώνται στις ιθαγενείς πρωτεΐνικές δομές. (α) 3_{10} -έλικα, (β) α -έλικα και (γ) π -έλικα. Στις τρεις αυτές τις περιπτώσεις, οι έλικες σχηματίζονται από 11 αμινοξικά κατάλοιπα. Στις πάνω απεικονίσεις οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται με πράσινες γραμμές και το μήκος τους και ο αριθμός των αμινοξικών καταλοίπων ανά στροφή αναγράφονται δε-

ξιά των δομών. Αν και στις πλευρικές απεικονίσεις, οι πλευρικές αλυσίδες και τα α-υδρογόνα έχουν παραλειφθεί για λόγους ευκρίνειας, στις κατόψεις έχουν συμπεριληφθεί.

Μεταξύ των στοιχείων των δευτεροταγούς δομής των πρωτεΐνων δεν περιλαμβάνονται μόνο οι έλικες: υπάρχει επίσης μεγάλη ποικιλία επαναλαμβανόμενων τοπικών διαμορφώσεων, οι οποίες δεν αναπτύσσουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των τμημάτων της αλυσίδας και είναι λιγότερο στροβιλισμένες από τις δομές του Σχήματος 1.8. Παραδείγματα τέτοιων δομών είναι η πολυπρολίνη II, η οποία φαίνεται να είναι σημαντική στην ξεδιπλωμένη κατάσταση των πρωτεΐνων, και κυρίως, η οικογένεια των β-φύλλων, που μαζί με τις α-έλικες είναι τα πλέον αναγνωρίσιμα στοιχεία δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Echenique, 2007).

Τα β -φύλλα είναι σχεδόν επίπεδες δομές που σχηματίζονται από β -κλάνους, οι οποίοι ευθυγραμμίζονται για να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τους γείτονές τους. Δύο αμιγείς διευθετήσεις αυτών των ξεχωριστών νηματοειδών σχηματισμών συστάνται: τα αντιπαράλληλα β -φύλλα (βλέπε Σχήμα 1.9α), στα οποία οι κλάνοι αναπτύσσονται σε αντίθετες κατευθύνσεις και τα παράλληλα β -φύλλα (βλέπε Σχήμα 1.9β), στα οποία οι κλάνοι αναπτύσσονται στην ίδια κατεύθυνση. Και στις δύο περιπτώσεις, οι πλευρικές αλυσίδες γειτονικών καταλοίπων διαδοχικών κλάνων διακλαδώνονται στην ίδια πλευρά του φύλλου και μπορούν και αλληλεπιδρούν. Φυσικά, είναι δυνατό να βρεθούν και μίγματα παράλληλων-αντιπαράλληλων φύλλων (Echenique, 2007).



Σχήμα 1.9: β-φύλλα σε αμιγείς (α) αντιπαράλληλες και (β) παράλληλες εκδοχές. Στα αριστερά φαίνεται η κάτοψη, με τις πλευρικές αλυσίδες και τα α-υδρογόνα να έχουν παραλειφθεί για λόγους ευκρίνειας και τις κατευθύνσεις των κλώνων να παριστάνονται με κίτρινα βέλη. Στα δεξιά απεικονίζεται η πλευρική όψη. Στην περίπτωση αυτή οι πλευρικές αλυσίδες και τα α-υδρογόνα έχουν συμπεριληφθεί.

Το επόμενο επίπεδο πρωτεΐνικής οργάνωσης, προκύπτει από τη συγκρότηση των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής και επίσης των τμημάτων της αλυσίδας που στερούνται κανονικότητας, σε μια καλά ορισμένη τρισδιάστατη μορφή, η οποία λέγεται *τριτοταγής δομή*. Το πρόβλημα της πρωτεΐνικής δίπλωσης είναι ακριβώς η προσπάθεια πρόβλεψης της δευτεροταγούς και της τριτοταγούς δομής από την πρωτοταγή δομή (Echenique, 2007).

Η *τεταρτοταγής δομή* αφορά στον τρόπο με τον οποίο πρωτεΐνικά μονομερή συσχετίζονται για να δημιουργήσουν περισσότερο πολύπλοκα συστήματα που αποτελούνται από περισσότερες από μία πρωτεΐνικές αλυσίδες (Echenique, 2007).

Μερικές πρωτεΐνες, όπως η κερατίνη των μαλλιών, είναι ινώδεις: η πολυπεπτιδική αλυσίδα τους αναπτύσσεται σε μια διάσταση του χώρου. Οι περισσότερες πρωτεΐνες, εντούτοις, είναι σφαιροειδείς: η πολυπεπτιδική αλυσίδα τους συσπειρώνεται σε συμπαγείς μορφές. Μιας και τα μοριακά βάρη των πρωτεΐνων κυμαίνονται από εκατό μέχρι και εκατομμύριο θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι το μέγεθος αυτών των σφαιροειδών διπλώσεων θα αυξάνει με το μοριακό βάρος, αλλά κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Πρωτεΐνες των οποίων το μοριακό βάρος είναι λιγότερο από περίπου 20,000 συχνά έχουν μια απλή σφαιροειδή μορφή με ένα μέσο όρο μοριακής διαμέτρου 20 με 30 Å, αλλά οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες διπλώνονται συνήθως σε δύο ή περισσότερες ανεξάρτητες σφαιροειδείς ή άλλες δομικές περιοχές. Μια πρωτεΐνική περιοχή είναι μια συμπαγής περιοχή της πρωτεΐνικής δομής που συχνά αλλά όχι πάντοτε σχηματίζεται από συνεχόμενα τμήματα της αμινοξικής ακολουθίας και είναι ικανή σε πολλές περιπτώσεις να διπλώνεται αρκετά σταθερά ώστε να μπορεί να υπάρχει από μόνη της σε υδατικά διαλύματα. Η έννοια ότι οι περιοχές των μεγάλων πρωτεΐνων είναι ανεξάρτητα σταθερές έχει επιβεβαιωθεί κλωνοποιώντας την αντίστοιχη αλληλουχία DNA και εκφράζοντάς την ανεξάρτητα. Όχι μόνο

πολλές από αυτές τις περιοχές είναι σταθερές, διπλωμένες δομές στο διάλυμα, αλλά συχνά διατηρούν μέρος της βιοχημικής λειτουργίας της μεγάλης πρωτεΐνης από την οποία προήλθαν. Οι πρωτεϊνικές περιοχές διαφοροποιούνται σε μέγεθος, αλλά συνήθως δεν είναι μεγαλύτερες από τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες αποτελούμενες από περίπου 250 αμινοξέα σε μια μόνο πρωτεϊνική περιοχή. Οι πρωτεϊνικές περιοχές αποτελούνται συνήθως από περίπου 200 αμινοξέα ή λιγότερα. Οι υδροφοβικοί πυρήνες φαίνονται να είναι ουσιώδεις για τη σταθερότητα των περιοχών. Η παρουσία του υδροφοβικού πυρήνα είναι αυτή που συχνά επιτρέπει την πρωτεϊνική περιοχή να διπλώνεται σταθερά όταν εκφράζεται από μόνη της (Petsko & Ringe, 2004).

1.3. Πρωτεϊνική δίπλωση

Ορόσημο στην επιστήμη των πρωτεϊνών ήταν η θερμοδυναμική υπόθεση του Christian Anfinsen και των συνεργατών του. Στα διάσημα πειράματά του με την ριβονουκλεάση, ο Anfinsen υποστήριξε ότι η ιθαγενής δομή μιας πρωτεΐνης είναι η θερμοδυναμικά σταθερή δομή. Η δομή αυτή εξαρτάται μόνο από την αλληλουχία των αμινοξέων και τις συνθήκες του διαλύματος και όχι από την κινητική διαδρομή της δίπλωσης. Από τότε έγινε ευρέως αποδεκτό ότι η ιθαγενής δομή δεν εξαρτάται κατά πόσο η πρωτεΐνη συντίθεται βιολογικά σε ένα ριβόσωμα με τη βοήθεια των chaperones ή αν η πρωτεΐνη απλώς διπλώνεται ως ένα μεμονωμένο μόριο στο δοκιμαστικό σωλήνα. (Υπάρχουν εξαιρέσεις, εντούτοις, όπως η iNSOLIN, η α-lytic πρωτεάση και οι serpins, στις οποίες η βιολογικά λειτουργική μορφή είναι η κινητικά παγιδευμένη) (Dill et al., 2008).

Από τα πειράματα του Anfinsen προκύπτουν συμπεράσματα εξαιρετικής σημασίας. Καταρχάς, έδωσε νόημα στο εγχείρημα της *in vitro* έρευνας, για την κατανόηση των ιθαγενών δομών των πρωτεϊνών με πειράματα εντός του δοκιμαστικού σωλήνα αντί για πειράματα εντός των κυττάρων. Επίσης, η αρχή του Anfinsen υποδηλώνει έναν μικρό επιμερισμό του μόχθου που πρέπει να καταβληθεί: από τη μία η εξέλιξη επιδρά αλλάζοντας τη σειρά των αμινοξέων, αλλά από την άλλη η ισορροπία και η κινητική της δίπλωσης μιας δεδομένης αλληλουχίας είναι ζήτημα της φυσικής και της χημείας (Dill et al., 2008).

Ποιες δυνάμεις οδηγούν μια πρωτεΐνη στην 3D διπλωμένη δομή της; Οι περισσότερες πληροφορίες προέρχονται από την Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων (Protein Data Bank ή PDB), μια συλλογή 80,000 και πλέον πρωτεϊνικών δομών σε ατομικό επίπεδο. Οι παράγοντες που φαίνεται να συνεισφέρουν είναι (Dill & MacCallum, 2012):

- (i) Οι δεσμοί υδρογόνου. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από α-έλικες και β-φύλλα, όπως είχε προβλεφθεί από τον Linus Pauling.
- (ii) Οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις. Τα άτομα στο εσωτερικό της πρωτεΐνης είναι σφιχτά πακεταρισμένα, υποδηλώνοντας τη σημασία των ίδιων τύπων μικρής εμβέλειας αλληλεπιδράσεων που διέπουν τις δομές των υγρών και των στερεών.
- (iii) Ευνοϊκές γωνίες της ραχοκοκαλιάς. Όπως και σε άλλους τύπους πολυμερών, τα πρωτεϊνικά μόρια διαθέτουν περισσότερο ευνοϊκές γωνίες προσανατολισμού γειτονικών πεπτιδικών δεσμών της ραχοκοκαλιάς.
- (iv) Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Κάποια αμινοξέα έλκονται ή απωθούνται εξαιτίας αρνητικών και θετικών φορτίων.
- (v) Οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε καλά πακεταρισμένες διπλωμένες καταστάσεις, στις οποίες τα υδροφοβικά αμινοξέα βρίσκονται ως επί το πλείστον στον πυρήνα της πρωτεΐνης και τα πολικά αμινοξέα συνήθως στην επιφάνεια της διπλωμένης πρωτεΐνης. Η θεωρία και τα πειράματα δείχνουν ότι η δίπλωση ελέγχεται από ένα δυαδικό κώδικα βασισμένο σε αλληλεπιδράσεις με τα περιβάλλοντα μόρια νερού: υπάρχουν λίγοι τρόποι με τους οποίους η δεδομένη πρωτεϊνική ακολουθία υδροφοβικών και πολικών αμινοξέων είναι δυνατόν να διευθετηθεί στο χώρο απομονώνοντας με τον καλύτερο τρόπο το υδρόφοβα αμινοξέα από το νερό.
- (vi) Η εντροπία της αλυσίδας. Αντιτιθέμενη στην πρωτεϊνική δίπλωση είναι η μεγάλη ελάττωση της εντροπίας της αλυσίδας καθώς η πρωτεΐνη καταρρέει στην συμπαγή ιθαγενή της κατάσταση από τις πολλές μετουσιωμένες χωροδιατάξεις της.

Υπάρχει όμως κάποια κυρίαρχη συνιστώσα στον κώδικα της πρωτεΐνικής δίπλωσης; Πριν τα μέσα της δεκαετίας του 1980 ο κώδικας της πρωτεΐνικής δίπλωσης φαινόταν ως ένα άθροισμα των πολλών διαφορετικών, μικρής ισχύος αλληλεπιδράσεων. Εντούτοις, μέσω μοντέλων στατιστικής μηχανικής, μια διαφορετική όψη αναδύθηκε τη δεκαετία του 1980, ότι, δηλαδή, υπάρχει μια κυρίαρχη συνιστώσα στον κώδικα δίπλωσης, που είναι η υδρόφοβη αλληλεπίδραση, την οποία ο κώδικας δίπλωσης κατανέμει τόσο τοπικά όσο και μη τοπικά στην αλληλουχία και ότι η δευτεροταγής δομή των πρωτεΐνών είναι μάλλον συνέπεια της τριτοταγούς δομής παρά η αιτία της (Dill et al., 2008).

Επειδή οι ιθαγενείς πρωτεΐνες είναι μόλις 5-10 kcal/mol περισσότερο σταθερές από τις μετουσιωμένες τους καταστάσεις, είναι φανερό ότι κανένας τύπος ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων δεν μπορεί να παραλειφθεί στη δίπλωση και στη πρόβλεψη της δομής. Αν και παραμένει πρόκληση το να διαχωρίσει κανείς με έναν ξεκάθαρο και αυστηρό τρόπο κάποιους τύπους αλληλεπιδράσεων από κάποιους άλλους, έχουν διαφανεί κάποια κύρια χαρακτηριστικά. Η δίπλωση δεν είναι πιθανό να κυριαρχείται από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων, επειδή οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν σχετικά λίγα φορτισμένα κατάλοιπα· αυτά συγκεντρώνονται στις υψηλής διηλεκτρικής σταθεράς περιοχές της πρωτεΐνικής επιφάνειας. Η πρωτεΐνική σταθερότητα τείνει να είναι ανεξάρτητη από το pH (κοντά στο φυσιολογικό) και από τη συγκέντρωση του άλατος και οι μεταλλάξεις φορτίων συνήθως οδηγούν σε μικρές αλλαγές στη δομή και στη σταθερότητα. Οι αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου είναι σημαντικές, γιατί ουσιαστικά όλες οι πιθανές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου γενικά ικανοποιούνται στις ιθαγενείς καταστάσεις. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αμιδικών και καρβοξυλικών ομάδων της ραχοκοκαλιάς αποτελούν το κλειδί όλων των δευτεροταγών δομών και μελέτες μεταλλάξεων σε διαφορετικούς διαλύτες υπολογίζουν την ισχύ τους να είναι περίπου 1-4 kcal/mol ή και μεγαλύτερη. Παρόμοια, το συμπαγές, συνεκτικό πακετάρισμα στις πρωτεΐνες υποδηλώνει ότι οι αλληλεπιδράσεις van der Waals είναι επίσης σημαντικές (Dill et al., 2008).

Εντούτοις, το ζητούμενο του κώδικα δίπλωσης είναι κατά πόσο υπάρχει ένας κυρίαρχος παράγοντας που να εξηγεί γιατί δύο οποιεσδήποτε πρωτεΐνες, για παράδειγμα, η λυσοζύ-

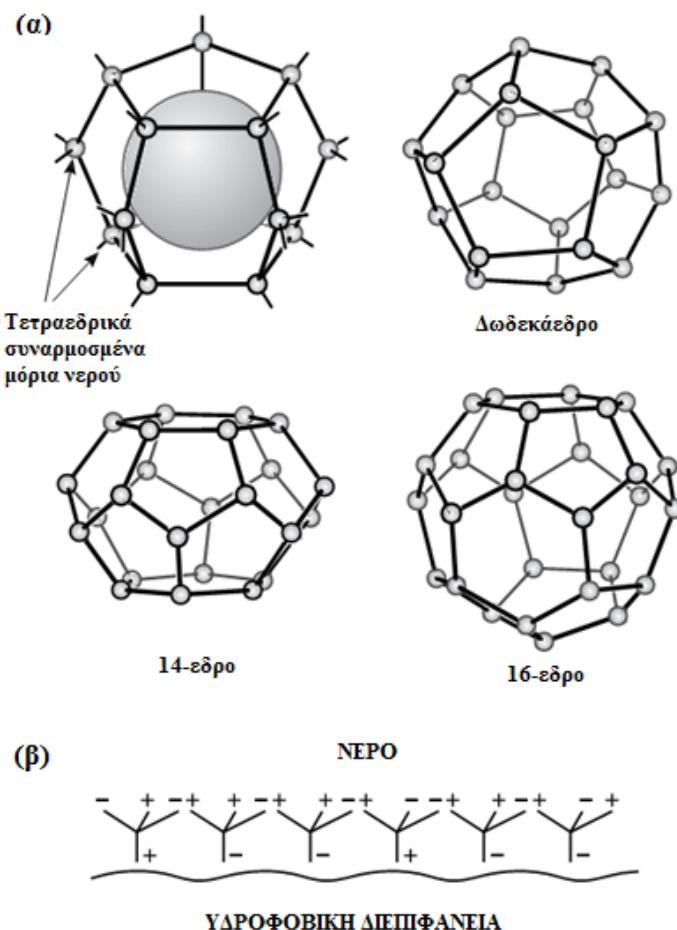
μη και η ριβονουκλεάση έχουν διαφορετικές ιθαγενείς δομές. Αυτός ο κώδικας πρέπει να είναι γραμμένος στις πλευρικές αλυσίδες, όχι στους δεσμούς υδρογόνου της ραχοκοκαλιάς, γιατί είναι στις πλευρικές αλυσίδες εκεί όπου διαφέρει η μία πρωτεΐνη από την άλλη. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις πρέπει να παίζουν τον κυρίαρχο αυτό ρόλο στην πρωτεΐνική δίπλωση: (α) Οι πρωτεΐνες έχουν υδροφοβικούς πυρήνες, υποδηλώνοντας ότι τα μη πολικά αμινοξέα οδηγούνται στη χωρική απομόνωσή τους από το νερό. (β) Μελέτες σε πρότυπες ουσίες δείχνουν 1-2 kcal/mol για τη μεταφορά μιας υδρόφοβης πλευρικής αλυσίδας από το νερό σε μη πολικά μέσα και υπάρχουν πολλές από αυτές σε μια αμινοξική αλυσίδα. (γ) Οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται εύκολα σε μη πολικούς διαλύτες. (δ) Ατάκτως αναμεμιγμένες αλληλουχίες που διατηρούν μόνο το σωστό υδροφοβικό και πολικό πατρόν διπλώνονται στις αναμενόμενες ιθαγενείς τους καταστάσεις, απουσία κάθε περαιτέρω προσπάθειας για σχεδιασμό πακεταρίσματος, φορτίων ή δεσμών υδρογόνου (Dill et al., 2008).

Τι σταθεροποιεί όμως τη δευτεροταγή δομή; Οι δευτεροταγείς δομές σπάνια είναι σταθερές από μόνες τους σε διάλυμα. Αν και διαφορετικά αμινοξέα έχουν διαφορετικές τάσεις να βρίσκονται σε δευτεροταγείς δομές υπάρχουν αρκετές αλληλουχίες «χαμαιλέοντες» στις φυσικές πρωτεΐνες, που είναι πεπτιδικά τμήματα και μπορούν να υιοθετήσουν είτε ελικοειδείς, είτε β διαμορφώσεις ανάλογα με το τριτοταγές περιεχόμενο. Υπολογιστικά μοντέλα έχουν δείξει ότι οι δευτεροταγείς δομές στις πρωτεΐνες σταθεροποιούνται ουσιαστικά από την συμπαγή αλυσίδα, μια έμμεση συνέπεια της κατάρρευσης που προκαλεί η υδρόφοβη δύναμη (Dill et al., 2008).

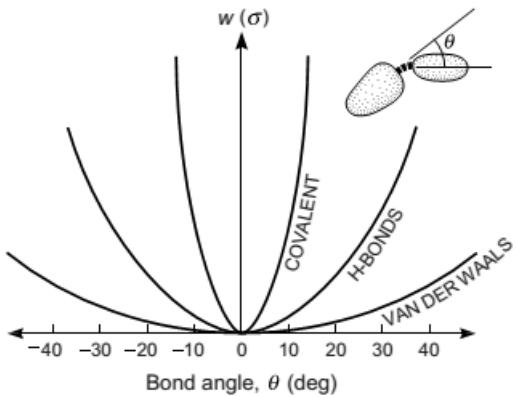
Η ισχυρή τάση των μορίων νερού να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους με μη πολικά μόρια που δεν είναι ικανά να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου (π.χ. αλκάνια, υδρογονάνθρακες, φθοράνθρακες, αδρανή άτομα, ατμούς). Όταν τα μόρια νερού έρχονται σε επαφή με ένα τέτοιο μόριο, τότε ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό των μορίων νερού φαίνεται ότι ένα ή περισσότερα από τα τέσσερα φορτία ανά μόριο θα πρέπει να προσανατολιστεί προς το αδρανές μόριο της διαλυμένης ουσίας και έτσι να χάσει ένα δεσμό υδρογόνου. Προφανώς η καλύτερη στερεοχημική διάταξη θα ήταν αυτή με τον ελάχιστο αριθμό των φορτίων του τετραέδρου προς τα

ανεπιθύμητα μόρια, έτσι ώστε τα άλλα φορτία να μπορούν να προσανατολιστούν προς τη φάση του νερού και να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου. Όμως, υπάρχουν πολλές επιλογές για να διασωθούν οι δεσμοί υδρογόνου. Αν το μη πολικό μόριο της διαλυμένης ουσίας δεν είναι τόσο μεγάλο, είναι δυνατό τα μόρια νερού να πακεταριστούν γύρω από αυτό χωρίς να θυσιάσουν καμία από τις θέσεις δεσμών υδρογόνου τους. Παραδείγματα τέτοιων διευθετήσεων φαίνονται στο Σχ. 1.10. Μιας και οι αλληλεπιδράσεις διασποράς μεταξύ νερού και υδρογονανθράκων δεν είναι πολύ διαφορετικές από αυτές μεταξύ νερού και νερού ή μεταξύ υδρογονάνθρακα και υδρογονάνθρακα, καταλαβαίνουμε ότι ο κύριος λόγος που συγκεντρώνει μαζί τα μόρια νερού και μαζί τα μόρια της μη πολικής διαλυμένης ουσίας είναι ο αναπροσανατολισμός ή αναδιοργάνωση των μορίων νερού, έτσι ώστε να συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, αν είναι δυνατόν, όπως στον κύριο όγκο του νερού - με άλλα λόγια χωρίς απαραίτητα να σπάσουν δεσμοί υδρογόνου. Για να γίνει αυτό οι δεσμοί υδρογόνου πρέπει να κλίνουν από την πιο ευνοϊκή γραμμική τους στερεοχημική διάταξη, και κάτι τέτοιο, όπως φαίνεται στο Σχ. 1.11, έχει ένα μικρό ενεργειακό κόστος. Έτσι χάρις στη μυστηριώδη ικανότητα των τετραεδρικά συναρμοσμένων με δεσμούς υδρογόνου μορίων νερού να συνδέονται μεταξύ τους γύρω από σχεδόν οποιοδήποτε αδρανές μόριο ανεξάρτητα από το μέγεθος ή το σχήμα του, διατηρείται η πλειονότητα των δεσμών υδρογόνου. Μάλιστα, μιας και τα μόρια νερού στην υγρή φάση συμμετέχουν κατά μέσο όρο σε 3.0-3.5 δεσμούς υδρογόνου θα φαινόταν από το Σχ. 1.10α ότι γύρω από κάποια αδρανή μόρια διαλυμένης ουσίας τα μόρια νερού θα μπορούσαν να έχουν μεγαλύτερο βαθμό συναρμογής (τέσσερα) και έτσι ακόμη χαμηλότερη ενέργεια (ενθαλπία) από ότι στον κύριο όγκο του υγρού. Είναι επίσης προφανές ότι τα μεγέθη και τα σχήματα των μη πολικών μορίων της διαλυμένης ουσίας είναι αρκετά κρίσιμα στον προσδιορισμό της δομής του νερού που νιοθετείται γύρω από αυτά και ότι οι δομές που νιοθετούνται γύρω από μικρά μόρια διαλυμένης ουσίας μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικές από ότι σε επιφάνειες (Σχ. 1.10β). Αυτό το φαινόμενο αποκαλείται συχνά υδρόφοβη διαλύτωση ή υδρόφοβη υδάτωση. Προς το παρόν δεν υπάρχει απλή θεωρία για τέτοιες αλληλεπιδράσεις διαλυμένης ουσίας-διαλύτη. Εντούτοις, τόσο οι θεωρητικές, όσο και οι πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η αναδιοργάνωση του νερού γύρω από υδροφοβικές διαλυμένες ουσίες ή επιφάνειες είναι εντροπικά μη ευνοϊκή, μιας και διακόπτει την υπάρχουσα δομή του νερού και θέτει μια νέα και πιο οργανωμένη δομή

στα περιβάλλοντα μόρια νερού. Η αδυναμία ανάμειξης αδρανών ουσιών με το νερό και η κυρίως εντροπική φύση αυτής της ασυμφωνίας είναι γνωστό ως *υδροφοβικό φαινόμενο* (Israelachvili, 2011).



Σχήμα 1.10: (α) «Clathrate κλωβοί» και «gas hydrated» σχηματισμένοι από μόρια νερού γύρω από μικρά υδροφοβικά μόρια διαλυμένης ουσίας, όπου κάθε μόριο νερού μπορεί να συμμετέχει μέχρι και σε τέσσερις δεσμούς υδρογόνου. Τα μόρια νερού που σχηματίζουν αυτούς τους κλωβούς είναι πιο οργανωμένα από ότι του κύριου του όγκου του υγρού και έτσι η απώλεια εντροπίας οδηγεί σε μη ευνοϊκή ελεύθερη ενέργεια, αλλά παραδόξως είναι σταθερή ιδιαίτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλές πιέσεις. Οι πολυεδρικοί κλωβοί μπορούν να οργανωθούν σε υπερπλέγματα, παγιδεύοντας μεγάλες συγκεντρώσεις αερίων, όπως μεθάνιο CH_4 και CO_2 . (β) Η δομή του νερού σε μια εκτεταμένη υδρόφοβη επιφάνεια.



Σχήμα 1.11: Η εξάρτηση διαφόρων τύπων δεσμών από τον προσανατολισμό. Ο ομοιοπολικός δεσμός είναι ο πλέον «κατευθυντικός» με ενέργειες δέσμευσης $w(\sigma)$ της τάξης των ~ 100 kT σε θερμοκρασία δωματίου. Οι δεσμοί υδρογόνου είναι λιγότερο κατευθυντικοί (μεταβάλλονται μέχρι $\sim 20^\circ$) και έχουν χαμηλότερες ενέργειες (~ 10 kT), ενώ οι δεσμοί van der Waals δεν είναι κατευθυντικοί ή είναι ελαφρώς κατευθυντικοί και έχουν τη χαμηλότερη ενέργειας από όλους (~ 1 kT). Σημειώνουμε ότι δεν υπάρχει απλή σχέση μεταξύ ισχύος και κατευθυντικότητας των δεσμών: για παράδειγμα, οι ιοντικοί δεσμοί είναι πολύ ισχυροί και εντελώς μη κατευθυντικοί.

Στενά συνδεμένη με το υδροφοβικό φαινόμενο είναι η υδρόφοβη αλληλεπίδραση, η οποία περιγράφει την ασυνήθιστα ισχυρή έλξη μεταξύ υδροφοβικών μορίων και επιφανειών στο νερό – συχνά ισχυρότερη από την έλξη τους στον ελεύθερο χώρο. Αυτή η ισχυρή αλληλεπίδραση στο νερό δεν μπορεί να λογαριαστεί με βάση τη συμβατική θεωρία των δυνάμεων van der Waals, η οποία προβλέπει ελαττωμένη αλληλεπίδραση στο νερό. Εξαιτίας της ισχύος της θεωρήθηκε ότι κάποιο είδος «υδροφοβικού δεσμού» ήταν υπεύθυνο για αυτήν την αλληλεπίδραση. Άλλα είναι ξεκάθαρο από την περιγραφή που προηγήθηκε ότι δεν υπάρχει δεσμός σχετιζόμενος με το κατεξοχήν εντροπικό φαινόμενο, το οποίο απορρέει πρωταρχικώς από την εκ νέου διευθέτηση της στεροχημικής διάταξης των δεσμών υδρογόνου στις επικαλυπτόμενες ζώνες διαλύτωσης δύο υδροφοβικών μορίων καθώς πλησιάζουν κοντά το ένα με το άλλο και επομένως είναι πολύ μεγαλύτερης εμβέλειας από έναν τυπικό δεσμό. Δεν υπάρχει προς το παρόν ικανοποιητική θεωρία των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων διαλυμένης ουσίας στο νερό. Η μεγάλη εμβέλειά τους ωστόσο φαίνεται να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην αυτό-οργάνωση αμφιφιλικών μορίων, όπως συμβαίνει στα μικκύλια και στις διπλοστοιβάδες, **στη δίπλωση**.

των πρωτεϊνών, στις υδροφοβικές συσσωματώσεις και στους μηχανισμούς σύντηξης των διπλοστοιβάδων και των βιολογικών μεμβρανών. Η επίδραση ηλεκτρολυτικών ιόντων σε υδατικά διαλύματα επίσης δεν έχει ακόμη γίνει κατανοητή: διαφορετικά ανιόντα και κατιόντα μπορούν είτε να αυξήσουν είτε να ελαττώσουν την ισχύ της έλξης μεταξύ μικρών υδροφοβικών διαλυμένων ουσιών. Εντούτοις, παραμένει ακόμη αναπάντητο το κρίσιμο ερώτημα κατά πόσο η υδρόφοβη αλληλεπίδραση είναι μεγάλης εμβέλειας ακόμη και μεταξύ μικρών μορίων και υπο-μοριακών ομάδων, όπως είναι οι αλυσίδες υδρογονανθράκων ή τα υδροφοβικά αμινοξικά κατάλοιπα. Αυτό είναι σημαντικό για τη γνώση του κατά πόσο μεγάλης εμβέλειας έλξεις είναι δυνατόν να εμπλέκονται, για παράδειγμα, στις αλληλεπιδράσεις της εξειδικευμένης βιολογικής αναγνώρισης και στην **πρωτεϊνική δίπλωση** (Israelachvili, 2011).

1.4. Θερμοδυναμική σταθερότητα

Η πολύπλοκη διεργασία της πρωτεϊνικής δίπλωσης λαμβάνει χώρα, τυπικά, υπό σταθερή πίεση και θερμοκρασία. Το φυσικό θερμοδυναμικό δυναμικό για να περιγράψει κανείς διεργασίες σε σταθερή πίεση και θερμοκρασία είναι η ελεύθερη ενέργεια Gibbs (Bryngelson et al., 1995).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μια πρωτεΐνη συντίθεται ως ένα ετερογενές γραμμικό πολυμερές, ένα πολυπεπτίδιο, και διπλώνεται σε μια λειτουργικά ενεργή, μοναδική διαμόρφωση χρησιμοποιώντας μόνο την πληροφορία που περιλαμβάνεται στην αλληλογνωσία των αμινοξικών καταλοίπων. Ο ρυθμός της δίπλωσης και η κατάληξη σε μια σωστά διπλωμένη διαμόρφωση αποκλείουν το ενδεχόμενο η δίπλωση να είναι μια απλή στοχαστική διεργασία. Η πολύπλοκη αυτή διεργασία είναι κατά κάποιο τρόπο μάλλον κατευθυνόμενη, δηλαδή, προχωράει μέσω μιας ορισμένης ακολουθίας ενδιάμεσων καταστάσεων με ελαττωμένες ελεύθερες ενέργειες Gibbs. Η φύση αυτών των ενδιάμεσων έχει προκαλέσει πολλή συζήτηση λόγω της απουσίας αξιόπιστων πληροφοριών για τις καταστάσεις αυτές, κάτι που κυρίως οφείλεται στο ότι είναι αρκετά ασταθείς και χαρακτηρίζονται από ταχύτητας ρυθμούς μετάπτωσης από τη μία κατάσταση στην άλλη έτσι ώστε ο πληθυσμός

των μορίων στις καταστάσεις αυτές να είναι ανά πάσα χρονική στιγμή ελάχιστος (Privalov, 1996).

Εντούτοις, κάποιες πρωτεῖνες κάτω υπό ειδικές συνθήκες έχει παρατηρηθεί ότι δεν εμφανίζονται ιθαγενείς ή πλήρως ξεδιπλωμένες. Αυτές οι περιπτώσεις έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μιας και θεωρούνται το κλειδί για τη λύση του προβλήματος της πρωτεϊνικής δίπλωσης. Τι είναι λοιπόν αυτές οι μη-ιθαγενείς καταστάσεις; Μπορεί να είναι, είτε λανθασμένα διπλωμένες πρωτεῖνες, είτε μερικώς διπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, αληθινά ενδιάμεσα της δίπλωσης. Αν είναι πράγματι ενδιάμεσοι, μπορεί να αντιπροσωπεύουν, είτε κάποια καθολική κατάσταση ολόκληρης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης, είτε μια κατάσταση στην οποία μόνο ένα τμήμα της αλυσίδας είναι διπλωμένο σε μια πλησίον της ιθαγενούς δομή. Αν αυτό το τμήμα της αλυσίδας είναι σταθερό και ξεδιπλώνεται συνεργατικά, περισσότερο ή λιγότερο ανεξάρτητα από το υπόλοιπο μόριο, τότε θα πρέπει να θεωρηθεί ως μια περιοχή δίπλωσης από μόνο του και η πρωτεΐνη ότι αποτελείται από περισσότερες από μία τέτοιες περιοχές. Είναι προφανές ότι η δίπλωση των μεγάλων πρωτεϊνών, αποτελούμενων από περισσότερες από μία δομικές περιοχές, προχωρά με διακριτά βήματα που αντιστοιχούν στη δίπλωση των διακεκριμένων αυτών περιοχών. Το βασικό πρόβλημα, όμως, είναι η δίπλωση μιας μικρής πρωτεΐνης χωρίς κάποια σαφή περαιτέρω οργάνωση της δομής της σε υποπεριοχές. Αν η εμφανιζόμενη κατά τη δίπλωση και το ξεδιπλωμα μιας μικρής πρωτεΐνης ενδιάμεση κατάσταση, όντας σταθερή υπό κάποιες συνθήκες, δεν αναπαριστά ένα τεχνούργημα της δίπλωσης, δηλαδή, δεν είναι μια κακώς διπλωμένη κατάσταση, παγιδευμένη σε ένα ενεργειακό πηγάδι, τότε θα πρέπει να είναι μια καθολική μακροσκοπική κατάσταση ολόκληρου του πρωτεϊνικού μορίου. Διαφορετικά αν η ενδιάμεση κατάσταση αφορούσε σε ένα μόνο διπλωμένο τμήμα του μορίου, τότε το τμήμα αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια υποπεριοχή ή μια επιπλέον περιοχή ολόκληρου του μορίου (Privalov, 1996).

Η εξαιρετική συναρμογή των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων (ή απλά το πακετάρισμά τους) στον πρωτεϊνικό πυρήνα είναι αποτέλεσμα του πρωτεύοντα ρόλου της στη μοριακή αναγνώριση κατά τη διεργασία της δίπλωσης. Αντίστοιχα, η μοριακή αναγνώριση παίζει επίσης πρωτεύοντα ρόλο στην ανάπτυξη εξειδικευμένων δομικών

στοιχείων στις διεπιφάνειες πρόσδεσης, ώστε να επιτυγχάνεται η λειτουργικότητα του πρωτεΐνικού μορίου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πρωτεΐνες είναι καλά πακεταρισμένες έτσι ώστε στο εσωτερικό τους παρουσιάζουν λίγα μόνο κενά ατομικών διαστάσεων. Η κατάσταση αυτή ομοιάζει πολύ με την αντίστοιχη των μικρών οργανικών στερεών. Όλο και περισσότερα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι, είτε η απόκτηση, είτε η διάρρηξη του κλειστού πακεταρίσματος είναι δυνατόν να παρατηρηθούν ως διακεκριμένο βήμα κατά τη δίπλωση ή το ξεδίπλωμα μιας πρωτεΐνης. Ως επακόλουθο, η ανακάλυψη της ενδιάμεσης χωροδιάταξης σφαιροειδούς τήγματος, molten globule, η οποία δεν είναι καλά πακεταρισμένη, οδήγησε σε πολλή συζήτηση περί του ρόλου της – αν υπάρχει – στο μηχανισμό της πρωτεΐνικής δίπλωσης. Αρχικά, ο όρος molten globule χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει το λεγόμενο «υγρό» molten globule, μια εξαιρετικά δυναμική κατάσταση της πρωτεΐνης με δευτεροταγή δομή παραπλήσια της ιθαγενούς και έναν πρωτεΐνικό πυρήνα που φιλοξενεί μόρια διαλύτη. Ένας τέτοιος πυρήνας στερείται ιδανικής προσαρμογής των πλευρικών ομάδων των αμινοξικών καταλοίπων. Αργότερα διαπιστώθηκε η ύπαρξη του λεγόμενου «ξηρού» molten globule που αποτελεί μια άλλη ξεχωριστή κατάσταση σε ένα φάσμα, όπως φαίνεται, molten globule. Το ξηρό molten globule είναι μια διογκωμένη μορφή της ιθαγενούς κατάστασης στην οποία οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων δεν είναι «κλειδωμένες», αλλά η χωροδιάταξη ομοιάζει με αυτήν της ιθαγενούς κατάστασης, ενώ το νερό δεν διαπερνά τον πυρήνα (Baldwin & Rose, 2013), (Baldwin et al., 2010). Το αν αυτές οι «εξωτικές» πρωτεΐνικές καταστάσεις αποτελούν ένα παγκόσμιο ενδιάμεσο της πρωτεΐνικής δίπλωση/αποδίπλωσης, μια τρίτη θερμοδυναμική κατάσταση των πρωτεΐνικών μορίων (Ptitsyn & Uversky, 1994), ή αν πρέπει να επανέλθουμε στην αρχική ιδέα του Anfinsen, ότι δηλαδή όλες οι ενδιάμεσες καταστάσεις είναι αποκλίσεις της ιθαγενούς χωροδιάταξης, εξαιρετικά ασταθείς, με διάφορα τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας συμπυκνωμένα σε μορφή πολύ κοντινή με αυτήν της ιθαγενούς, παραμένει ανοικτό (Privalov, 1996).

Η θερμοδυναμική κατάσταση ενός μακροσκοπικού συστήματος διαφέρει σημαντικά από όλες τις άλλες καταστάσεις στις εκτατικές θερμοδυναμικές παραμέτρους, στην ενθαλπία, στην εντροπία, στον όγκο, κ.τ.λ., στις πρώτες παραγώγους του θερμοδυναμικού δυναμικού. Η μετάβαση από τη μία κατάσταση στην άλλη προχωράει μέσω δραματικών μετα-

βολών αυτών των παραμέτρων. Με άλλα λόγια, σχετίζεται με την ασυνέχεια των πρώτων παραγώγων του θερμοδυναμικού δυναμικού. Μια τέτοια μεταβολή κατάστασης λέγεται μετάβαση πρώτης φάσης. Θεωρώντας ένα πρωτεΐνικό μακρομόριο ως μακροσκοπικό σύστημα, μπορεί κανείς να ορίσει τις θερμοδυναμικές του καταστάσεις ως τις διαμορφώσεις που διαχωρίζονται μεταξύ τους με μια μετάβαση φάσης πρώτης τάξης. Η ιθαγενής κατάσταση μιας πρωτεΐνης, που αποτελεί η ίδια μια υψηλής συνεργατικότητας περιοχή, διαχωρίζεται από τη μετουσιωμένη, ξεδιπλωμένη κατάσταση από μια, δύο-καταστάσεων μετάβαση, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως μια μετάβαση φάσης πρώτης τάξεως, μιας και συνοδεύεται από μια δραματική μεταβολή στην ενθαλπία, στην εντροπία και στον όγκο (Privalov, 1996).

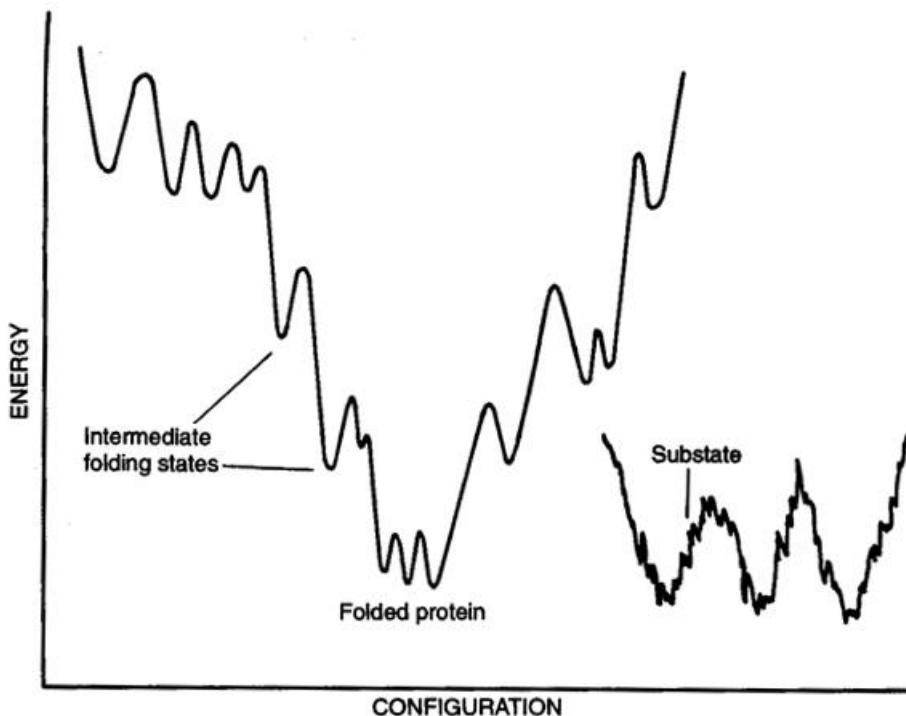
Οι πρωτεΐνες λοιπόν εμφανίζουν θερμοδυναμικά διακριτά μακροσκοπικά συστήματα, δηλαδή, υποδιαιρούνται σε διακριτές συνεργατικές περιοχές και μια πρωτεΐνη που συνιστά από μόνη της μια συνεργατική περιοχή έχει μόνο δύο σταθερές μακροσκοπικές καταστάσεις, την ιθαγενή και τη μετουσιωμένη. Ορίζουμε τότε τη θερμοδυναμική σταθερότητα μιας συνεργατικής δομής που διαρρηγνύεται ως μια οντότητα, τη διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs μεταξύ της ιθαγενούς και της μετουσιωμένης κατάστασης:

$$\Delta G_N^D = G_D - G_N$$

Αυτή η διαφορά αντιστοιχεί στο έργο που απαιτείται για τη διάρρηξη τη ιθαγενούς δομής (Makhatadze & Privalov, 1995).

Οι πρωτεΐνες είναι «μεσοσκοπικά» σε μέγεθος συστήματα. Είναι αρκετά μικρά ώστε να μπορεί κανείς να δημιουργήσει και να μελετήσει μια μεγάλη συλλογή από αυτά και ακόμη κάθε ένα από αυτά είναι αρκετά μεγάλο για να έχει πολλές διακριτές θέσεις που μπορούν να ανιχνευθούν ξεχωριστά με ισχυρές φασματοσκοπικές μεθόδους. Η περίθλαση ακτίνων-X και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες αυτό-οργανώνονται με τέτοιο τρόπο που μπορούμε να δώσουμε τουλάχιστον μια προσεγγιστική χωρική τοποθέτηση σε αυτές τις διαφοροποιήσιμες θέσεις στη διπλωμένη πρωτεΐνη. Η προσδιοριζόμενη με τις παραπάνω μεθόδους δομή αποτελεί μια στατική εικόνα που είναι παραπλανητική σε ό,τι αφορά στις ενεργειακές στάθμες μιας πρωτεΐνης. Σε απλά συστήματα όπως είναι τα άτομα, οι πυρήνες ή τα σωματίδια, η θεμε-

λιώδης κατάσταση δεν είναι εκφυλισμένη και οι διεγερμένες καταστάσεις μπορούν να χαρακτηριστούν από τις ενέργειες πάνω από τη θεμελιώδη στάθμη με επιπλέον βοηθητικούς κβαντικούς αριθμούς, όπως το σπιν και η ομοτιμία. Σε πολύπλοκα συστήματα τέτοια περιγραφή δεν είναι πλέον εφικτή: Η θεμελιώδης κατάσταση μιας πρωτεΐνης είναι υψηλού βαθμού εκφυλισμένη και αντί για ενεργειακές στάθμες πρέπει να μιλήσουμε για ένα «ενεργειακό ανάγλυφο». Η ενέργεια μιας πρωτεΐνης είναι συνάρτηση της τοπολογικής διευθέτησης των ατόμων. Περιγράφεται από μια υπερ-επιφάνεια σε έναν χώρο μερικών χιλιάδων συντεταγμένων, με έναν μεγάλο αριθμό ενεργειακών κοιλάδων και ορέων. (Βλέπε σχήμα 1.12). Κάθε κοιλάδα στην υπερ-επιφάνεια περιγράφει την πρωτεΐνη σε μια συγκεκριμένη διαμόρφωση. Οι πρωτεΐνες επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες. Ακόμη και στις απλούστερες περιπτώσεις έχουν δύο καταστάσεις, για παράδειγμα μια φορτισμένη κατάσταση και μια ουδέτερη κατάσταση. Κάθε τέτοια κατάσταση έχει ένα ενεργειακό ανάγλυφο με πολλές κοιλάδες. Λέμε ότι κάθε κοιλάδα χαρακτηρίζει μια «χωροδιατακτική υποκατάσταση» (Frauenfelder & Wolynes, 1994).



Σχήμα 1.12: Το ανάγλυφο ενέργειας δίπλωσης για ένα πρωτεϊνικό μόριο, αναπαρίσταται σχηματικά με μια μονοδιάστατη διατομή. Η δίπλωση ξεκινά καθώς το μόριο κατέρχεται το χωνοειδές πολυδιάστατο ανάγλυφο που το οδηγεί απευθείας στις διαμορφώσεις μικρότερης ενέργειας στον

πυθμένα. «Τραχιά» και «λεία» χαρακτηριστικά συνυπάρχουν: Η χοάνη δημιουργείται από τις λείες καθοδηγητικές δυνάμεις υπερτιθέμενες πάνω στα μικρότερης κλίμακας τραχιά χαρακτηριστικά της. Ενδιάμεσες καταστάσεις δίπλωσης ενεδρεύουν στις κατωφέρεις της χοάνης και ακόμη και στην περιοχή της πλήρους δίπλωσης στον πυθμένα υπάρχει μεγάλος αριθμός υποκαταστάσεων.

2. Πειραματικές Τεχνικές & Μεθοδολογία

2.1. Αδιαβατική Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης

Η τεχνική της Αδιαβατικής Θερμιδομετρίας Διαφορικής Σάρωσης ή DSC (Differential Scanning Calorimetry) χρησιμοποιείται ευρέως τρεις δεκαετίες και πλέον για τη μελέτη των θερμοδυναμικών παραμέτρων των σχετιζόμενων με διεργασίες που συμβαίνουν είτε λόγω αύξησης, είτε λόγω ελάττωσης της θερμοκρασίας. Μόρια αρκετά μικρού μοριακού βάρους δεν είναι δυνατόν να εξεταστούν με την τεχνική DSC (στο θερμοκρασιακό εύρος από -10 ως 120 °C) εκτός αν σχηματίζουν δομές υπερμοριακών συσσωματωμάτων που εμφανίζουν διαμοριακή συνεργατικότητα. Υψηλής συνεργατικότητας δομές, όπως τα βιοπολυμερή (συσσωματώσεις λιπιδίων ή λιποσωμάτων, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες), τα οποία σταθεροποιούνται μέσω της συνεργατικότητας μεγάλου αριθμού ασθενών αλληλεπιδράσεων (δεσμών υδρογόνου, ηλεκτροστατικών και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων), συχνά υφίστανται μεταβάσεις φάσης ως αποτέλεσμα μεταβολών που συμβαίνουν στη χωροδιάταξη, στην υδάτωση, στη συσσωμάτωση ή σε συνδυασμό αυτών των παραγόντων. Για αυτούς τους τύπους μορίων η ανάλυση με DSC είναι δυνατόν να εξασφαλίσει τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων τους. Σε συνδυασμό μάλιστα με πληροφορίες που λαμβάνονται από φασματοσκοπικές τεχνικές, το DSC καθιστά μια λεπτομερέστερη ανάλυση του υπό μελέτη συστήματος, επιτρέποντας να διερευνηθεί ο συσχετισμός των μεταβολών που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο κατά την αλλαγή της θερμοκρασίας με την ενέργεια του συστήματος (Ladbury & Chowdhry, 1998).

Η σημασία της θερμιδομετρικής μελέτης των μεταβολών των πρωτεΐνικών καταστάσεων οφείλεται στο γεγονός ότι η θερμιδομετρία είναι η μόνη μέθοδος άμεσου προσδιορισμού της ενθαλπίας της σχετιζόμενης με τη διεργασία που μας ενδιαφέρει. Αποκτά μάλιστα ιδιαίτερη σημασία στη μελέτη των θερμικά επαγόμενων μεταβολών των πρωτεΐνικών καταστάσεων, μιας και η θερμοκρασία με την ενθαλπία είναι συζυγείς εντατικές και εκτατικές μεταβλητές. Όλες οι θερμικά επαγόμενες μεταβολές σε μακροσκοπικά συστήματα λαμβάνουν χώρα με μια αντίστοιχη μεταβολή στην ενθαλπία, δηλαδή, συνοδεύονται από απορρόφηση θερμότητας, αν η διεργασία προκαλείται με αύξηση της θερμο-

κρασίας ή από έκλυση θερμότητας, αν προκαλείται με ελάττωση της θερμοκρασίας. Η συναρτησιακή σχέση μεταξύ ενθαλπίας και θερμοκρασίας περιλαμβάνει όλη τη θερμοδυναμική πληροφορία των μακροσκοπικών καταστάσεων, των προσβάσιμων μέσα στο θεωρούμενο θερμοκρασιακό εύρος (Privalov & Potekhin, 1986). Η εν λόγω εξάρτηση μπορεί να εξαχθεί πειραματικά από τις θερμιδομετρικές μετρήσεις της θερμοχωρητικότητας του υπό μελέτη συστήματος στο θερμοκρασιακό εύρος που μας ενδιαφέρει. Μιας και η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση είναι η παράγωγος ως προς τη θερμοκρασία της συνάρτησης της ενθαλπίας

$$C_P = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_P$$

μπορεί κανείς εύκολα να υπολογίσει την ενθαλπία ως συνάρτηση της θερμοκρασίας

$$H(T) = \int_{T_0}^T C_P(T) dT + H(T_0)$$

Η πρωτεΐνη, ως υλικό για θερμιδομετρική μελέτη, έχει κάποια χαρακτηριστικά τα οποία τη διαφοροποιούν από άλλα υλικά. Το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης είναι συνήθως μεγαλύτερο από 10000. Έτσι, αυτά τα μόρια, αποτελούμενα από μερικές χιλιάδες ατόμων, μπορούν να θεωρηθούν από μόνα τους ως μακροσκοπικά συστήματα. Το σημαντικό χαρακτηριστικό στις θερμιδομετρικές μελέτες αυτών των βιολογικών μακρομορίων είναι ότι ενδιαφερόμαστε για τις φυσικές τους ιδιότητες όχι σε απομονωμένη κατάσταση-στο κενό, αλλά σε μια διασκορπιστική κατάσταση-σε διάλυμα (συγκεκριμένα σε υδατικό διάλυμα) μέσα στο οποίο μπορούν να θεωρηθούν ως ξεχωριστά μακροσκοπικά συστήματα που περιβάλλονται από το μέσο του διαλύτη. Η συγκέντρωση του διαλύματος, στην οποία η αλληλεπίδραση μεταξύ των μακρομορίων είναι επαρκώς μικρή για να αγνοηθεί, είναι της τάξης του 10^{-4} M για μέσου μεγέθους πρωτεΐνες. Σε τόσο αραιά διαλύματα, εντούτοις, η συνεισφορά των μακρομορίων στις θερμικές ιδιότητες ολόκληρων των δειγμάτων είναι μικρή: η θερμοχωρητικότητα της πρωτεΐνης δεν ξεπερνά το 0.03%, ενώ το πλεόνασμα της θερμοχωρητικότητας στην κορυφή της μετουσίωσης είναι λιγότερο από 1% της θερμοχωρητικότητας του διαλύματος. Η άλλη σημαντική ιδιαιτερότητα των βιολογικών μορίων είναι η περιορισμένη διαθεσιμότητά τους και ενίστε το υψηλό τους κόστος, λόγω της δυσκολίας της απομόνωσης και του καθαρισμού τους. Η ποσότητα του

υλικού που πρακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και για υλικά που παράγονται με σχετική ευκολία, δεν ξεπερνά τα λίγα χιλιοστογραμμάρια (Privalov & Potekhin, 1986).

2.1.1. Αδιαβατικό θερμιδόμετρο διαφορικής σάρωσης υψηλής ευαισθησίας

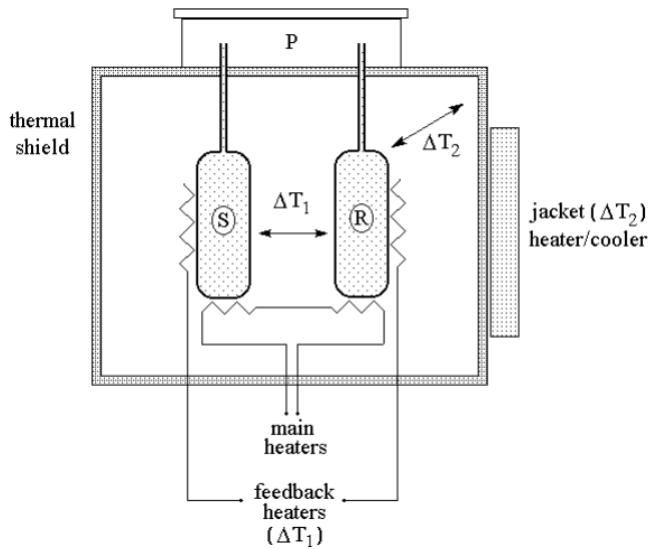
Όσον αφορά στις εφαρμογές των θερμιδομετρικών τεχνικών με μελέτες βιομορίων η ευαισθησία των θερμιδόμετρων ήταν μεταξύ άλλων ένα από τα σημαντικά προβλήματα των περασμένων δεκαετιών. Μεγαλύτερη ευαισθησία εξασφαλίζει ακρίβεια ακόμα και για μικρότερες ποσότητες βιολογικών υλικών. Το VP DSC της Microcal, Northampton, USA, σχεδιασμένο από τον Valerian Plotnikov επέτρεψε τη χρήση μόλις 50 μg πρωτεΐνης και ταυτόχρονα βελτίωσε σημαντικά και άλλα χαρακτηριστικά σχετιζόμενα με τις συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων. Το όργανο αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Ένα σχηματικό διάγραμμα του οργάνου φαίνεται στο Σχήμα 2.1. Αποτελείται από τα ακόλουθα κύρια μέρη: πανομοιότυπα κελιά δείγματος και αναφοράς, με σχεδόν τριχοειδείς σωλήνες εισόδου για γόμωση και καθαρισμό· κύρια θερμαντικά στοιχεία στα κελιά για σάρωση αυξανόμενης θερμοκρασίας· βοηθητικά θερμαντικά στοιχεία που παρέχουν ισχύ ανάδρασης στα κελιά και κρυσταλλικό αισθητήρα που μετρά τη διαφορά θερμοκρασίας ΔT_1 των δύο κελιών. Γύρω από τα κελιά υπάρχει ένα θερμικό περίβλημα με μια συσκευή θέρμανσης/ψύξης. Ένας δεύτερος αισθητήρας μετράει τη διαφορά θερμοκρασίας ΔT_2 μεταξύ περιβλήματος και κελιών (Plotnikov et al., 1997).

Σε ένα DSC πείραμα παρέχεται στα κελιά δείγματος και αναφοράς ισχύς με σταθερό ρυθμό. Τα κελιά φιλοξενούν το πρωτεϊνικό και το ρυθμιστικό διάλυμα, αντίστοιχα, και η ισχύς παρέχεται μέσω των κύριων θερμαντικών στοιχείων. Καταγράφονται οι διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ των κελιών δείγματος και αναφοράς (ΔT_1) και μεταξύ των κελιών και του θερμικού περιβλήματος (ΔT_2). Η συσκευή θέρμανσης του περιβλήματος παρέχει ισχύ έτσι ώστε η θερμοκρασία του περιβλήματος να ακολουθεί αυτή των κελιών και οι βοηθητικοί αισθητήρες στα κελιά αντισταθμίζουν οποιαδήποτε θερμοκρασιακή διαφορά

μεταξύ των κελιών κατά τη διάρκεια της σάρωσης. Διαφορές στη θερμική ενέργεια που απορροφούν το κελί του δείγματος και το κελί αναφοράς για να διατηρούν την ίδια θερμοκρασία αντιστοιχούν σε διαφορές της φαινόμενης θερμοχωρητικότητας και είναι αυτές που δίνουν τις άμεσες πληροφορίες για την ενέργεια της θερμικά επαγόμενης διεργασίας στο δείγμα. Το σήμα εξόδου του οργάνου είναι ανάλογο με τη διαφορά θερμοχωρητικότητας μεταξύ των δύο κελιών (Harding & Chowdhry, 2001). Τα κελιά είναι κατασκευασμένα από ταντάλιο και έχουν ενεργό όγκο 0.5 ml (Plotnikov et al., 1997).

Για πειράματα σάρωσης αυξανόμενης θερμοκρασίας, το όργανο λειτουργεί με αδιαβατικό τρόπο, έτσι ώστε η ισχύς σάρωσης να εφαρμόζεται στα κελιά και η θερμοκρασία του περιβλήματος να ακολουθεί αυτήν των κελιών. Για πειράματα σάρωσης στα οποία η θερμοκρασία ελαττώνεται, το όργανο λειτουργεί μη-αδιαβατικά μιας και η ισχύς σάρωσης εφαρμόζεται στο περίβλημα και η θερμοκρασία των κελιών ακολουθεί αυτήν του περιβλήματος με μια θερμική υστέρηση, διότι τα κελιά ψύχονται μόνο μέσω ανταλλαγής θερμότητας με το περίβλημα. Η αδιαβατικότητα έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη επαναληψιμότητα και λιγότερο θερμικό θόρυβο στο υπόβαθρο του οργάνου κατά τη σάρωση. Όταν απαιτείται το υψηλότερο επίπεδο πειραματικής ευαισθησίας από ένα DSC όργανο, μια σημαντική θεώρηση είναι αυτή της «θερμικής ιστορίας» του οργάνου πριν την έναρξη ενός νέου πειράματος. Μια σάρωση πραγματοποιούμενη αφού το όργανο έχει μείνει σε θερμοκρασία δωματίου όλο το βράδυ θα διαφέρει κάπως από μια σάρωση πραγματοποιούμενη μετά την ολοκλήρωση ενός πειράματος που κατέληξε σε υψηλή θερμοκρασία. Στην πραγματικότητα, ο υψηλότερος βαθμός επικάλυψης μεταξύ διαδοχικών σαρώσεων, είτε με, είτε χωρίς αναγόμωση, θα επιτευχθεί όταν το όργανο παραμείνει στον ίδιο θερμικό κύκλο (ίδιο ρυθμό σάρωσης, ίδια αρχική και τελική θερμοκρασία, ίδιο χρόνο μεταξύ του τέλους και της αρχής της επόμενης σάρωσης) στη διάρκεια της πορείας όλων των πειραμάτων (Plotnikov et al., 1997).



Σχήμα 2.1: Διαγραμματικό σκίτσο ενός τυπικού DSC που χρησιμοποιείται για θερμικές μελέτες αραιών διαλυμάτων βιομορίων. Πανομοιότυπα κελιά δείγματος (S) και αναφοράς (R) που περιέχουν διάλυμα πρωτεΐνης και ρυθμιστικό διάλυμα, αντίστοιχα, βρίσκονται σε αυξημένη ατμοσφαιρική πίεση (P) για να εμποδιστεί ο σχηματισμός φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της θέρμανσης. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, παρέχεται ισχύς στους κύριους αισθητήρες θερμότητας για την αύξηση της θερμοκρασίας των κελιών με σταθερό ρυθμό, ενώ στην οθόνη του H/Y βλέπουμε τις διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ των κελιών δείγματος και αναφοράς (ΔT_1) και μεταξύ των κελιών και του αδιαβατικού περιβλήματος (ΔT_2). Η ανάδραση μέσω της συσκευής θέρμανσης του περιβλήματος εξασφαλίζει η θερμοκρασία του αδιαβατικού περιβλήματος να ακολουθεί αυτή των κελιών και οι αισθητήρες ανάδρασης στα κελιά αντισταθμίζουν οποιαδήποτε θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ των κελιών κατά τη διάρκεια της σάρωσης.

Οι παράμετροι λειτουργίας του θερμιδόμετρου VP-DSC είναι καταχωρημένες στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Τα βασικά χαρακτηριστικά λειτουργίας του θερμιδόμετρου VP-DSC

| | |
|------------------------------------|----------------------|
| Διακριτική ικανότητα | 2 μcal/min |
| Λειτουργικό θερμοκρασιακό εύρος | -10 έως 130 °C |
| Εύρος ρυθμού θέρμανσης | 0.017 έως 1.5 °C/min |
| Εύρος ρυθμού ψύξης | 0.017 έως 1.0 °C/min |
| Θερμοκρασιακή σταθερότητα | 0.01 °C |
| Συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος | 0.001 έως 0.01 mM |

2.1.2. Πειραματική μεθοδολογία DSC

Η διαφορά ισχύος ($J \text{ s}^{-1}$), μετά από κανονικοποίηση ως προς το ρυθμό θέρμανσης ($K \text{ s}^{-1}$), είναι η απευθείας μετρούμενη ποσότητα ενός DSC και εκφράζει τη διαφορά θερμοχωρητικότητας μεταξύ του διαλύματος στο κελί του δείγματος και του διαλύτη στο κελί αναφοράς $\Delta C_P^{sol-solv} = C_P^{sol} - C_P^{solv}$ (σε μονάδες των $J \text{ K}^{-1}$). Το μέγεθος για το οποίο ενδιαφέρεται κανείς είναι η μερική ειδική θερμοχωρητικότητα ($J \text{ K}^{-1} \text{ g}^{-1}$) της διαλυμένης ουσίας M , $C_P(T)$. Για να προσδιοριστεί αυτή πρέπει να αφαιρεθεί η μερική ειδική θερμοχωρητικότητα του διαλύτη, $C_{P,solv}(T)$. Αυτή η διόρθωση απαιτεί ακριβή γνώση των μαζών του μακρομορίου και του διαλύτη, της μάζας του διαλύτη που αντικαθίσταται από το μακρομόριο και των μερικών ειδικών όγκων του μακρομορίου και του διαλύτη. Αυτές οι ποσότητες είναι θερμοκρασιακά εξαρτώμενες και οι συντελεστές θερμικής διαστολής των χημικών ειδών όπως επίσης και των θερμιδομετρικών κελιών πρέπει να είναι γνωστές. Μπορεί να δειχθεί ότι η μερική ειδική θερμοχωρητικότητα της διαλυμένης ουσίας M (σε μονάδες $J \text{ K}^{-1} \text{ g}^{-1}$) δίνεται από:

$$C_P(T) = C_P^{solv} \frac{\bar{v}_M}{\bar{v}_S} + \frac{\Delta C_P^{sol-solv}}{m_M}$$

όπου m_M και \bar{v}_M είναι αντίστοιχα, η μάζα και ο μερικός ειδικός όγκος του M και \bar{v}_S είναι ο μερικός ειδικός όγκος του διαλύτη (Jelesarov & Bosshard, 1999). Για να έχει νόημα η σύγκριση των καμπυλών θερμικής μετάβασης διαφορετικών συστατικών η ειδική θερμο-

χωρητικότητα δεν είναι κατάλληλη διότι είναι κανονικοποιημένη ως προς τη μάζα του συστατικού. Η κατάλληλη ποσότητα είναι η μερική γραμμομοριακή θερμοχωρητικότητα, $\langle C_p \rangle$, η οποία έχει μονάδες $J\ K^{-1} \ mol^{-1}$. Λαμβάνεται από τη C_P ($J\ K^{-1} \ g^{-1}$) πολλαπλασιάζοντας με το μοριακό βάρος ($g\ mol^{-1}$). Οι γωνιακές παρενθέσεις, $\langle \rangle$, υποδηλώνουν το μέσο ως προς τη συλλογή πληθυσμό όλων των μοριακών καταστάσεων που καταλαμβάνονται κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την ιθαγενή στη μετουσιωμένη μορφή (Jelesarov & Bosshard, 1999). Κατά τη διάρκεια της μετάβασης μιας πρωτεΐνης η συνάρτηση της θερμοχωρητικότητας θα εμφανίσει μια ανωμαλία (μία ή περισσότερες κορυφές) σε κάποια ή κάποιες χαρακτηριστικές θερμοκρασίες. Τότε, η συνάρτηση της θερμοχωρητικότητας δεν μπορεί πλέον να αποδοθεί σε μια μόνο δομική κατάσταση, διότι περιλαμβάνει συνεισφορές από όλες τις καταστάσεις που καταλαμβάνονται κατά τη διάρκεια της μετάβασης, όπως επίσης επιπλέον συνεισφορές από την παρουσία αυξημένων ενθαλπικών διακυμάνσεων μέσα στη θερμοκρασιακή περιοχή της μετάβασης. Οι τελευταίες παράγουν τη χαρακτηριστική κορυφή που σχετίζεται με τη θερμικά επαγόμενη μετάβαση. Αν η ιθαγενής κατάσταση ληφθεί ως κατάσταση αναφοράς, η πλεονάζουσα γραμμομοριακή θερμοχωρητικότητα ή απλά πλεονάζουσα θερμοχωρητικότητα ($\langle \Delta C_p \rangle$), μπορεί να οριστεί ως (Jelesarov & Bosshard, 1999), (Freire, 1995)

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle C_p \rangle - \langle C_{p,N} \rangle$$

Η θεμελιώδης ποσότητα που απαιτείται για να περιγράψει κανείς τη χωροδιατακτική ισορροπία μιας μονομερούς πρωτεΐνης είναι η συνάρτηση επιμερισμού, Q , η οποία ορίζεται ως το άθροισμα των στατιστικών βαρών όλων των προσβάσιμων στην πρωτεΐνη καταστάσεων:

$$Q = \sum_{i=0}^N \exp(-\Delta G_i / RT) \quad (2.1)$$

όπου τα στατιστικά βάρη ή αλλιώς τα εκθετικά Boltzmann [$\exp(-\Delta G_i / RT)$] ορίζονται με όρους της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ΔG_i για κάθε κατάσταση, R είναι η σταθερά των αερίων, και T η απόλυτη θερμοκρασία. Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs για κάθε κατάσταση δίνεται από την θερμοδυναμική σχέση:

$$\Delta G_i = \Delta H_i(T_R) + \int_{T_R}^T \Delta C_{p,i} dT - T \left[\Delta S_i(T_R) + \int_{T_R}^T \Delta C_{p,i} d\ln T \right] \quad (2.2\alpha)$$

$$\Delta G_i = \Delta H_i(T_R) + \Delta C_{p,i}(T - T_R) - T [\Delta S_i(T_R) + \Delta C_{p,i} \ln(T/T_R)] \quad (2.2\beta)$$

όπου $\Delta H_i(T_R)$ και $\Delta S_i(T_R)$ είναι οι σχετικές ενθαλπίες και εντροπίες της κατάστασης i στη θερμοκρασία αναφοράς T_R και $\Delta C_{p,i}$ είναι η σχετική θερμοχωρητικότητα αυτής της κατάστασης. Η Εξ. (2.2α) είναι η πλέον γενική εξίσωση, ενώ η Εξ (2.2β) είναι η εξίσωση στην οποία η διαφορά θερμοχωρητικότητας μεταξύ των καταστάσεων θεωρείται ανεξάρτητη της θερμοκρασίας. Για διευκόλυνση, η ιθαγενής κατάσταση (κατάσταση 0) επιλέγεται ως η κατάσταση αναφοράς για να εκφράσει όλες τις σχετικές θερμοδυναμικές παραμέτρους (Freire, 1995).

Στην ανάλυση των δεδομένων DSC, η ποσότητα που πρέπει καταρχάς να οριστεί σε θεωρητικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας τα εργαλεία της στατιστικής θερμοδυναμικής, είναι η συνάρτηση της μέσης ενθαλπίας ($\langle \Delta H \rangle$), διότι η $\langle \Delta C_p \rangle$ είναι ίση με την παράγωγο ως προς τη θερμοκρασία της $\langle \Delta H \rangle$ υπό σταθερή πίεση. Η συνάρτηση της πλεονάζουσας μέσης ενθαλπίας είναι το άθροισμα των ενθαλπικών συνεισφορών όλων των καταστάσεων που καταλαμβάνονται κατά τη διάρκεια της μετάβασης

$$\langle \Delta H \rangle = \sum_{i=0}^N P_i \Delta H_i$$

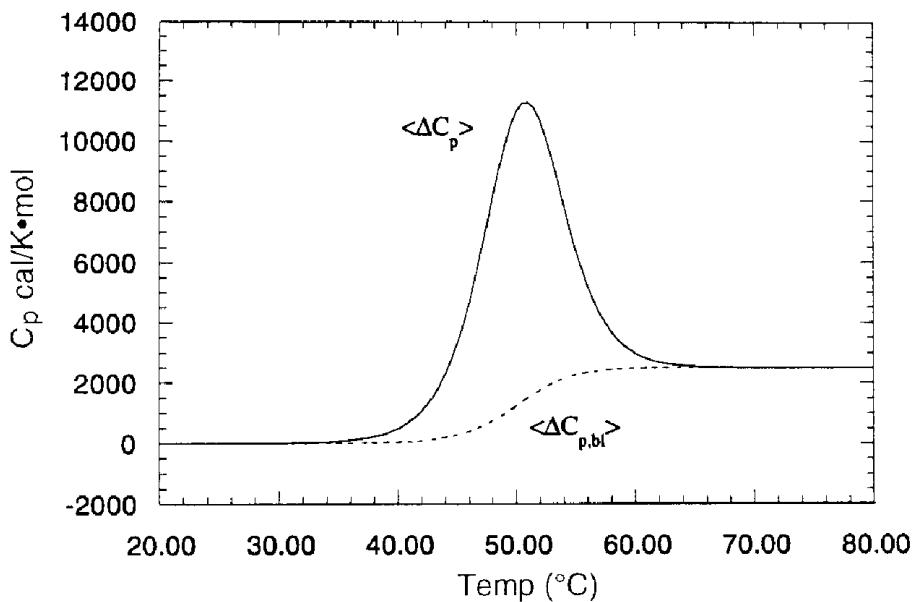
όπου P_i αντιπροσωπεύει τον πληθυσμό ή την πιθανότητα μιας κατάστασης i και ΔH_i αντιπροσωπεύει την ενθαλπία της i -στής κατάστασης σε σχέση με αυτήν της ιθαγενούς κατάστασης, η οποία λαμβάνεται ως η κατάσταση αναφοράς. Κατά την ανάλυση διαφορετικών μοντέλων μεταβάσεων το P_i εκφράζεται με τους όρους των ειδικών παραμέτρων του μοντέλου.

Με βάση τα παραπάνω, η συνάρτηση της πλεονάζουσας θερμοχωρητικότητας γίνεται:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \sum_{i=0}^N \Delta H_i (\partial P_i / \partial T) + \sum_{i=0}^N P_i \Delta C_{p,i} \quad (2.3\alpha)$$

$$= \langle \Delta C_{p,tr} \rangle + \langle \Delta C_{p,bl} \rangle \quad (2.3\beta)$$

Ο πρώτος όρος στο δεξί μέλος ($\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$) είναι η συνάρτηση πλεονάζουσας θερμοχωρητικότητας μετάβασης και ορίζει τη χαρακτηριστική κορυφή στη συνάρτηση θερμοχωρητικότητας (Σχ. 2.2). Ο δεύτερος όρος στο δεξί μέλος ($\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$) ορίζει τη σιγμοειδή διολίσθηση της καμπύλης αναφοράς που σχετίζεται συνήθως με την πρωτεϊνική αποδίπλωση ή με άλλες μεταβάσεις που χαρακτηρίζονται από θετικές μεταβολές στο ΔC_p (Freire, 1995).



Σχήμα 2.2: Η συνάρτηση πλεονάζουσας θερμοχωρητικότητας αποτελείται από δύο όρους. Ο πρώτος, λέγεται πλεονάζουσα θερμοχωρητικότητα μετάβασης, αποτυπώνει τις σχετιζόμενες με τις κορυφές θερμικές μεταβάσεις. Ο δεύτερος όρος $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$, είναι υπεύθυνος για την παρατηρούμενη σιγμοειδή διολίσθηση στη θερμοχωρητικότητα των μεταβάσεων που εμφανίζουν κάποιο ΔC_p . Η πλεονάζουσα θερμοχωρητικότητα μετάβασης, $\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$, λαμβάνεται αφαιρώντας την $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$ από την $\langle \Delta C_p \rangle$.

Η πλεονάζουσα θερμοχωρητικότητα μετάβασης μετρά την αύξηση των ενθαλπικών διακυμάνσεων που σχετίζονται με τη χωροδιατακτική μετάβαση. Κάνοντας την παραγώγιση στην Εξ. (2.3a) έχουμε

$$\begin{aligned}\langle \Delta C_{p,tr} \rangle &= \left\{ \left[\sum_{i=0}^N \Delta H_i^2 \exp(-\Delta G_i/RT)/Q \right] - \left[\sum_{i=0}^N \Delta H_i \exp(-\Delta G_i/RT)/Q \right]^2 \right\} / RT^2 \quad (2.4) \\ &= \{\langle \Delta H^2 \rangle - \langle \Delta H \rangle^2\} / RT^2\end{aligned}$$

Η Εξ. (2.4) είναι ίση με τη διασπορά της κατανομής της ενθαλπίας. Επομένως, οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή της μετάβασης είναι μια άμεση αντανάκλαση των αυξημένων ενθαλπικών διακυμάνσεων που συμβαίνουν όταν οι πρωτεΐνικοί πληθυσμοί μεταξύ διαφορετικών ενθαλπικών καταστάσεων μεταβάλλονται (Freire, 1995).

Οι πιο σημαντικές θερμοδυναμικές παράμετροι που σχετίζονται με τη θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών είναι οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας (ΔG), της ενθαλπίας (ΔH), της εντροπίας (ΔS) και της θερμοχωρητικότητας (ΔC_p) μεταξύ της αποδιπλωμένης και της ιθαγενούς κατάστασης. Όλες αυτές οι παράμετροι είναι συναρτήσεις κατάστασης, δηλαδή, οι τιμές τους εξαρτώνται μόνο από τη φύση της μετουσιωμένης και της ιθαγενούς κατάστασης και όχι από το ειδικό μονοπάτι μετάβασης ή την παρουσία μερικώς διπλωμένων ενδιάμεσων. Από πρακτική άποψη, αυτές οι παράμετροι είναι ανεξάρτητοι από το σχήμα της μετρούμενης συνάρτησης θερμοχωρητικότητας και μπορούν να εξαχθούν με ένα τρόπο ανεξάρτητο από τα χρησιμοποιούμενα μοντέλα (Freire, 1995).

Η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας είναι η διαφορά μεταξύ της θερμοχωρητικότητας της θερμικά μετουσιωμένης κατάστασης και της ιθαγενούς κατάστασης. Η μεταβολή της ενθαλπίας είναι το εμβαδόν κάτω από τη συνάρτηση της πλεονάζουσας θερμοχωρητικότητας μετάβασης ($\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$)

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_f} \langle \Delta C_{p,tr} \rangle dT \quad (2.5)$$

όπου τα όρια ολοκλήρωσης ορίζονται από τις θερμοκρασίες έναρξης και λήξης της μετάβασης (δηλαδή, οι θερμοκρασίες στις οποίες ουσιαστικά όλα τα μόρια βρίσκονται στην αρχική και στην τελική κατάσταση, αντίστοιχα). Η μεταβολή της εντροπίας υπολογίζεται απλά

$$\Delta S = \int_{T_0}^{T_f} \langle \Delta C_{p,tr} \rangle d\ln T \quad (2.6)$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι Εξ. (2.5) και (2.6) ορίζονται με βάση την πλεοναζουσα θερμοχωρητικότητα μετάβασης της καμπύλης, υποδηλώνοντας ότι η $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$ πρέπει να αφαιρεθεί από τη συνάρτηση της πλεονάζουσας θερμοχωρητικότητας. Ιστορικά, διάφορες μέθοδοι αφαίρεσης έχουν χρησιμοποιηθεί. Παλαιότερα, το $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$ συνηθίζονταν να προσεγγίζεται από μια συνάρτηση βήματος ορισμένη από την τιμή του T_m και ένα ύψος προσδιοριζόμενο από τις προεκβαλλόμενες αρχικές και τελικές τιμές της θερμοχωρητικότητας. Επειδή η καμπύλη αναφοράς είναι ανάλογη του βαθμού αποδίπλωσης [βλέπε Εξ. (2.3)] ένας περισσότερο ακριβής τρόπος υπολογισμού μπορεί να επιτευχθεί ορίζοντας το σχήμα της με όρους κανονικοποιημένης ολοκλήρωσης της συνάρτησης θερμοχωρητικότητας. Αυτή η εναλλακτική είναι εύκολο να εφαρμοστεί με υπολογιστικά δεδομένα και είναι μαθηματικά ακριβής για μια μετάβαση δύο-καταστάσεων. Γενικά, οι συνολικές θερμοδυναμικές παράμετροι ΔH και ΔS δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην ακριβή μέθοδο που χρησιμοποιείται για την αφαίρεση του $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$. Η κατάσταση είναι διαφορετική, εντούτοις, για τη θερμοδυναμική ανάλυση του σχήματος της συνάρτησης θερμοχωρητικότητας (Freire, 1995).

2.1.3. Υπολογισμός της ενθαλπίας van't Hoff για διεργασίες δύο-καταστάσεων

Η εξίσωση van't Hoff είναι άμεσα εφαρμόσιμη μόνο σε διεργασίες δύο-καταστάσεων. Σε ισορροπία, ενδιάμεσες καταστάσεις μεταξύ της αρχικής και της τελικής κατάστασης καταλαμβάνονται από ασήμαντους πληθυσμούς (Sturtevant, 1987). Τότε η μετάβαση μπορεί να περιγραφεί ως μια χημική αντίδραση μεταξύ της ιθαγενούς κατάστασης (το αντιδρών) και της ξεδιπλωμένης κατάστασης (το προϊόν) (Zhou et al., 1999).

Σύμφωνα με την εξίσωση van't Hoff

$$\left(\frac{\partial \ln K(T)}{\partial T} \right)_P = \frac{\Delta H_{vH}(T)}{RT^2} \quad (2.7)$$

όπου

$$\Delta H_{vH}(T) = \Delta H_{vH}(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta C_p(T) dT$$

$K(T)$ είναι η σταθερά ισορροπίας σε θερμοκρασία T , $\Delta H_{vH}(T_m)$ είναι η ενθαλπία van't Hoff σε θερμοκρασία T_m , τη θερμοκρασία στην οποία το ήμισυ της διεργασίας έχει ολοκληρωθεί. $\Delta C_p(T)$ είναι η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας μεταξύ των διπλωμένων και αποδιπλωμένων χωροδιατάξεων και είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας και R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων. Η εξίσωση (2.7) εισάγει την ιδέα ότι η θερμοκρασιακή εξάρτηση της χημικής ισορροπίας σχετίζεται με την ενθαλπία και τη θερμοχωρητικότητα αυτής της διεργασίας. Στη θερμιδομετρία ο όρος της ενθαλπίας αναφέρεται ως ενθαλπία van't Hoff (Ladbury & Chowdhry, 1998).

Η σταθερά ισορροπίας για τη θερμική αποδίπλωση δύο-καταστάσεων μιας πρωτεΐνης δίνεται από τη σχέση:

$$K(T) = [\text{Unfolded form}] / [\text{Native form}]$$

η οποία μπορεί να εκφραστεί

$$\alpha(T) = \frac{[\text{Unfolded form}]}{[\text{Native form}] + [\text{Unfolded form}]} = \frac{K(T)}{1 + K(T)}$$

όπου $\alpha(T)$ είναι ο βαθμός ολοκλήρωσης της μετατροπής σε θερμοκρασία T . Για οποιαδήποτε διεργασία, όπου το $\Delta H_{vH}(T)$ είναι μη-μηδενικό, το $K(T)$ θα αλλάξει καθώς μεταβάλλεται η θερμοκρασία και το $\alpha(T)$ με τη σειρά του θα προσαρμοστεί σε μια νέα τιμή. Έτσι το θερμιδομετρικό σήμα είναι στην πραγματικότητα η απόδειξη της μεταβολής της σύστασης του συστήματος. Είναι αξιοσημείωτο, για θερμοδυναμικά ελεγχόμενες διεργασίες, ότι ως συνέπεια της σχέσης van't Hoff μόνο ενδόθερμες μεταβάσεις μπορούν να παρακολουθηθούν. Για θερμοδυναμικά ελεγχόμενες εξώθερμες διεργασίες η σταθερά ισορροπίας $K(T)$ ελαττώνεται κατά τη θέρμανση (σάρωση προς υψηλότερες θερμοκρασίες) οδηγώντας σε μια μικρότερη τιμή το $\alpha(T)$ και σε σταθεροποίηση της αρχικής κατάστασης. Αν ένα εξώθερμο συμβάν εμφανιστεί κατά τη σάρωση προς υψηλότερες θερμοκρασίες, τότε πρέπει να αναπαριστά το αποτέλεσμα μιας κινητικά ελεγχόμενης διεργασίας και είναι πολύ συχνά ορατό στο DSC σήμα για πρωτεΐνες που μετουσιώνονται μη αντιστρεπτά (Ladbury & Chowdhry, 1998).

Η τιμή της σταθεράς ισορροπίας σε οποιαδήποτε θερμοκρασία $T - K(T)$ – μπορεί να βρεθεί ολοκληρώνοντας την εξίσωση (2.7). Αν το $\ln K$ ολοκληρώνεται μεταξύ των ορίων $\ln K(T)$ και $\ln K(T_m)$, όπου T είναι η θερμοκρασία για την οποία ενδιαφερόμαστε και σημειώνουμε ότι $K(T_m)$ έχει την τιμή 1, μιας και το $\alpha(T_m)$ έχει την τιμή 0.5, τότε η σταθερά ισορροπίας δίνεται από:

$$K(T) = \exp\left(\int_{T_m}^T \frac{\Delta H_{vH}(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta C_p(T) dT}{RT^2} dT\right)$$

Και η πλεονάζουσα θερμοχωρητικότητα δίνεται από την ακόλουθη έκφραση:

$$\langle \Delta C_p \rangle(T) = \frac{d}{dT} \left[\alpha(T) \left(\Delta H_{cal}(T_m) + \beta \int_{T_m}^T \Delta C_p(T) dT \right) \right] \quad (2.8)$$

όπου $\Delta H_{cal}(T_m)$ είναι η θερμιδομετρική ενθαλπία στη θερμοκρασία T_m – η ενθαλπία που λαμβάνεται με ολοκλήρωση της κορυφής και β είναι ο λόγος $\Delta H_{cal}(T_m)/\Delta H_{vH}(T_m)$ (Ladbury & Chowdhry, 1998).

Υπολογισμός του $K(T)$ επιτρέπει ακολούθως τον υπολογισμό του $\alpha(T)$, το οποίο παρέχει την απαραίτητη πληροφορία για τη γνώση της θερμοκρασιακής εξάρτησης της πλεονάζουσας θερμοχωρητικότητας και έτσι γίνεται εφικτή η προσομοίωση και η προσαρμογή μιας μετάβασης DSC. Η ενθαλπία van't Hoff μπορεί να ληφθεί με τον ακόλουθο τρόπο. Όταν $T = T_m$,

$$\int_{T_m}^T \Delta C_p(T) dT = 0$$

Και έτσι η εξίσωση (2.8) μπορεί να γραφεί ως:

$$\langle \Delta C_p \rangle(T_m) = \Delta H_{cal}(T_m) \frac{d\alpha}{dT}$$

όπου $\langle \Delta C_p \rangle(T_m)$ είναι το ύψος της κορυφής στο T_m , $C_{P,m}$. Τελικά:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_P \frac{da}{d\ln K} = \frac{\Delta H_{vH}(T_m)}{RT^2} \cdot \frac{1}{4}$$

συνεπώς

$$\Delta H_{vH}(T_m) = 4 \cdot \frac{RT^2 C_{P,m}}{\Delta H_{cal}(T_m)}$$

Αυτή η εξίσωση περιλαμβάνει το λόγο $C_{P,m}/\Delta H_{cal}(T_m)$ και μιας και οι δύο ποσότητες προκύπτουν από το θερμιδομετρικό σήμα, ο λόγος έχει μονάδες K^{-1} . Το mol που αναφέρεται στις μονάδες της ενθαλπίας van't Hoff προέρχεται επομένως από τη παγκόσμια σταθερά των αερίων. Αυτό είναι ήσσονος σημασίας αν απλά ενδιαφέρουν οι μονάδες μετρησης, αλλά μεγάλης σημασίας για την ταυτοποίηση της φύσης του αντιδρώντος (Ladbury & Chowdhry, 1998).

Η θερμιδομετρική ενθαλπία αναπαριστά την πραγματική ενθαλπία για μια μετάβαση διότι είναι ίση με το ποσό της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται διαιρούμενη με τη συγκέντρωση. Ως τέτοια είναι μια αληθινή συνάρτηση καταστάσεως που εξαρτάται μόνο από τη φύση της αρχικής και της τελικής κατάστασης. Η ενθαλπία van't Hoff, από την άλλη, εκφράζει την ενθαλπία που σχετίζεται με το μετασχηματισμό ενός mol μιας «συνεργατικής μονάδας». Η φυσική ή δομική έκταση αυτής της συνεργατικής μονάδας είναι μια ενδογενής ιδιότητα του συστήματος, ανεξάρτητη της κανονικοποίησης που χρησιμοποιείται. Στην πραγματικότητα προσδιορίζεται από το μέγεθος και την έκταση των συνεργατικών αλληλεπιδράσεων μέσα στο σύστημα. Αν αυτές οι συνεργατικές αλληλεπιδράσεις εκτείνονται σε ολόκληρο το πρωτεϊνικό μόριο, τότε η ενθαλπία van't Hoff και η θερμιδομετρική ενθαλπία θα είναι πανομοιότυπες. Αν η ενθαλπία van't Hoff είναι μικρότερη από την θερμιδομετρικά μετρούμενη ενθαλπία, τότε η συνεργατική μονάδα του συστήματος θα είναι μικρότερη από την μονάδα που ορίστηκε για να προσδιορίσει τη θερμιδομετρική ενθαλπία (συνήθως ανά mol πρωτεϊνικών μορίων). Στην περίπτωση αυτή, η μετάβαση θα προχωρά μέσω της παρουσίας μερικώς διπλωμένων ενδιάμεσων διότι η μονάδα ενδογενούς συνεργατικότητας είναι μικρότερη από την ίδια την πρωτεΐνη. Το αντίστροφο συμβαίνει όταν η ενθαλπία van't Hoff είναι μεγαλύτερη από τη θερμιδομετρική ενθαλπία. Στην περίπτωση αυτή η μονάδα συνεργατικότητας του συστήματος επεκτείνεται πέραν του ενός μορίου, δείχνοντας την ύπαρξη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (συνήθως ολιγομερισμού). Για το λόγο αυτό, ο λόγος της ενθαλπίας van't Hoff προς τη θερμιδομετρική ενθαλπία είναι μια αντανάκλαση των συνεργατικών αλληλεπιδράσεων που υπάρχουν μέσα στο σύστημα (Ibarra-Molero & Sanchez-Ruiz, 2006).

2.1.4. Θερμοδυναμική ανάλυση θερμιδομετρικών δεδομένων

Πιθανώς το πιο σημαντικό θέμα της ανάλυσης των DSC δεδομένων είναι κατά πόσο οι πειραματικές τιμές της θερμοχωρητικότητας αντανακλούν μια διεργασία μετουσίωσης σε καταστάσεις ισορροπίας ή όχι. Με τον όρο «διεργασία ισορροπίας» εννοούμε ότι η θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ των σημαντικά κατειλημμένων πρωτεϊνικών καταστάσεων (ιθαγενής, ξεδιπλωμένη, μερικώς ξεδιπλωμένη, κτλ.) λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της θερμοκρασιακής σάρωσης. Με άλλα λόγια, οι συγκεντρώσεις των κατειλημμένων καταστάσεων σε κάθε θερμοκρασία προσδιορίζονται από τις σχετικές σταθερές ισορροπίας στη θερμοκρασία αυτή. Φυσικά, οι σταθερές ισορροπίας μεταβάλλονται με τη θερμοκρασία σύμφωνα με απλές θερμοδυναμικές σχέσεις (δηλαδή, σύμφωνα με την εξίσωση van't Hoff και τη μεταβολή της ενθαλπίας της διεργασίας), οδηγώντας έτσι στη διολίσθηση των πληθυσμών των κατειλημμένων καταστάσεων με τη θερμοκρασία, έχοντας ως αποτέλεσμα τις μεταβάσεις («κορυφές») στο DSC θερμόγραμμα. Για παράδειγμα, σε μια διεργασία ισορροπίας δύο-καταστάσεων με μια επαρκώς υψηλή ενθαλπία μετουσίωσης, η σταθερά ισορροπίας της μετουσίωσης μεταβάλλεται από μια χαμηλή τιμή που ευνοεί την ιθαγενή κατάσταση σε μια υψηλή τιμή που ευνοεί τη μετουσιωμένη κατάσταση εντός μιας σχετικά στενής θερμοκρασιακής περιοχής. Πρέπει να σημειωθεί ότι μια διεργασία που συμβαίνει μέσω μιας σειράς καταστάσεων ισορροπίας λέγεται συνήθως «αντιστρεπτή» (ή ψευδοστατική) (Ibarra-Molero & Sanchez-Ruiz, 2006).

Η ανάλυση θερμοδυναμικής ισορροπίας των DSC θερμογραμμάτων δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε DSC θερμογράμματα τα οποία αλλοιώνονται από διεργασίες κινητικού χαρακτήρα. Ο λόγος είναι ότι οι συγκεντρώσεις των καταστάσεων που εμπλέκονται σε κινητικές διεργασίες προσδιορίζονται από εξισώσεις ρυθμών και όχι από την θερμοκρασιακή εξάρτηση της σταθεράς ισορροπίας. Οι δύο πιο κοινές προελεύσεις κινητικών αλλοιώσεων στα DSC θερμογράμματα των πρωτεΐνων είναι η «αργή ισορροπία» και η παρουσία μη αντιστρεπτών τροποποιήσεων (συσσωματώσεις, αυτόλυση στην περίπτωση των πρωτεολυτικών ενζύμων, κτλ.). Οι μη-αντιστρεπτές τροποποιήσεις οδηγούν την πρωτεΐνη σε μια «τελική» κατάσταση από την οποία είναι αδύνατον να επιστρέψει στην ιθαγενή κατάσταση (κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στο DSC πείραμα). Οι μη-

αντιστρεπτές τροποποιήσεις είναι επομένως κατ' ουσία μη αντιστρεπτές διεργασίες και πρέπει να περιγραφούν με εξισώσεις ρυθμών. Πειραματικά στο DSC η ύπαρξη μη-αντιστρεπτών τροποποιήσεων είναι εύκολο να ανιχνευθεί με την απουσία θερμιδομετρικής μετάβασης σε μια συνεχόμενη σάρωση (δηλαδή, μια δεύτερη σάρωση πραγματοποιείται μετά από την ψύξη της αρχικής χωρίς να απομακρυνθεί το πρωτεΐνικό δείγμα από το θερμιδομετρικό κελί). Είναι επίσης σημαντικό, να σταματήσει κανείς την πρώτη σάρωση αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η πρώτη μετάβαση για να αποφευχθούν μη-αντιστρεπτές τροποποιήσεις που μπορεί να πραγματοποιούνται στις υψηλότερες θερμοκρασίες (Ibarra-Molero & Sanchez-Ruiz, 2006).

Μια μετάβαση που δεν αναπαράγεται κατά τη σάρωση αναθέρμανσης λέμε ότι είναι θερμιδομετρικά μη-αντιστρεπτή (ή απλά μη-αντιστρεπτή). Η θερμιδομετρική μη-αντιστρεψιμότητα υποδεικνύει ότι η DSC καμπύλη της μετάβασης έχει κινητικά αλλοιώσει σε σημαντικό βαθμό. Μια λεπτομερέστερη θεώρηση μπορεί να προκύψει από πειράματα DSC πραγματοποιούμενα σε διαφορετικούς ρυθμούς σάρωσης. Μιας και οι κινητικές διεργασίες είναι εξ' ορισμού χρονικά εξαρτώμενες διεργασίες, η κατάσταση ενός κινητικά προσδιορισμένου συστήματος σε μια δεδομένη θερμοκρασία θα εξαρτάται από τον χρόνο που απαιτείται για να φτάσει σε αυτήν τη θερμοκρασία. Είναι επακόλουθο ότι οι κινητικά αλλοιωμένες DSC μεταβάσεις πρέπει να δείχνουν σημαντική εξάρτηση από το ρυθμό θέρμανσης. Στην πραγματικότητα, για την πλειονότητα των θερμιδομετρικά μη-αντιστρεπτών μεταβάσεων που έχουν μελετηθεί έχει βρεθεί ότι έχουν ισχυρή εξάρτηση από το ρυθμό θέρμανσης (Ibarra-Molero & Sanchez-Ruiz, 2006).

Οι DSC μελέτες σε μη-αντιστρεπτές πρωτεΐνικές μετουσιώσεις έχουν συνεισφέρει στην κατανόηση του ότι η πρωτεΐνική σταθερότητα έχει και θερμοδυναμική και κινητική συνιστώσα. Συγκεκριμένα, έχει γίνει σαφές ότι η θερμοδυναμική σταθερότητα (η θετική τιμή της ελεύθερης ενέργειας μετουσίωσης σε φυσιολογική θερμοκρασία) δεν εγγυάται ότι η πρωτεΐνη θα παραμένει στην ιθαγενή της κατάσταση κατά τη διάρκεια μιας δεδομένης χρονικής κλίμακας, μιας και μη-αντιστρεπτές τροποποιήσεις μπορούν να εκκενώσουν την ιθαγενή κατάσταση με έναν χρονικά εξαρτώμενο τρόπο. Είναι σαφές, επομένως, ότι πολλές πρωτεΐνες (συγκεκριμένα, τα πολύπλοκα πρωτεΐνικά συστήματα) πρέπει

να «σχεδιαστούν από την εξέλιξη» για να έχουν σημαντική κινητική σταθερότητα όταν έρχονται αντιμέτωπα με αποσταθεροποιητικά φαινόμενα των πολυαριθμών μη-αντιστρεπτών διεργασιών που μπορεί συμβαίνουν *in vivo* (Ibarra-Molero & Sanchez-Ruiz, 2006).

Όταν η DSC καμπύλη μιας μετάβασης αναπαράγεται με σημαντικό βαθμό επικάλυψης στη σάρωση αναθέρμανσης λέμε ότι η διεργασία μετουσίωσης είναι θερμιδομετρικά αντιστρεπτή. Αυτή η περίπτωση συνήθως συναντάται στις «μικρές» πρωτεΐνες (δηλαδή, ένα είδος πρωτεΐνικών «μοντέλων», συχνά χρησιμοποιούμενων για θεμελιώδεις μελέτες δίπλωσης και σταθερότητας.) Μιλώντας αυστηρά, θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα δεν υποδηλώνει απαραίτητα θερμοδυναμική αντιστρεψιμότητα (δηλαδή, ότι η διεργασία συμβαίνει μέσω καταστάσεων ισορροπίας έτσι ώστε κατά τη διάρκεια μιας DSC σάρωσης να αποκαθίσταται πάντα ισορροπία). Ο λόγος είναι ότι υπάρχει πάντα η πιθανότητα οι ρυθμοί δίπλωσης και ξεδιπλώματος της διεργασίας να είναι συγκριτικά αργοί με τέτοιο τρόπο που η σάρωση (στους συνηθισμένους ρυθμούς) να είναι πολύ γρήγορη για να επιτευχθεί ισορροπία. Αυτή η περίπτωση είναι γνωστή ως «αργή ισορροπία».

2.1.5. Καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας πρωτεΐνών

Η γνώση των αρχών που διέπουν τη σταθερότητα των πρωτεΐνών είναι ουσιώδης για την κατανόηση της δομής και της λειτουργία τους. Η σταθερότητα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη ώστε η πρωτεΐνη να βρει και να διατηρήσει την ιθαγενή της διαμόρφωση σε σχέση με άλλες διαμορφώσεις, αλλά όχι όσο τόσο μεγάλη ώστε να αποκλείονται χωροδιατακτικές μεταβολές ή προσαρμογές, οι οποίες θεωρούνται αναπόσπαστο μέρος πολλών πρωτεΐνικών λειτουργιών (Becktel & Schellman, 1987).

Θυμίζουμε ότι η θερμοδυναμική σταθερότητα μιας πρωτεΐνης ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας Gibbs του μακρομορίου στην ξεδιπλωμένη κατάσταση και στην ιθαγενή διπλωμένη κατάσταση. Αν η αντίδραση του πρωτεΐνικου ξεδιπλώματος μπορεί να αναπαρασταθεί ως μια διεργασία δύο-καταστάσεων, αυτή η μεταβολή της ε-

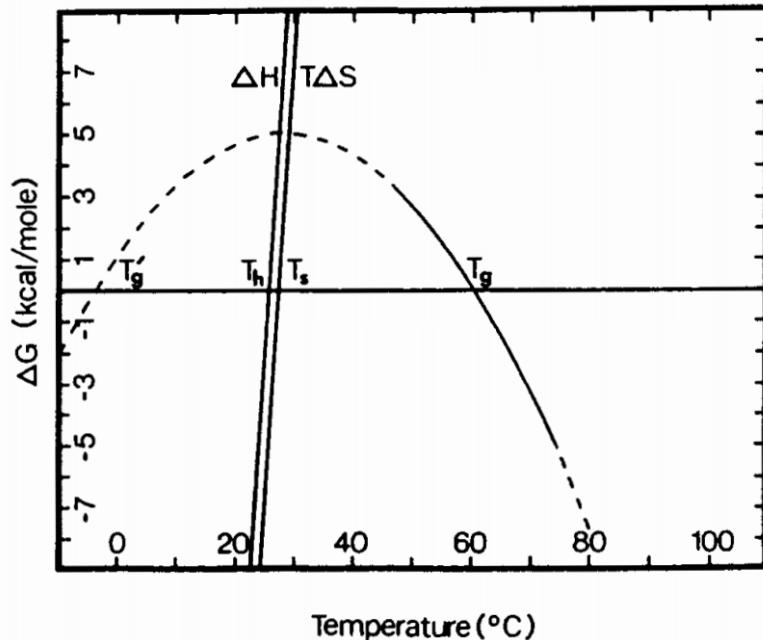
λεύθερης ενέργειας Gibbs είναι πειραματικά μετρήσιμη. Ας σημειωθεί ότι στον ορισμό της σταθερότητας μιας πρωτεΐνης συνεισφέρουν τόσο η διπλωμένη, όσο και η ξεδιπλωμένη κατάσταση. Είναι πρόκληση, ειδικά για πρωτεΐνες γνωστής κρυσταλλικής δομής, να συσχετίσει κανείς μεταβολές στη σταθερότητα μιας πρωτεΐνης αποκλειστικά με τα χαρακτηριστικά της ιθαγενούς δομής του μορίου. Πρέπει όμως να λαμβάνεται υπόψη ότι είναι πιθανόν μια μεγάλη συνιστώσα της ελεύθερης ενέργειας σταθεροποίησης να προέρχεται από την αυξημένη διαλύτωση της ξεδιπλωμένης αλυσίδας σε σχέση με τη διπλωμένη (Becktel & Schellman, 1987).

Βάσει τριών αξιωμάτων είναι δυνατόν να εξαχθούν σημαντικές πληροφορίες για τις ιδιότητες της πρωτεΐνικής σταθερότητας. Τα αξιώματα αυτά είναι: (1) η αντίδραση μπορεί να θεωρηθεί ως μια διεργασία δυο-καταστάσεων, έτσι ώστε τα ΔG , ΔS και ΔH να ορίζονται πειραματικά, (2) η πρωτεΐνη είναι σταθερή σε κάποια θερμοκρασία, έτσι ώστε το ΔG είναι θετικό σε κάποιο θερμοκρασιακό εύρος και (3) $\Delta C_p = \text{σταθερό} > 0$. Από το δεύτερο αξίωμα έχουμε

$$\begin{aligned}\Delta H &= \Delta H(T_R) + \Delta C_p(T - T_R) \\ \Delta S &= \Delta S(T_R) + \Delta C_p \ln(T/T_R) \\ \Delta G &= \Delta H(T_R) - T\Delta S(T_R) + \Delta C_p[T - T_R - T \ln(T/T_R)]\end{aligned}$$

όπου T_R είναι οποιαδήποτε θερμοκρασία αναφοράς και $\Delta S(T_R)$ και $\Delta H(T_R)$ είναι οι μεταβολές της εντροπίας και της ενθαλπίας στη θερμοκρασία αυτή, αντίστοιχα. Υπάρχουν τρεις παράμετροι σε αυτές τις εξισώσεις (ΔC_p , $\Delta S(T_R)$ και $\Delta H(T_R)$) και η εύρεση αυτών είναι επαρκής για τον προσδιορισμό της ενθαλπίας, της εντροπίας και της ελεύθερης ενέργειας στο θερμοκρασιακό εύρος για το οποίο ισχύει το τρίτο αξίωμα (Becktel & Schellman, 1987).

Ένα διάγραμμα των συναρτήσεων της εντροπίας, της ενθαλπίας και της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, παρέμενο από την ανάλυση πειραματικών δεδομένων, φαίνεται στο Σχ. 2.3. Ορίζουμε την καμπύλη του ΔG vs T ως καμπύλη θερμοδυναμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης. Οι σχετικές σταθερότητες των δύο συστημάτων (είτε δύο διαφορετικών πρωτεϊνών ή της ίδιας πρωτεΐνης κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες) συγκρίνονται τότε μέσω των καμπυλών σταθερότητά τους (Becktel & Schellman, 1987).



Σχήμα 2.3: Η καμπύλη σταθερότητας μιας πρωτεΐνης. Η καμπύλη έχει προκύψει από θερμοκρασιακές αλλαγές της ενθαλπίας και εντροπίας αποδίπλωσης. Η συνεχής γραμμή αναπαριστά το τμήμα της καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση van't Hoff της μετάβασης. Η διακεκομμένη γραμμή είναι η προέκτασή της. Οι θερμοκρασίες στο σχήμα εξηγούνται στο κείμενο.

Η καμπύλη σταθερότητας έχει κάποια πολύ γενικά χαρακτηριστικά. Η καμπυλότητά της δίνεται από τη σχέση $\partial^2 \Delta G / \partial T^2 = -\Delta C_p/T$, και αξιωματικά είναι αρνητική σε όλες τις θερμοκρασίες. Η κλίση της καμπύλης δίνεται από τη σχέση $\partial \Delta C_p / \partial T = -\Delta S$. Ορίζουμε τη θερμοκρασία στην οποία η σταθερότητα είναι μέγιστη ως T_s , που ερμηνεύεται ως η θερμοκρασία στην οποία $\Delta S = 0$. Η κλίση της καμπύλης σταθερότητας ισούται με $-\Delta S$ και είναι πάντα αρνητική για $T > T_s$. Επομένως η καμπύλη έχει μόνο ένα ακρότατο, το οποίο είναι μέγιστο. Αξιωματικά η ιθαγενής πρωτεΐνη είναι σταθερή σε κάποιο θερμοκρασιακό εύρος έτσι ώστε το ΔG είναι θετικό στην περιοχή αυτή και η καμπύλη σταθερότητας τέμνει τον άξονα των τετμημένων σε δύο σημεία. Αυτά τα σημεία συνιστούν τα υψηλής και χαμηλής θερμοκρασίας σημεία τήξης της πρωτεΐνης. Το χαμηλής θερμοκρασίας σημείο τήξης συχνά προεκβάλλεται κάτω από τη θερμοκρασία πήξης του νερού (Becktel & Schellman, 1987).

Εξ ορισμού οι θερμοκρασίες τήξης δίνονται ως τα σημεία όπου $\Delta G = 0$ και συμβολίζονται με T_m . Ένας τόνος θα χρησιμοποιείται για τη χαμηλότερη ανάστροφη θερμοκρασία τήξης, όπου η διάκριση είναι απαραίτητη. Μιας και $\Delta G = 0$ στη θερμοκρασία T_m εξ ορισμού έχουμε

$$T_m = \Delta H_m / \Delta S_m \quad (2.9)$$

Η θερμοκρασία T_m μετριέται συνήθως πειραματικά ως το μέσο της θερμιδομετρικής ή φασματοσκοπικά παρατηρούμενης μετάβασης. Το ΔH_m λαμβάνεται ως μια άμεση θερμική μέτρηση με ένα θερμιδόμετρο ή ως η κλίση ενός γραφήματος $R\ln K$ vs $1/T$ στην ανάλυση van't Hoff. Το ΔS_m μπορεί τότε να προσδιοριστεί από την Εξ. (2.9). Το ΔC_p μπορεί να μετρηθεί άμεσα με θερμιδομετρία αλλά κανονικά χρησιμοποιείται μια διαδικασία του Privalov (Privalov & Khechinashvili, 1974), η οποία εμπλέκει μέτρηση του ΔH ως συνάρτηση του pH. Η διαδικασία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί νωρίτερα με φασματοσκοπικές τεχνικές (Shiao et al., 1971).

Το ΔC_p αποδίπλωσης των πρωτεΐνων είναι αρκετά μεγάλο και συνήθως βρίσκεται στην περιοχή των 12-18 cal/deg ανά κατάλοιπο. Αυτό οδηγεί σε μια εντυπωσιακά απότομη εξάρτηση τόσο της εντροπίας όσο και της ενθαλπίας αποδίπλωσης από τη θερμοκρασία (Σχ. 2.3). Από την άλλη, η μέγιστη σταθερότητα των πρωτεΐνων τείνει να είναι μικρή, της τάξης των 50-100 cal ανά κατάλοιπο (Becktel & Schellman, 1987).

2.1.6. Εξισώσεις αποσυνέλιξης των δεδομένων DSC

Υποθέτουμε ότι μια πρωτεΐνη αποτελείται από έναν αριθμό δομικών περιοχών A, B, ..., κάθε μία από τις οποίες εμπλέκεται ανεξάρτητα από τις άλλες στη μετάβαση μεταξύ της διπλωμένης και της ξεδιπλωμένης μορφής ($A \rightleftharpoons A'$, $B \rightleftharpoons B'$, ...). Οι σταθερές ισορροπίας εκφράζονται ως $K_A = f_{A'}/f_A$, $K_B = f_{B'}/f_B$, ...

Η ολική γραμμομοριακή ενθαλπία του συστήματος H θα είναι

$$H = H_N + f_{A'} \Delta H_A + f_{B'} \Delta H_B + \dots \quad (2.10)$$

όπου ΔH_A , ΔH_B , ... οι γραμμομοριακές μεταβολές της ενθαλπίας.

Ο πρώτος όρος για τη συνολικά ιθαγενή μορφή της πρωτεΐνης, όπου όλες οι περιοχές βρίσκονται στη διπλωμένη τους κατάσταση, H_N , πρέπει να συμπεριληφθεί μιας και όλες οι τιμές ΔH μετριούνται ως προς τη διπλωμένη μορφή. Η ολική γραμμομοριακή θερμοχωρητικότητα του συστήματος C_p είναι η παράγωγος ως προς τη θερμοκρασία της ενθαλπίας στην Εξ 2.10, επομένως

$$C_p = C_{pN} + \left[f_{A'} \Delta C_{pA} + \Delta H_A \left(\frac{\delta f_{A'}}{\delta T} \right) \right] + \dots \quad (2.11)$$

όπου C_{pN} είναι η γραμμομοριακή θερμοχωρητικότητα της συνολικά διπλωμένης κατάστασης, ΔC_{pA} είναι η μεταβολή στη θερμοχωρητικότητα για την αποδίπλωση της περιοχής A και όπου ο όρος στις παρενθέσεις θα επαναλαμβάνεται για κάθε εμπλεκόμενη στην αποδίπλωση περιοχή. Ενθυμούμενοι ότι $f_A = 1 - f_{A'}$, τότε

$$f_{A'} = \frac{K_A}{1 + K_A} \quad (2.12)$$

η οποία μπορεί τότε να διαφοριστεί για να δώσει

$$\left(\frac{\delta f_{A'}}{\delta T} \right) = \left(\frac{K_A}{(1 + K_A)^2} \right) \left(\frac{\delta \ln K_A}{\delta T} \right) \quad (2.13)$$

Η παράγωγος στο δεξί μέλος της Εξ 2.13 είναι γνωστή από στοιχειώδη θερμοδυναμική

$$\left(\frac{\delta \ln K_A}{\delta T} \right) = \left(\frac{\Delta H_A^*}{RT^2} \right) \quad (2.14)$$

όπου ΔH_A^* είναι η λεγόμενη μεταβολή της ενθαλπίας van't Hoff για την αντίδραση, η οποία αντιστοιχεί στη θερμότητα ανά μονάδα συνεργατικότητας η οποία πραγματικά συμμετέχει στην αντίδραση. Αντικαθιστώντας τις εξ 2.12-2.14 στην Εξ 2.11 παίρνουμε

$$C_p = C_{pN} + \left[\frac{K_A \Delta C_{pA}}{1 + K_A} + \frac{K_A \Delta H_A^* \Delta H_A}{(1 + K_A)^2 RT^2} \right] + \dots \quad (2.15)$$

Μπορούμε να εκφράσουμε το $\Delta H_A(T)$ με όρους της θερμοκρασιακά ανεξάρτητης τιμής της στο T_{mA} και τη μεταβολή της θερμοχωρητικότητας της μετάβασης ΔC_{pA} , δηλαδή,

$$\Delta H_A(T) = \Delta H_{mA} + \Delta C_{pA}(T - T_{mA}) \quad (2.15)$$

και κατόπιν ολοκληρώνοντας την Εξ 2.14 από T_{mA} , όπου το $K_A(T)$ είναι μονάδα σε μια αυθαίρετη θερμοκρασία T

$$K_A(T) = \exp \left\{ \frac{-\Delta H_{mA}^*}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_{mA}} \right) - \frac{\Delta C_{pA}}{RT} \left(T - T_{mA} - T \ln \frac{T}{T_{mA}} \right) \right\} \quad (2.16)$$

Αφαιρώντας μια προοδευτική γραμμή αναφοράς από τα πειραματικά δεδομένα, απομακρύνονται τα φαινόμενα ΔC_p (αυτό θέτει επίσης το C_{pN} μηδέν σε όλες τις θερμοκρασίες). Δείχνοντας τις θερμοκρασιακά εξαρτώμενες παραμέτρους, η Εξ 2.15 μπορεί να ξαναγραφεί ως

$$C_p(T) = \frac{K_A(T)\Delta H_{mA}^*\Delta H_{mB}}{(1 + K_A(T))^2 RT^2} + \dots \quad (2.17)$$

όπου από την Εξ 2.16

$$K_A(T) = \exp\left\{\frac{-\Delta H_{mA}^*}{RT}\left(1 - \frac{T}{T_{mA}}\right)\right\} \quad (2.18)$$

Η Εξ 2.17 (χρησιμοποιώντας την Εξ. 2.18 για κάθε μετάβαση A, B, ...) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογίσει κανείς τις τιμές της θερμοχωρητικότητας του συστήματος $C_p(T)$ σε οποιαδήποτε θερμοκρασία T , εφόσον οι τιμές των θερμοκρασιακά ανεξάρτητων παραμέτρων προσαρμογής T_{mA} , ΔH_{mA} , ΔH_{mA}^* , T_{mB} , ΔH_{mB} , ΔH_{mB}^* ... έχουν προσδιοριστεί. Χρησιμοποιούνται μέθοδοι Marquardt βασισμένες στη μη-γραμμική προσαρμογή ελαχίστων τετραγώνων (Microcal, 1995).

2.2. Φασματοσκοπία Φθορισμού

Η μετουσίωση των πρωτεΐνων μπορεί να προκληθεί με πολλούς τρόπους. Αυτοί περιλαμβάνουν την αύξηση (ή την ελάττωση) της θερμοκρασίας, την προσθήκη χαοτροπικών χημικών αποδιατακτών (π.χ. ουρίας ή υδροχλωρικής γουανιδίνης), την έκθεση σε ακραία pH ή την αύξηση της υδροστατικής πίεσης (Alexandrakis et al., 2014), (Alexandrakis, 2014b). Οι αντιδράσεις μετουσίωσης μπορούν να χαρακτηριστούν από το μέσον της μετάβασης (π.χ., τη θερμοκρασία μετάβασης ή τη συγκέντρωση χημικού αποδιατακτή όπου το 50% των πρωτεΐνικών μορίων έχει μετουσιωθεί), αλλά η πλήρης περιγραφή της θερμοδυναμικής γίνεται με όρους της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs για την αντίδραση ξεδιπλώματος σε κάποιες πρότυπες συνθήκες (δηλαδή, απουσία διαταραχής στους 20 °C) και μιας επιπλέον θερμοδυναμικής παραμέτρου που εξαρτάται από τον τύπο της διαταραχής. Η μετουσίωση μπορεί να είναι ή να μην είναι αντιστρεπτή· μόνο ό-

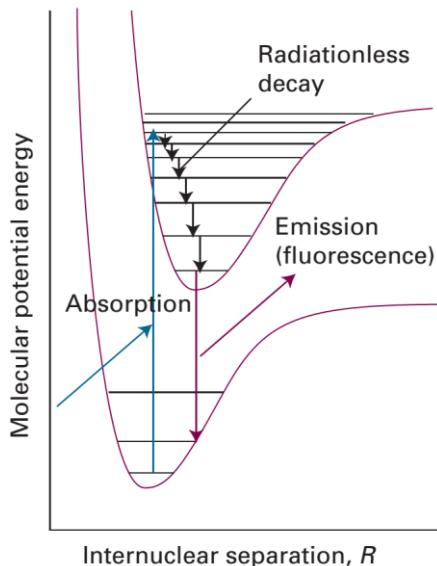
μως για αντιστρεπτές μεταβάσεις η θερμοδυναμική ανάλυση σε ισορροπία είναι εφικτή (Eftink, 1995).

Η θερμιδομετρία DSC είναι η πλέον κατάλληλη μέθοδος για τη μελέτη της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεΐνων. Οι μετρήσεις DSC μπορούν να παρέχουν με ακρίβεια τη θερμοκρασία μετάβασης, την ενθαλπία μετουσίωσης, τη μεταβολή της θερμοχωρητικότητας και έναν δείκτη συνεργατικότητας (από το λόγο της ενθαλπίας van't Hoff προς τη θερμιδομετρική ενθαλπία). Εντούτοις, τα πειράματα DSC απαιτούν σχετικά μεγάλες πρωτεΐνικές συγκεντρώσεις και δίνουν περιορισμένη πληροφορία σε μοριακό δομικό επίπεδο. Διάφορες φασματοσκοπικές μέθοδοι πλεονεκτούν στα δύο τελευταία πεδία, εφόσον η ανάλυση των δεδομένων τους υπακούει σε συγκεκριμένα μοντέλα. Πέρα από αυτόν τον περιορισμό, τα πρακτικά πλεονεκτήματα και η προσέγγιση σε μοριακό επίπεδο που επιτρέπουν οι φασματοσκοπικές μέθοδοι, τις καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μελέτη των πρωτεΐνικών μεταβάσεων. Μεταξύ των μεθόδων οπτικής φασματοσκοπίας, ο φθορισμός και ο κυκλικός διχροϊσμός είναι οι συχνότερα επιστρατευμένες τεχνικές στη μελέτη των πρωτεΐνικών μεταβάσεων (Eftink, 1995), (Thanassoulas et al., 2011).

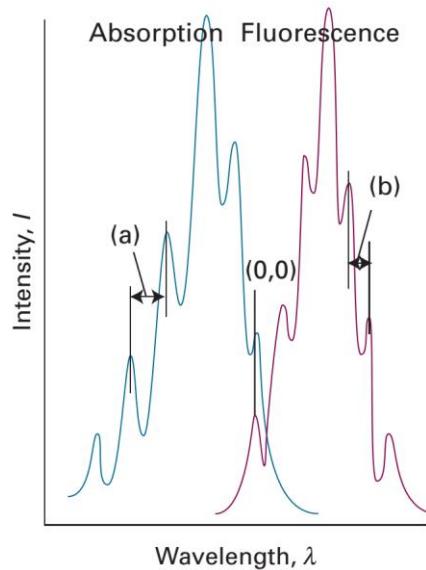
Μια διεργασία ακτινοβολούμενης διάσπασης είναι μια διεργασία στην οποία ένα μόριο χάνει την ενέργεια διέγερσης εκπέμποντας ένα φωτόνιο. Μια πιο συνηθισμένη περίπτωση είναι η μη-ακτινοβολούμενη διάσπαση, στην οποία η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται στη δόνηση, στην περιστροφή και στη μεταφορά των μορίων του περιβάλλοντος. Αυτή η θερμική υποβάθμιση μετατρέπει πλήρως την ενέργεια διέγερσης σε θερμική κίνηση των μορίων του περιβάλλοντος (δηλαδή, σε θερμότητα). Ένα διεγερμένο μόριο μπορεί επίσης να πάρει μέρος σε χημικές αντιδράσεις (Atkins & de Paula, 2010).

Στο φθορισμό η αυθόρμητα εκπεμπόμενη ακτινοβολία λαμβάνει χώρα εντός λίγων νανοδευτερολέπτων μετά την απορρόφηση της ακτινοβολίας διέγερσης σε αντιδιαστολή με το φωσφορισμό, όπου η αυθόρμητη εκπομπή μπορεί να κρατήσει για μεγάλες περιόδους (ακόμη και ώρες, αλλά χαρακτηριστικά κρατάει δευτερόλεπτα ή κλάσματα του δευτερολέπτου) (Atkins & de Paula, 2010).

Το Σχήμα 2.4 δείχνει την αλληλουχία των βημάτων που εμπλέκονται στο φθορισμό. Η αρχική απορρόφηση μεταφέρει το μόριο σε μια διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση. Το φάσμα απορρόφησης είναι όπως στο Σχ. 2.5α. Το διεγερμένο μόριο συγκρούεται με τα μόρια του περιβάλλοντος και καθώς χάνει ενέργεια χωρίς να ακτινοβολεί κατεβαίνει τη σκάλα των δονητικών επιπέδων μέχρι να φτάσει το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο των διεγερμένων μοριακών καταστάσεων. Τα μόρια του περιβάλλοντος, εντούτοις, μπορεί να μην είναι ικανά να δεχτούν μια ακόμα μεγαλύτερη ενεργειακή διαφορά, την απαιτούμενη για να υποβιβαστεί το μόριο στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση. Μπορεί επομένως να επιζήσει αρκετό χρόνο μέχρι να υποστεί αυθόρυμη εκπομπή, και να εκπέμψει την υπόλοιπη περίσσεια ενέργειας ως ακτινοβολία. Η προς τα κάτω ηλεκτρονιακή μετάβαση είναι κατακόρυφη (σύμφωνα με την αρχή Franck-Condon) και το φάσμα φθορισμού (Σχ. 2.5β) αποτυπώνει τις δονητικές καταστάσεις της χαμηλότερης ενεργειακής κατάστασης (Atkins & de Paula, 2010).

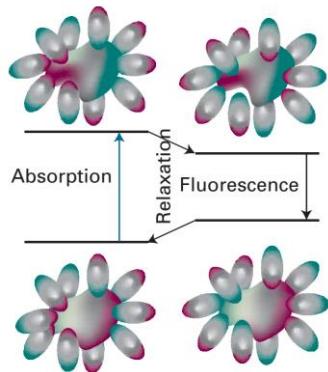


Σχ. 2.4.: Η αλληλουχία των βημάτων που οδηγούν στο φθορισμό. Μετά την αρχική απορρόφηση, οι ανώτερες δονητικές καταστάσεις υφίστανται μη-ακτινοβολούμενη διάσπαση δίνοντας ενέργεια στο περιβάλλον. Μια ακτινοβολούμενη μετάβαση συμβαίνει από τη θεμελιώδη δονητική κατάσταση της πάνω ηλεκτρονιακής κατάστασης.



Σχ. 2.5.: Ένα φάσμα απορρόφησης (α) δείχνει τη δονητική δομή της διεγερμένης κατάστασης. Ένα φάσμα φθορισμού (β) δείχνει μια δομή χαρακτηριστική της θεμελιώδους κατάστασης. Μετατοπίζεται επίσης σε χαμηλότερες συχνότητες (αλλά οι 0-0 μεταβάσεις συμπίπτουν) και εμφανίζουν την κατοπτρική εικόνα της απορρόφησης.

Εφόσον είναι δυνατόν να παρατηρηθούν, οι μεταβάσεις 0-0 απορρόφησης και φθορισμού θα μπορούσε να συμπίπτουν. Εντούτοις, οι κορυφές 0-0 της απορρόφησης και του φθορισμού δεν συμπίπτουν πάντα επακριβώς, διότι ο διαλύτης μπορεί να αλληλεπιδρά διαφορετικά με τη διαλυμένη ουσία στη θεμελιώδη και στις διεγερμένες καταστάσεις (για παράδειγμα, μπορεί να διαφέρει το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου). Επειδή τα μόρια του διαλύτη δεν έχουν το χρόνο να αναδιοργανωθούν κατά τη διάρκεια της μετάβασης, η απορρόφηση συμβαίνει σε ένα περιβάλλον χαρακτηριστικό της θεμελιώδους κατάστασης του διαλύτη. Ο φθορισμός απεναντίας συμβαίνει σε ένα περιβάλλον χαρακτηριστικό της διεγερμένης κατάστασης του διαλύτη (Σχ. 2.6) (Atkins & de Paula, 2010).

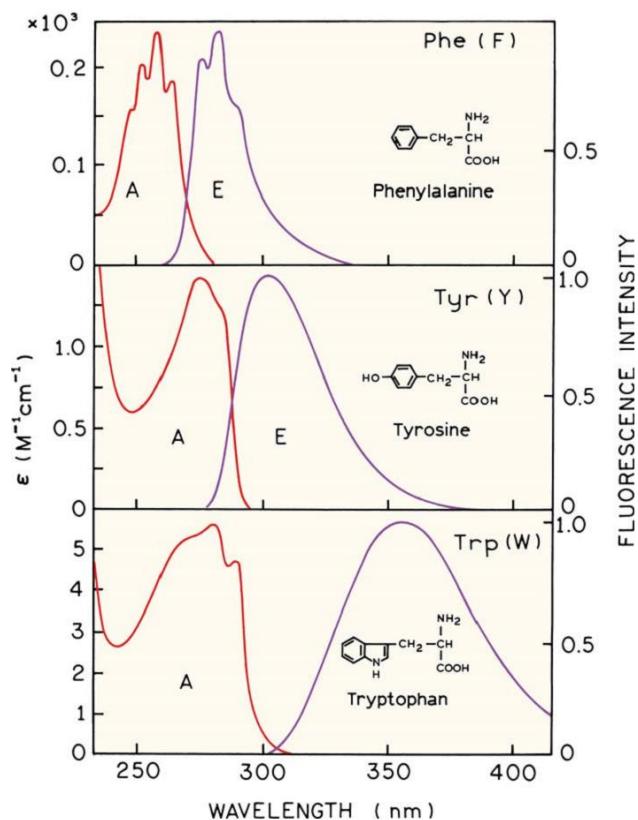


Σχ. 2.6.: Ο διαλύτης μπορεί να μετατοπίσει το φάσμα φθορισμού ως προς το φάσμα απορρόφησης. Αριστερά βλέπουμε ότι η απορρόφηση συμβαίνει με το διαλύτη (οι ελλείψεις) σε διευθέτηση χαρακτηριστική της θεμελιώδους ηλεκτρονικής κατάστασης του μορίου (η σφαίρα). Εντούτοις, πριν συμβεί ο φθορισμός, τα μόρια του διαλύτη εφησυχάζουν σε μια νέα διευθέτηση και η διευθέτηση διατηρείται κατά τη διάρκεια της επακόλουθης μετάβασης ακτινοβολίας.

Ο φθορισμός εμφανίζεται σε χαμηλότερες συχνότητες από αυτές της προσπίπτουσας ακτινοβολίας διότι η μετάβαση εκπομπής πραγματοποιείται αφού πρώτα κάποια ενέργεια έχει ξοδευτεί στο περιβάλλον. Ο μηχανισμός επίσης υποδεικνύει ότι η ένταση φθορισμού πρέπει να εξαρτάται από την ικανότητα των μορίων του διαλύτη να δεχτούν τα ηλεκτρονιακά και δονητικά κβάντα. Πράγματι έχει βρεθεί ότι ένας διαλύτης αποτελουμένος από μόρια με ευρέως χωρισμένα δονητικά επίπεδα (όπως το νερό) μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να δεχτεί το μεγάλο ποσό της ηλεκτρονιακής ενέργειας και να προκαλέσει σβέση του φθορισμού (Atkins & de Paula, 2010).

Οι πρωτεΐνες περιέχουν τρία αμινοξικά κατάλοιπα που συνεισφέρουν στο φθορισμό. Αυτά είναι η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και η φαινυλαλανίνη. Το φάσμα απορρόφησης και εκπομπής αυτών των αμινοξέων φαίνεται στο σχήμα 2.7. Η συνεισφορά της τρυπτοφάνης στο φάσμα φθορισμού των πρωτεϊνών κυριαρχεί. Απορροφά στο μεγαλύτερο μήκος κύματος και επιδεικνύει το μεγαλύτερο συντελεστή απόσβεσης. Η ενέργεια που απορροφάται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη συχνά μεταφέρεται στα τρυπτοφανικά κατάλοιπα στην ίδια πρωτεΐνη. Η φαινυλαλανίνη εμφανίζει τα μικρότερα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής. Το μέγιστο εκπομπής της φαινυλαλανίνης εμφανίζεται κοντά στα 282 nm. Η εκπομπή της τυροσίνης στο νερό συμβαίνει στα 303 nm και δεν είναι

ιδιαίτερα ευαίσθητη στην πολικότητα του διαλύτη. Το μέγιστο εκπομπής της τρυπτοφάνης στο νερό συμβαίνει κοντά στα 350 nm και είναι ισχυρά εξαρτώμενο από την πολικότητα και/ή το τοπικό περιβάλλον. Ως αποτέλεσμα, η εκπομπή κάθε τρυπτοφανικού καταλοίπου σε μια πρωτεΐνη να εξαρτάται από τις λεπτομέρειες του περιβάλλοντος χώρου (Lakowicz, 2007).

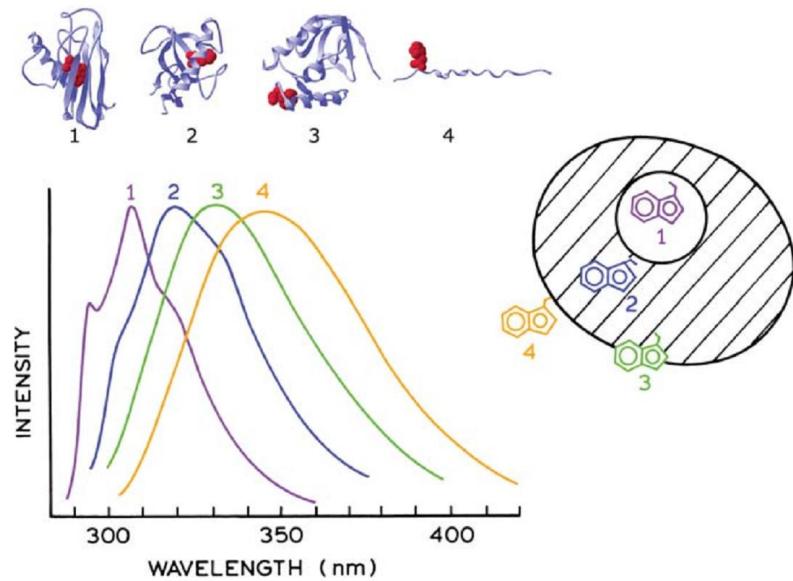


Σχ. 2.7.: Φάσματα απορρόφησης (A) και εκπομπής (E) των αρωματικών αμινοξέων σε pH 7 υδατικού διαλύματος.

Τυπικά ο πρωτεϊνικός φθορισμός διεγείρεται στο μέγιστο απορρόφησης κοντά στα 280 nm ή σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Συνεπώς, στα περισσότερα πειράματα η φαινυλαλανίνη δε διεγείρεται. Επιπλέον, ο κβαντικός λόγος της φαινυλαλανίνης στις πρωτεΐνες είναι μικρός – τυπικά κοντά στο 0.03 – και έτσι η εκπομπή από αυτό το κατάλοιπο σπάνια παρατηρείται στις πρωτεΐνες. Η απορρόφηση των πρωτεϊνών στα 280 nm οφείλεται στα κατάλοιπα και τυροσίνης και της τρυπτοφάνης. Στους 23 °C σε ουδέτερα υδατικά διαλύ-

ματα οι κβαντικοί λόγοι της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης είναι κοντά στα 0.14 και 0.13, αντίστοιχα. Σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 295 nm, η απορρόφηση γίνεται πρωτίστως από την τρυπτοφάνη. Η διέγερση στα 295 nm που αναφέρεται σε πολλά άρθρα γίνεται ακριβώς για να αποφευχθεί η διέγερση των καταλοίπων τυροσίνης (Lakowicz, 2007).

Οι πιο πολλές πρωτεΐνες περιέχουν περισσότερα από ένα κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τα κατάλοιπα αυτά συνεισφέρουν άνισα στην ολική εκπομπή. Έχουν γίνει προσπάθειες κατηγοριοποίησης των πρωτεϊνών με βάση το φάσμα εκπομπής τους έχοντας ως βασική ιδέα ότι το φάσμα εκπομπής τρυπτοφάνης αντανακλά κατά μέσο όρο το περιβάλλον της τρυπτοφάνης. Για τρυπτοφάνη σε ένα εντελώς μη-πολικό περιβάλλον παρατηρείται μια μετατόπιση προς το μπλε στο φάσμα εκπομπής. Καθώς το κατάλοιπο τρυπτοφάνης συμμετέχει σε περισσότερους δεσμούς υδρογόνου ή εκτίθεται στο νερό, η εκπομπή μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (Σχήμα 2.8) (Lakowicz, 2007).



Σχ. 2.8: Επίδραση του περιβάλλοντος της τρυπτοφάνης στο φάσμα εκπομπής. Τα φάσματα εκπομπής είναι αυτά των apoazurin Pfl, ριβονουκλεάση T₁, staphylococcal νουκλεάση και glucagon, για 1 ως 4, αντίστοιχα.

Η ευαισθησία του φθορισμού επιτρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες πρωτεϊνικών μετουσιώσεων σε μικρογραμμομοριακές (ή χαμηλότερες) συγκεντρώσεις, οι οποίες ελαχιστοποιούν τόσο την απαιτούμενη ποσότητα του μακρομορίου όσο και τα προβλήματα τα σχετιζόμενα με συσσωματώσεις και χαμηλές διαλυτότητες (Eftink, 1994). Το φάσμα φθορισμού τρυπτοφάνης μετατοπίζεται προς το ερυθρό (σε μεγαλύτερα μήκη κύματος) κατά την πρωτεϊνική μετουσίωση και το μέγεθος της παρατηρούμενης μετατόπισης εξαρτάται από το βαθμό κατά τον οποίο το κατάλοιπο τρυπτοφάνης είναι θαμμένο στην ιθαγενή πρωτεΐνη ή εκτεθειμένο στη μετουσιωμένη (Royer, 1995).

Πέρα από τη θερμικά επαγόμενη μετουσίωση των πρωτεϊνών, ένας δεύτερος τρόπος με τον οποίο συνήθως προκαλείται είναι η προσθήκη των χημικών αποδιατακτών, όπως η υδροχλωρική γουανιδίνη ή η ουρία (Eftink, 1994). Η μέτρηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της διπλωμένης κατάστασης σε σχέση με τις ξεδιπλωμένες καταστάσεις απαιτεί τον προσδιορισμό της σταθεράς ισορροπίας και των μεταβολών της ελεύθερης ενέργειας Gibbs για την αντίδραση

$$N \rightleftharpoons U$$

Το ΔG για την αντίδραση στους 25 °C απουσία αποδιατακτή, $\Delta G(H_2O)$, είναι η θερμοδυναμική σταθερότητα (Shaw et al., 2009).

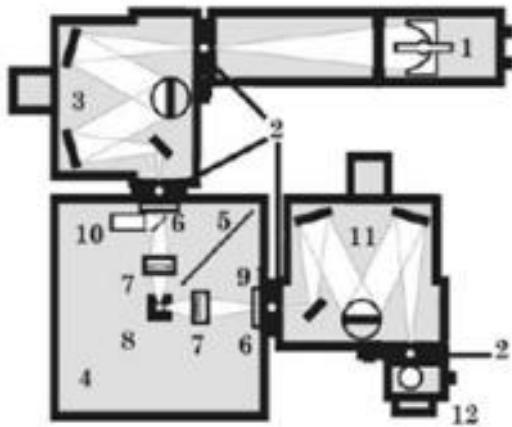
Η λήψη των προφίλ πρωτεϊνικών μετουσιώσεων χρησιμοποιώντας χημικούς αποδιατακτές, όπως η υδροχλωρική γουανιδίνη και η ουρία, είναι οι πιο κοινοί τύποι πειραμάτων φθορισμού αποδίπλωσης. Κατόπιν διέγερσης στα 295 nm, λαμβάνεται το φάσμα εκπομπής σε κάθε συγκέντρωση αποδιατακτή και από αυτό υπολογίζεται το μέσο μήκος κύματος με στατιστικό βάρος την ένταση όλων των μηκών κύματος που έχουν σαρωθεί.

$$\langle \lambda \rangle = \sum_{i=v_1}^{v_N} F_i \lambda_i \Bigg/ \sum_{i=v_1}^{v_N} F_i$$

Το μέγεθος αυτό αποτελεί πολύ καλύτερη επιλογή ως μέτρο οποιασδήποτε μετατόπισης ή μεταβολής στη μορφή του φάσματος εκπομπής. Η ποσότητα αυτή είναι λιγότερο επιδεκτικό στο θόρυβο του οργάνου από ότι για παράδειγμα είναι το μέγιστο μήκος κύματος, μιας και είναι ολοκληρωτική μέτρηση. Επιπρόσθετα, είναι μια περισσότερο ευαίσθητη τιμή διότι προκύπτει από έναν υπολογισμό, ο οποίος εμπλέκει ολόκληρο το φά-

σμα, και κατά συνέπεια αντανακλά σε μεταβολές τόσο του σχήματος όσο και της θέσης, (Royer et al., 1993), (Royer, 1995).

Στο επόμενο σχήμα (Σχήμα 2.9) παρουσιάζεται το διάγραμμα ενός φασματοφθορισμόμετρου. Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το φασματοφθορισμόμετρο PTI QuantaMaster (Photon Technology International Incorporation, NJ, USA).



Σχήμα 2.9.: Σχηματική αναπαράσταση της φασματοφθορισμομετρικής διάταξης PTI QuantaMaster 3500 που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων φθορισμού. (1) Λάμπα ξένου 75 Watt με ωφέλιμο εύρος ακτινοβολίας από 185 έως 680 nm, (2) Οπές διέλευσης ακτινοβολίας προσαρμόσιμης διαμέτρου, (3) μονοχρωμάτορας διέγερσης, (4) Θάλαμος δείγματος, (5) Χώρισμα, (6) Φίλτρα ακτινοβολίας εκπομπής, (7) Πρίσματα εστίασης δέσμης, (8) Θέση κυψελίδας δείγματος (9) Θύρα εισόδου ακτινοβολίας εκπομπής (10) Συσκευή διόρθωσης ακτινοβολίας διέγερσης, (11) Μονοχρωμάτορας εκπομπής, (12) Διάταξη φωτοπολλαπλασιαστή.

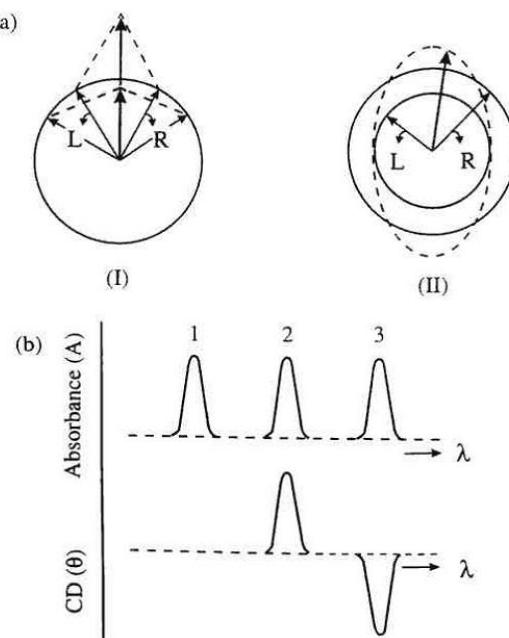
2.3. Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχροϊσμού

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 υπάρχει μια εκρηκτική ανάπτυξη στη δομική βιολογία με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεΐνικών δομών υψηλής ανάλυσης να προστίθενται στην πρωτεΐνική βάση δεδομένων (PDB) (πάνω από 2000 το χρόνο). Αυτό έχει επιτρέψει μια λεπτομερή, συστηματική διαλεύκανση στη λειτουργία συστημάτων ολοένα αυξανόμενου μεγέθους, περιλαμβάνοντας πολύπλοκα κυτταρικά συμπλέγματα, όπως το πρωτεόσωμα

και μεγάλες ριβοσωμικές υπομονάδες. Σε μεγάλο βαθμό, η ανάπτυξη στη δομική βιολογία πυροδοτείται από την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, η οποία επιτρέπει να παραχθούν πρωτεΐνες στις απαιτούμενες ποσότητες, όπως επίσης και από την πρόοδο στην ανάλυση των μεγάλων δεδομένων της βιοπληροφορικής και της δομικής κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X σε εγκαταστάσεις επιταχυντών σύγχροτρον. Παρόλα αυτά, γίνεται ολοένα περισσότερο αντιληπτό ότι υπάρχει η ανάγκη υλοποίησης δομικών μελετών σε συνθήκες που οι πρωτεΐνες πραγματικά λειτουργούν (δηλαδή, σε διάλυμα) που επιπρόσθετα να επιτυγχάνουν μετρήσεις των ρυθμών των δομικών μεταβολών των πρωτεϊνών που είναι συχνά ουσιώδεις για τη βιολογική τους λειτουργία. Ο κυκλικός διχροϊσμός (CD) αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο ως μια ιδιαίτερα χρήσιμη δομική τεχνική για να διαχειριστεί κανείς τα θέματα αυτά (Kelly et al., 2005).

Ο κυκλικός διχροϊσμός αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μορφή χειρομορφικής φασματοσκοπίας. Το φαινόμενο του κυκλικού διχροϊσμού συνίσταται από τη διαφορική απορρόφηση αριστερόστροφα και δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός από ένα χειρόμορφο μόριο. Ο κυκλικός διχροϊσμός ο οφειλόμενος σε ηλεκτρονιακές μεταβάσεις αναφέρεται απλά ως CD (Sreerama & Woody, 2004b). Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει όταν ένα χρωμοφόρο είναι χειρόμορφο (οπτικά ενεργό) είτε (α) εγγενώς, λόγω της δομής του ή (β) όντας ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα χειρομορφικό κέντρο ή (γ) ευρισκόμενο σε ένα μη-συμμετρικό περιβάλλον. Στην πράξη η επίπεδα πολωμένη ακτινοβολία διαχωρίζεται στα δύο κυκλικά πολωμένα συστατικά της κατά τη διέλευσή της μέσω ενός διαμορφωτή που υποβάλλεται σε ένα εναλλασσόμενο (50 kHz) ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαμορφωτής συνήθως αποτελείται από έναν πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο χαλαζία και ένα λεπτό δισκίο ισοτροπικού υλικού (για παράδειγμα, χαλαζία) συνεκτικά συνδεδεμένο με τον κρύσταλλο. Το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο επάγει δομικές αλλαγές στον κρύσταλλο χαλαζία κάτι το οποίο κάνει το δίσκο να επιτρέπει τη διάδοση μόνο κυκλικά πολωμένου φωτός. Αν μετά τη διέλευση μέσω του δείγματος τα αριστερόστροφα και δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένα συστατικά δεν απορροφώνται (ή απορροφώνται στον ίδιο βαθμό), ο συνδυασμός των συστατικών θα αναδημιουργήσει ακτινοβολία πολωμένη στο αρχικό επίπεδο. Όμως, αν ένα από τα συστατικά απορροφάται από το δείγμα σε μεγαλύτερο βαθμό από το άλλο, η ακτινοβολία που θα προκύψει (η συνισταμένη ακτινοβολία) θα

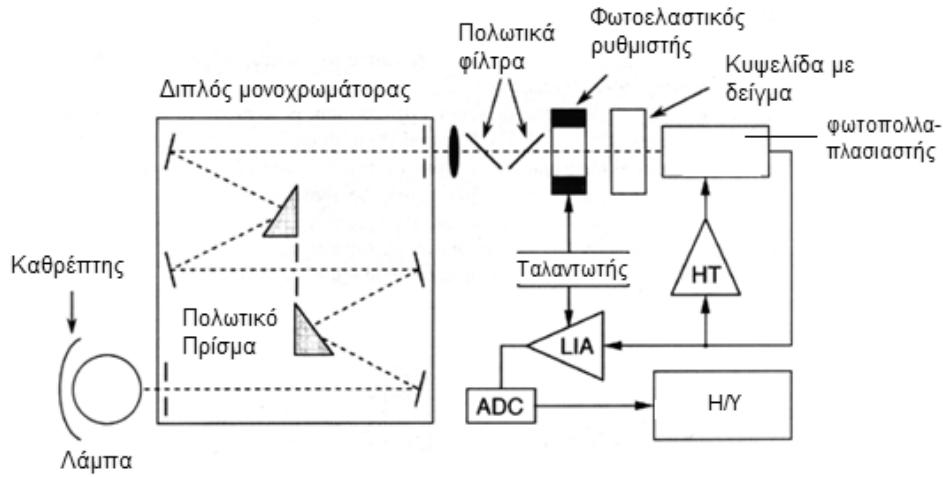
είναι τώρα ελλειπτικά πολωμένη (Σχ. 2.10). Στην πράξη, το όργανο CD (φασματοπολωσίμετρο) δεν ανασυνθέτει τις συνιστώσες αλλά ανιχνεύει τις δύο συνιστώσες ξεχωριστά. Θα επιδείξει διχροϊσμό σε ένα μήκος κύματος της ακτινοβολίας εκφρασμένο είτε ως διαφορά στην απορρόφηση των δύο συνιστωσών ($\Delta A = A_L - A_R$) ή ως ελλειπτικότητα σε μοίρες (θ) ($\theta = \tan^{-1}(b/a)$), όπου b και a είναι μικρός και ο μεγάλος άξονας της δημιουργούμενης έλλειψης. Υπάρχει μια απλή αριθμητική σχέση μεταξύ ΔA και θ (σε μοίρες), δηλαδή, $\theta = 32.98 \Delta A$. Ένα CD φάσμα λαμβάνεται όταν ο διχροϊσμός μετριέται συναρτήσει του μήκους κύματος (Kelly & Price, 2000).



Σχ. 2.10.: Η αρχή του φαινομένου CD. (α) Αριστερόστροφα (L) και δεξιόστροφα (R) κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία: (I) οι δύο συνιστώσες έχουν το ίδιο πλάτος και όταν ανασυντεθούν δημιουργούν επίπεδα πολωμένη ακτινοβολία (II) οι συνιστώσες έχουν διαφορετικό μέγεθος και το αποτέλεσμα (διακεκομένη γραμμή) είναι ελλειπτικά πολωμένο. (β) Η σχέση μεταξύ απορρόφησης και φάσματος CD. Η μπάντα 1 δεν είναι χειρομορφική, η μπάντα 2 έχει θετικό φάσμα CD με την L συνιστώσα να έχει απορροφηθεί περισσότερο από την R μπάντα και η μπάντα 3 έχει αρνητικό CD φάσμα.

Το επόμενο σχήμα (Σχήμα 2.11) δείχνει το οπτικό διάγραμμα ενός φασματοπολωσίμετρου κυκλικού διχροϊσμού. Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα

εργασία είναι το φασματοπολωσίμετρο JASCO-715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) με λειτουργικό εύρος μήκους κύματος στην περιοχή του ορατού (VIS) και του υπεριώδους (UV) ($\lambda_{\min}=170$ nm).

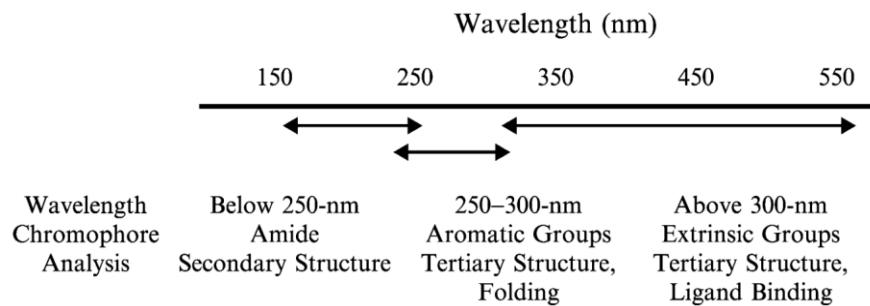


Σχήμα 2.11.: Η ακτινοβολία λυχνίας ξένου (Xe) διέρχεται από έναν διπλό μονοχρωμάτορα πόλωσης. Στη συνέχεια το γραμμικά πολωμένο φως, με τη βοήθεια ενός διαμορφωτή (modulator), μετατρέπεται σε κυκλικά πολωμένο, διέρχεται την κυψελίδα με το προς μελέτη δείγμα και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα μέσω ενός φωτοπολλαπλασιαστή. Το σήμα του φωτοπολλαπλασιαστή αποτελείται από μία συνιστώσα συνεχούς ρεύματος (DC) και μία εναλλασσομένου (AC). Ένας βρόχος θετικής ανάδρασης (positive feedback loop) εξασφαλίζει τη σταθερότητα της συνιστώσας DC ρυθμίζοντας την παροχή υψηλής τάσης του φωτοπολλαπλασιαστή. Η AC συνιστώσα, με συχνότητα αυτή του διαμορφωτή, προκύπτει από την διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός από το δείγμα. Το πλάτος της συνιστώσας AC αποτελεί το μέτρο του κυκλικού διχροϊσμού. Μετά από διόρθωση (rectification) μέσω του ενισχυτή υψηλής ευαισθησίας ανίχνευσης φάσης (LIA: lock-in amplifier), η συνιστώσα AC μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα μέσω ενός μετατροπέα ADC και υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία στον υπολογιστή. Το φάσμα CD λαμβάνεται από σάρωση σε περιοχή μήκους κύματος με ταυτόχρονη μεταβολή του πλάτους διαμόρφωσης (Nöltung, 2006).

Το CD φάσμα των πρωτεΐνων χωρίζεται γενικά σε τρεις περιοχές μηκών κύματος, βάσει της ενέργειας των ηλεκτρονιακών μεταβάσεων που κυριαρχούν (Σχ. 2.12). Αυτές είναι:

- (1) η άνω υπεριώδης far UV (κάτω από 250 nm), όπου κυριαρχούν οι συνεισφορές του

πεπτιδικών δεσμών, (2) η εγγύς υπεριώδης near UV (250–300 nm), όπου συνεισφέρουν οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες και (3) η εγγύς υπεριώδης near UV – ορατή περιοχή (300–700 nm), όπου κυριαρχούν τα εξωτερικά χρωμοφόρα (Sreerama & Woody, 2004a).

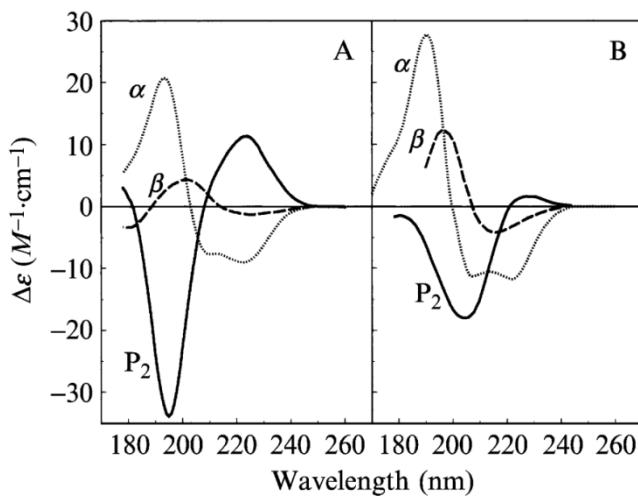


Σχ. 2.12.: CD φασματικές περιοχές και συνεισφορές χρωμοφόρων στις πρωτεΐνες.

Οι τρεις κανονικές δευτεροταγείς δομές, α , β και P_2 , που έχουν επαναλαμβανόμενες ϕ και ψ γωνίες, εμφανίζουν χαρακτηριστικά CD φάσματα (Σχ. 2.13). Το CD φάσμα της α -έλικας χαρακτηρίζεται από δύο αρνητικές μπάντες στα 222 και στα 208 nm, και μια θετική μπάντα στα 192 nm. Στις πρωτεΐνες οι α -έλικες εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στη δομή τους και η μέση γεωμετρία τους διαφέρει από τη θεωρητικά αναμενόμενη μορφή. CD φάσματα α -έλικων έχουν υπολογιστεί και δείχνουν να είναι συνεπή με ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η ένταση CD της α -έλικας αυξάνει με το μήκος της αλυσίδας κάτι που έχει επιβεβαιωθεί και από θεωρητικούς υπολογισμούς (Sreerama & Woody, 2004a).

Το CD φάσμα ενός τυπικού β φύλλου έχει μια αρνητική μπάντα κοντά στα 215 nm και μια θετική μπάντα κοντά στα 198 nm (Σχ. 2.13). Το CD των β -φύλλων είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί λόγω των διαφοροποιήσεων στη γεωμετρία των β -φύλλων στα πολυπεπτίδια και στις πρωτεΐνες και την περιορισμένη διαλυτότητα των πολυπεπτιδών στη β δομή. Μεταξύ των διαφοροποιήσεων στη γεωμετρία των β -φύλλων, η συστροφή των β -φύλλων έχει εξεταστεί. Ασθενώς συστρεφόμενα β φύλλα έχουν παρόμοια πλάτη για τις δύο μπάντες αντίθετου πρόσημου στα 215 και στα 198 nm, ενώ ισχυρά συστρεφόμενα β φύλλα εμφανίζουν ισχυρότερη μπάντα στα 198 nm (Sreerama & Woody, 2004a).

Η P_2 διαμόρφωση είναι μια αριστερόστροφη έλικα με τρία κατάλοιπα ανά στροφή, η γεωμετρία της οποίας εξάγεται από την poly(Pro)II-έλικα που σχηματίζεται από trans πεπτίδια. Το CD φάσμα της poly(Pro)II έλικας χαρακτηρίζεται από μια ασθενή θετική μπάντα κοντά στα 226 nm και μια ισχυρή αρνητική μπάντα κοντά στα 206 nm (Σχ. 2.13). Το φάσμα αυτό είναι ποιοτικά παρόμοιο με εκείνο των ανοργάνωτων (συναντώνται στη βιβλιογραφία ως τυχαία σπειράματα) και ξεδιπλωμένων πρωτεΐνων, το οποία υποδεικνύει την ύπαρξη της P_2 διαμόρφωσης σε αυτές. Επακόλουθες αναλύσεις κρυσταλλικών δομών επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μικρού μήκους διαμορφώσεων P_2 σε σφαιροειδείς πρωτεΐνες (Sreerama & Woody, 2004a).



Σχ. 2.13.: (A) Φάσματα CD α-έλικας, β-φύλλου και P_2 δομής, όπως προέκυψαν από την αποσύνελιξη των φασμάτων ενός σετ αναφοράς 37 πρωτεΐνων. **(B)** Φάσματα CD πρότυπων πολυπεπτιδίων σε α-ελικοειδείς, β-φύλλου και poly(Pro)II-έλικας διαμορφώσεις.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι να αναλύσει κανείς φάσματα CD για να υπολογίσει τη δευτεροταγή δομή. Όλες οι μέθοδοι ανάλυσης φασμάτων CD υποθέτουν ότι το φάσμα μιας πρωτεΐνης μπορεί να αναπαρασταθεί ως ένας γραμμικός συνδυασμός των φασμάτων των στοιχειωδών στοιχείων της δευτεροταγούς δομής, συν έναν όρο θορύβου, ο οποίος περιλαμβάνει τη συνεισφορά των αρωματικών χρωμοφόρων και των προσθετικών ομάδων

$$\theta_\lambda = \sum \varepsilon_i S_{\lambda i} + noise$$

όπου θ_λ είναι το CD φάσμα της πρωτεΐνης σαν συνάρτηση του μήκους κύματος, ε_i είναι το κλάσμα κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής, i , και $S_{\lambda i}$ είναι η ελλειπτικότητα σε κάθε μήκος κύματος κάθε $i^{\text{στού}}$ στοιχείου δευτεροταγούς δομής. Στις περιορισμένες προσαρμογές, το άθροισμα όλων των κλασματικών βαρών, ε_i , πρέπει να είναι ίσο με ένα και όλες οι κλασματικές συνεισφορές πρέπει να είναι μεγαλύτερες ή ίσες του μηδενός (Greenfield, 2006).

Υπάρχουν δύο γενικές κατηγορίες μεθόδων για να υπολογίσει κανείς την πρωτεϊνική διαμόρφωση. Η πρώτη χρησιμοποιεί πρότυπα πολυπεπτιδίων, με καλά ορισμένη σύσταση σε γνωστές διαμορφώσεις, οι οποίες έχουν προσδιοριστεί με περίθλαση ακτίνων-X σε υμένια ή από φασματοσκοπία IR σε διάλυμα. Η δεύτερη χρησιμοποιεί τα φάσματα πρωτεϊνών τα οποία έχουν χαρακτηριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X ως πρότυπα. Αυτά κατόπιν συγκρίνονται με τα φάσματα των άγνωστων πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας την ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων, τη ridge παλινδρόμηση, την αυτοσυνεπή μέθοδο ή την ανάλυση νευρωνικών δικτύων κ.α. (Greenfield, 2006).

Σε ό,τι αφορά στην τελευταία μέθοδο ανάλυσης, ένα νευρωνικό δίκτυο είναι ένα πρόγραμμα τεχνητής νοημοσύνης που χρησιμοποιείται για την εύρεση συσχετίσεων δεδομένων. Ένα από τα πιο διαδεδομένα προγράμματα είναι το CDNN. Το CDNN αναλύει τα δεδομένα για να προσδιορίσει έλικες, αντι-παράλληλα και παράλληλα β-φύλλα, β-στροφές και εναπομένουσες δομές. Ένα νευρωνικό δίκτυο «εκπαιδεύεται» πρώτα χρησιμοποιώντας ένα σετ από γνωστές πρωτεΐνες, έτσι ώστε η είσοδος του CD σε κάθε μήκος κύματος να οδηγεί στην έξοδο στη σωστή δευτεροταγή δομή. Το «εκπαιδευμένο» δίκτυο κατόπιν χρησιμοποιείται για να αναλύσει άγνωστες πρωτεΐνες. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Greenfield, 2006).

Όλες οι μέθοδοι είναι χρήσιμες για τον προσδιορισμό του περιεχομένου των α-ελίκων σφαιροειδών πρωτεϊνών. Η βασισμένη στις πρωτεΐνες ανάλυση είναι εντυπωσιακή όταν αναλύονται διαμορφώσεις σφαιροειδών καλά διπλωμένων πρωτεϊνών. Εντούτοις, τα περισσότερα προγράμματα που χρησιμοποιούν δεδομένα βασισμένα πάνω σε πρωτεϊνικά φάσματα δεν αναλύουν σωστά τη διαμόρφωση πρωτεϊνών με πλειονότητα σε β-φύλλα,

όπως συμβαίνει σε κάποια συνθετικά πολυπεπτίδια και στις αμυλοειδείς πρωτεΐνες ή σε πολλές ινώδεις πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο ή τις πρωτεΐνες σπειρωμένου σπειράματος (Greenfield, 2006).

Οι συνεισφορές των αρωματικών καταλοίπων είναι ασθενείς σε σύγκριση με αυτές των πεπτιδικών δεσμών της ραχοκοκαλιάς. Εντούτοις, μεταβολές στο περιβάλλον των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων στις πρωτεΐνες προκαλούμενες από εξωτερικές διαταραχές, όπως η πρόσδεση κάποιου προσδέματος, μεταλλάξεις, ή στις πειραματικές συνθήκες, μπορούν να οδηγήσουν σε ανιχνεύσιμες μεταβολές στα CD σήματα. Τέτοιες συνεισφορές γενικά παρατηρούνται στην περιοχή near-UV, όπου δεν συνεισφέρουν οι πεπτιδικοί δεσμοί της ραχοκοκαλιάς. Η ανάλυση, εντούτοις, είναι ποιοτικής φύσης, αν και σε κάποιες πρωτεΐνες οι αρωματικές μπάντες CD μπορούν να αποδοθούν σε συγκεκριμένα κατάλοιπα και έτσι να εξαχθούν πληροφορίες για το περιβάλλον τους. Μελέτες πρωτεΐνικής δίπλωσης συχνά χρησιμοποιούν τις μεταβολές του αρωματικού CD ως δείκτη των τριτοταγών αλληλεπιδράσεων (Sreerama & Woody, 2004a).

Το near-UV φάσμα CD των πρωτεϊνών προέρχεται από το περιβάλλον κάθε αρωματικής πλευρικής αλυσίδας. Πιθανές συνεισφορές έχουμε επίσης από δισουλφιδικούς δεσμούς, ή μη-πρωτεΐνικους συμπαράγοντες οι οποίοι μπορεί να απορροφούν σε αυτή τη φασματική περιοχή. Στις ιθαγενείς καταστάσεις των πρωτεϊνών οι πλευρικές αλυσίδες των αρωματικών αμινοξέων βρίσκονται σε μια ποικιλία από μη-συμμετρικά περιβάλλοντα, χαρακτηριστικά της τριτοταγούς δομής της διπλωμένης πρωτεΐνης. Κάθε αρωματικό κατάλοιπο τείνει να έχει ένα χαρακτηριστικό προφίλ μήκους κύματος: η τρυπτοφάνη μια κορυφή κοντά στα 290 nm με λεπτή δομή μεταξύ 290 και 305 nm, η τυροσίνη μια κορυφή μεταξύ 275 και 282 nm (η λεπτή δομή μπορεί να μη φανεί λόγω της τρυπτοφάνης), η φαινυλαλανίνη μια αιχμηρή λεπτή δομή μεταξύ 255 και 270 nm. Η λεπτή δομή σε αυτές τις μπάντες προέρχεται από δονητικές μεταβάσεις στις οποίες εμπλέκονται διαφορετικά δονητικά επίπεδα διεγερμένων καταστάσεων. Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το CD φάσμα των αρωματικών αμινοξέων. Μεταξύ αυτών είναι: η ακαμψία της πρωτεΐνης, με τις πιο μεγάλης κινητικότητας πλευρικές αλυσίδες να εμφανίζουν μικρότερες εντάσεις, και η φύση του περιβάλλοντος εκφρασμένη με όρους σχηματισμού δε-

σμών υδρογόνου, παρουσίας πολικών ομάδων και πολωσιμότητας. Επιπλέον το CD φάσμα μπορεί να μεταβληθεί από αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρωματικών αμινοξέων, οι οποίες είναι σημαντικές αν η απόσταση μεταξύ τους είναι μικρότερη από 1 nm (Kelly & Price, 2000). Αρωματικές πλευρικές αλυσίδες συχνά σχηματίζουν αλληλεπιδρώντα ζεύγη ή συστάδες στις πρωτεΐνες και οι συζευγμένων-ταλαντωτών αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους αποτελεί μια πηγή αρωματικού CD στις πρωτεΐνες, η οποία εξηγεί την απουσία συσχέτισης μεταξύ του αριθμού των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων και των αρωματικών CD μπαντών. Η σύζευξη δύο αρωματικών ομάδων εξαρτάται από την απόσταση που τις χωρίζει και το σχετικό προσανατολισμό των αρωματικών δακτυλίων και, κανονικά, σε μικρότερες αποστάσεις δίνει ισχυρότερα σήματα CD. Παρά τη φαινόμενη τυχαιότητα των αρωματικών CD μπαντών λόγω της φύσης της σύζευξης, η ανάλυση των αρωματικών συνεισφορών μπορεί να πραγματοποιηθεί με συνδυασμό πειραματικών και υπολογιστικών εργαλείων. Πειραματικά, οι συνεισφορές από ένα αρωματικό κατάλοιπο μπορούν να συναχθούν αντικαθιστώντας το κατάλοιπο αυτό με ένα μη αρωματικό αμινοξύ ή με ένα αρωματικό αμινοξύ που είναι ασθενέστερο χρωμοφόρο και εξετάζοντας τη διαφορά των φασμάτων CD (αγρίου-τύπου – μεταλλαγμένου). Χρησιμοποιώντας υπολογιστικά εργαλεία μπορεί κανείς να πραγματοποιήσει ένα παρόμοιο εικονικό πείραμα στον υπολογιστή για να πάρει τις αρωματικές συνεισφορές θεωρητικά, υποθέτοντας ότι η δομή δεν μεταβάλλεται με τη μετάλλαξη. Στις περισσότερες περιπτώσεις η διαφορά της πειραματικής διαφοράς των φάσματος CD και της θεωρητικά υπολογισμένης είναι σε καλή συμφωνία υποδηλώνοντας δομική ομοιότητα της αγρίου-τύπου και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Εντούτοις, οι δυσκολίες που εμπλέκονται στη μοντελοποίηση δομικών μεταβολών λόγω διάρρηξης μιας αρωματικής συστάδας μπορεί να οδηγήσει σε ασυμφωνία μεταξύ θεωρίας και πειράματος (Sreerama & Woody, 2004a). Ένας τελευταίος παράγοντας είναι ο αριθμός των αρωματικών αμινοξέων στην πρωτεΐνη. Πρωτεΐνες με μεγάλο αριθμό τέτοιων αμινοξέων μπορεί να έχουν μικρότερες CD μπάντες από το αναμενόμενο λόγω φαινομένων ακύρωσης και αρνητικών συνεισφορών (Kelly & Price, 2000).

3. Πειραματικά Αποτελέσματα: Θερμοδυναμική Σταθερότητα της Πρωτεΐνης Λυσοζύμη σε συνθήκες κρυστάλλωσης

3.1. Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες μελετώνται *in vitro* σε μορφή υδατικών διαλυμάτων και αυτό προϋποθέτει τη διαλυτότητά τους στις συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων. Οι πρωτεΐνες κρυσταλλώνονται από πυκνά υδατικά διαλύματα, στα οποία αρχικώς είναι πλήρως διαλυτές, με ελεγχόμενη μείωση της διαλυτότητάς τους. Από το 1888 ο Hofmeister ανακάλυψε ότι διάφορα άλατα μεταβάλλουν την πρωτεΐνική διαλυτότητα και η κατάταξή τους ανάλογα με την αποτελεσματικότητά τους ως προς τη δράση αυτή είναι γνωστή ως **σειρά Hofmeister** (Hirano et al., 2007). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος η διαλυτότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται λόγω της ηλεκτροστατικής θωράκισης Debye-Hückel που επιφέρει η παρουσία ιόντων αντίθετου φορτίου με αυτό της πρωτεΐνης. Η αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι γνωστή ως **φαινόμενο εναλάτωσης (salting-in)**. Στις υψηλές συγκεντρώσεις η αφθονία των ιόντων ελαττώνει τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών, φαινόμενο που είναι γνωστό ως **φαινόμενο εξαλάτωσης (salting-out)**.

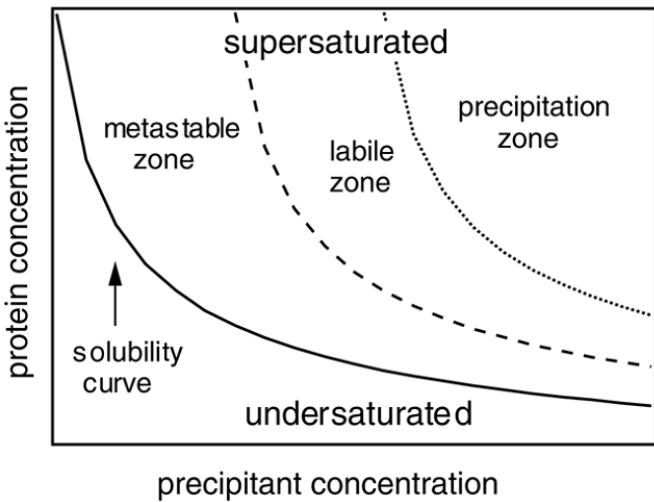
Στις χαμηλές συγκεντρώσεις τα άλατα σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες μέσω μη εξειδικευμένων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων εξαρτώμενων μόνο από την ιοντική ισχύ του μέσου. Στις υψηλές συγκεντρώσεις όμως με την ηλεκτροστατική θωράκιση σε κορεσμό οι κυρίαρχες επιδράσεις του άλατος αφορούν στις ιδιότητες του διαλύτη. Η φύση και η συγκέντρωση των αλάτων καθορίζουν το εξειδικευμένο αποτέλεσμα της δράσης τους στις πρωτεΐνες και οδηγούν είτε σε σταθεροποίηση, είτε σε μετουσίωση των πρωτεϊνών, όπως επίσης στην εναλάτωση ή εξαλάτωση (κατακρήμνιση ή κρυστάλλωση). Η πρωτεΐνική σταθερότητα επηρεάζεται από τα διαφορετικά είδη αλάτων (ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις) με την ίδια σειρά όπως η σειρά Hofmeister (Timasheff, 1993), (Arakawa & Timasheff, 1984), (Dill, 1990).

3.1.1. Η πρωτεϊνική κρυστάλλωση - Διαγράμματα φάσης

Η πρωτεϊνική κρυστάλλωση εξακολουθεί να αποτελεί το κλειδί στο χαρακτηρισμό των ατομικών δομών των πρωτεΐνων και των συμπλόκων τους με μεθόδους περίθλασης ακτίνων X. Λεπτομερής γνώση της φυσικής και της θερμοδυναμικής της κρυστάλλωσης δεν έχει ουσιαστικά αξία πρόβλεψης και η κρυστάλλωση νέων πρωτεΐνων πάντοτε πραγματοποιείται με μεθόδους σάρωσης. Το δείγμα σαρώνεται ως προς πολλαπλά προετοιμασμένα διαλύματα που διατίθενται στο εμπόριο, συχνά αποδίδοντας λίγη προσοχή στη χημεία της πρωτεΐνης ή τη λειτουργία της. Είναι δυνατόν να σχεδιαστεί μια πιο ορθολογιστικά τεκμηριωμένη προσέγγιση, η οποία θα μπορούσε να αυξήσει το ρυθμό επιτυχίας της πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης και να βάλει το εγχείρημα σε πιο ορθολογιστικά θεμέλια (Derewenda & Vekilov, 2006);

Όταν ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος εμβαπτίζεται σε διαλύτη, θα ξεκινήσει να διαλύεται. Αν ο όγκος του διαλύτη είναι μικρός ο κρύσταλλος δε θα διαλυθεί πλήρως, θα σταματήσει να διαλύεται όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα φτάσει μια συγκεκριμένη τιμή. Σ' αυτή τη συγκέντρωση, ο κρύσταλλος χάνει πρωτεϊνικά μόρια με τον ίδιο ρυθμό με τον οποίο τα πρωτεϊνικά μόρια επανασυνδέονται στον κρύσταλλο – το σύστημα τότε βρίσκεται σε ισορροπία. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα σε ισορροπία με τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο λέγεται **διαλυτότητα** (Asherie, 2004).

Η διαλυτότητα της πρωτεΐνης μεταβάλλεται με τις συνθήκες του διαλύματος. Ένα σχηματικό διάγραμμα της καμπύλης διαλυτότητας, το οποίο, δείχνει πώς η διαλυτότητα μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση ενός κατακρημνιστικού παράγοντα (π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ή κάποιο αλάτι), φαίνεται στο Σχ. 3.1. Οι κρύσταλλοι διαλύονται στην **περιοχή κάτω του κορεσμού** – όπου η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι μικρότερη από τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης – και μεγαλώνουν στη **ζώνη υπερκορεσμού** (Asherie, 2004).



Σχήμα 3.1: Ένα σχηματικό φασικό διάγραμμα που δείχνει τη διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης σε διάλυμα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του παράγοντα κατακρήμνισης.

Πώς όμως σχηματίζονται οι κρύσταλλοι για να παραχθεί η καμπύλη διαλυτότητας; Καταρχήν, οι κρύσταλλοι σχηματίζονται δύσκολα εκτός και αν η συγκέντρωση υπερβεί σημαντικά τη διαλυτότητα (σε κάποιες περιπτώσεις τουλάχιστον τρεις φορές). Ο μεγάλος υπερκορεσμός απαιτείται έτσι ώστε να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα ενεργοποίησης που υπάρχει για να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι. Αυτό το φράγμα αναπαριστά την απαιτούμενη ελεύθερη ενέργεια για το σχηματισμό μικροσκοπικών συμπλεγμάτων πρωτεΐνων – γνωστών ως **πυρήνων** – από τους οποίους ο κρύσταλλος τελικά θα σχηματιστεί. Μιας και υπάρχει ενεργειακό φράγμα, η **πυρηνογένεση** (η διεργασία σχηματισμού ενός πυρήνα) απαιτεί χρόνο. Αν ο υπερκορεσμός είναι χαμηλός, ο ρυθμός πυρηνογένεσης θα είναι τόσο αργός που δεν πρόκειται να σχηματιστούν κρύσταλλοι σε κάποιο εύλογο χρονικό διάστημα. Η αντίστοιχη περιοχή του φασικού διαγράμματος είναι γνωστή ως «**μετασταθής ζώνη**». Στην «**ασταθή ζώνη**» ή «**ζώνη κρυστάλλωσης**», ο υπερκορεσμός είναι αρκετός ώστε η αυθόρυμη πυρηνογένεση να μπορεί να παρατηρηθεί. Αν ο υπερκορεσμός είναι πολύ μεγάλος, τότε ανοργάνωτες δομές, όπως συσσωματώματα ή ιζήματα, είναι δυνατόν να σχηματιστούν. Η «**ζώνη κατακρήμνισης**» δεν είναι ευνοϊκή για το σχηματισμό κρυστάλλου, διότι τα συσσωματώματα και τα ιζήματα σχηματίζονται ταχύτερα από τους κρυστάλλους. Οι τρεις αυτές ζώνες απεικονίζονται σχηματικά στο Σχ. 3.1. Επειδή αυτές οι ζώνες σχετίζονται με φαινόμενα κινητικής, τα όριά τους δεν είναι σαφώς

προσδιορισμένα (αυτό είναι σε αντίθεση με την καμπύλη διαλυτότητας η οποία συνιστά ξεκάθαρη περιγραφή της θερμοδυναμικής ισορροπίας μεταξύ διαλύματος και κρυστάλλου) (Asherie, 2004).

Η χρήση ενός συστατικού για τη ενίσχυση των επαφών του κρυσταλλικού πλέγματος ή για κάποια άλλη ειδική αλληλεπίδραση, όπως π.χ. η χρήση μεταλλικού ιόντος για τη σταθεροποίηση μιας μεταλλοπρωτεΐνης, ορίζει το συστατικό ως ένα **πρόσθετο (additive)**. Αντίθετα η χρήση ενός συστατικού για να φέρει το μακρομόριο στην ασταθή ζώνη για τον σχηματισμό κρυστάλλου κατηγοριοποιεί το συστατικό ως έναν **κατακρημνιστικό παράγοντα (precipitating agent)**. Άν και ένα συστατικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως πρόσθετο και ως κατακρημνιστικός παράγοντας, εμπειρικά, οι κατακρημνιστικοί παράγοντες συνήθως χρησιμοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις και τα πρόσθετα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τυπικά η χρήση των πρόσθετων λαμβάνει χώρα αφού οι συνθήκες κρυστάλλωσης έχουν προσδιορισθεί (Yeh & Beale, 2007).

3.1.2. Η λυσοζύμη από το λεύκωμα του αυγού της κότας

Η λυσοζύμη και η ανοσολογική της δράση ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming το 1922 στη ρινική βλέννα του και έκτοτε έχει απομονωθεί από πολλές άλλες πηγές (σάλιο, ιούς, βακτήρια, φυτά, έντομα και πουλιά). Απομονώνεται ευκολότερα από το λεύκωμα του αυγού της κότας. Η **Chicken hen-egg-white lysozyme** ή **HEWL** είναι ίσως η περισσότερο μελετημένη μικρή σφαιροειδής πρωτεΐνη με μια τεράστια επιστημονική βιβλιογραφία γύρω από τις βιοφυσικές της ιδιότητες. Η σημασία της είναι μεγάλη διότι είναι ένα ένζυμο που προστατεύει τον άνθρωπο από βακτηριακές μολύνσεις. Πιο συγκεκριμένα, επιτίθεται στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων διαρρηγνύοντας τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες τους. Με την καταστροφή της δομικής ακεραιότητας των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων, το βακτήριο εκρήγνυται ως αποτέλεσμα της εσωτερικής του πίεσης. Λόγω της ικανότητάς της να σκοτώνει βακτήρια, η λυσοζύμη χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια σε εφαρμογές στη φαρμακευτική και στα τρόφιμα. Έχει επίσης πολλές άλλες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων της απενεργοποίησης κάποιων ιών με το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλεγμάτων της και αντιφλεγμονώδη δράση (Gunton et al.,

2007). Η λυσοζύμη είναι το πρώτο ένζυμο του οποίου η τρισδιάστατη δομή προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Blake et al., 1965). Η δομή της μπορεί να βρεθεί στην πρωτεΐνική τράπεζα δεδομένων (PDB) στο www.resb.org/pdb με κωδικό εισόδου 2lyz (Gunton et al., 2007).

Η λυσοζύμη αποτελεί ένα πρότυπο παράδειγμα για τη διαδικασία πρωτεΐνικής κρυστάλλωσης. Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεΐνες, είναι εύκολο να κρυσταλλώσει. Επιπρόσθετα είναι χαμηλού κόστους. Ως συνέπεια υπάρχει πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών για τις ιδιότητες τις σχετιζόμενες με την κρυστάλλωσή της συμπεριλαμβανομένου και του φασικού της διαγράμματος. Το τελευταίο είναι αποτέλεσμα πολλών παραμέτρων ελέγχου, όπως η συγκέντρωση άλατος, οι συνθήκες ρυθμιστικού διαλύματος, και άλλων πρόσθετων, όπως το PEG. Το PEG μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο όταν ένα άλας είναι ο κύριος κατακρημνιστικός παράγοντας, αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις λειτουργεί και το ίδιο – ειδικά στα μοριακά βάρη 1000-8000 – ως ένας ιδιαίτερα αποτελεσματικός κατακρημνιστικός παράγοντας. Η λυσοζύμη έχει μοριακό βάρος 14.4 kDa και μια υψηλή τιμή pI~11. Πέρα από το γεγονός ότι τα πειράματα μπορούν να πραγματοποιηθούν σε συνθήκες pH κάτω από το pI, η λυσοζύμη χρησιμοποιήθηκε συχνά ως ένα πρωτεΐνικό πρότυπο για τη μελέτη τόσο των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, όσο και για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-ιόντος σε διαλύματα με άλατα, πιθανώς λόγω της διαθεσιμότητάς της και της τάσης της για εύκολη κρυστάλλωση. Πολυάριθμα πειράματα αποκάλυψαν ιδιαίτερα πολύπλοκες σχέσεις μεταξύ διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και συγκεντρώσεων αλάτων, τύπου άλατος και pH· διάφορες θεωρίες έχουν επιστρατεύθει για να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα (Gunton et al., 2007).

3.2. Πειραματικά αποτελέσματα της θερμικής μετουσίωσης της λυσοζύμης με εφαρμογή DSC

Η θερμική μετουσίωση της HEW λυσοζύμης σε διάφορες συνθήκες έχει πραγματοποιηθεί στο παρελθόν με DSC (Privalov & Khechinashvili, 1974), (Cooper et al., 1992). Από όσο γνωρίζουμε υπάρχουν ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές για τη θερμική μετουσί-

ωση της λυσοζύμης παρουσία παραγόντων κατακρήμνισης, όπως π.χ. PEG (Zielenkiewicz et al., 2006), ενώ δεν έχουμε υπόψη κάποια συστηματική μελέτη της θερμικής μετουσίωσής της παρουσία αλάτων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επιχειρήθηκε λοιπόν να διερευνηθούν οι μεταβολές που επιφέρει στο θερμοδυναμικό προφίλ της λυσοζύμης η παρουσία τεσσάρων αλάτων: του χλωριούχου νάτριου NaCl, του θειικού νατρίου Na₂SO₄, του όξινου φωσφορικού αμμωνίου (NH₄)₂HPO₄ και του θειικού λιθίου Li₂SO₄ με DSC. Από τα άλατα αυτά, τα δύο πρώτα, NaCl και Na₂SO₄, είναι γνωστό ότι ευνοούν την κρυστάλλωση της λυσοζύμης, ενώ για τα άλλα δύο, (NH₄)₂HPO₄ και Li₂SO₄, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές κρυστάλλωσης της εν λόγω πρωτεΐνης. Απεναντίας, υπάρχουν συστηματικές μελέτες που δείχνουν αδυναμία αυτών των αλάτων στο να την κρυσταλλώσουν (McPherson, 2001; Ries-Kautt & Ducruix, 1989). Καταρχάς μελετήθηκε η θερμική μετουσίωση 7 mg/ml διαλύματος λυσοζύμης σε pH 4.5, ρυθμιζόμενο στην τιμή αυτή από 50 mM οξικού νατρίου (NaOA_c), χωρίς την παρουσία άλατος και εν συνεχεία παρουσία καθενός από τα προαναφερθέντα άλατα σε διάφορες συγκεντρώσεις ξεκινώντας από μια χαμηλή συγκέντρωση (κάποιων δεκάδων mM) προοδευτικά αυξανόμενης μέχρι το πρωτεϊνικό διάλυμα να φτάσει στην περιοχή της κρυστάλλωσης για τα άλατα φυσικά που την κρυσταλλώνουν. Η παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων λυσοζύμης από σκόνη λυσοζύμης (της εταιρίας Sigma-Aldrich) στις παραπάνω συνθήκες έγινε στο εργαστήριο Υπερμοριακής και Δομικής Χημείας του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από τον Δρ. Ε. Σαρειδάκη.

3.2.1. Θερμική μετουσίωση απουσία άλατος

Πραγματοποιήθηκε η θερμική μετουσίωση 7 mg/ml λυσοζύμης εντός 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (NaOA_c) σε pH 4.5 χωρίς την παρουσία άλατος. Η θερμική μετουσίωση πραγματοποιήθηκε με ρυθμό θέρμανσης 90 Deg/hr. Η χρήση μικρότερου ρυθμού θέρμανσης δεν άλλαξε το προφίλ της μετουσίωσης πιστοποιώντας την απο-

κατάσταση ισορροπίας μεταξύ διπλωμένων και ξεδιπλωμένων πρωτεΐνικών μορίων εντός του χρονικού πλαισίου που επιβάλει ο ρυθμός θέρμανσης 90 Deg/hr. Μια δεύτερη θέρμανση μετά από ταχεία ψύξη του πρωτεΐνικου διαλύματος κατέγραψε το υψηλό ποσοστό ανάκτησης 90% του θερμογράμματος DSC. Στο Σχήμα 3.2. φαίνεται το θερμόγραμμα DSC και η σιγμοειδής καμπύλη που σχεδιάστηκε για την απομόνωση της θερμοχωρητικότητας μετάβασης. Η καμπύλη αυτή σχεδιάστηκε σύμφωνα με το μοντέλο της προοδευτικής γραμμής αναφοράς (progress baseline) χρησιμοποιώντας το *DSC Data Analysis in Origin, Tutorial Guide, Version 5.0, Microcal*. Στο Σχήμα 3.3. φαίνεται η θερμοχωρητικότητα μετάβασης, το αποτέλεσμα δηλαδή της αφαίρεσης σιγμοειδούς από τη συνολική θερμοχωρητικότητα, και η προσαρμογή της στο μοντέλο πρωτεΐνικής μετουσίωσης μιας δομικής περιοχής μη συμπεριλαμβανομένων φαινομένων ΔC_p (βλ. Εξισώσεις αποσυνέλιξης DSC δεδομένων, κεφάλαιο 2). Οι τιμές των προσδιοριζόμενων από την προσαρμογή παραμέτρων: θερμοκρασία T_m , ενθαλπία μετουσίωσης ΔH και ενθαλπία van't Hoff ΔH_V καταγράφονται στην πρώτη γραμμή του Πίνακα 3.1.

Η θερμοχωρητικότητα ΔC_p προσδιορίστηκε ως εξής. Από την προσαρμογή της σιγμοειδούς καμπύλης στην εξίσωση Boltzmann

$$\langle \Delta C_p \rangle = C_{P,N} + a \cdot T + \frac{(C_{P,D} + b \cdot T - C_{P,N} - a \cdot T)}{1 + \exp\left(\frac{T_0 - T}{dT}\right)} \quad (3.1)$$

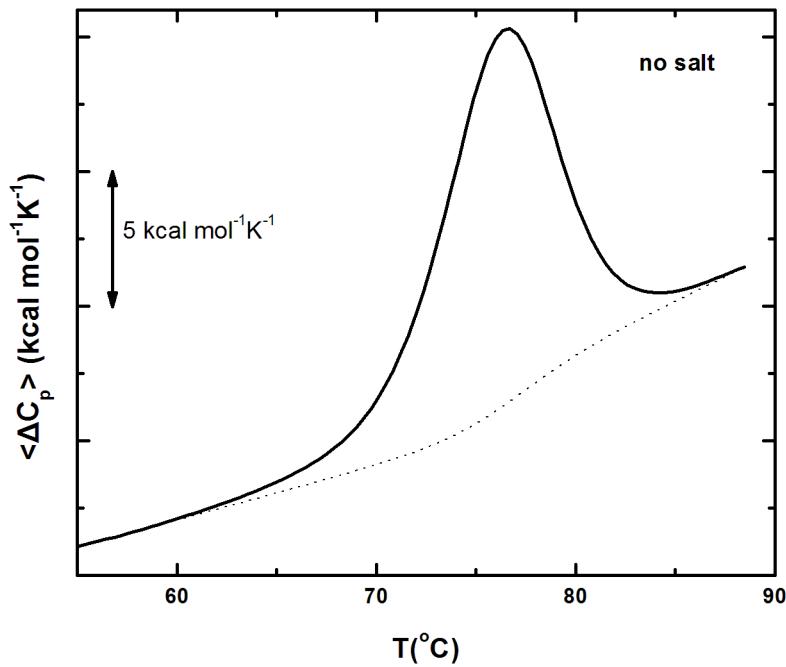
προσδιορίζονται οι παράμετροι $C_{P,N}$, $C_{P,D}$, a , b , T_0 , dT . Οι ενθείες $C_{P,N} + a \cdot T$ και $C_{P,D} + b \cdot T$ προσδιορίζουν τις γραμμές αναφοράς πριν και μετά τη θερμική μετάβαση, αντίστοιχα, T_0 είναι το σημείο καμπής και dT το εύρος της μετάβασης. Η θερμοχωρητικότητα ΔC_p υπολογίστηκε από την εξίσωση

$$\Delta C_p = C_{P,D} - C_{P,N} + (b - a)T_0 \quad (3.2)$$

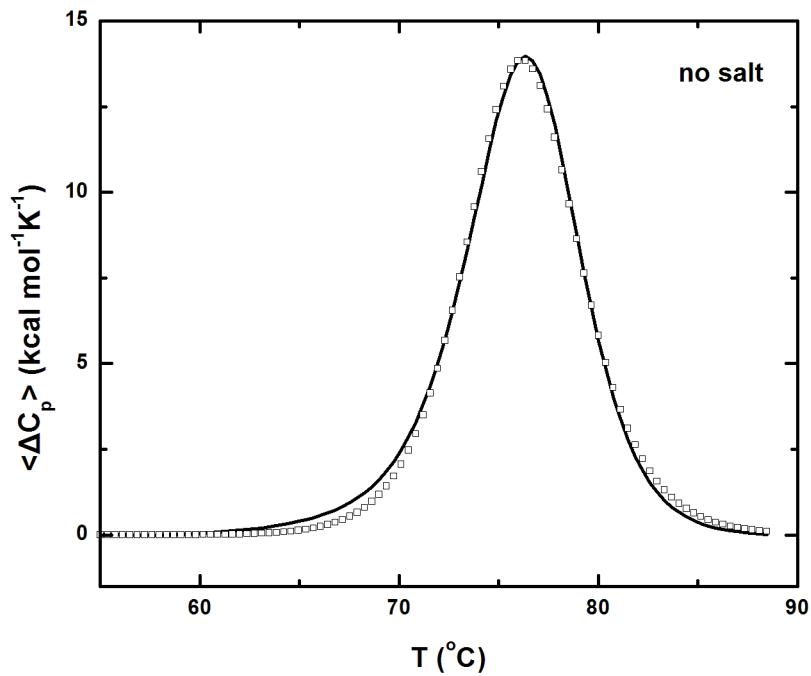
Η τιμή αυτή καταγράφεται επίσης στον Πίνακα 3.1. Η ενθαλπία μετουσίωσης και το ΔC_p βρίσκονται πολύ κοντά σε αυτές της βιβλιογραφίας (Privalov & Khechinashvili, 1974), (Cooper et al., 1992). Επίσης η τιμή του λόγου $\Delta H/\Delta H_V=0.8$ είναι τέτοια ώστε να θεωρήσουμε με καλή προσέγγιση ότι η θερμική μετάβαση είναι δύο-καταστάσεων (αμελητέος πρωτεΐνικός πληθυσμός σε ενδιάμεσες καταστάσεις). Χρησιμοποιώντας τις τιμές αυ-

τές σχεδιάστηκε η καμπύλη θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.11 (μαύρη καμπύλη).

Θα πρέπει να τονίσουμε ότι οι κλίσεις της σιγμοειδούς καμπύλης που σχεδιάστηκε πριν και μετά την περιοχή της μετάβασης δεν αφορούν αποκλειστικά τις πραγματικές μεταβολές της θερμοχωρητικότητας του πρωτεΐνικου διαλύματος της ιθαγενούς και της μετουσιωμένης κατάστασης, αντίστοιχα. Διότι συμπεριλαμβάνονται και τη μη γραμμική - στο θερμοκρασιακό εύρος της σάρωσης - συνεισφορά που προέρχεται από ελάχιστες διαφορές όγκου (της τάξης των μερικών μL) που αναπόφευκτα συμβαίνουν κατά τη φόρτωση των διαλυμάτων στα θερμιδομετρικά κελιά. Θεωρούμε λοιπόν ότι η πραγματική εξάρτηση του $\Delta C_p(T)$ στην ανάλυση αυτή δε λαμβάνεται υπόψη. Το σφάλμα στον προσδιορισμό του ΔC_p και στη θερμοκρασιακή εξάρτησή του είναι 5-10% (Becktel & Schellman, 1987). Η θερμοκρασιακή εξάρτηση της θερμοχωρητικότητας των περισσότερων πρωτεϊνών στη φυσική τους κατάσταση είναι με πολύ καλή προσέγγιση γραμμική, ενώ της μετουσιωμένης είναι ανώτερης τάξης και μάλιστα χωρίς να διαφαίνεται κάποια παγκόσμια για όλες τις πρωτεΐνες συμπεριφορά (Becktel & Schellman, 1987), (Freire, 1995), (Makhatadze, 2001). Παρόλα αυτά θεωρείται σε πολλές περιπτώσεις ικανοποιητική η προσέγγιση $\Delta C_p = \text{const.}$ Σύμφωνα λοιπόν με την υπόθεση $\Delta C_p = \text{const.}$ έγινε και ο προσδιορισμός του ΔC_p (Becktel & Schellman, 1987). Επίσης, οι πειραματικά προσβάσιμες θερμοδυναμικές παράμετροι μιας θερμικής μετουσίωσης T_m , ΔH και ΔC_p επιτρέπουν τον προσδιορισμό του ΔG μόνο σε μια μικρή περιοχή γύρω από το T_m (Becktel & Schellman, 1987). Έτσι η προεκβολή της καμπύλης θερμοδυναμικής σταθερότητας προς τις χαμηλές θερμοκρασίες εισάγει επίσης ένα σφάλμα στον προσδιορισμό του ΔG . Το σφάλμα αυτό εξαρτάται από την ακρίβεια προσδιορισμού των προαναφερθεισών παραμέτρων.



Σχήμα 3.2: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομένη γραμμή.



Σχήμα 3.3: Προσαρμογή (τετράγωνα) της θερμοχωρητικότητας μετάβασης της HEWL (συνεχής γραμμή) στην Εξ. (2.17).

3.2.2. Θερμική μετουσίωση παρουσία NaCl

Η θερμική μετουσίωση 7 mg/ml λυσοζύμης σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (NaOA_c) και pH 4.5, παρουσία 0.26, 0.43, 0.53, 0.77, 0.94 και 1.28 M NaCl πραγματοποιήθηκε με DSC. Η παρουσία 0.26 M NaCl στις προαναφερθείσες συνθήκες οδηγεί στην περιοχή του φασικού διαγράμματος πριν την καμπύλη διαλυτότητας, ενώ στις συγκεντρώσεις 0.43, 0.53 και 0.77 M NaCl στην περιοχή υπερκορεσμού και μάλλον στην μετασταθή ζώνη. Στη συγκέντρωση 0.94 M το πρωτεϊνικό διάλυμα βρίσκεται πολύ κοντά στην ζώνη κρυστάλλωσης και στην 1.28 M στην καρδιά της ζώνης κρυστάλλωσης. Μάλιστα στην συγκέντρωση των 1.28 M NaCl η θερμική μετουσίωση πραγματοποιήθηκε, αφού επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων με μικροσκόπιο. Οι μεταβολές αυτές ορίζουν στο φασικό διάγραμμα της λυσοζύμης μια θερμοδυναμική διαδρομή η κατάληξη της οποίας βρίσκεται εντός της ζώνης κρυστάλλωσης. Σημειώνουμε ότι το άλας του NaCl για λόγους που δεν είναι πλήρως κατανοητοί κρυσταλλώνει τη λυσοζύμη πολύ εύκολα, ενώ δεν είναι γενικώς από τους αποτελεσματικότερους κατακρημνιστικούς παράγοντες στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών (McPherson, 2001).

Όλες οι θερμικές μετουσιώσεις πραγματοποιήθηκαν με ρυθμό θέρμανσης 90 Deg/hr. Η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ήταν ιδιαίτερα υψηλή: κυμάνθηκε στο 80-90% για συγκεντρώσεις άλατος NaCl 0.26, 0.43, 0.53 και 0.77 M. Το υψηλό ποσοστό θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας στις θερμικές μετουσιώσεις αποτελεί ένδειξη ότι η προϋπόθεση των αραιών διαλυμάτων για την εφαρμογή της θερμοδυναμικής ισχύει ικανοποιητικά. Παρουσία 0.94 M NaCl η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ελαττώθηκε στο 65%, ενώ στην περίπτωση του διαλύματος με τους κρυστάλλους (1.28 M NaCl) παραδόξως ήταν μεγαλύτερη φτάνοντας στο 80%.

Στα Σχήματα 3.4-3.7 φαίνονται οι καμπύλες DSC του πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσία 0.26, 0.43, 0.53 και 0.77 M NaCl και οι σιγμοειδείς καμπύλες που προσδιορίστηκαν όπως στην περίπτωση απουσίας άλατος από πρωτεϊνικό διάλυμα, ενώ στο Σχήμα 3.10 φαίνονται οι θερμοχωρητικότητες μετάβασης και οι προσαρμογές στο μοντέλο πρωτεΐνης μετουσίωσης μιας δομικής περιοχής μη συμπεριλαμβανομένων φαινομένων ΔC_p (βλ.

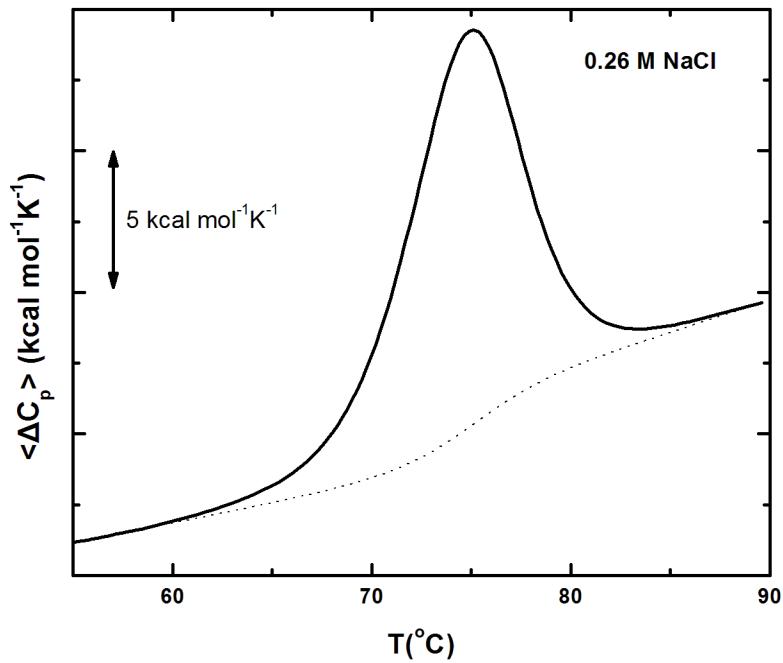
Εξισώσεις αποσυνέλιξης DSC δεδομένων, κεφάλαιο 2). Οι τιμές των προσδιοριζόμενων παραμέτρων αναγράφονται στον Πίνακα 3.1. Η προσαρμογή της σιγμοειδούς καμπύλης στην Εξ. (3.1) επιτρέπει τον υπολογισμό της στη θερμοκρασία T_o από την Εξ. (3.2). Η τιμή αυτή ΔC_p αναγράφεται επίσης στον Πίνακα 3.1. Το θερμόγραμμα της λυσοζύμης παρουσία 0.94 M NaCl, Σχήμα 3.8, εμφανίζει αρνητικό ΔC_p , το οποίο συσχετίζόμενο με την ελαττωμένη θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα υποδεικνύει συσσωματώσεις ξεδιπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων. Ως εκ τούτου η πειραματική καμπύλη στις συνθήκες αυτές δεν αναλύθηκε περαιτέρω. Η θερμική μετουσίωση των κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία 1.28 M NaCl φαίνεται στο Σχήμα 3.9. Η απουσία οποιασδήποτε διαταραχής στην γραμμή αναφοράς πριν την ενδόθερμη κορυφή, η οποία φαίνεται ότι αποτυπώνει τη θερμική μετουσίωση διπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων λυσοζύμης, δείχνει ότι η οργάνωση των μακρομορίων στον πρωτεϊνικό κρύσταλλο είναι κυρίως εντροπικής φύσης. Χρησιμοποιώντας τις τιμές του Πίνακα 3.1 σχεδιάστηκαν οι καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης παρουσία NaCl, Σχήμα 3.11.

Οι καμπύλες αυτές παρουσιάζουν ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Καταρχάς η τιμή του λόγου $\Delta H/\Delta H_V$ κυμαίνεται από 0.8 έως 0.9 έτσι ώστε να μπορούμε να θεωρήσουμε με καλή προσέγγιση ότι η θερμική μετάβαση είναι δύο-καταστάσεων. Η θερμοκρασία T_m σε όλες τις περιπτώσεις παρουσίασε μια μικρή ελάττωση σε σχέση με την τιμή της απουσία άλατος που έφτασε το πολύ τους 1.63 °C. Η ενθαλπία μετουσίωσης είτε παρέμεινε σταθερή, είτε ελαττώθηκε ελαφρώς, σε σχέση με την τιμή της απουσία άλατος με τη μέγιστη ελάττωση να είναι ~10%. Η παράμετρος που εμφάνισε τις μεγαλύτερες αποκλίσεις είναι το ΔC_p και είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο από κάθε άλλη παράμετρο τις καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης ρυθμίζοντας την καμπυλότητά τους. Την ελάττωση του ΔG στη μικρότερη από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ακολουθεί αύξηση, η οποία γίνεται πιο σημαντική στην υψηλότερη συγκέντρωση του NaCl.

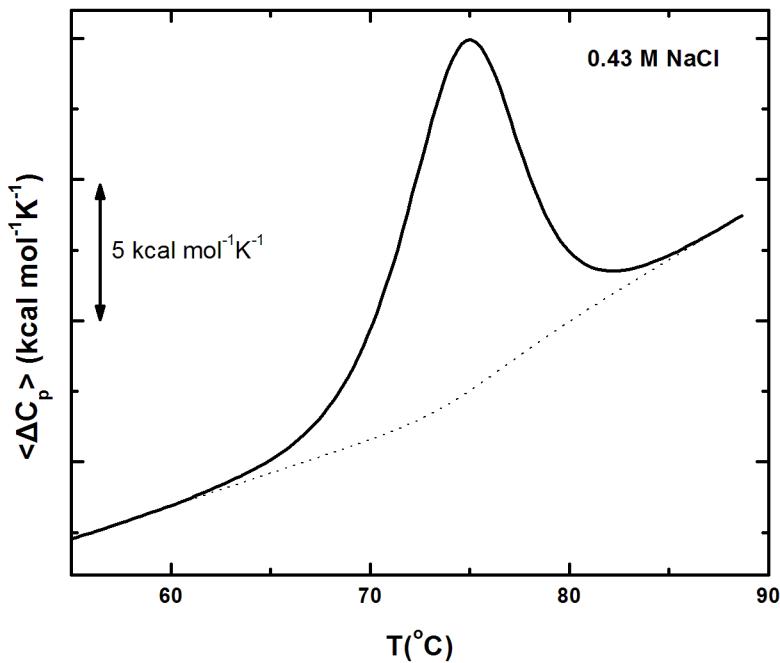
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα DSC της λυσοζύμης παρουσία NaCl

| Άλας | c_{salt} (% w/v) | c_{salt} (M) | T_m (°C) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | ΔH_v (kcal mol ⁻¹) | $\Delta H/\Delta H_v$ | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|------|------------------------------|--------------------------|---------------|---|---|-----------------------|---|
| - | - | - | 76.21 | 106 | 127 | 0.8 | 1.78 |
| NaCl | 1.5 | 0.26 | 74.69 | 107 | 125 | 0.9 | 2.39 |
| | 2.5 | 0.43 | 74.64 | 95 | 126 | 0.8 | 0.97 |
| | 3.1 | 0.53 | 74.58 | 99 | 128 | 0.8 | 1.27 |
| | 4.5 | 0.77 | 75.55 | 105 | 119 | 0.9 | 0.79 |
| | 5.5 | 0.94 | 74.79 | 104 | 127 | 0.9 | -0.28 |

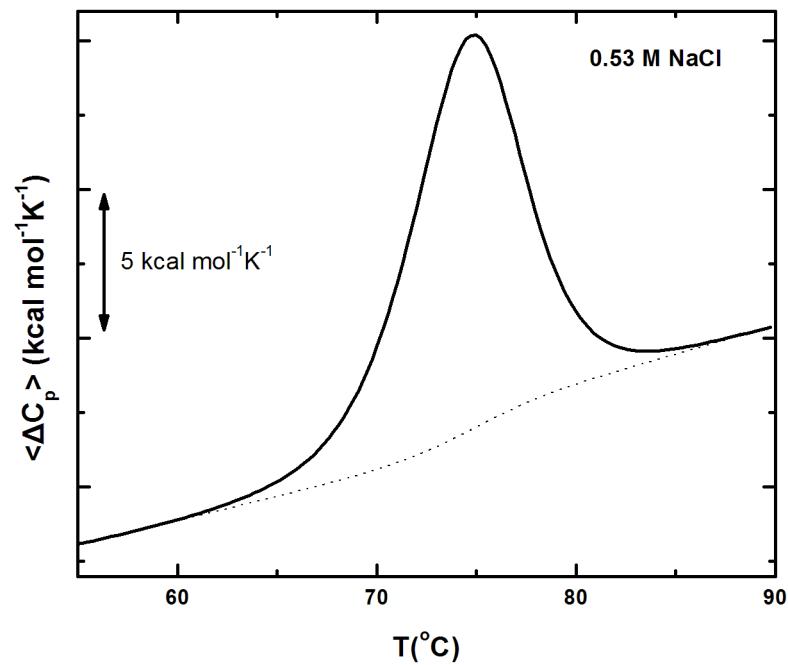
c: η συγκέντρωση του άλατος, T_m : η θερμοκρασία τήξης, ΔH : η ενθαλπία μετουσίωσης, ΔH_v : η ενθαλπία van't Hoff, ΔC_p η ενδογενής θερμοχωρητικότητα



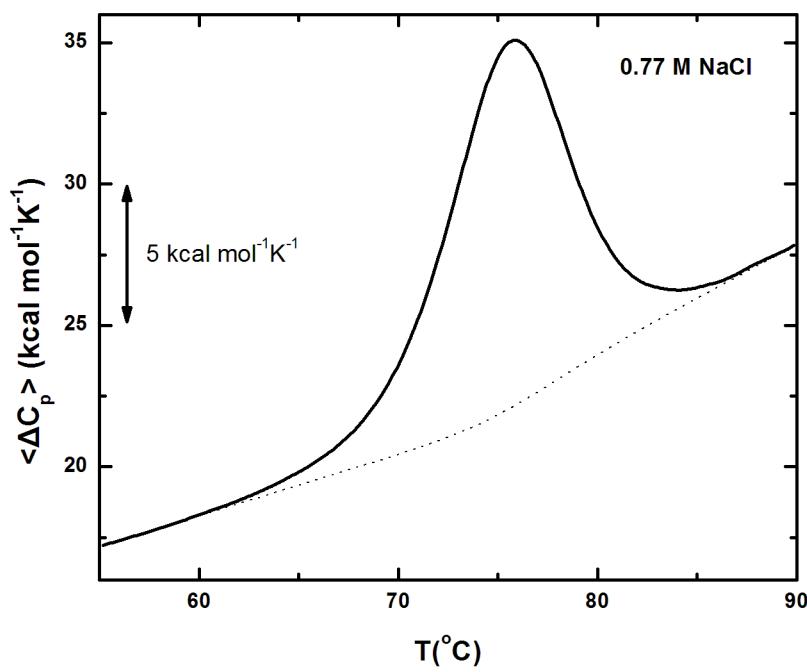
Σχήμα 3.4: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.26 M NaCl (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η στιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



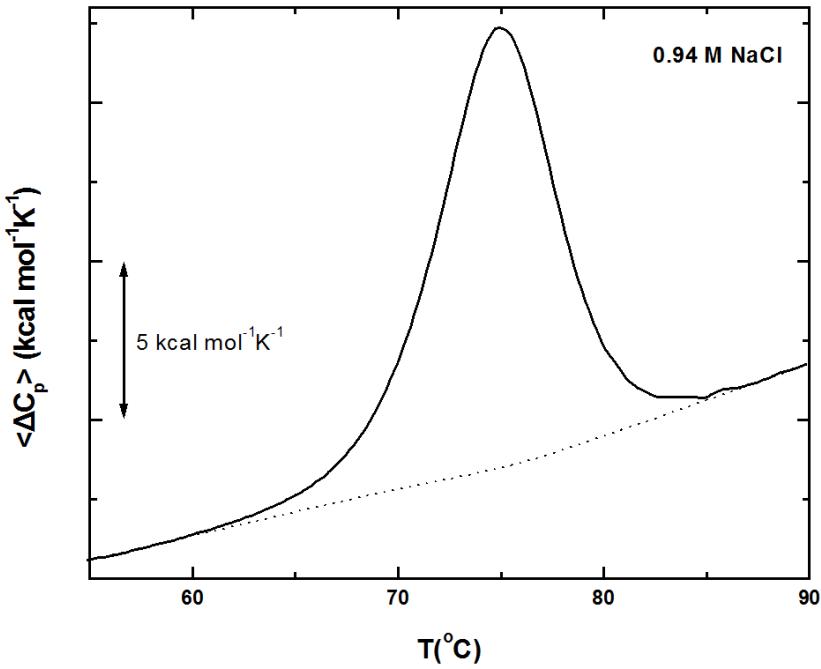
Σχήμα 3.5: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.43 M NaCl (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



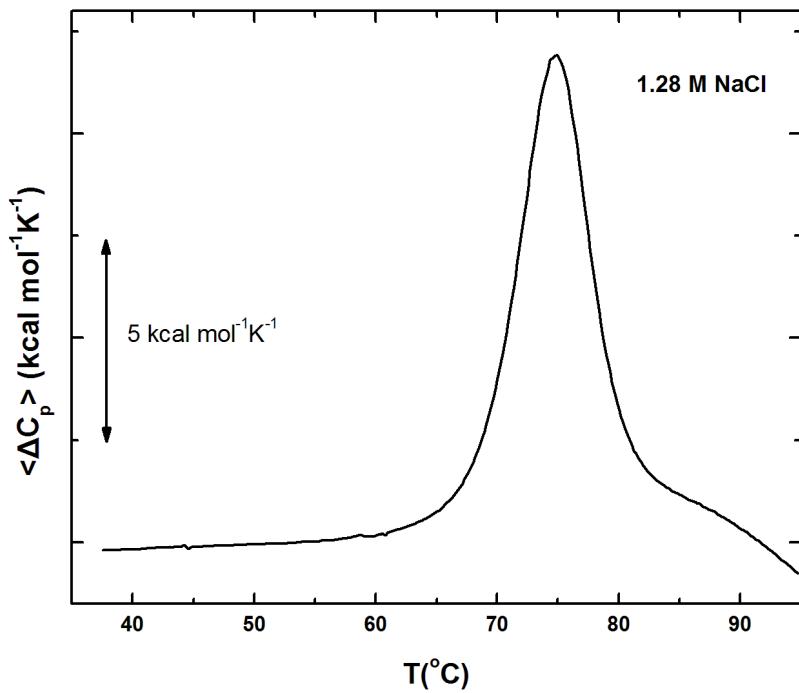
Σχήμα 3.6: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.53 M NaCl (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



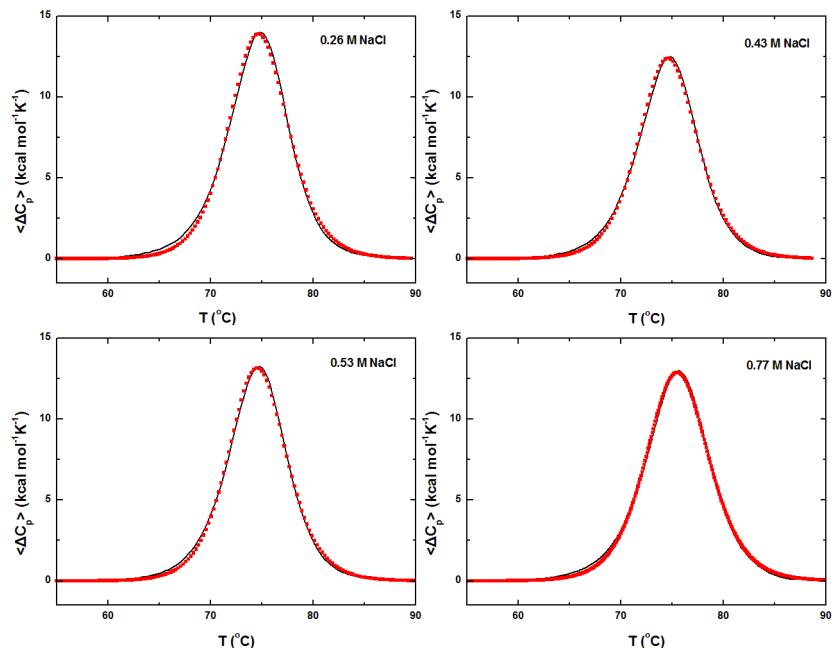
Σχήμα 3.7: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.77 M NaCl (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



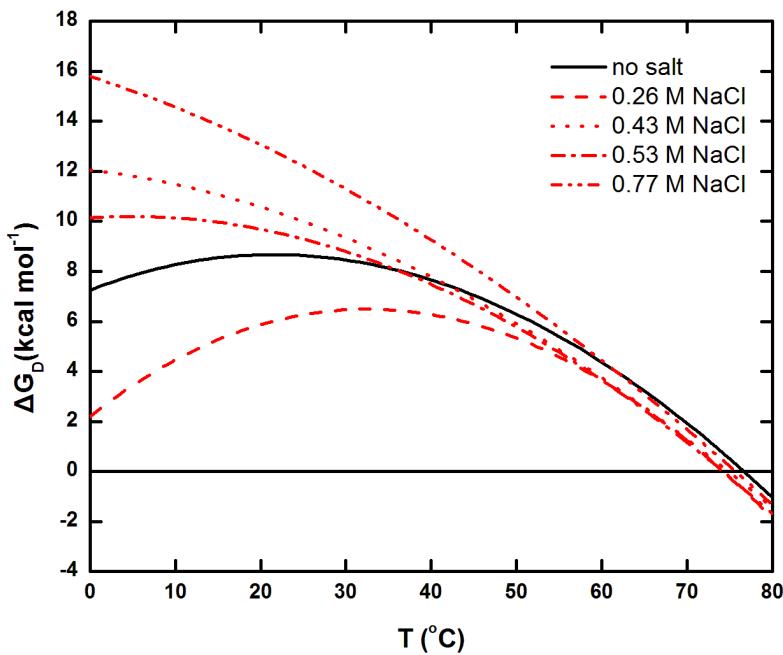
Σχήμα 3.8: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.94 M NaCl (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



Σχήμα 3.9: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 1.28 M NaCl (μαύρη συνεχής καμπύλη).



Σχήμα 3.10: Προσαρμογές (κόκκινες καμπύλες) της θερμοχωρητικότητας μετάβασης 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.26, 0.43, 0.53 και 0.77 M NaCl (μαύρες καμπύλες) στην Εξ. (2.17).



Σχήμα 3.11: Καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης απουσία άλατος (συνεχής μαύρη καμπύλη), παρουσία 0.26 M (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη), 0.43 M (κόκκινη στικτή καμπύλη), 0.53 M (κόκκινη διακεκομμένη-στικτή καμπύλη) και 0.77 M (κόκκινη διακεκομμένη-στικτή-στικτή καμπύλη) NaCl.

3.2.3. Θερμική μετουσίωση παρουσία Na_2SO_4

Με ρυθμό θέρμανσης 90 Deg/hr μετουσιώθηκαν θερμικά 7 mg/ml λυσοζύμης 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος NaOA_c σε pH 4.5, παρουσία 0.1, 0.2, 0.3 και 0.4 M άλατος Na_2SO_4 . Η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ήταν 83%, 71%, 73% και 40% για τις συγκεντρώσεις 0.1, 0.2, 0.3 και 0.4 M, αντίστοιχα. Το ποσοστό θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας του πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσία 0.4 M Na_2SO_4 είναι χαμηλό για τη θερμοδυναμική ανάλυση του θερμογράμματος. Στα Σχήματα 3.12, 3.13 και 3.14 φαίνονται οι καμπύλες DSC του πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσία 0.1, 0.2 και 0.3 M Na_2SO_4 και οι αντίστοιχες σιγμοειδείς καμπύλες που σχεδιάστηκαν όπως στις προαναφερθείσες περιπτώσεις. Στο Σχήμα 3.16 φαίνονται οι θερμοχωρητικές μετάβασης και οι προσαρμογές στο προαναφερθέν μοντέλο πρωτεϊνικής μετουσίωσης. Οι τιμές των προσδιοριζόμενων παραμέτρων καθώς η τιμή του ΔC_p προσδιοριζόμενη, όπως και στην περίπτωση του NaCl αναγράφονται στον Πίνακα 3.2. Η περίπτωση του 0.4 M Na_2SO_4 πα-

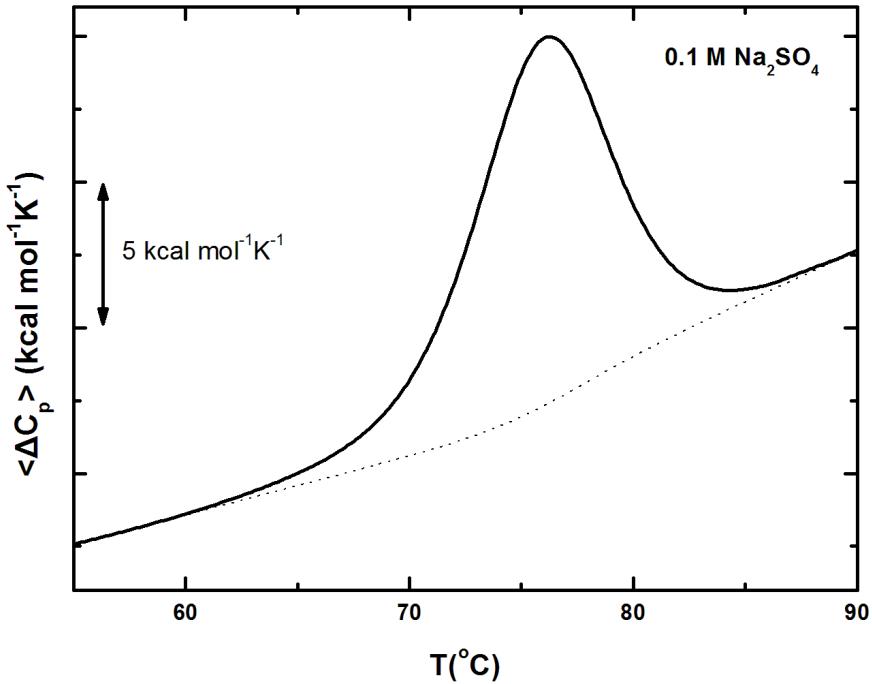
ρουσιάζεται στο Σχήμα 3.15 όπου και πάλι το αρνητικό ΔC_p σχετίζεται με την ελάττωση της θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας.

Στο Σχήμα 3.17 φαίνονται οι καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων Na_2SO_4 σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2. Η τιμή του λόγου $\Delta H/\Delta H_v$ παρουσιάζει μια σημαντικότερη διαφοροποίηση σε σχέση με περίπτωση του NaCl από 0.7 έως 0.9. Παρόλα αυτά θα θεωρήσουμε τη θερμική μετάβαση δύο-καταστάσεων. Οι μεταβολές του T_m είναι μικρότερες του ενός βαθμού, ενώ η ενθαλπία μετουσίωσης ελαττώθηκε μέχρι και σχεδόν 20%, μεταβολή σημαντικότερη σε σχέση με αυτήν που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του NaCl . Η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p εμφανίζεται και πάλι ως ο κυρίαρχος παράγοντας επίδρασης του άλατος στις καμπύλες σταθερότητας. Διαφαίνεται και εδώ αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης στις υψηλότερες συγκεντρώσεις Na_2SO_4 .

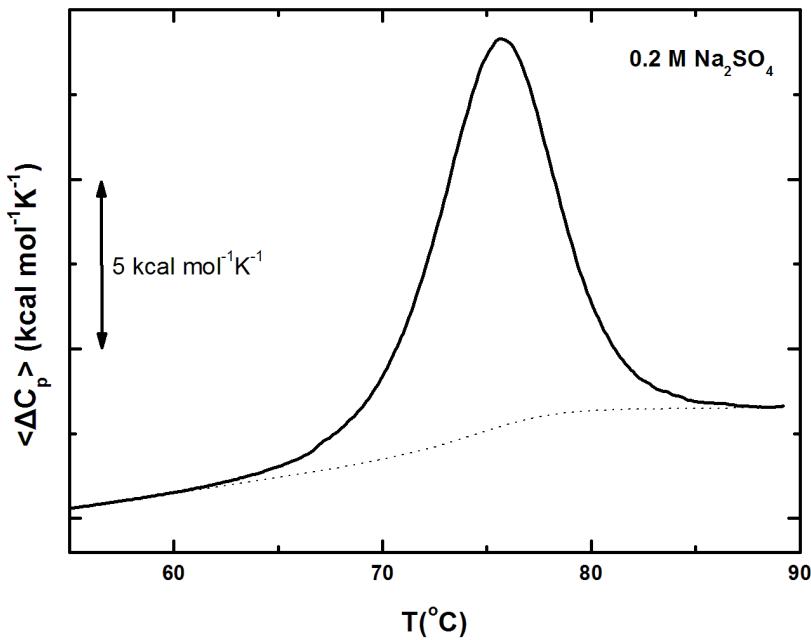
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα DSC της λυσοζύμης παρουσία Na_2SO_4

| Άλας | c_{salt} (M) | T_m (°C) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | ΔH_v (kcal mol ⁻¹) | $\Delta H/\Delta H_v$ | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|--------------------------|-------------------|---------------|---|---|-----------------------|---|
| - | - | 76.21 | 106 | 127 | 0.8 | 1.78 |
| Na_2SO_4 | 0.1 | 75.96 | 102 | 119 | 0.9 | 1.03 |
| | 0.2 | 75.49 | 85 | 129 | 0.7 | 1.06 |
| | 0.3 | 76.31 | 94 | 138 | 0.7 | 0.30 |

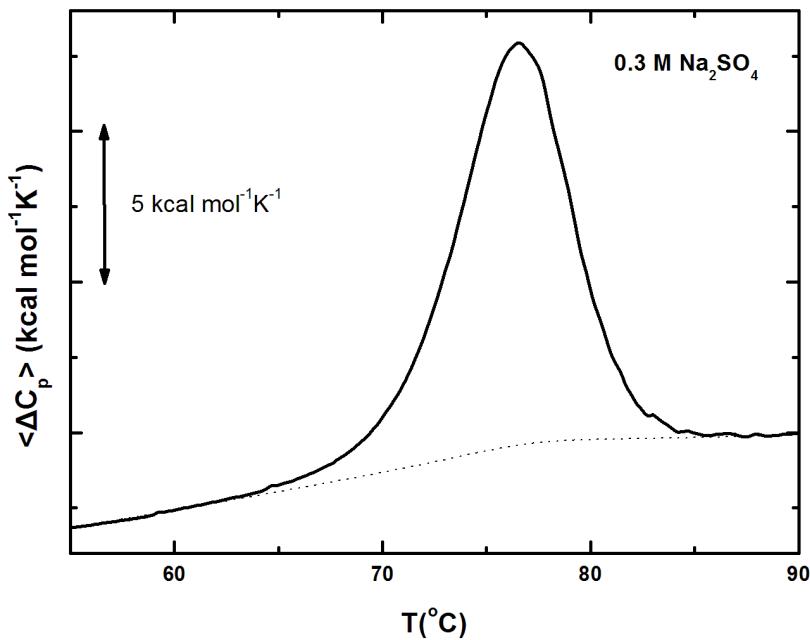
c: η συγκέντρωση του άλατος, T_m : η θερμοκρασία τήξης, ΔH : η ενθαλπία μετουσίωσης, ΔH_v : η ενθαλπία van't Hoff, ΔC_p η ενδογενής θερμοχωρητικότητα



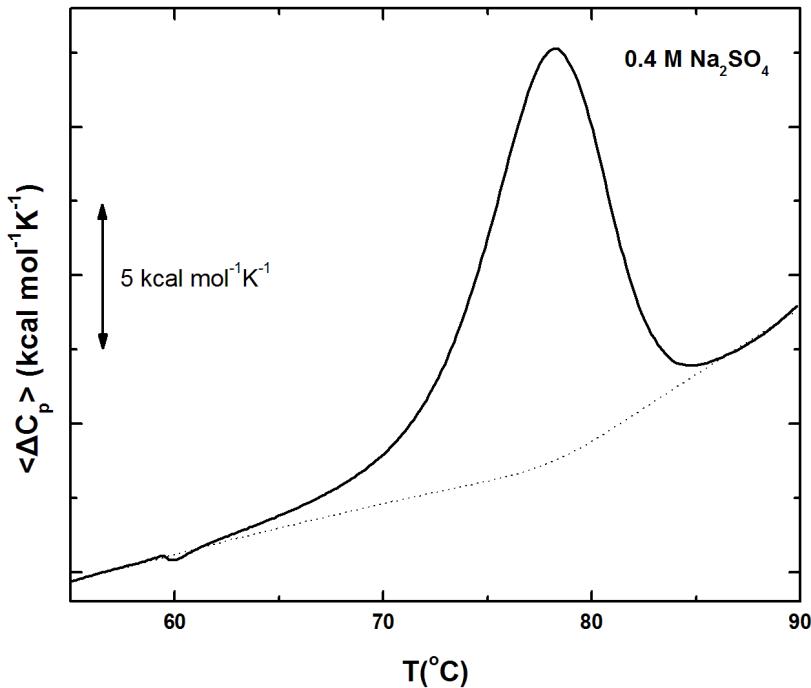
Σχήμα 3.12: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.1 M Na_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



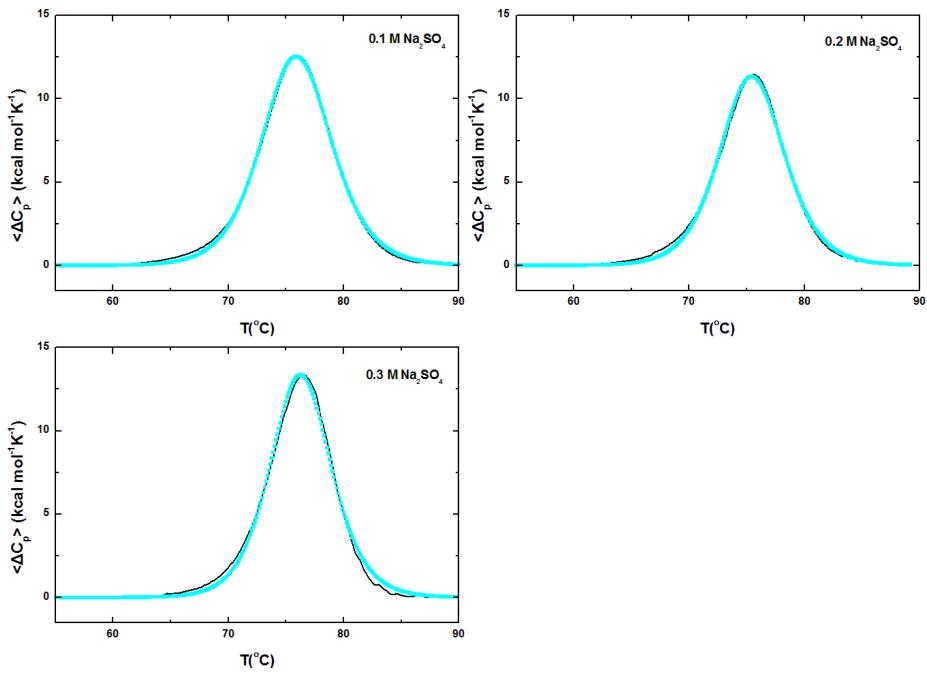
Σχήμα 3.13: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.1 M Na_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



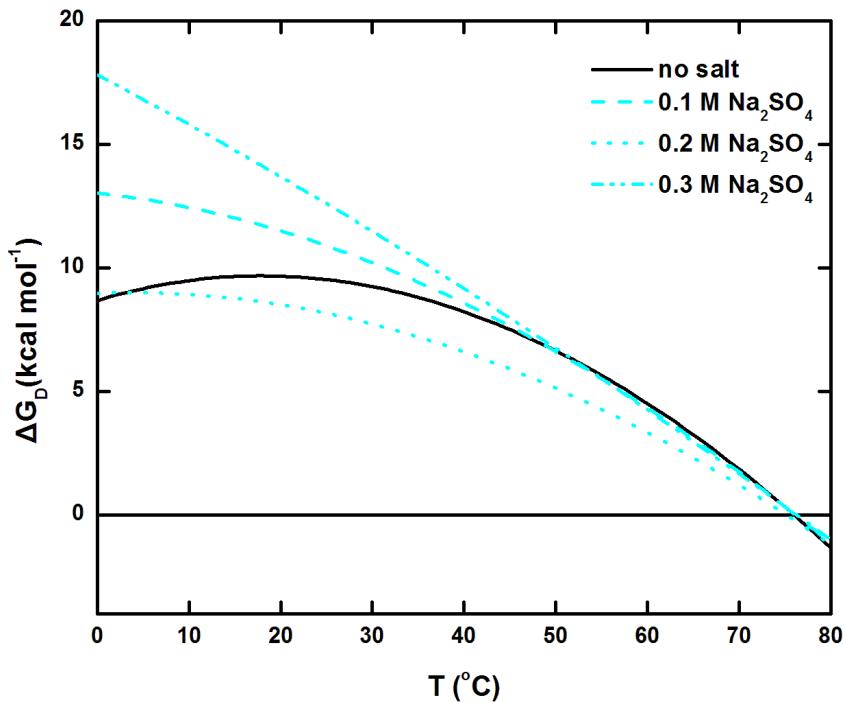
Σχήμα 3.12: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.3 M Na_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομένη γραμμή.



Σχήμα 3.13: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.4 M Na_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομένη γραμμή.



Σχήμα 3.14: Προσαρμογές (κυανές καμπύλες) της θερμοχωρητικότητας μετάβασης 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.1, 0.2 και 0.3 M Na₂SO₄ (μαύρες καμπύλες) στην Εξ. (2.17).



Σχήμα 3.15: Καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης απουσία άλατος (συνεχής μαύρη καμπύλη), παρουσία 0.1 M (κυανή διακεκομένη καμπύλη), 0.2 M (κυανή στικτή καμπύλη) και 0.3 M Na₂SO₄ (κυανή διακεκομένη-στικτή καμπύλη).

3.2.4. Θερμική μετουσίωση παρουσία $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Προχωρώντας τώρα στα áλατα που δεν ευνοούν την κρυστάλλωση της λυσοζύμης, πραγματοποιήθηκε η θερμική μετουσίωση 7 mg/ml λυσοζύμης σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος NaOA_c σε pH 4.5, παρουσία 0.3, 0.6, 0.7 και 0.8 M áλατος $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Όλες οι θερμικές μετουσιώσεις πραγματοποιήθηκαν με ρυθμό θέρμανσης 90 Deg/hr. Η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ήταν ιδιαίτερα υψηλή: κυμάνθηκε στο 80-90% για όλες τις συγκεντρώσεις του áλατος. Στα Σχήματα 3.18-3.21 φαίνονται οι καμπύλες DSC του πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσία 0.3, 0.6, 0.7 και 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ και οι αντίστοιχες σιγμοειδείς καμπύλες που δημιουργήθηκαν όπως παραπάνω. Στο Σχήμα 3.22 φαίνονται οι θερμοχωρητικότητες μετάβασης και οι προσαρμογές στο προαναφερθέν μοντέλο πρωτεϊνικής μετουσίωσης μιας δομικής περιοχής. Οι τιμές των προσδιοριζόμενων παραμέτρων καθώς η τιμή του ΔC_p αναγράφονται στον Πίνακα 3.3.

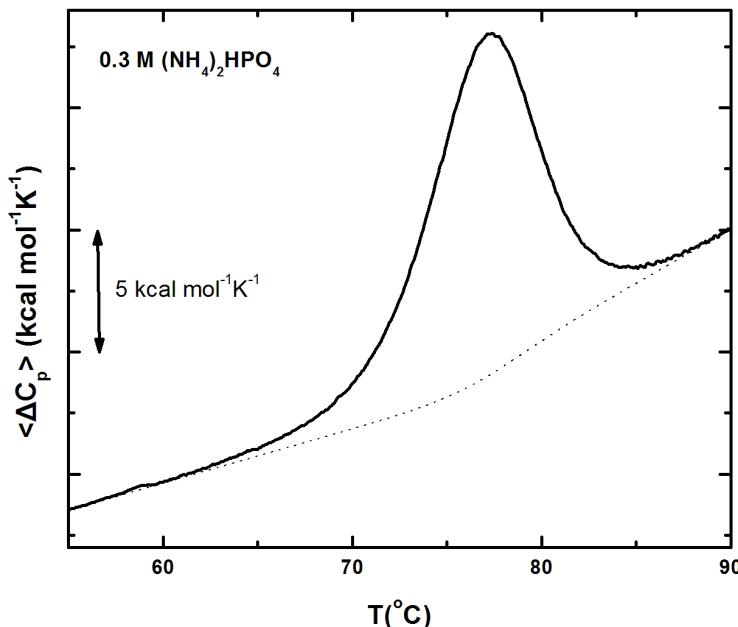
Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα DSC της λυσοζύμης παρουσία $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

| Άλας | c_{salt} (M) | T_m (°C) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | ΔH_v (kcal mol ⁻¹) | $\Delta H/\Delta H_v$ | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|-------------------------------|--------------------------|---------------|---|---|-----------------------|---|
| - | - | 76.21 | 106 | 127 | 0.8 | 1.78 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 0.3 | 76.96 | 107 | 126 | 0.9 | 1.04 |
| | 0.6 | 77.82 | 104 | 129 | 0.8 | 1.18 |
| | 0.7 | 78.39 | 104 | 127 | 0.8 | 1.51 |
| | 0.8 | 78.84 | 103 | 129 | 0.8 | 1.73 |

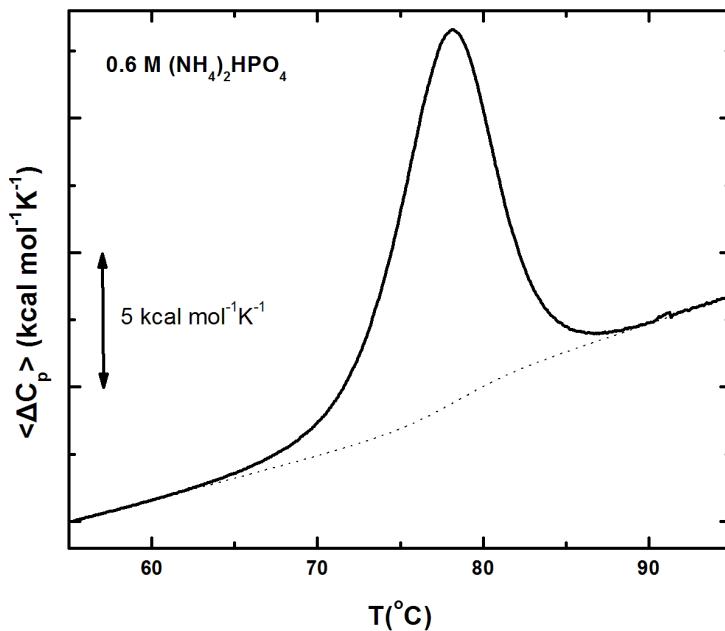
c: η συγκέντρωση του áλατος, T_m : η θερμοκρασία τήξης, ΔH: η ενθαλπία μετουσίωσης, ΔH_v: η ενθαλπία van't Hoff, ΔC_p η ενδογενής θερμοχωρητικότητα

Η τιμή του λόγου $\Delta H/\Delta H_v$ κυμαίνεται από 0.8 έως 0.9 έτσι ώστε να μπορούμε να θεωρήσουμε με καλή προσέγγιση ότι η θερμική μετάβαση είναι δύο-καταστάσεων. Χρησιμοποιώντας τις τιμές του Πίνακα 3.3 σχεδιάστηκαν στο Σχήμα 3.23 οι καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Η αύξηση της θερμοσταθερότητας (T_m) της λυσοζύμης που φτάνει τους 2.63 °C αποτελεί το πρώτο χαρακτηριστικό των μεταβολών που επιφέρει η παρουσία $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Η ενθαλπία μετουσίωσης παραμένει σχεδόν αμετάβλητη, ενώ τέλος η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p εμφανίζεται και πάλι ως ο

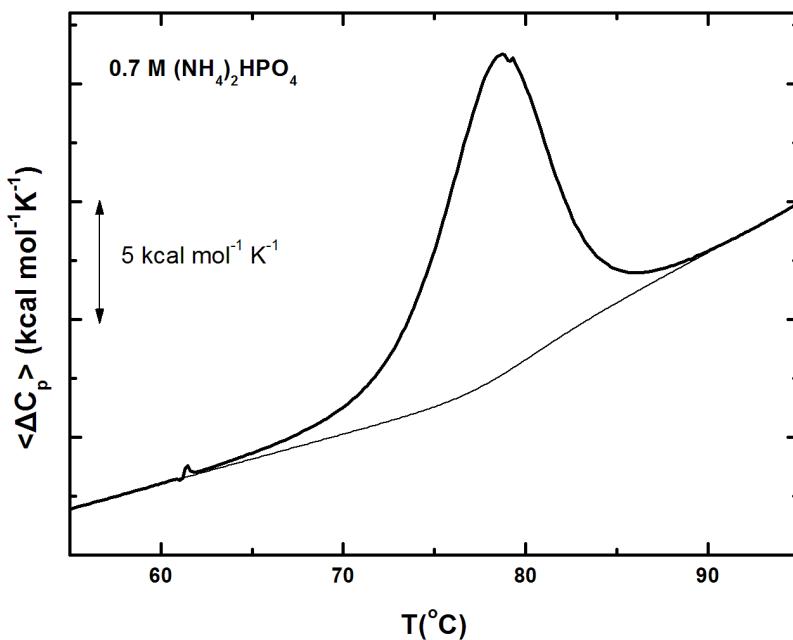
κυρίαρχος παράγοντας επίδρασης του άλατος στις καμπύλες σταθερότητας. Παρατηρείται αύξηση του ΔG , η οποία όμως ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος. Στην υψηλότερη συγκέντρωση άλατος παρατηρείται ελαφρά μείωση του ΔG σε σχέση με την καμπύλη απουσία άλατος.



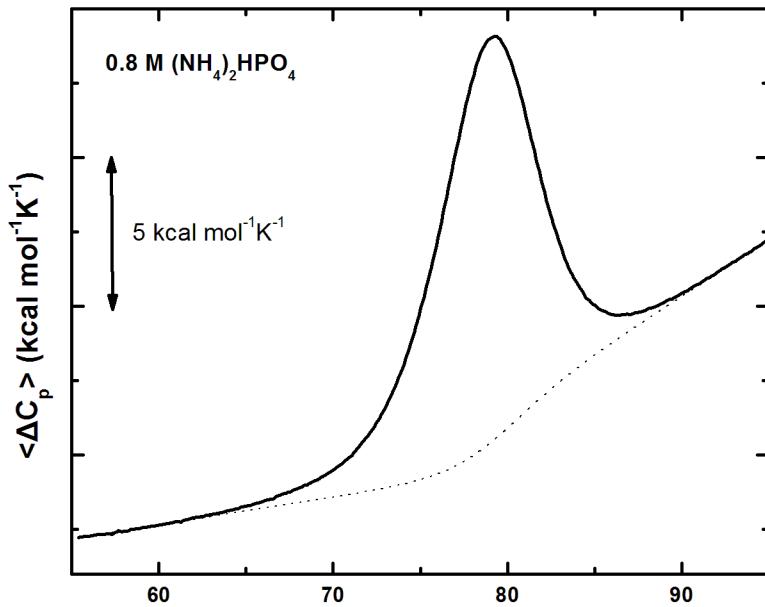
Σχήμα 3.16: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.3 M (NH₄)₂PO₄ (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η στιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



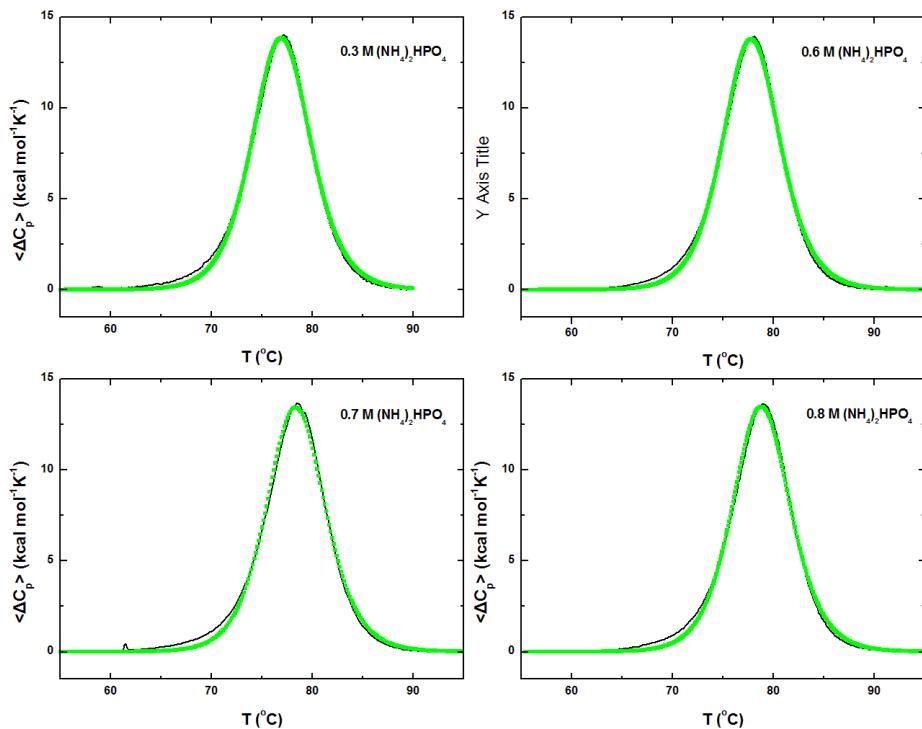
Σχήμα 3.17: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



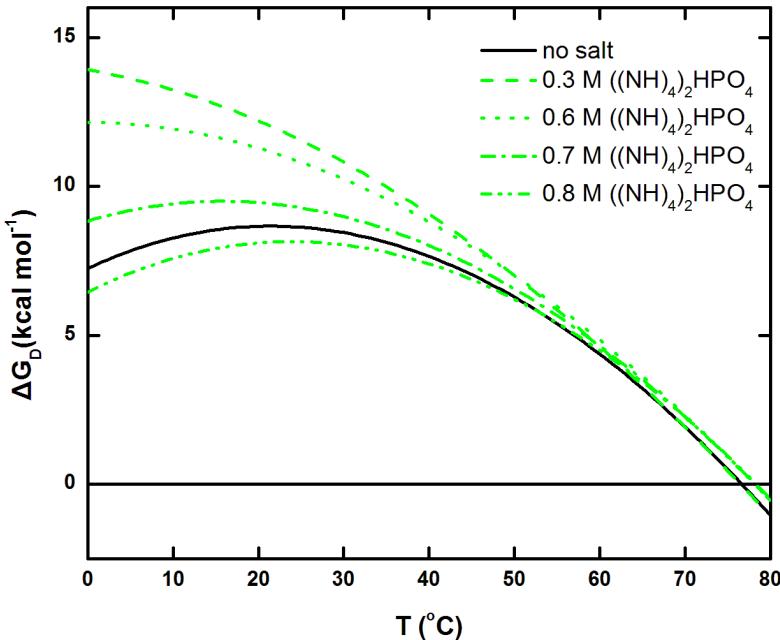
Σχήμα 3.18: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



Σχήμα 3.19: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



Σχήμα 3.20: Προσαρμογές (πράσινες καμπύλες) της θερμοχωρητικότητας μετάβασης 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.3, 0.6, 0.7 και 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (μαύρες καμπύλες) στην Εξ. (2.17).



Σχήμα 3.21: Καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης απουσία άλατος (συνεχής μαύρη καμπύλη), παρουσία 0.3 M (πράσινη διακεκομμένη καμπύλη), 0.6 M (πράσινη στικτή καμπύλη), 0.7 M (πράσινη διακεκομμένη-στικτή καμπύλη) και 0.8 M (πράσινη διακεκομμένη-στικτή-στικτή καμπύλη) $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$.

3.2.5. Θερμική μετουσίωση παρουσία Li_2SO_4

Με ρυθμό θέρμανσης 90 Deg/hr μετουσιώθηκαν θερμικά 7 mg/ml λυσοζύμης σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος NaOAc σε pH 4.5, παρουσία 0.1, 0.3, 0.5, 0.6 και 1.2 M άλατος Li_2SO_4 . Για τις συγκεντρώσεις 0.1 και 0.3 M η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ήταν ιδιαίτερα υψηλή: κυμάνθηκε στο 85-95%, για την συγκέντρωση 0.5 M στο 74%, οριακή για την εφαρμογή της θερμοδυναμικής, μόλις στο 41% στα 0.6 M Li_2SO_4 και απολύτως μη αντιστρεπτή στα 1.2 M. Στα Σχήματα 3.24 και 3.25 φαίνονται οι καμπύλες DSC του πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσία 0.1 και 0.3 M Li_2SO_4 και οι αντίστοιχες σιγμοειδείς καμπύλες, ενώ στο Σχήμα 3.29 οι θερμοχωρητικότητες μετάβασης και οι προσαρμογές στο μοντέλο πρωτεϊνικής μετουσίωσης μιας δομικής περιοχής μη συμπεριλαμβανομένης της ενδογενούς θερμοχωρητικότητας. Οι τιμές των προσδιοριζόμενων παραμέτρων καθώς η τιμή του ΔC_p αναγράφονται στον Πίνακα 3.4. Στο Σχήμα 3.26 φαίνεται η καμπύλη DSC του πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσία 0.5 M Li_2SO_4 και η αντίστοιχη ενδογενής

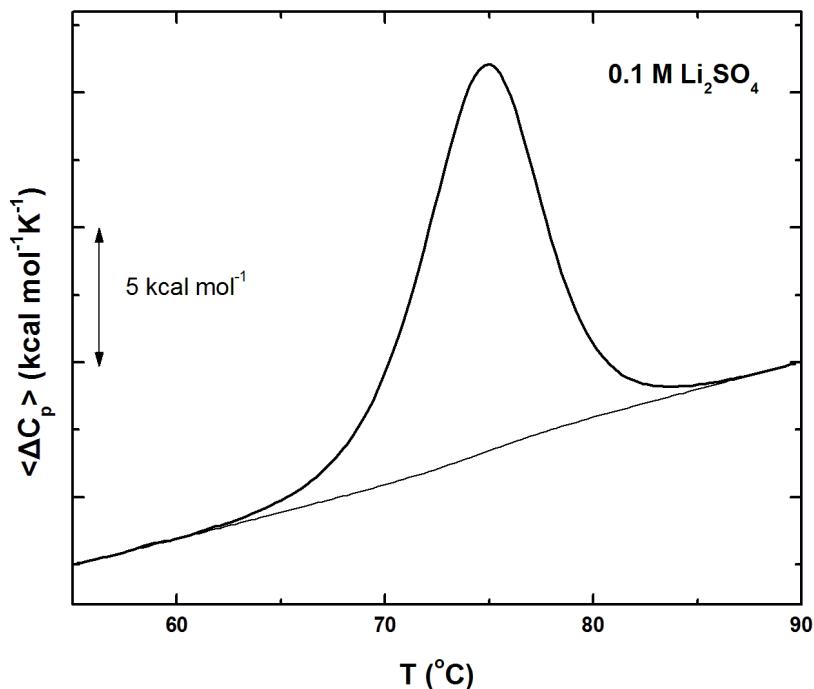
θερμοχωρητικότητα. Η αρνητική τιμή του ΔC_p που διαπιστώθηκε στη συγκέντρωση 0.5 M Li₂SO₄ πιθανότατα οφείλεται σε φαινόμενα συσσωμάτωσης τα οποία ελαττώνουν την ούτως ή άλλως όπως φαίνεται χαμηλή τιμή του ΔC_p . Ως εκ τούτου η πειραματική καμπύλη στις συνθήκες αυτές δεν αναλύθηκε περαιτέρω. Η προοδευτική ελάττωση του ΔC_p με την αύξηση της συγκέντρωσης του Li₂SO₄ στις τιμές 0.6 και 1.2 επιβεβαιώνει την υπόθεση. Στα Σχήματα 3.27 και 3.28 φαίνονται οι καμπύλες DSC του πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσία 0.6 και 1.2 M Li₂SO₄.

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα DSC της λυσοζύμης παρουσία Li₂SO₄

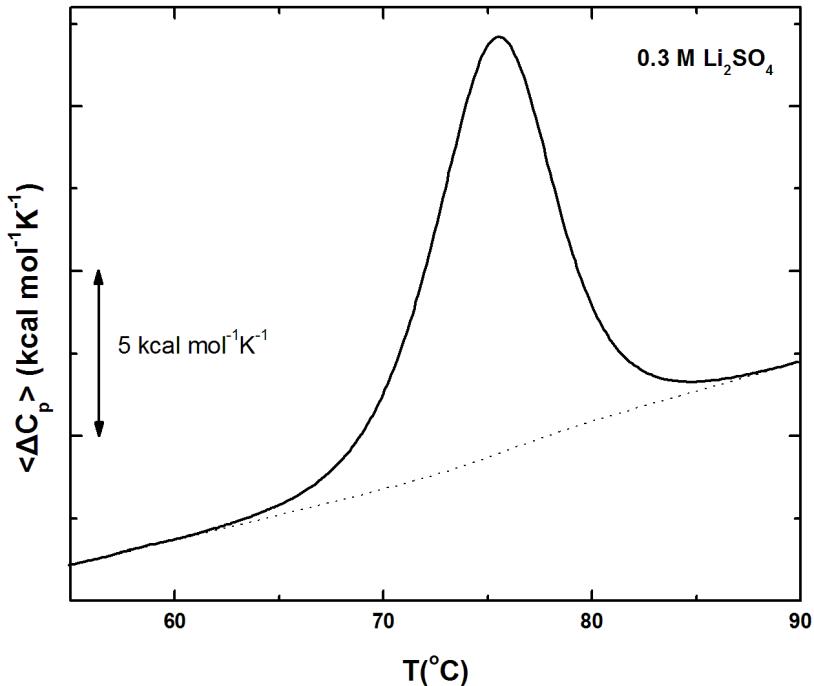
| Άλας | c _{salt} (M) | T _m (°C) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | ΔH _v (kcal mol ⁻¹) | ΔH/ΔH _v | ΔC _p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|---|--------------------|---|
| - | - | 76.21 | 106 | 127 | 0.8 | 1.78 |
| Li ₂ SO ₄ | 0.1 | 74.70 | 106 | 129 | 0.8 | 0.58 |
| | 0.3 | 75.32 | 96 | 127 | 0.8 | 0.50 |

c: η συγκέντρωση του άλατος, T_m: η θερμοκρασία τήξης, ΔH: η ενθαλπία μετουσίωσης, ΔH_v: η ενθαλπία van't Hoff, ΔC_p η ενδογενής θερμοχωρητικότητα

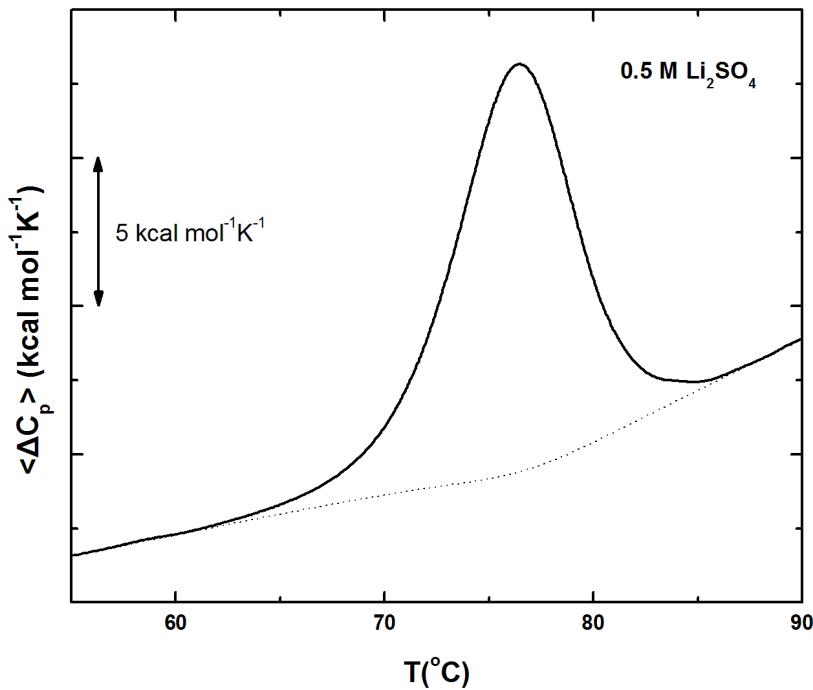
Χρησιμοποιώντας τις τιμές του Πίνακα 3.4 και θεωρώντας με καλή προσέγγιση ότι η θερμική μετάβαση είναι δύο-καταστάσεων σχεδιάστηκαν στο Σχήμα 3.30 οι καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Li₂SO₄. Η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p εμφανίζεται και πάλι ως ο κυρίαρχος παράγοντας επίδρασης του άλατος στις καμπύλες σταθερότητας. Χωρίς υψηλό βαθμό στατιστικής αξιοπιστίας θα μπορούσε κανείς να εντάξει τη διαφαινόμενη τάση μεταβολής του ΔG σε ένα πλαίσιο που θυμίζει το αντίστοιχο της περίπτωσης του (NH₄)₂HPO₄.



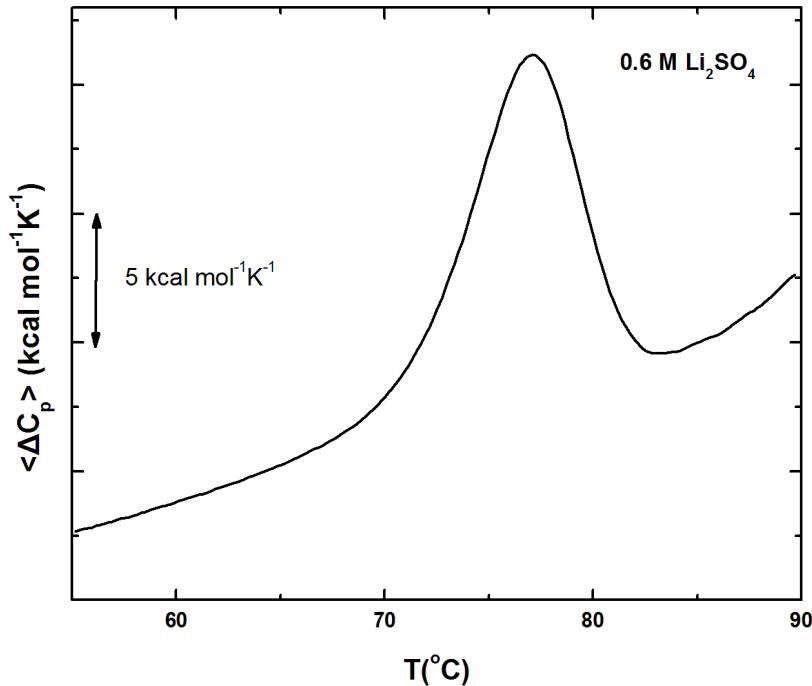
Σχήμα 3.22: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.1 M Li_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



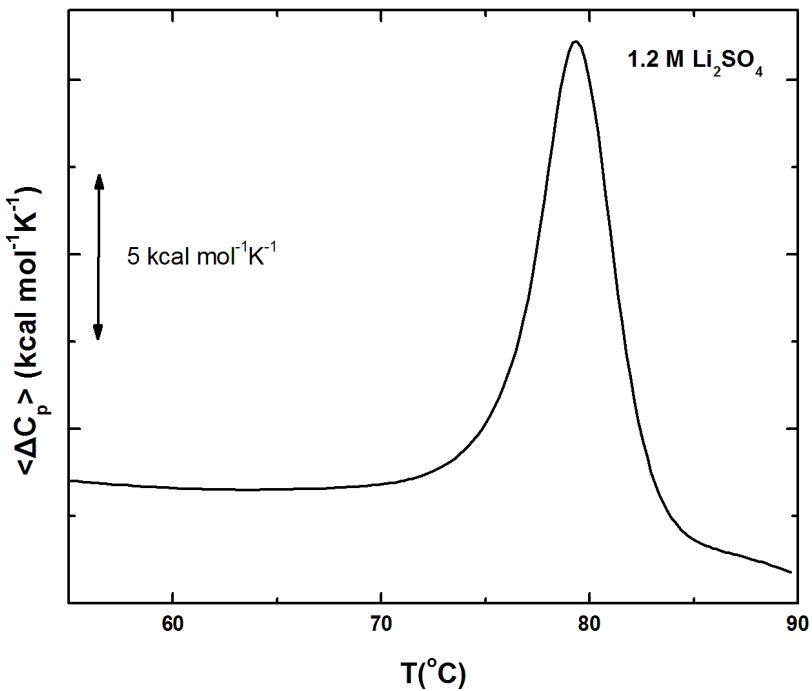
Σχήμα 3.23: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.3 M Li_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η ενδογενής θερμοχωρητικότητα αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη σιγμοειδή καμπύλη.



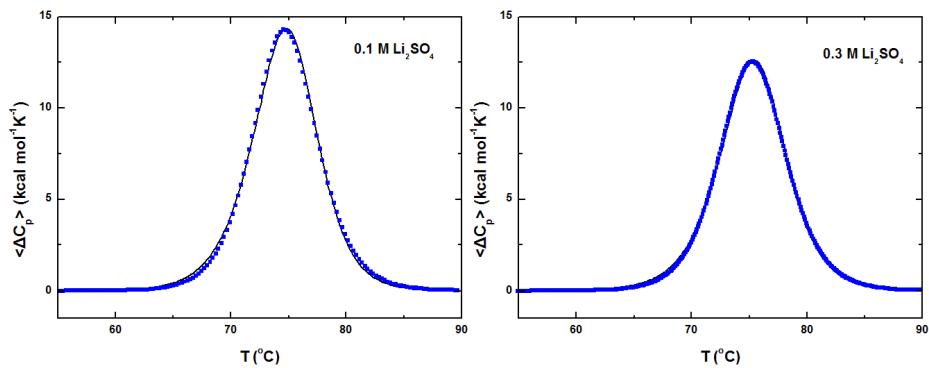
Σχήμα 3.24: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.5 M Li_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη). Η σιγμοειδής καμπύλη αναπαρίσταται με τη διακεκομμένη γραμμή.



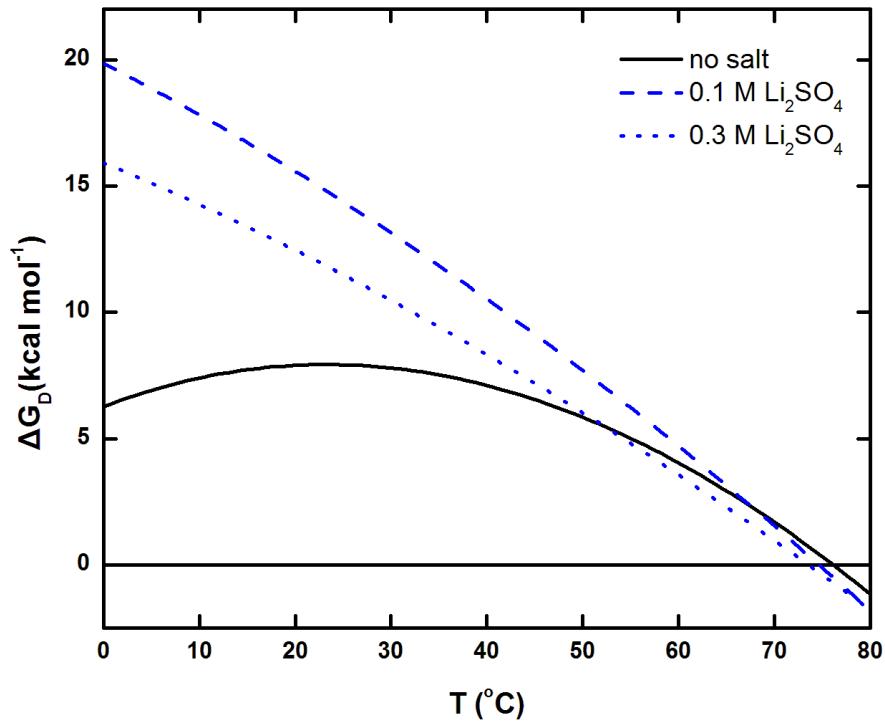
Σχήμα 3.25: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.6 M Li_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη).



Σχήμα 3.26: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 1.2 M Li_2SO_4 (μαύρη συνεχής καμπύλη).



Σχήμα 3.27: Προσαρμογές (μπλε καμπύλες) της θερμοχωρητικότητας μετάβασης 7 mg/ml HEWL σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία 0.1 και 0.3 M Li_2SO_4 στην Εξ. (2.17).



Σχήμα 3.28: Καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης απουσία άλατος (συνεχής μαύρη καμπύλη), παρουσία 0.1 M (μπλε διακεκομμένη καμπύλη) και 0.3 M (μπλε στικτή καμπύλη) Li_2SO_4 .

3.3. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η θερμοδυναμική ανάλυση των θερμικών μετουσιώσεων της λυσοζύμης έδειξε ότι η παρουσία μη-αποδιατακτικών αλάτων στο πρωτεϊνικό διάλυμα είναι δυνατόν να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στο θερμοδυναμικό προφίλ της. Το είδος του άλατος και η συγκέντρωσή του στο πρωτεϊνικό διάλυμα φαίνεται κυρίως να επηρεάζει τη μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p της λυσοζύμης. Δεδομένων των πολύ μικρότερων μεταβολών που παρατηρήθηκαν στις άλλες θερμοδυναμικές παραμέτρους, T_m και ΔH , το ΔC_p προσδιορίζει ως επί το πλείστον τις αλλαγές στις καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας ΔG vs T . Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των δύο αλάτων, τα οποία κρυσταλλώνουν τη λυσοζύμη – χλωριούχο νάτριο NaCl και θειϊκό νάτριο Na_2SO_4 – καταγράφεται αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση του όξινου φωσφορικού

αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, διαφαίνεται μια τάση ελάττωσης του ΔG με την αύξηση της συγκέντρωσης, ενώ η περίπτωση του θεικού λιθίου Li_2SO_4 είναι λιγότερο διαφωτιστική λόγω της αδυναμίας πειραματικής πρόσβασης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.3 M, όμως ομοιάζει με την περίπτωση του $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Η ενθαλπία μετουσίωσης στη θερμοκρασία T_m , σε όλες τις περιπτώσεις των θερμικών μετουσιώσεων της λυσοζύμης στις συνθήκες που διερευνήθηκαν, παρουσίασε μικρές μόνο μεταβολές. Για την χωροδιατακτική μετάβαση $N \rightleftharpoons U$ μιας πρωτεΐνης, θετικές μεταβολές της ενθαλπίας $\Delta H > 0$ και αρνητικές μεταβολές της εντροπίας $\Delta S < 0$ σταθεροποιούν την ιθαγενή κατάσταση ως προς την μετουσιωμένη $\Delta G > 0$ ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Η υδατωμένη, ξεδιπλωμένη κατάσταση μιας πρωτεΐνης είναι ενθαλπικά μη ευνοϊκή για τη σταθερότητά της σε σχέση με την μερικώς αφυδατωμένη, διπλωμένη κατάστασή της, $\Delta H^{hyd} < 0$. Η συνεισφορά των πολικών ομάδων στην τάση αυτή είναι σημαντικά μεγαλύτερη από των μη πολικών ομάδων, δηλαδή, $\Delta H^{hyd} = \Delta H_{pl}^{hyd} + \Delta H_{npl}^{hyd}$ με $|\Delta H_{pl}^{hyd}| > |\Delta H_{npl}^{hyd}|$. Την αποσταθεροποιητική αυτή τάση αντισταθμίζουν και με το παραπάνω οι van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μη πολικών ομάδων στο εσωτερικό της διπλωμένης πρωτεΐνης, $\Delta H_{npl}^{inter} > 0$. Συνολικά λοιπόν $\Delta H = \Delta H^{hyd} + \Delta H^{inter} > 0$ με $\Delta H^{inter} > |\Delta H^{hyd}|$. Το πλεόνασμα είναι μικρότερο, αν μεταξύ των πολικών ομάδων στον πυρήνα της πρωτεΐνης σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου $\Delta H_{pl}^{inter} < 0$ οπότε ελαττώνεται η συνολικά θετική συνεισφορά των αλληλεπιδράσεων στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, δηλαδή, $\Delta H^{inter} = \Delta H_{pl}^{inter} + \Delta H_{npl}^{inter}$, με $\Delta H_{npl}^{inter} > |\Delta H_{pl}^{inter}|$. Το ενθαλπικό ισοζύγιο που συνολικά προκύπτει δίνει το χαρακτηριστικό ενδόθερμο DSC θερμόγραμμα (Makhatadze, 2008), (Loladze et al., 2002).

Το γεγονός επίσης ότι η θερμοκρασία T_m δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές σημαίνει ότι η εντροπία μετουσίωσης στη θερμοκρασία T_m , επίσης δε μεταβάλλεται σημαντικά. Υπενθυμίζεται ότι $\Delta S(T_m) = \frac{\Delta H(T_m)}{T_m}$. Η υδατωμένη, ξεδιπλωμένη κατάσταση μιας πρωτεΐνης είναι εντροπικά ευνοϊκή σε σχέση με την μερικώς αφυδατωμένη, διπλωμένη κατάστασή της. Παρά το γεγονός ότι ο μηχανισμός σε μοριακό επίπεδο δεν έχει γίνει

πλήρως κατανοητός προς το παρόν, υπάρχει ελάττωση της εντροπίας στη μετουσιωμένη κατάσταση της πρωτεΐνης η οποία οφείλεται στην οργάνωση των μορίων του νερού γύρω και από τις πολικές και τις μη πολικές ομάδες $\Delta S^{hyd} < 0$. Η υδάτωση των μη πολικών ομάδων λέγεται συχνά και υδροφοβικό φαινόμενο. Την τάση όμως αυτή αντισταθμίζει και με το παραπάνω η αποσταθεροποιητική αύξηση της χωροδιατακτικής εντροπίας $\Delta S^{conf} > 0$, μιας και στην ξεδιπλωμένη χωροδιάταξη της πρωτεΐνης αυξάνεται ο αριθμός των προσβάσιμων καταστάσεων (Makhatadze, 2008). Συνολικά λοιπόν $\Delta S = \Delta S^{hyd} + \Delta S^{conf} > 0$ με $\Delta S^{conf} > |\Delta S^{hyd}|$.

Από την άλλη, η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p μεταξύ της μετουσιωμένης και της ιθαγενούς κατάστασης (υποθέτοντας ότι είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας) είναι η παράμετρος που τροποποιεί σημαντικά τη θερμοκρασιακή εξάρτηση της μεταβολής της ενθαλπίας και της εντροπίας για το πρωτεΐνικό σύστημα της λυσίνης. Στα πρωτεΐνικά συστήματα γενικά η μεταβολή αυτή δεν έχει γίνει προς το παρόν πλήρως κατανοητή. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι μη-πολικές πρωτεΐνικές ομάδες που κατά τη μετουσίωση εκτίθενται στο διαλύτη είναι υπεύθυνες για τη μεγαλύτερη θερμοχωρητικότητα της μετουσιωμένης κατάστασης σε σχέση με τη θερμοχωρητικότητα της ιθαγενούς κατάστασης. Η συνεισφορά των πολικών πρωτεΐνικών ομάδων που κατά τη μετουσίωση εκτίθενται στο διαλύτη είναι αμφιλεγόμενη και ως προς το πρόσημο και ως προς το μέγεθος. Σύμφωνα με την περισσότερο διαδεδομένη άποψη η συνεισφορά των πολικών ομάδων είναι μεν μικρότερη από των μη-πολικών, ελαττώνουν όμως τη διαφορά της θερμοχωρητικότητας των δύο καταστάσεων. Σύμφωνα με μια άλλη άποψη τόσο οι μη-πολικές όσο και οι πολικές ομάδες συνεισφέρουν θετικά στο ΔC_p και η καλύτερη συσχέτιση γίνεται λαμβάνοντας τον ολικό αριθμό των αμινοξικών καταλοίπων στην πρωτεΐνη, ανεξάρτητα από την πολικότητά τους (Cooper, 2010). Φαίνεται όμως ότι υπάρχει και μια μη ευκαταφρόνητη συνεισφορά προερχόμενη από τις δυναμικές ιδιότητες της ιθαγενούς κατάστασης (Sturtevant, 1977), (Sochava & Smirnova, 1993), (Makhatadze, 2008). Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει κανείς να συμπεριλάβει στον υπολογισμό του ΔC_p και τις μεταβολές των ταλαντωτικών βαθμών ελευθερίας της πρωτεΐνης. Η ποσοτική συσχέτιση της δυναμικής της ιθαγενούς κατάστασης και του ΔC_p αναμένει την πειραματική της επιβεβαίωση (Makhatadze, 2008).

Οι μεταβολές που προκαλεί η παρουσία διαφορετικών αλάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε ένα πρωτεϊνικό σύστημα φαίνεται ότι είναι δυνατόν να επηρεάζει όλες τις πιθανές προελεύσεις του ΔC_p . Η έκθεση των αμινοξικών καταλοίπων, που στην ιθαγενή κατάσταση της πρωτεΐνης βρίσκονται στο εσωτερικό της, σε ένα «νέο» κάθε φορά διαλύτη, εμπλουτισμένο με διαφορετικά ιόντα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, φαίνεται να τροποποιεί σημαντικά τη θερμοχωρητικότητα του διαλύτη.

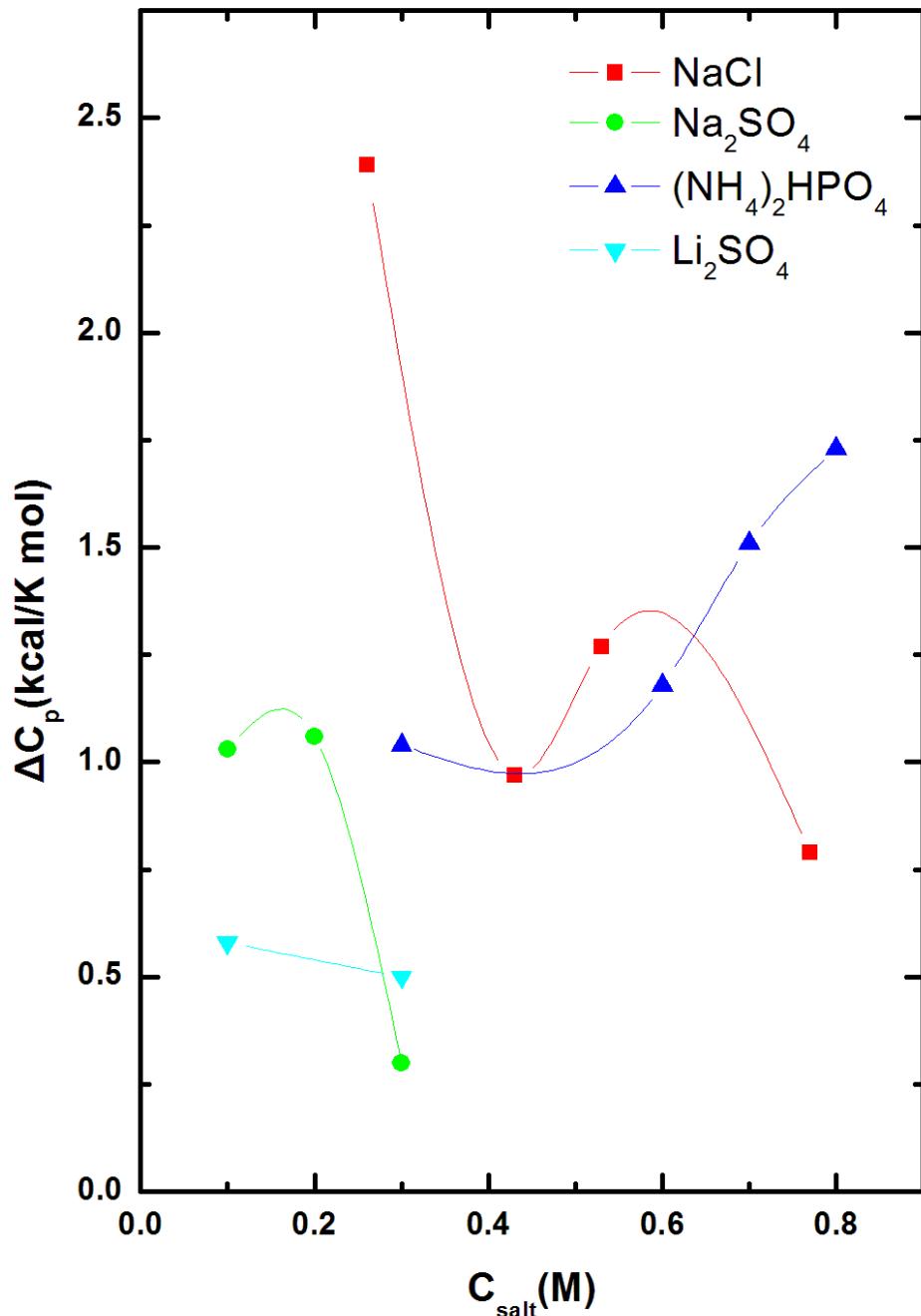
Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει μεταβολές στη θερμοχωρητικότητα του νερού παρουσία πολικών και μη πολικών διαλυμένων ουσιών. Οι πολικοί διαλύτες αυξάνουν τον πληθυσμό των μορίων του νερού που σχηματίζουν κεκλιμένους δεσμούς υδρογόνου σε σχέση με τον πληθυσμό των μορίων του νερού που σχηματίζουν σχεδόν ευθύγραμμους δεσμούς υδρογόνου, ενώ για τις μη-πολικές διαλυμένες ουσίες ή ομάδες δεν συμβαίνει το ίδιο. Οι σχεδόν ευθυγραμμισμένοι δεσμοί υδρογόνου με μεγαλύτερη ενέργεια αλληλεπίδρασης αυξάνουν συνολικά τη θερμοχωρητικότητα του συστήματος. Οι πολικές διαλυμένες ουσίες με τους δεσμούς υδρογόνου να έχουν μικρότερη ενέργεια αλληλεπίδρασης ελαττώνουν συνολικά τη θερμοχωρητικότητα του συστήματος (Sharp & Vanderkooi, 2010). Η χρήση του μοντέλου αυτού των δύο-καταστάσεων των δεσμών υδρογόνου στο νερό επεκτάθηκε στη σειρά Hofmeister με τα ανιόντα τα οποία ευνοούν τη γραμμική διευθέτηση των δεσμών υδρογόνου ακολουθούν ακριβώς την κατάταξη Hofmeister: $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^-$. Για τα κατιόντα, η σειρά που βρέθηκε ήταν $\text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ \geq \text{K}^+$, με το «κοσμοτροπικό» Mg^{2+} να ευνοεί τη γραμμική διευθέτηση των δεσμών υδρογόνου και το «χαοτροπικό» K^+ τη γωνιακή διευθέτηση των δεσμών υδρογόνου (Sharp & Vanderkooi, 2010).

Στο Σχήμα 3.31 φαίνεται η μεταβολή του ΔC_p της λυσοζύμης συναρτήσει της συγκεντρωσης των τεσσάρων αλάτων. Η συσχέτιση των μεταβολών αυτών με τη σειρά Hofmeister δεν είναι εύκολη υπόθεση καθώς οι θέσεις των ιόντων στην κατάταξη προδιαθέτουν κυρίως για τα άλατα $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ και Na_2SO_4 μια ενδιάμεση χαρακτήρα συμπεριφορά (το NH_4^+ είναι ελαφρώς πιο χαοτροπικό από το K^+ (Curtis & Lue, 2006),

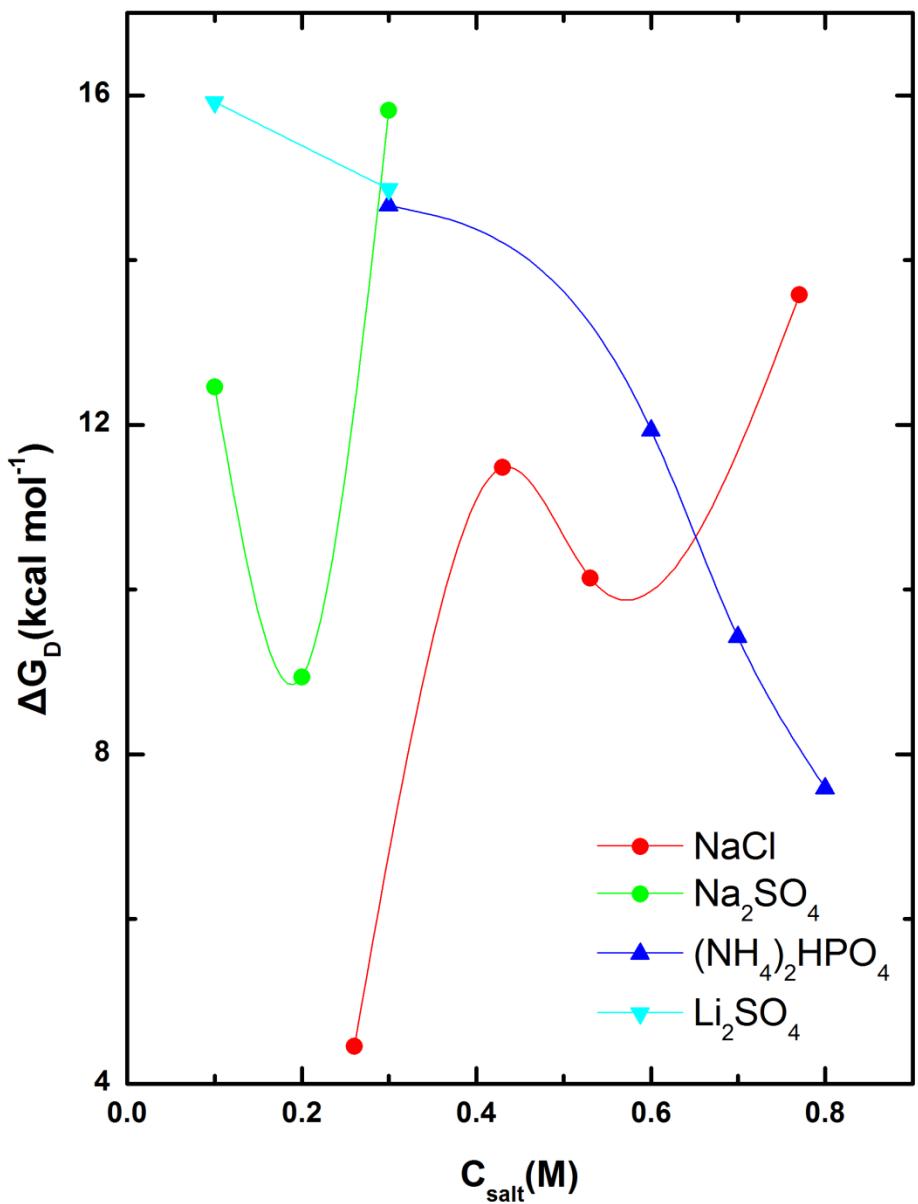
(Baldwin, 1996), (Collins, 2004)). Το ενδιαφέρον όμως χαρακτηριστικό είναι ότι καταγράφεται παρόμοια τάση μεταβολής του ΔC_p για τα δύο αλάτια που γνωρίζουμε ότι κρυσταλλώνουν τη λυσοζύμη, το NaCl και το Na₂SO₄, η παρουσία των οποίων στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαττώνει το ΔC_p . Από την άλλη, το (NH₄)₂HPO₄ που ως γνωστόν δεν κρυσταλλώνει τη λυσοζύμη, αυξάνει το ΔC_p . Το αυξημένο ΔC_p που προκαλεί το NaCl στα 0.26 M φαίνεται περίεργο, η περίπτωση όμως του NaCl αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση για τη λυσοζύμη. Στο pH 4.5 που πραγματοποιήθηκαν όλες οι θερμικές μετουσιώσεις της λυσοζύμης, το πρωτεϊνικό μόριο φέρει θετικό φορτίο 11.4e στην επιφάνειά του, ανομοιόμορφα κατανεμημένο (Poon et al., 2000). Σε κάποιες από τις θέσεις αυτές έχει επιβεβαιωθεί ότι δεσμεύονται ανιόντα Cl⁻ με αποτέλεσμα να υπάρχει μια επιπλέον πηγή προέλευσης ΔC_p , η οποία αναμένεται να κυριαρχεί στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογεί το υψηλό ΔC_p της λυσοζύμης στη χαμηλότερη συγκέντρωση NaCl σε σχέση με τα ΔC_p των άλλων αλάτων. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NaCl οι θέσεις δέσμευσης πιθανώς είναι ήδη κατειλημμένες και οι όποιες μεταβολές θα αφορούν στις ιδιότητες του διαλύτη.

Περαιτέρω διερεύνηση του θερμοδυναμικού προφίλ των θερμικών μετουσιώσεων είναι εφικτή με την ανάλυση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης σε ενθαλπικές ΔH και εντροπικές συνιστώσες TΔS. Από τις καμπύλες θερμοδυναμικής σταθερότητας υπολογίστηκαν οι ενθαλπικές και εντροπικές συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs της λυσοζύμης στη θερμοκρασία 10 °C (Σχήμα 3.33). Η θερμοκρασία αυτή επιλέχθηκε ως ενδεικτική στην οποία παρατηρούνται πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι σε κατάλληλες φυσικά συνθήκες. Το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που προκύπτει από αυτή την ανάλυση αφορά στην ενίσχυση της ενθαλπικής σταθεροποίησης ($\Delta H > 0$) και εντροπικής αποσταθεροποίησης ($T\Delta S > 0$) της λυσοζύμης παρουσία των αλάτων NaCl και Na₂SO₄ σε όλο και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Από την άλλη η παρουσία του άλατος (NH₄)₂HPO₄ δείχνει ξεκάθαρα μια τάση εντροπικής σταθεροποίησης ($T\Delta S < 0$) και ενθαλπικής αποσταθεροποίησης ($\Delta H < 0$) σε προοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Για το Li₂SO₄ παρατηρείται ήδη εξασθένηση από το 0.1 M στο 0.3 M και δεν αποκλείεται η περαιτέρω εξασθένηση της ενθαλπικής σταθεροποίησης ($\Delta H > 0$) και της εντροπικής αποσταθεροποίησης ($T\Delta S > 0$) με την υποθετική αύξηση της συγκέντρωσης άλατος.

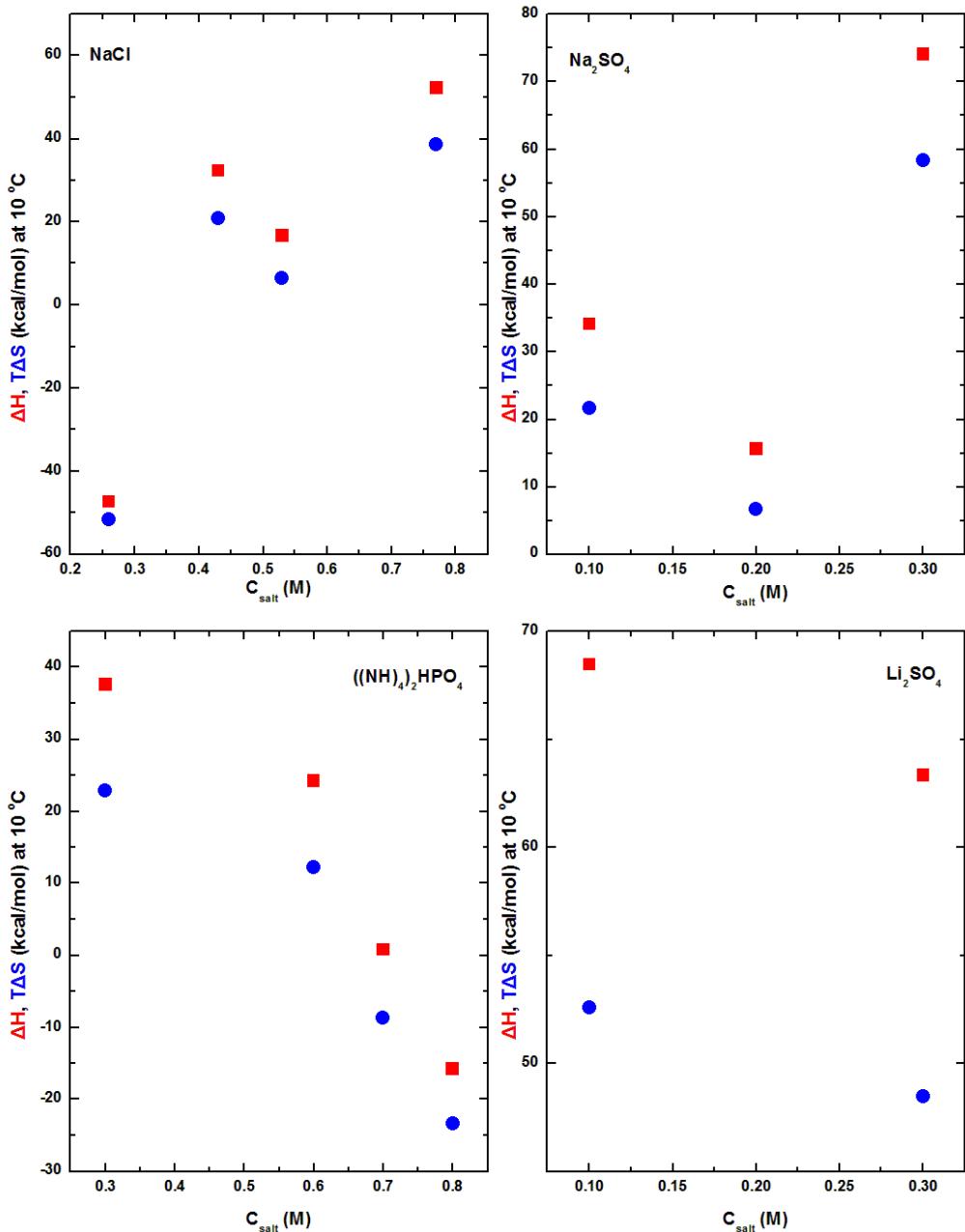
Η ελάττωση του ΔC_p της λυσοζύμης παρουσία των δύο αλάτων που την κρυσταλλώνουν, όταν η συγκέντρωσή τους υπερβεί κάποια κρίσιμη τιμή, αυξάνει την εντροπία μετουσίωσης του συστήματος (βλ. Σχήμα 3.33). Αυτό ενδεχομένως συμβαίνει λόγω ελάττωσης του αρνητικού όρου της εντροπίας μετουσίωσης που σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις των αμινοξικών καταλοίπων που κατά την μετουσίωση εκτίθενται στο διαλύτη με το διαλύτη. Αν η ελάττωση αυτής της συνεισφοράς προέρχεται από την ελάττωση της εντροπίας της ιθαγενούς κατάστασης της λυσοζύμης, η αυξημένη τάξη αυτής της κατάστασης θα αυξάνει το εντροπικό όφελος της κρυστάλλωσης. Η απελευθέρωση μορίων νερού από την πρωτεΐνική επιφάνεια θεωρείται η κύρια θερμοδυναμική καθοδηγητική τάση στην κρυστάλλωση (Vekilov, 2003). Οι μεταβολές του ΔC_p της λυσοζύμης κυριαρχούν στη διαμόρφωση των καμπυλών θερμοδυναμικής σταθερότητας. Η αύξηση των τιμών των ΔG 's στους 10 °C, Σχήμα 3.32, για τα άλατα που ευνοούν την κρυστάλλωση σε αντιδιαστολή με την ελάττωση που επιφέρουν τα άλατα που αδυνατούν να κρυσταλλώσουν τη λυσοζύμη συνάδουν με μια γενική ιδέα αύξησης της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεΐνικών διαλυμάτων οδεύοντας προς συνθήκες κρυστάλλωσης (Price II et al., 2009).



Σχήμα 3.29: Τιμές ενδογενούς θερμοχωρητικότητας λυσοζύμης σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία NaCl (κόκκινα τεράγωνα), Na_2SO_4 (πράσινες κουκίδες), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (μπλε τρίγωνα προ τα πάνω) και Li_2SO_4 (κυανά τρίγωνα προ τα κάτω) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι καμπύλες είναι βοηθητικές για την παρακολούθηση των μεταβολών αυξανομένης της συγκέντρωσης του άλατος.



Σχήμα 3.30: Τιμές θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης στους 10° C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία NaCl (κόκκινα τεράγωνα), Na₂SO₄ (πράσινες κουκίδες), (NH₄)₂HPO₄ (μπλε τρίγωνα προ τα πάνω) και Li₂SO₄ (κυανά τρίγωνα προ τα κάτω) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι καμπύλες είναι βιοθητικές για την παρακολούθηση των μεταβολών αυξανομένης της συγκέντρωσης του άλατος.



Σχήμα 3.31: Ενθαλπικές ΔH (κόκκινα τετράγωνα) και εντροπικές $T\Delta S$ (μπλε κουκίδες) συνεισφορές στη θερμοδυναμική σταθερότητας της λυσοζύμης στους 10°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου σε pH 4.5 παρουσία NaCl , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ και Li_2SO_4 σε διάφορες συγκεντρώσεις.

4. Πειραματικά Αποτελέσματα: Θερμοδυναμική Σταθερότητα της Πρωτεΐνης Χιτινάση-60

4.1. Εισαγωγή

4.1.1. Η αρχιτεκτονική δίπλωσης «(βα)8-βαρέλι» των ενζύμων

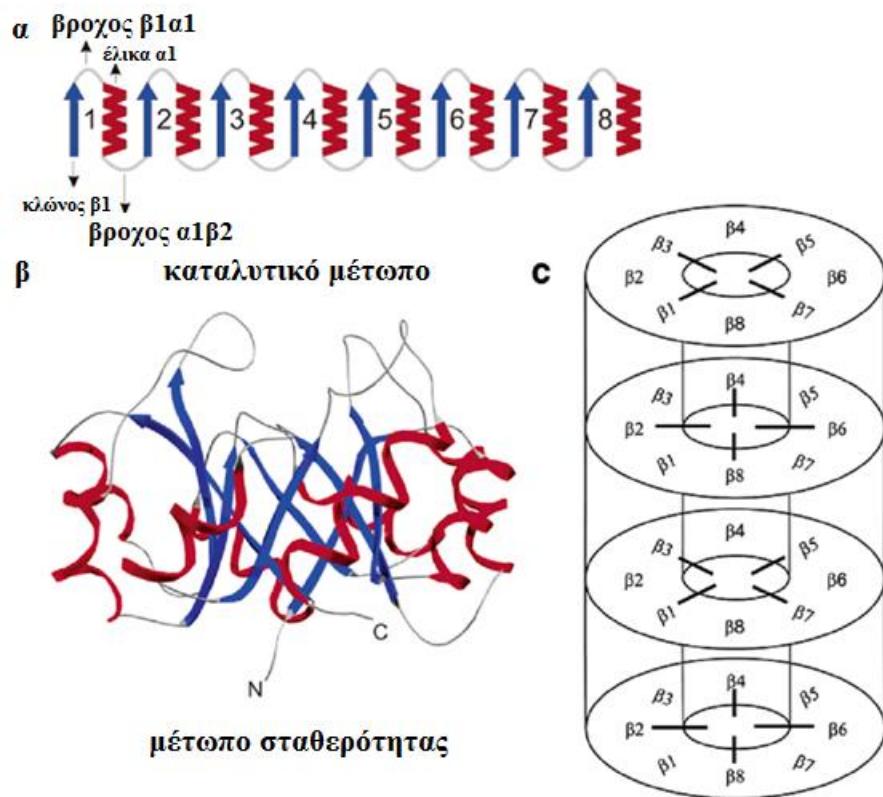
Η φυσική εξέλιξη έχει αναδείξει ένζυμα που καταλύουν όλες σχεδόν τις μεταβολικές αντιδράσεις σε ήπιες συνθήκες με υψηλή εξειδίκευση και γιγαντιαία αύξηση των ρυθμών τους. Σχεδόν έναν αιώνα τώρα αποτελεί μείζονα σκοπό της βιοχημείας η κατανόηση των χημικών αρχών και του μοριακού μηχανισμού που υπαγορεύουν αυτή την αξιοθαύμαστη καταλυτική ισχύ και ποικιλία. Από τις περασμένες δεκαετίες η χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA ρίχνει φως στη σχέση δομής-λειτουργίας των ενζύμων. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνων για κρυσταλλογραφία ακτίνων X ή φασματοσκοπία NMR και τον έλεγχο του καταλυτικού ρόλου μεμονωμένων αμινοξέων μέσω κατευθυνόμενων σημειακών μεταλλάξεων. Η ολοκλήρωση της καταγραφής της ακολουθίας του ανθρώπινου γονιδιώματος και τα εργαλεία της βιοπληροφορικής για την ανάλυσή τους, δίνουν πλέον την ευκαιρία να ανακαλυφθούν νέα ένζυμα και να γίνει περισσότερο κατανοητή η φυσική τους εξέλιξη. Επιπλέον, νέες μέθοδοι κατευθυνόμενης εξέλιξης στα εργαστήρια παρέχουν μια δυναμική τροποποίησης ενζύμων για τη χρήση τους σε βιομηχανικές διαδικασίες (Sterner & Hocker, 2005).

Η πρωτεΐνική μηχανική είναι ο χώρος της σύγχρονης βιοχημείας που αποβλέπει στην κατανόηση των θεμελιωδών αρχών που διέπουν τη σχέση δομής-λειτουργίας των φυσικών πρωτεΐνων, στη διάνοιξη δρόμων πέραν του φυσικού βιολογικού πλαισίου που φτάνει μέχρι και στην οικοδόμηση πρωτεΐνων που δεν υπάρχουν στη φύση. Στο χώρο της πρωτεΐνικης μηχανικής, ο όρος «ικρίωμα» έχει υιοθετηθεί ώστε να χαρακτηρίζει αρχιτεκτονικές δίπλωσης πολυπεπτιδικών αλυσίδων επιδεκτικές τροποποιήσεων με σκοπό την παραγωγή νέων ενζύμων με καινοτόμες λειτουργίες. Μεγάλη ποικιλία πρωτοταγών δομών με διαφορετικές βιοχημικές λειτουργίες σε συνδυασμό με μια συντηρημένη τρισδιάστατη

αρχιτεκτονική δίπλωσης είναι μάλλον ένα αναγκαίο αλλά όχι ικανό κριτήριο για να τεκμηριώσει κανείς ένα ικρίωμα. Δύο επιπλέον κριτήρια φαίνεται να είναι απαραίτητο να πληρούνται: α) ένας καλά ορισμένος υδροφοβικός πυρήνας, δομικά αλληλοεπικαλύψιμος και ικανός να εξασφαλίζει σημαντική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια δίπλωσης, β) ένα εκτεθειμένο στο διαλύτη ενεργό κέντρο χωρικά σαφώς διαχωρισμένο από τον υδροφοβικό πυρήνα που να αναγνωρίζει διαφορετικούς στόχους (Skerra, 2000).

Στην επιλογή της για την αρχιτεκτονική δίπλωσης των $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιών η φύση φαίνεται να εκφράζει την προτίμησή της στο να δημιουργεί βιοκαταλύτες ενώ παράλληλα αναδεικνύει ένα ιδανικό ικρίωμα για την πρωτεϊνική μηχανική. Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων όλα τα γνωστά $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλια είναι ένζυμα. Καλύπτουν πέντε από τις έξι κατηγορίες ενζύμων, με τις υδρολάσες (ειδικά τις γλυκοϋδρολάσες) να έχουν τη μερίδα του λέοντος, με τις μισές σχεδόν από αυτές να είναι $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλια. Πάνω από 60 αντιδράσεις πραγματοποιούνται από $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλια, το 85% των οποίων εμπλέκονται σε διεργασίες μεταβολισμού (Sterner & Hocker, 2005).

Το $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι, το οποίο ανακαλύφθηκε πρώτα στην τριφωσφορική ισομεράση (triosephosphate isomerase) και έτσι είναι επίσης γνωστό ως TIM βαρέλι, είναι η συνηθέστερη αρχιτεκτονική δίπλωσης των ενζύμων. Περισσότερα από 378 διαφορετικά $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλια έχουν καταγραφεί, ενώ περίπου το 10% των πρωτεϊνών με γνωστή τριτοταγή δομή είναι $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλια ή περιλαμβάνουν μια πρωτεϊνική περιοχή τέτοιας δίπλωσης. Το $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι περιέχει περίπου 200 αμινοξέα και αποτελείται από οκτώ επιμέρους μονάδες, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από έναν β -κλώνο και μια α-έλικα, τα οποία συνδέονται με έναν $\beta\alpha$ -βρόχο. Οι επιμέρους μονάδες συνδέονται μεταξύ τους μέσω αβ-βρόχων (Σχήμα 4.1). Οι οκτώ β -κλώνοι σχηματίζουν ένα κυρτό κεντρικό παράλληλο β -φύλλο, το βαρέλι, το οποίο περιβάλλεται από τις α-έλικες (Σχήμα 4.1). Οι β -κλώνοι εμφανίζουν κλίση περίπου 36° ως προς τον κύριο άξονα του βαρελιού. Στο εσωτερικό του βαρελιού, οι πλευρικές αλυσίδες σχηματίζουν από τρία ως τέσσερα στρώματα κάθετα στον κύριο άξονα του βαρελιού. Κάθε στρώμα αποτελείται από τέσσερα κατάλοιπα που ανήκουν ή σε περιττούς- (1, 3, 5, 7) ή σε άρτιους- (2, 4, 6, 8) β -κλώνους (Σχήμα 4.1) (Sterner & Hocker, 2005).



Σχήμα 4.4: Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού. (α) Αναπαράσταση των οκτώ $\beta\alpha$ -μονάδων και των βρόχων που συνδέουν τα στοιχεία της δευτεροταγούς εντός των μονάδων ($\alpha\beta$ -βρόχοι) και μεταξύ των μονάδων ($\beta\alpha$ -βρόχοι). (β) Τρισδιάστατη δομή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ταινιωτή αναπαράσταση, με το αποτελούμενο οκτώ κλώνους β -φύλλο να περιβάλλεται από τις οκτώ α -έλικες. Το ενεργό κέντρο σχηματίζεται από κατάλοιπα στο C-άκρο των β -κλώνων και των $\beta\alpha$ -βρόχων («καταλυτικό μέτωπο»). Το υπόλοιπο της δομής, που περιλαμβάνει το μέτωπο από την άλλη πλευρά του βαρελιού με τους $\alpha\beta$ -βρόχους, είναι σημαντικό για τη σταθερότητα. Τα N- και C-άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι σημειωμένα. (γ) Παρουσίαση των τεσσάρων στρωμάτων του βαρελιού από το καταλυτικό μέτωπο (πάνω) προς το μέτωπο σταθερότητας (κάτω).

Σε όλα τα γνωστά ένζυμα που διπλώνονται με την αρχιτεκτονική του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού, τα καταλυτικώς δραστικά κατάλοιπα βρίσκονται στο καρβοξυλικό άκρο των β κλώνων και στους $\beta\alpha$ -βρόχους («καταλυτικό μέτωπο»), ενώ τα κατάλοιπα που σταθεροποιούν την τρισδιάστατη δομή βρίσκονται στον πυρήνα και στο άλλο άκρο του βαρελιού, το οποίο

περιλαμβάνει τους αβ-βρόχους («μέτωπο σταθερότητας», Σχήμα 4.1). Αυτή η διευθέτηση επιτρέπει τη μεταβολή του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου χωρίς να υπονομεύεται η σταθερότητά του (Sterner & Hocker, 2005). Τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στη δεσμευση του υποστρώματος βρίσκονται ως επί το πλείστον στο εσωτερικό αυτού καθεαυτού του βαρελιού και αυτών που εμπλέκονται στην κατάλυση όπως αναφέρθηκε ως επί το πλείστον στις περιοχές των βρόχων. Αυτός ο μερικός επιμερισμός εξειδίκευσης και κατάλυσης μεταξύ διακριτών δομικών περιοχών αποτελεί έναν κατάλληλο μηχανισμό ημι-αυτόνομης εξέλιξης που μπορεί να δημιουργήσει μεγάλη ποικιλία εξειδίκευσης – κατάλυσης με ένα συνδυαστικό τρόπο. Το δομικό αυτό χαρακτηριστικό αυξάνει την πιθανότητα *in vitro* εξέλιξη να μιμηθεί την *in vivo* εισάγοντας νέα καταλυτική ιδιότητα σε μια ήδη υπάρχουσα περιοχή πρόσδεσης ή μια νέα περιοχή πρόσδεσης σε μια ήδη υπάρχουσα καταλυτική περιοχή (Altamirano et al., 2000).

Η αρχιτεκτονική της δίπλωσης του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού δεν φαίνεται να υπαγορεύεται από λεπτομέρειες της πρωτοταγούς δομής αλλά μάλλον από γενικά χαρακτηριστικά, όπως η συνολική κατανομή των πολικών και μη πολικών ή φορτισμένων καταλοίπων. Αυτή η διαπίστωση αντανακλάται στη συνολικά χαμηλή διατήρηση της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ των $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιών, κάτι που μπορεί να κάνει δύσκολη την ανίχνευση κάποιας εξελικτικής συσχέτισης. Παρόλα αυτά, η αντιπαραβολή των αμινοξικών ακολουθιών αποκαλύπτει συμπλέγματα παρόμοιων καταλοίπων σε τοπολογικά ισοδύναμες θέσεις κάτι που θα μπορούσε να καθοδηγήσει και ενδεχομένως να παγιώσει ένα κοινό καλούπι για την παραγωγή $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιών. Πέραν των κοινών χαρακτηριστικών τους οι δομές των $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιών ποικίλουν γεωμετρικά. Η απουσία δεσμών υδρογόνου μεταξύ γειτονικών β-κλώνων μπορεί για παράδειγμα να οδηγήσει σε αλλοιώσεις της δομής του βαρελιού. Αποκλίσεις από την κανονική τοπολογία του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού είναι επίσης γνωστές, όπως για παράδειγμα η παρουσία επτά β-κλώνων, η τοπολογία $\beta\beta\alpha(\beta\alpha)_6$ και παρεμβολές στοιχείων δευτεροταγούς δομής σε βα-βρόχους (Sterner & Hocker, 2005).

Το πιο συνηθισμένο μοτίβο ενεργού κέντρου των $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιών είναι το ονομαζόμενο φωσφορικής πρόσδεσης μιας και τα 2/3 εξ' αυτών έχουν ως υπόστρωμα ή σχηματίζουν σύμπλοκα με οργανικές ενώσεις απαραίτητες για τη λειτουργία τους, με τουλάχιστον μία

φωσφορική ομάδα. Έχει υποστηριχθεί ότι τοπικά μικρά δίπολα μεμονωμένων α-ελίκων και ένα συνολικό από όλες τις α-έλικες διπολικό ηλεκτροστατικό πεδίο δημιουργούν ένα θετικό δυναμικό στο καταλυτικό μέτωπο του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού. Οι πλευρικές αλυσίδες φαίνεται να ενισχύουν το ηλεκτροστατικό πεδίο και να το εστιάζουν σε μια συγκεκριμένη περιοχή κοντά στο ενεργό κέντρο, το οποίο θα μπορούσε να εξηγεί την προτίμηση των ($\beta\alpha$)₈-ενζύμων σε αρνητικά φορτισμένους μεταβολίτες (Sterner & Hocker, 2005).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να αναγνωρίσουν δομικά στοιχεία και αμινοξέα που είναι καίρια για τη σταθερότητα των ($\beta\alpha$)₈-βαρελιών. Τα περισσότερα από τα κατάλοιπα που σταθεροποιούν τα βαρέλια βρίσκονται στο β-φύλλο των οκτώ κλώνων με περίπου τα μισά προσανατολισμένα προς το εσωτερικό του βαρελιού και τα υπόλοιπα προς τις περιβάλλουσες α-έλικες (Sterner & Hocker, 2005).

Η εξέλιξη των ενζύμων στα βιολογικά συστήματα συχνά εμπλέκει την απόκτηση νέων καταλυτικών ιδιοτήτων ή ιδιοτήτων που καθορίζουν την πρόσδεση ενζύμου-υποστρώματος από ένα ήδη υπάρχον πρωτεΐνικό ικρίωμα. Το ($\beta\alpha$)₈-βαρέλι φαίνεται να είναι η ιδεώδης αρχιτεκτονική δίπλωσης για την κατευθυνόμενη εξέλιξη νέων βιοκαταλυτών (Sterner & Hocker, 2005).

4.1.2. Χιτινάσες

Η χιτίνη, ένα αδιάλυτο ομοπολυμερές N-ακετυλο-D-γλυκοζαμινών (GlcNAc) συνδεδέμενων με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, είναι το δεύτερο σε αφθονία μετά την κυτταρίνη βιολογικό πολυμερές. Τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων, ο εξωσκελετός των αρθροπόδων, ιδιαίτερα των οστρακοειδών (καβούρια, αστακοί και γαρίδες) και των εντόμων, η μασητική συσκευή των μαλακίων, τα ράμφη και τα εσωτερικά κελύφη των κεφαλόποδων (καλαμάρια και οκτάποδα) έχουν ως βασικό συστατικό τους τη χιτίνη.

Οι χιτινάσες είναι τα φυσικά εργαλεία διάσπασης της χιτίνης. Υδρολύουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των GlcNAc σε απλά σάκχαρα (Li & Greene, 2010), (Ubhayasekera, 2011). Απαντώνται σε πολλούς οργανισμούς μεταξύ των οποίων βακτή-

ρια, μύκητες, φυτά, έντομα και ζώα. Οι προερχόμενες από τα βακτήρια και τους μύκητες χιτινάσες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ μεγάλων ποσοτήτων άνθρακα και αζώτου παγιδευμένων στη βιομάζα ως αδιάλυτη χιτίνη. Οι χιτινάσες χρησιμοποιούνται από τους μύκητες για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά τη διαίρεση των φυσιολογικών κυττάρων και οι προερχόμενες από κάποια φυτά χιτινάσες μπορεί να είναι σημαντικές στην αναχαίτιση παθογόνων. Στα έντομα και στα οστρακοειδή οι χιτινάσες σχετίζονται με την υποβάθμιση της παλιάς τους επιδερμίδας (Li & Greene, 2010). Επιπρόσθετα, οι δύο γνωστές ανθρώπινες χιτινάσες φαίνεται ότι βοηθούν στην αντιμετώπιση μυκητιακών λοιμώξεων αναγνωρίζοντας και υποβαθμίζοντας τη χιτίνη των παθογόνων μυκήτων (Vega & Kalkum, 2012).

Βάσει της ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών οι χιτινάσες ταξινομούνται στις οικογένειες 18 και 19 των γλυκοζιτικών υδρολασών. Τα μέλη των διαφορετικών οικογενειών διαφέρουν στην αμινοξική ακολουθία, στις τριτοταγείς δομές και στο μοριακό μηχανισμό της καταλυτικής αντίδρασης. Οι χιτινάσες της οικογένειας 18 έχουν καταλυτικές περιοχές με αρχιτεκτονική δίπλωσης αυτή των TIM βαρελιών και διαθέτουν ένα συντηρημένο DXDXE (όπου D=ασπαρτικό οξύ, E=γλουταμινικό οξύ και X=κάποιο άλλο αμινοξύ) μοτίβο καταλοίπων που καταλύουν την υδρολυτική αντίδραση μέσω ενός έμμεσου μηχανισμού υποβοηθούμενου από το υπόστρωμα. Η οικογένεια 18 των χιτινασών μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις υποοικογένειες A, B και C, με βάση την αμινοξική τους ακολουθία. Η κύρια δομική διαφορά μεταξύ των A και B χιτινασών είναι ότι μια α+β περιοχή παρεμβάλλεται στην καταλυτική περιοχή των TIM βαρελιού στην οικογένεια A, ενώ αυτή η προσθήκη απουσιάζει στην υποοικογένεια B (Li & Greene, 2010).

Τα απόβλητα της χιτίνης, ειδικά αυτά που παράγονται από μονάδες επεξεργασίας θαλασσινών, προκαλούν σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα παγκοσμίως. Οι χιτινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο σε βιομηχανικές εφαρμογές διαχείρισης της χιτίνης. Η παραγγή χαμηλού κόστους χιτινολυτικών ενζύμων εξασφαλίζει ιδανικούς βιομετατροπείς των αποβλήτων χιτίνης (Kao et al., 2007), (Songsiriritthigul et al., 2009).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την ισχυρή συσχέτιση μιας εκ των δύο ανθρώπινων χιτινασών και μιας ψευδο-χιτινάσης με το βρογχικό άσθμα. Οι ψευδο-χιτινάσες στερούνται χιτινολυτικής δραστικότητας λόγω μια σημειακής μετάλλαξης στο καταλυτικό κέντρο, αλλά διατηρούν την ικανότητα πρόσδεσής τους στη χιτίνη. Η σημειακή μετάλλαξη αφορά στην αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος (Ε) με λευκίνη, ισολευκίνη ή γλουταμίνη. Ο ενδεχόμενος ρόλος των ψευδο/χιτινασών αυτών ως βιοδείκτες εκτίμησης της οξύτητας του άσθματος και παρακολούθησης της θεραπείας του αναμένεται να ελεγχθεί με περαιτέρω κλινικές μελέτες (Shuhui et al., 2009). Ανξημένα επίπεδα μιας ψευδο-χιτινάσης στον ορό του αίματος έχουν συσχετιστεί εκτός από το άσθμα, με φλεγμονές, ακόμη και με καρκίνο, ενώ η έκφραση άλλης ψευδο-χιτινάσης με οστεοαρθρίτιδα (Schimpl et al., 2012).

4.1.3. Η χιτινάση-60

Το βακτηριακό στέλεχος *Moritella marina* απομονώθηκε από δείγμα που ανασύρθηκε εκ βάθους 1,200 μέτρων στον Βόρειο Ειρηνικό ωκεανό σε θερμοκρασία 3.24 °C. Στο γονιδίωμα του ψυχρόφιλου βακτηρίου ανιχνεύθηκε και απομονώθηκε το γονίδιο μιας χιτινάσης που ονομάστηκε *MmChi60*. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 550 αμινοξικών καταλοίπων με μοριακό βάρος 60.788 kDa. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε και η ανασυνδυασμένη *MmChi60* παράχθηκε και καθαρίστηκε (Stefanidi & Vorgias, 2008). Είκοσι δύο αμινοξικά κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο του μορίου (1-22) απουσιάζουν στο καθαρισμένο ένζυμο (Malecki et al., 2013).

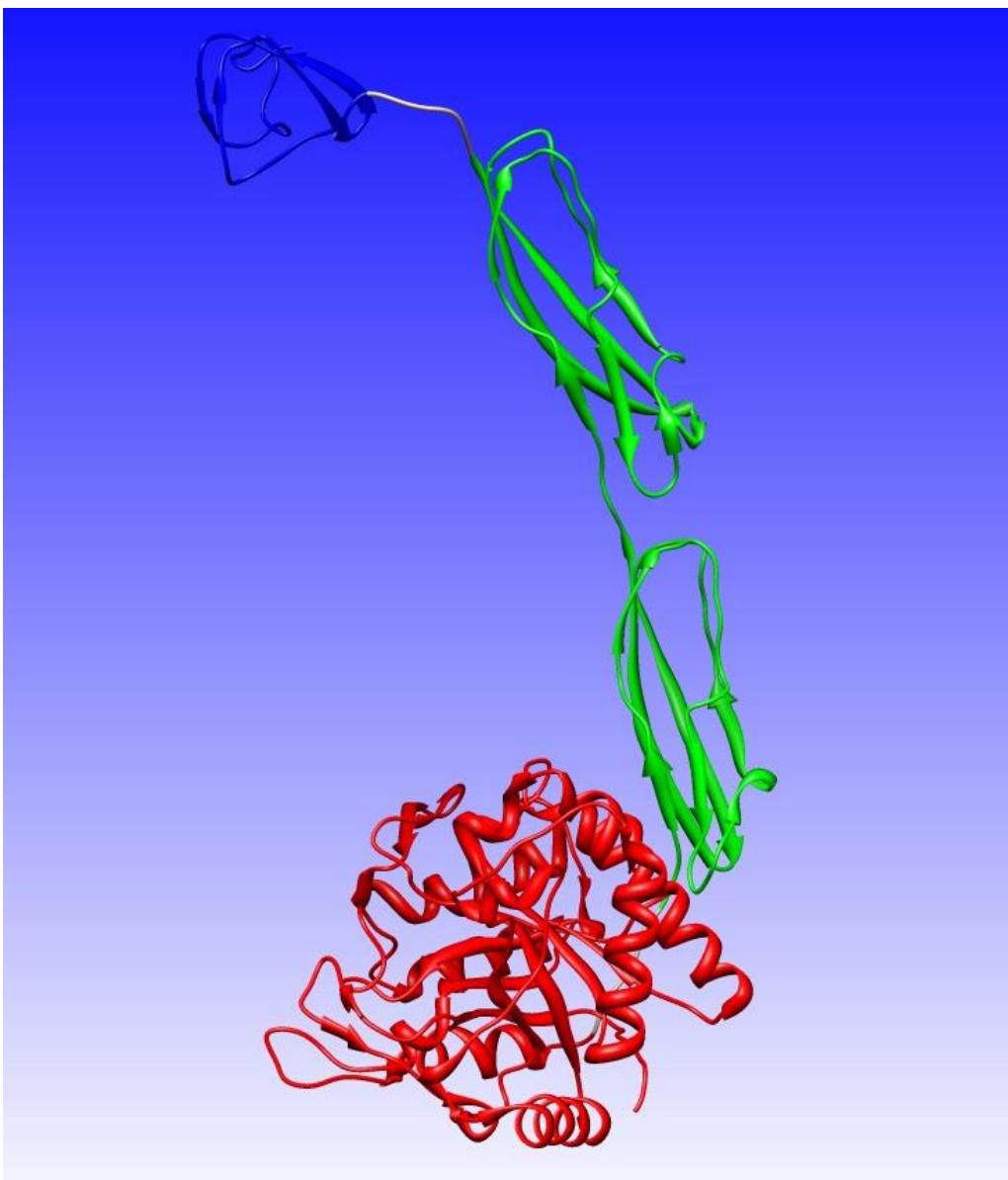
Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X αποκάλυψε την πιο σύνθετη δομή γλυκοζιτικής υδρολάσης που έχει μέχρι σήμερα λυθεί. Σύμφωνα με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα τα 528 αμινοξικά κατάλοιπα (23-550) της *MmChi60* διευθετούνται στο χώρο σε τέσσερις πρωτεΐνικές περιοχές:

- την καταλυτική περιοχή στο αμινικό άκρο με την αρχιτεκτονική δίπλωσης του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού (κατάλοιπα 22-342)

- δύο περιοχές ομοιάζουσες με βακτηριακές ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulin-like, Ig-like) (κατάλοιπα 348-421 και 422-501) και
- την περιοχή πρόσδεσης στη χιτίνη (κατάλοιπα 507-550) στο καρβοξυλικό άκρο με γραμμικό τρόπο δίνοντας στο μόριο ένα σχήμα εκτεταμένου πετάλου με μήκος 100 Å (Σχήμα 4.2) (Malecki et al., 2013).

Η δίπλωση της καταλυτικής περιοχής στην αρχιτεκτονική του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού και το χαρακτηριστικό μοτίβο πλευρικών αλυσίδων DXDXE (όπου D=ασπαρτικό οξύ, E=γλουταμινικό οξύ και X=κάποιο άλλο αμινοξύ) που συνιστούν την καταλυτική περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου κατατάσσει τη χιτινάση-60 στην οικογένεια 18 των υδρολασών. Ο αυλακοειδής σχηματισμός της περιοχής πρόσδεσης του ενεργού κέντρου της χιτινάσης-60 είναι ρηχός σε σχέση με τους αντίστοιχους άλλων χιτινασών με γνωστές δομές. Τα TIM-βαρέλια χιτινασών με βαθύτερους αυλακοειδείς σχηματισμούς διαθέτουν επιπλέον παρεμβαλλόμενες α+β πρωτεϊνικές περιοχές και στερούνται πρωτεΐνικής περιοχής πρόσδεσης στη χιτίνη, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στη ChiA. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα αποκάλυψαν επίσης εντυπωσιακές μεταβολές στη γεωμετρία των καταλυτικών καταλοίπων με και χωρίς την παρουσία πολύ-NAG αλυσίδων (Malecki et al., 2013).

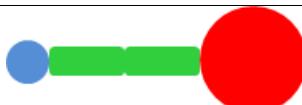
Πέραν της εξειδικευμένης συγγένειας μεταξύ της περιοχής πρόσδεσης του TIM βαρελιού της χιτινάσης-60 και της χιτίνης, η πρωτεϊνική περιοχή πρόσδεσης και το ζεύγος των δύο καταλοίπων τρυπτοφάνης στην επιφάνεια του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού φαίνεται να εξασφαλίζουν τη γενική συγγένεια ενζύμου – χιτίνης και μάλιστα η κατανομή τους σε όλο το μήκος του μορίου, την αποτελεσματικότητα του ενζύμου προς μεγάλου μήκους υποστρώματα. Οι λειτουργικές περιοχές των «ανοσοσφαιρινών» επιμηκύνουν μορφολογικά την πρόσβαση του μορίου στην επιφάνεια της χιτίνης. Η εύκαμπτη περιοχή μεταξύ της πρωτεϊνικής περιοχής πρόσδεσης και της γειτονικής «ανοσοσφαιρίνης» εφοδιάζει το ένζυμο με την ικανότητα εξερεύνησης της επιφάνειας του υποστρώματός του. Ο ρηχός αυλακοειδής σχηματισμός της περιοχής πρόσδεσης του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού στο υπόστρωμα διευκολύνει την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο (Malecki et al., 2013).



Σχήμα 4.5: Ταινιωτή αναπαράσταση της κρυσταλλογραφική δομής της *MmChi60* (Malecki et al., 2013). Με διαφορετικά χρώματα απεικονίζονται οι τέσσερις πρωτεΐνικές περιοχές της: η διπλωμένη στην αρχιτεκτονική του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού καταλυτική περιοχή (κόκκινο), οι δύο Ig-like περιοχές (πράσινο) και η περιοχή πρόσδεσης στη χιτίνη (μπλε). Η διευθέτηση των επιμέρους περιοχών στον χώρο δίνει στο μόριο τη μορφή ενός εκτεταμένου πετάλου. Η δομή είναι καταχωρημένη στην πρωτεΐνική βάση δεδομένων (Protein Data Bank ή PDB) με τον κωδικό, 4HMC (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=4HMC>). Για την οπτικοποίηση της δομής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα UCSF Chimera 1.7.

4.1.4. Πειραματικός σχεδιασμός

Καταρχάς μελετήθηκε ακέραιο το πρωτεϊνικό μόριο της χιτινάσης-60. Αδιαμφισβήτητα όμως η πρωτεϊνική περιοχή της χιτινάσης-60 με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η καταλυτική της περιοχή, το $(\beta\alpha)_8$ βαρέλι της. Χάρη σε μεθόδους που έχει αναπτύξει η μοριακή βιολογία είναι εφικτό το «κόψιμο» και «ράψιμο» πρωτεϊνικών περιοχών πολύπλοκων πρωτεϊνικών μορίων με σκοπό την ανεξάρτητη μελέτη τους. Το TIM-βαρέλι της χιτινάσης-60 μελετήθηκε πρώτα παρουσία της μικρής λειτουργικής περιοχής πρόσδεσης στη χιτίνη, ως το μετάλλαγμα της χιτινάσης-60 χωρίς τις Ig-like περιοχές. Το μετάλλαγμα αυτό εφεξής θα ονομάζεται *MmChi60-[Ig-like domains]*. Κατόπιν μελετήθηκε μόνο του το TIM βαρέλι ως το μετάλλαγμα της χιτινάσης-60 χωρίς τις Ig-like περιοχές και χωρίς την περιοχή πρόσδεσης στη χιτίνη. Τα σκαριφήματα των προαναφερθέντων μορίων συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

| Μόριο | Σκαρίφημα |
|---|---|
| <i>MmChi60</i> ή χιτινάση-60 |  |
| <i>MmChi60-[Ig-like domains]</i> |  |
| $(\beta\alpha)_8$ ή TIM βαρέλι της <i>MmChi60</i> |  |

Τέλος, η μελέτη του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της χιτινάσης-60 ολοκληρώθηκε εκφράζοντας το μόριο *MmChi60* με μια σημειακή μετάλλαξη αντικαθιστώντας το γλουταμινικό οξύ Ε που βρίσκεται στη θέση 153 της αμινοξικής ακολουθίας στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με γλουταμίνη Q.

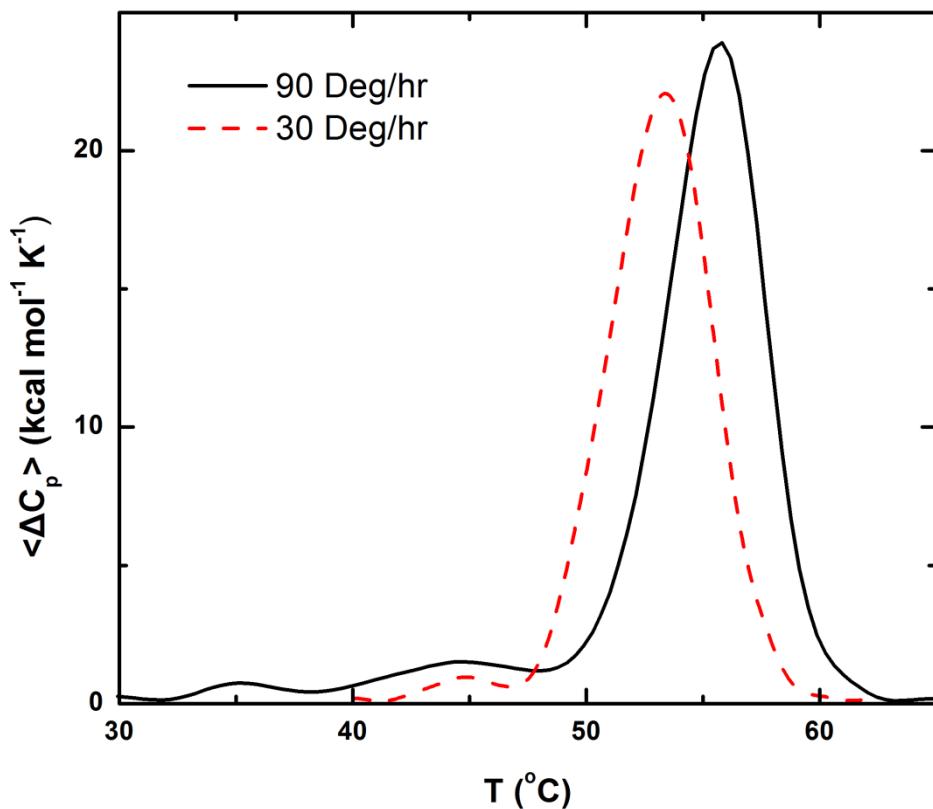
Το διάλυμα της χιτινάσης-60 παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ (Υπεύθυνος Καθ. Κ. Βοργιάς). Η διαδικασία παρασκευής του πρωτεϊνικού διαλύματος περιλάμβανε καταρχάς την κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σε κατάλληλους πλασμιδικούς φορείς. Στη συνέχεια

το μετασχηματισμό του πλασμιδίου σε βακτηριακά κύτταρα και καλλιέργεια των κυττάρων στους 18 °C. Κατόπιν τη λύση των κυττάρων και τον καθαρισμό πρωτεΐνικού δείγματος ώστε να απομονωθεί η πρωτεΐνη. Τέλος, το διάλυμα της καθαρής πλέον πρωτεΐνης μεταφέρθηκε με διαπίδυση σε ρυθμιστικό υδατικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσία 1 mM EDTA. Η ίδια μεθοδολογία εφαρμόστηκε για την παρασκευή των μεταλλαγμάτων της χιτινάσης-60 που μελετήθηκαν η οποία πραγματοποιήθηκε στο Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Η παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων υδροχλωρικής γουανιδίνης από σκόνη υδροχλωρικής γουανιδίνης (της εταιρίας Applichem) που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική μετουσίωση του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού της χιτινάσης-60 έγινε στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

4.2. Θερμική μετουσίωση της χιτινάσης-60

4.2.1. Θερμική μετουσίωση με εφαρμογή DSC

Η θερμική μετουσίωση του πρωτεΐνικου διαλύματος πραγματοποιήθηκε με τρεις ρυθμούς θέρμανσης 90, 30 και 10 Deg/hr. Σε κάθε περίπτωση η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα (calorimetric reversibility) της διαδικασίας ελέγχθηκε με γρήγορη ψύξη και θέρμανση του διαλύματος στον ίδιο ρυθμό. Η ανάκτηση του ενθαλπικού περιεχομένου του θερμογράμματος επιβεβαιώθηκε σε βαθμό περίπου 70% και 80% για τους ρυθμούς 90 και 30 Deg/hr, αντίστοιχα. Στο ρυθμό θέρμανσης 10 Deg/hr οι ενδείξεις συσσωμάτωσης (aggregations) ήταν εμφανείς από την πρώτη κιόλας σάρωση ενώ η δεύτερη σάρωση εμφάνισε ποσοστό αντιστρεψιμότητας λιγότερο από 50%. Τα πειραματικά αποτελέσματα για τους ρυθμούς 90 και 30 Deg/hr φαίνονται στο Σχήμα 4.3. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος 1.4 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσία 1 mM EDTA.



Σχήμα 4.6: Καμπύλες DSC για τη θερμική μετουσίωση 1.4 mg/ml *MmChi60* σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσία 1 mM EDTA με ρυθμούς θέρμανσης 90 Deg/hr (μαύρη συνεχής καμπύλη) και 30 Deg/hr (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη).

Η θερμική μετουσίωση της *MmChi60* στους 90 Deg/hr εμφανίζει ένα σύνθετο DSC πρόφιλ στο οποίο δύο μικρές «απλωμένες» ενδόθερμες κορυφές περί τους 35 °C και 45 °C προηγούνται της κύριας ενδόθερμης κορυφής. Μάλιστα η ενδιάμεσης θερμοκρασίας θερμική μετουσίωση ξεκάθαρα αλληλοεπικαλύπτεται μερικώς με την κύρια ενδόθερμη.

Ο Πίνακας 4.1 περιλαμβάνει τη θερμοκρασία T_{max} που εμφανίζεται η μέγιστη τιμή $\langle \Delta C_p \rangle_{max}$ της κύριας ενδόθερμης κορυφής, την ενθαλπία μετουσίωσής της ΔH_{cal} και τη συνολική ενθαλπία μετουσίωσης, για κάθε ρυθμό θέρμανσης u . Η μόνη πληροφορία που ήταν δυνατόν να εξαχθεί από το θερμόγραμμα που ελήφθη στο ρυθμό σάρωσης των 10 Deg/hr ήταν η θερμοκρασία T_{max} .

Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα DSC της χιτινάσης-60

| u (Deg/hr) | T_{max} (°C) | ΔH_{cal} (kcal mol⁻¹) | ΔH_{cal}^{tot} (kcal mol⁻¹) |
|-------------------|-----------------------------|---|---|
| 90 | 55.8 | 127.8 | 146.0 |
| 30 | 53.3 | 121.4 | 126.6 |
| 10 | 50.6 | - | - |

υ: ο ρυθμός θέρμανσης, T_{max}: η θερμοκρασία που εμφανίζεται η μέγιστη τιμή (ΔC_p)_{max}, ΔH_{cal}: η ενθαλπία μετουσίωσης κύριας κορυφής, ΔH_{cal}^{tot}: η συνολική ενθαλπία μετουσίωσης

Η αποτύπωση αφενός μεν της πολυπλοκότητας του μηχανισμού θερμικής μετουσίωσης της *MmChi60*, αφετέρου δε φαινομένων συσσωμάτωσης στις υψηλές θερμοκρασίες των μεταβάσεων στις DSC καμπύλες δεν επέτρεψαν σε κανένα ρυθμό θέρμανσης τον προσδιορισμό του συνολικού ΔC_p της μετάβασης.

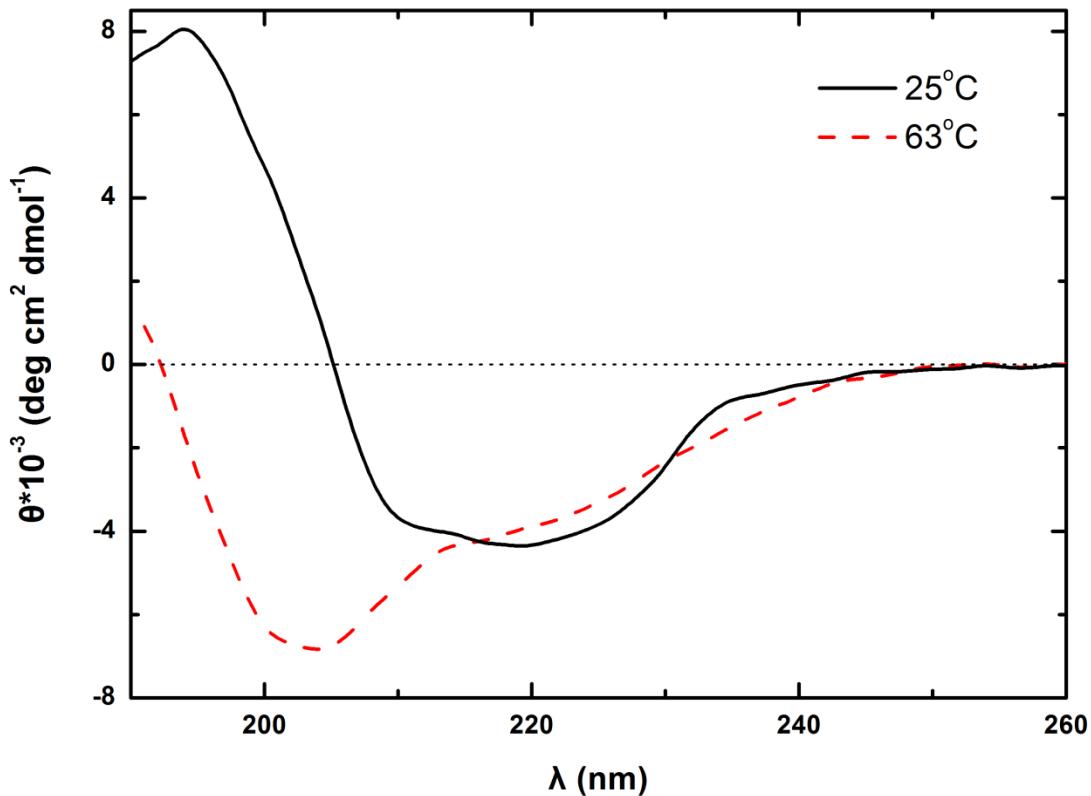
Η ενθαλπία μετουσίωσης δε μεταβάλλεται σημαντικά στους δύο ρυθμούς θέρμανσης· είναι αξιοσημείωτο όμως ότι η συνολική ενθαλπία μετουσίωσης ανά κατάλοιπο 0.26 kcal (mol res)⁻¹ ή 1.10 kJ (mol res)⁻¹ (υπολογισμένη στους 90 Deg/hr) είναι σημαντικά μικρότερη από την προβλεπόμενη από τη βιβλιογραφία τιμή 2.92 ± 0.08 kJ (mol res)⁻¹ (Robertson & Murphy, 1997). Η τελευταία τιμή αφορά στην τιμή της ενθαλπίας μετουσίωσης σε θερμοκρασία αναφοράς 60°C για πρωτεΐνες με αριθμό αμινοξικών καταλοίπων $N_{res} < 400$. Η υποεκτίμηση από την αδυναμία αναγωγής της ενθαλπίας μετουσίωσης στους 60°C και το σφάλμα που υπεισέρχεται από το μεγάλο αριθμό αμινοξικών καταλοίπων $N_{res} = 528$ ενδεχομένως να ερμηνεύει μερικώς την απόκλιση. Αφήνει όμως ανοικτά και άλλα ενδεχόμενα, όπως τη διατήρηση δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής του πρωτεϊνικού μορίου στην θερμικά μετουσιωμένη κατάστασή του, τη συμμετοχή σχετικά μικρού αριθμού αμινοξικών καταλοίπων σε αλληλεπιδράσεις και άρα μια υψηλή ενθαλπική στάθμη της ιθαγενούς κατάστασης.

Η εξάρτηση από το ρυθμό θέρμανσης του θερμογράμματος DSC υποδεικνύει ότι η θερμική μετουσίωση της *MmChi60* λαμβάνει χώρα υπό τον έλεγχο φαινομένων κινητικής και άρα καταρχήν δεν είναι εφικτή η θερμοδυναμική μελέτη του φαινομένου. Η μετατόπιση των DSC καμπυλών προς χαμηλότερες θερμοκρασίες με την ελάττωση του ρυθμού

θέρμανσης είναι πιο πιθανό να οφείλεται σε μια αργή διεργασία ξεδιπλώματος/δίπλωσης παρά σε φαινόμενα συσσωμάτωσης, μιας και ο βαθμός θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας του λάχιστον στους ρυθμούς θέρμανσης 90 και 30 Deg/hr είναι σχετικά υψηλός. Ο έλεγχος της υπόθεσης της αργής αποκατάστασης χημικής ισορροπίας με τη σύγκλιση των θερμογραμμάτων κατά την ελάττωση του ρυθμού θέρμανσης δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι η μετουσίωση με ρυθμό θέρμανσης 10 Deg/hr συνοδεύεται από την εμφάνιση εντονότερης συσσωμάτωσης.

4.2.2. Θερμική μετουσίωση με χρήση CD

Τα φάσματα κυκλικού διχροϊσμού της χιτινάσης-60 στην Far UV περιοχή του H/M φάσματος στους 25^oC (ιθαγενής κατάσταση) και στους 63^oC (θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση) δίνονται στο Σχήμα 4.4. Η ελλειπτικότητα έχει εκφραστεί ως μέση ανά αμινοξικό κατάλοιπο ελλειπτικότητα (mean residue ellipticity) (Greenfield, 2006) ώστε να είναι δυνατή η αντιπαραβολή φασμάτων διαφορετικών πρωτεΐνων. Τα φάσματα ελήφθησαν με συγκέντρωση πρωτεΐνικου διαλύματος 0.14 mg/ml, 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 mm. Από κάθε φάσμα έχει αφαιρεθεί το φάσμα αναφοράς (20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA, pH 8.0).



Σχήμα 4.7: Κανονικοποιημένα φάσματα CD στην περιοχή Far UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής μαύρη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή) 0.14 mg/ml *MmChi60* σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 mm.

Το φάσμα του πρωτεΐνικου διαλύματος της ιθαγενούς κατάστασης είναι χαρακτηριστικό πρωτεϊνών στις οποίες τα β-φύλλα συνεισφέρουν σημαντικά στη δευτεροταγή δομή τους. Η αρνητική μπάντα απορρόφησης στην περιοχή από 217 nm έως 222 nm οφείλεται στην επικάλυψη των αρνητικών ζωνών απορρόφησης των β-φύλλων και των α-ελίκων. Χαρακτηρίζεται γενικά από ένα ασθενές σήμα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο, σύμφωνα με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα², χαμηλό ποσοστό συμμετοχής 43.6% των αμινοξικών καταλοίπων στους συνηθισμένους τύπους δομής, α-έλικες και β-φύλλα, το οποίο ανέρχεται στο 49% αν συμπεριληφθούν οι λιγότερο συχνά εμφανιζόμενες 3₁₀-έλικες. Οφείλεται επίσης στο υψηλό ποσοστό, 29%, του σχεδόν τρεις φορές ασθενέστερου σήματος των β-

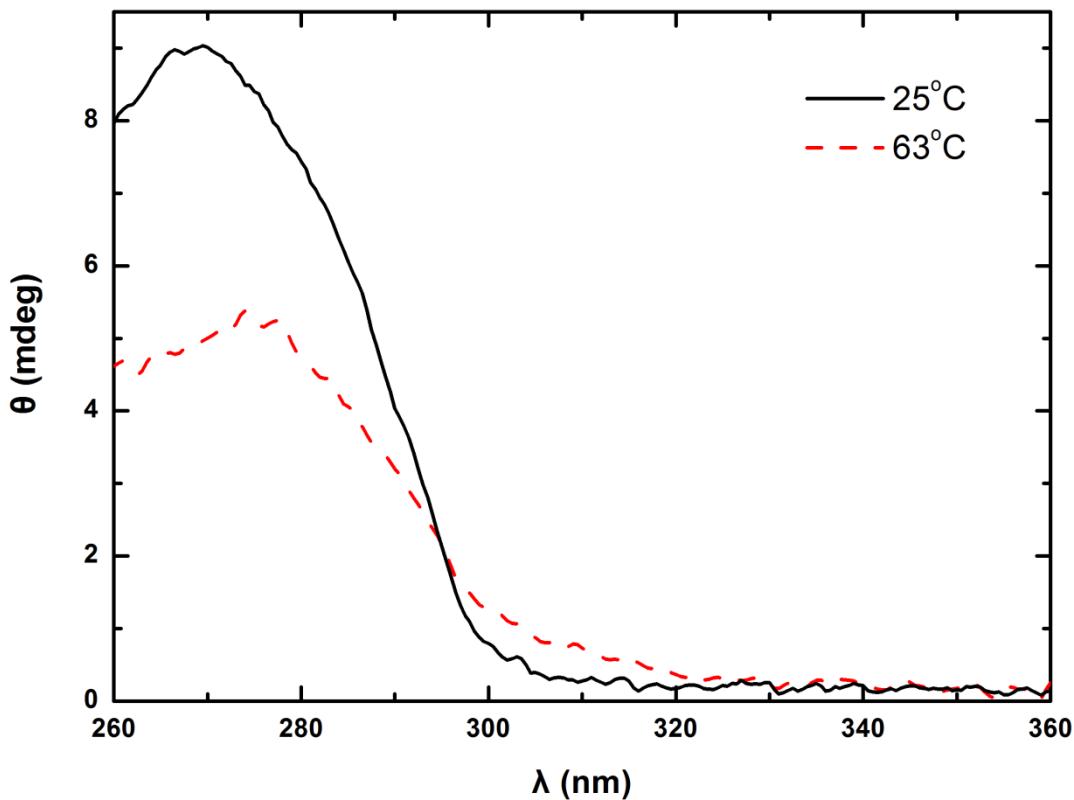
² (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=4HMC>)

φύλλων σε σχέση με του αντίστοιχου των α-ελίκων (Whitmore & Wallace, 2008). Θεωρητικοί υπολογισμοί που αφορούν στην αύξηση της έντασης CD των α-ελίκων με το μήκος της έλικας έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά (Sreerama & Woody, 2004a) και επομένως η συνεισφορά των πολύ μικρού μήκους 3_{10} -ελίκων σε ποσοστό 7% αναμένεται μικρή. Το φάσμα αναλύθηκε με την στηριζόμενη στη θεωρία των νευρωνικών δικτύων μέθοδο CDNN (Bohm et al., 1992). Η πρόβλεψη του ποσοστού των στοιχείων της δευτεραγούς δομής 20.7% α-έλικες, 38.3% β-φύλλα αποκλίνει από την αντίστοιχη που έδειξαν τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα 23% α-έλικες, 29% β-φύλλα. Η διαφοροποίηση για τις α-έλικες ενδεχομένως οφείλεται στο λόγο που αναφέραμε, ενώ για τα β-φύλλα που είναι και μεγαλύτερη οφείλεται στην απουσία πλούσιων σε β-φύλλα πρωτεϊνών στη βάση δεδομένων του προγράμματος ανάλυσης, στη μεγάλη απόκλιση της αρχιτεκτονικής της *MmChi60* σε σχέση εκείνη των πρωτεϊνών που συνιστούν τη βάση δεδομένων της μεθόδου (μικρές σφαιροειδείς πρωτεΐνες), και στην ποικιλία που εμφανίζει γενικά η γεωμετρία των β-φύλλων και αντανακλά σε μεταβολές των φασμάτων απορρόφησης.

Το φάσμα μιας θερμικά μετουσιωμένης πρωτεΐνης δεν ενδείκνυται να αναλύεται με τέτοιες μεθόδους, διότι η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών διαμορφώσεων από σχεδόν πλήρως ξεδιπλωμένες πρωτεΐνικές αλυσίδες μέχρι μερικώς διπλωμένες ακόμη και σχεδόν πλήρως διπλωμένες όχι κατ' ανάγκη όμοιες με της ιθαγενούς κατάστασης. Στο φάσμα της *MmChi60* στους 63°C διακρίνεται μια ισχυρή αρνητική μπάντα στα 204 nm η οποία ενδεχομένως οφείλεται στην παρουσία P_2 διαμόρφωσης που σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα κυκλικού διχροϊσμού σε συνθήκες κενού αποτελεί κοινό τόπο των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Matsuo et al., 2007). Παρατηρούμε επίσης, στο φάσμα μικρή ελάττωση της έντασης του φάσματος στα 222 nm, κάτι που υποδηλώνει τη διατήρηση σημαντικού ποσοστού α-ελίκων στη θερμοκρασία αυτή.

Στην near UV περιοχή του H/M φάσματος τα φάσματα κυκλικού διχροϊσμού της χιτινάσης-60 στους 25°C (ιθαγενής κατάσταση) και στους 63°C (θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση) δίνονται στο Σχήμα 4.5. Η συνεισφορά των αμινοξικών καταλοίπων των τρυπτοφανών, τυροσινών και φαινυλαλανινών διαφοροποιείται από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη και ως εκ τούτου είναι άνευ σημασίας η έκφραση της ελλειπτικότητας σε μέση ανά

αμινοξικό κατάλοιπο ελλειπτικότητα (Pain, 2005). Τα φάσματα ελήφθησαν με συγκέντρωση πρωτεΐνικου διαλύματος 0.7 mg/ml, 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 10 mm. Από κάθε φάσμα έχει αφαιρεθεί το φάσμα αναφοράς (20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA, pH 8.0). Η συνεισφορά των 57 αρωματικών καταλοίπων της χιτινάσης-60 συνιστούν το 10.8% του συνολικού αριθμού τους. Η απουσία ιδιαζόντων χαρακτηριστικών (έντονων κορυφών) στο φάσμα πιστοποιεί την πολυπλοκότητα ενός μεγάλου αριθμού αλληλεπιδράσεων του μικροπεριβάλλοντος με τις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις των αρωματικών καταλοίπων. Η διαφορά των φασμάτων στις δύο θερμοκρασίες υποδεικνύει έναν ενδεχόμενο τρόπο μεταβολής του φάσματος κατά τη θερμική μετουσίωση της πρωτεΐνης χαρακτηριζόμενο από ελάττωση της έντασης του κυκλικού διχροϊσμού.



Σχήμα 4.5: Φάσματα CD στην περιοχή Near UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής μαύρη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή) 0.7 mg/ml *MmChi60* σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 10 mm.

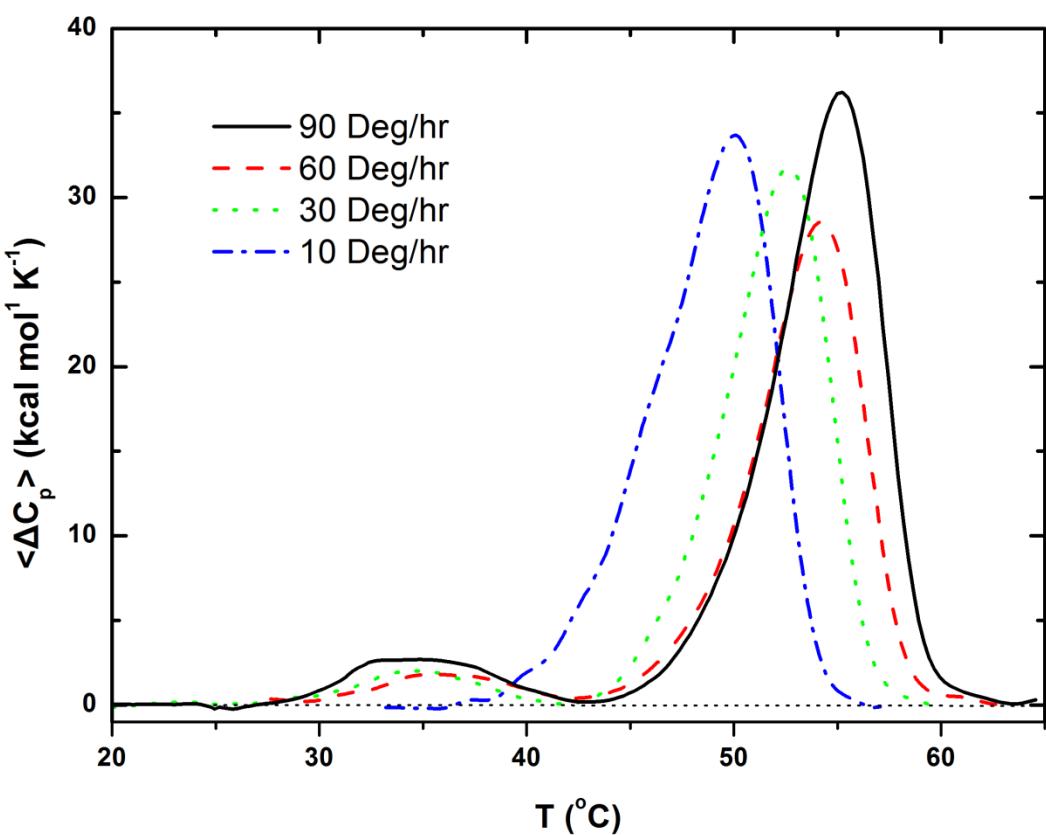
4.2.3. Θερμική μετουσίωση μεταλλάγματος με εφαρμογή DSC

Η πολυπλοκότητα του DSC θερμογράμματος της *MmChi60* συσχετίζεται με την πολυπλοκότητα της 3D δομής της, λόγω της παρουσίας των δύο εκτεταμένων περιοχών Ig-like και της περιοχής πρόσδεσης. Αυτές οι προσαρτημένες στο TIM βαρέλι του πρωτεΐνικού μορίου περιοχές ταυτοποιούν μια σημαντική απόκλιση της χιτινάσης-60 από τις σφαιρίνες.

Με μεθόδους μοριακής βιολογίας εκφράστηκε η αμινοξική ακολουθία της *MmChi60* χωρίς την αλληλουχία των καταλοίπων που εκφράζουν τις Ig-like πρωτεϊνικές περιοχές. Η θερμική μετουσίωση του μεταλλάγματος πραγματοποιήθηκε με ρυθμούς θέρμανσης 90, 60, 30 και 10 Deg/hr χρησιμοποιώντας διαλύματα πρωτεϊνικής συγκέντρωσης 0.8, 1.0, 0.8 και 0.5 mg/ml αντίστοιχα σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσίας 1 mM EDTA (Σχήμα 4.6). Η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ήταν 92, 92, 84 και 52%, αντίστοιχα. Τα θερμιδομετρικά χαρακτηριστικά των θερμογραμμάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 4.2, ενώ στο Σχήμα 4.7 αντιπαραβάλλονται οι DSC καμπύλες στους 90 και 30 Deg/hr με αυτές της αγρίου τύπου χιτινάσης-60. Η θερμική μετουσίωση και του μεταλλάγματος λαμβάνει χώρα υπό τον έλεγχο φαινομένων κινητικής. Η εξάρτηση της θερμοκρασίας T_{max} από το ρυθμό θέρμανσης συμβαδίζει με αυτόν της αγρίου τύπου. Η απουσία της μετάβασης στους 45°C περίπου και η εντυπωσιακή αύξηση της ενθαλπίας μετουσίωσης τόσο για την κύρια ενδόθερμη κορυφή, όσο και για τη μετάβαση περί των 35°C είναι τα κύρια χαρακτηριστικά του θερμογράμματος. Στο χαμηλότερο ρυθμό θέρμανσης δεν παρατηρήθηκε η μετάβαση της χαμηλότερης θερμοκρασίας, λόγω της μικρότερης ευαισθησίας του θερμιδόμετρου στους μικρότερους ρυθμούς θέρμανσης και της μικρότερης συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος. Η θερμική μετουσίωση των Ig-like περιοχών αποδεικνύεται ότι αφορά στην μετάβαση της αγρίου τύπου χιτινάσης-60 που παρατηρήθηκε στους 45°C. Η παρουσία των δύο μεταβάσεων στις χαμηλές και στις υψηλές θερμοκρασίες με τις θερμοκρασίες T_{max} των μεταβάσεων να παραμένουν σταθερές χωρίς την παρουσία των Ig-like λειτουργικών περιοχών υποδεικνύει έναν ανεξάρτητο κατά μία έννοια τρόπο θερμικής μετουσίωσης των πρωτεϊνικών περιοχών της χιτινάσης-60. Από την άλλη οι Ig-like περιοχές επηρεάζουν εντυπωσιακά την ενθαλπία με-

τουσίωσης. Η απουσία της θερμικής μετάβασης περί τους 45°C απλοποιεί μερικώς το σύνθετο προφίλ θερμικής μετουσίωσης της χιτινάσης-60 με τις δύο παρατηρούμενες μεταβάσεις του μεταλλάγματος να μην υφίστανται πλέον αλληλοεπικάλυψη. Όμως, φαίνεται να εμφανίζεται μια κάπως εντονότερη ασυμμετρία του κύριου ενδόθερμου. Από τη μία, οι λόγοι αυτοί κάνουν εξαιρετικά δύσκολο τον προσδιορισμό του συνολικού ΔC_p της διαδικασίας, από την άλλη η αδυναμία επίτευξης θερμοδυναμικής ισορροπίας στις πειραματικές συνθήκες καθιστούν αδύνατο το προσδιορισμό της θερμοδυναμικής σταθερότητας του μεταλλάγματος. Πάντως, η αύξηση της ενθαλπίας μετουσίωσης κατά $\sim 75\%$ με το T_{max} να παραμένει σταθερό είναι πολύ πιθανό να οδηγεί σε σημαντική αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας του πρωτεΐνικου μορίου. Η συνολική ενθαλπία μετουσίωσης ανά κατάλοιπο $0.69 \text{ kcal (mol res)}^{-1}$ ή $2.90 \text{ kJ (mol res)}^{-1}$ ($N_{res} = 371$) συναντά την προβλεπόμενη από τη βιβλιογραφία τιμή $2.92 \pm 0.08 \text{ kJ (mol res)}^{-1}$.

Τα πολύ μεγάλα ποσοστά θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας (με εξαίρεση τη μετουσίωση με 10 Deg/hr) ενισχύουν την υπόθεση ότι τα φαινόμενα κινητικής σχετίζονται με φαινόμενα αργής αποκατάστασης χημικής ισορροπίας και όχι με φαινόμενα συσσωμάτωσης.

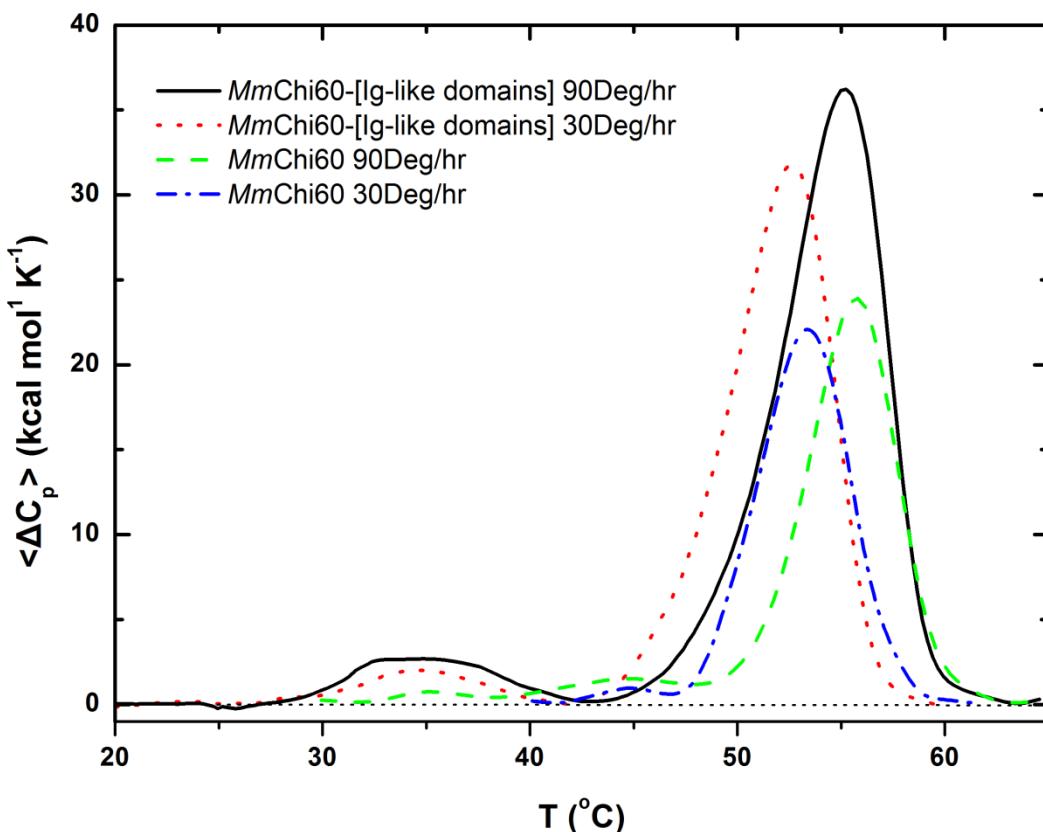


Σχήμα 4.8: Καμπύλες DSC για τη θερμική μετουσίωση του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* με ρυθμούς θέρμανσης 90 Deg/hr (μαύρη συνεχής καμπύλη), 60 Deg/hr (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη), 30 Deg/hr (πράσινη στικτή καμπύλη) και 10 Deg/hr (μπλε διακεκομμένη-στικτή καμπύλη). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0.8, 1.0, 0.8 και 0.5 mg/ml αντίστοιχα σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσίας 1 mM EDTA.

**Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα DSC του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]*
της χιτινάσης-60**

| u (Deg/hr) | T_{max} ($^{\circ}$ C) | ΔH_{cal} (kcal mol $^{-1}$) | ΔH_{cal}^{tot} (kcal mol $^{-1}$) |
|--------------|---------------------------|--------------------------------------|--|
| 90 | 55.2 | 234.1 | 257.4 |
| 60 | 54.4 | 184.7 | 199.5 |
| 30 | 53.3 | 197.5 | 212.9 |
| 10 | 50.1 | 240.0 | 240.0 |

υ: ο ρυθμός θέρμανσης, T_{max} : η θερμοκρασία που εμφανίζεται η μέγιστη τιμή $\langle \Delta C_p \rangle_{max}$, ΔH_{cal} : η ενθαλπία μετουσίωσης κύριας κορυφής, ΔH_{cal}^{tot} : η συνολική ενθαλπία μετουσίωσης



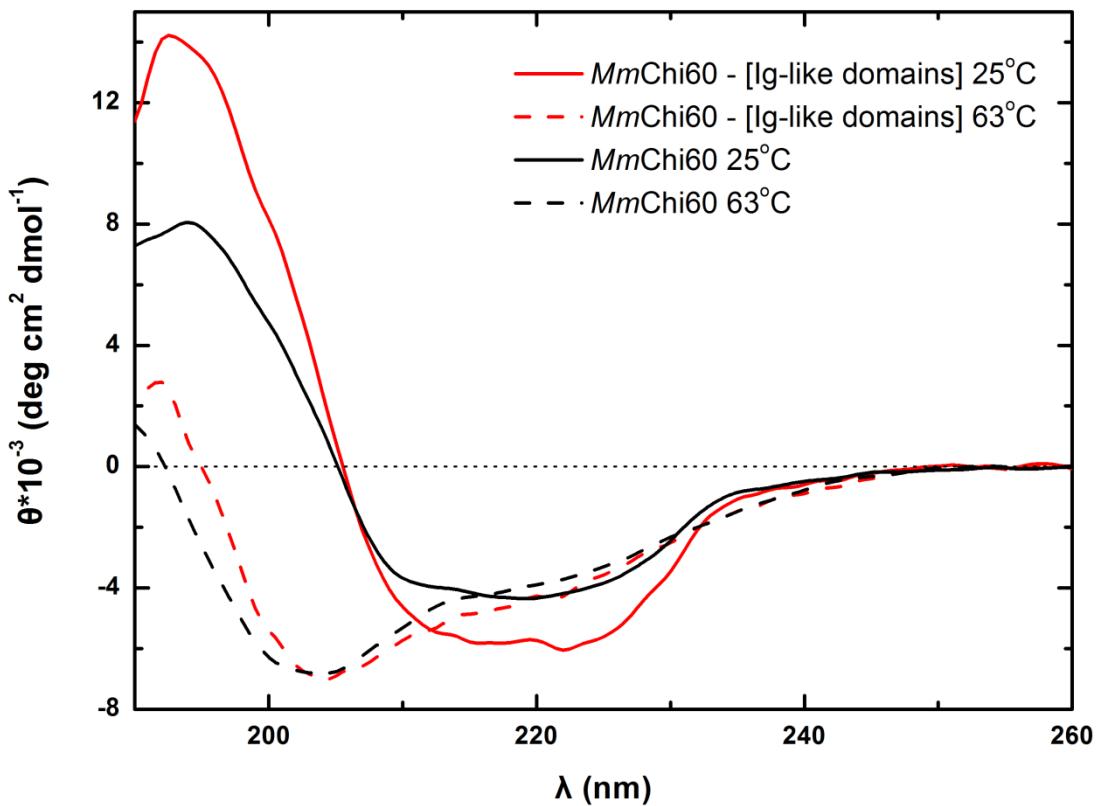
Σχήμα 4.7: Αντιπαραβολή των DSC καμπυλών του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* vs της αγρίου τύπου *MmChi60* στους 90 Deg/hr (μαύρη συνεχής καμπύλη vs πράσινη διακεκομένη καμπύλη αντίστοιχα) και στους 30 Deg/hr (κόκκινη στικτή καμπύλη vs μπλε διακεκομμένη-στικτή καμπύλη).

4.2.4. Θερμική μετουσίωση μεταλλάγματος με χρήση CD

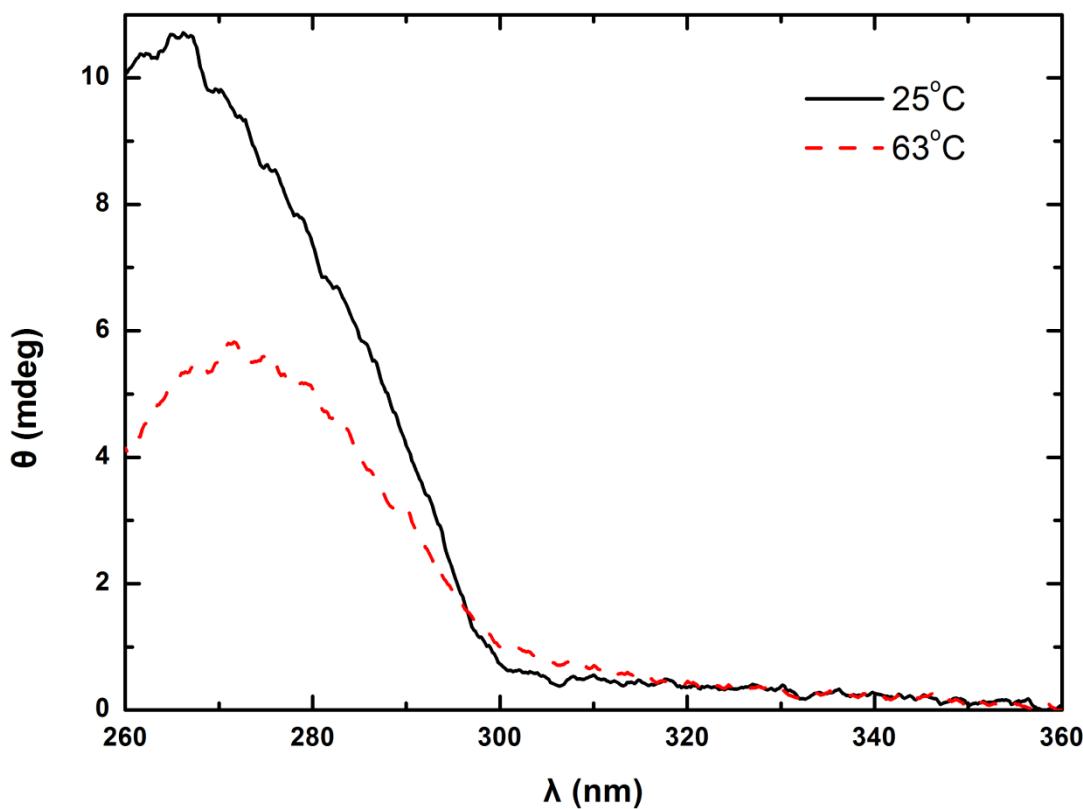
Τα φάσματα κυκλικού διχροϊσμού του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* αντιπαραβάλλονται με αυτά της αγρίου τύπου στο far UV στους 25°C (ιθαγενής κατάσταση) και στους 63°C (θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση) στο Σχήμα 4.8. Τα φάσματα του μεταλλάγματος ελήφθησαν με συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος 0.0856 mg/ml, με όλες τις υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος να είναι αυτές που περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες. Η αφαίρεση των πλουσίων σε β-φύλλα Ig-like περιοχών ενισχύει το ποσοστό των α-ελίκων στη δευτεροταγή δομή του μεταλλάγματος 31.3% (vs 23% στην αγρίου τύπου) και ελαττώνει το ποσοστό των β-φύλλων στο 17.3% (vs 29% στην αγρίου τύπου). Η πρώτη μεταβολή είναι εμφανής στο φάσμα του μεταλλάγματος στους 25°C με την ενίσχυση της έντασης των ζωνών απορρόφησης περί τα 222, 210 και 193 nm. Η δεύτερη μεταβολή επίσης αποτυπώνεται στο φάσμα κάνοντας λιγότερο επίπεδη την περιοχή επικάλυψης των ζωνών απορρόφησης από 210-222 nm με την ελάττωση της ζώνης απορρόφησης των β-φύλλων στα 213 nm. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του φάσματος με τη μέθοδο CDNN ήταν 28.5% α-έλικες, 20.1% β-φύλλα. Ελαττώνεται η απόκλιση κατ' απόλυτη τιμή των αποτελεσμάτων της CDNN ανάλυσης και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε σχέση με την απόκλιση που παρατηρήθηκε στην αγρίου τύπου χιτινάση-60 (-9% για τις α-έλικες στο μετάλλαγμα vs -14% στην αγρίου τύπου και για τα β-φύλλα +16% vs +46%, αντίστοιχα) επιβεβαιώνοντας τις υποθέσεις που εκτιμήθηκε ότι οδηγούσαν στην ασυμφωνία. Όσον αφορά το φάσμα στη θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση δε διαφέρει σημαντικά από αυτό της αγρίου τύπου. Παρατηρείται μόνο σημαντική ελάττωση της διαφοράς του ύψους των ζωνών απορρόφησης περί τα 204 nm στην θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση και περί τα 220 nm της ιθαγενούς κατάστασης στο μετάλλαγμα και στην αγρίου τύπου χιτινάση-60.

Στο Σχήμα 4.9 απεικονίζονται τα φάσματα στο near UV στους 25°C και στους 63°C. Τα φάσματα του μεταλλάγματος ελήφθησαν με συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος 0.6 mg/ml. Η αφαίρεση των Ig-like περιοχών ελαττώνει μεν κατά 11 τα αρωματικά καταλοίπα του μεταλλάγματος, επιφέρει δε μια μικρή αύξηση του ποσοστού τους επί του συνολικού αριθμού στο 12.4% (vs 10.8% στην αγρίου τύπου χιτινάση). Η απουσία έντο-

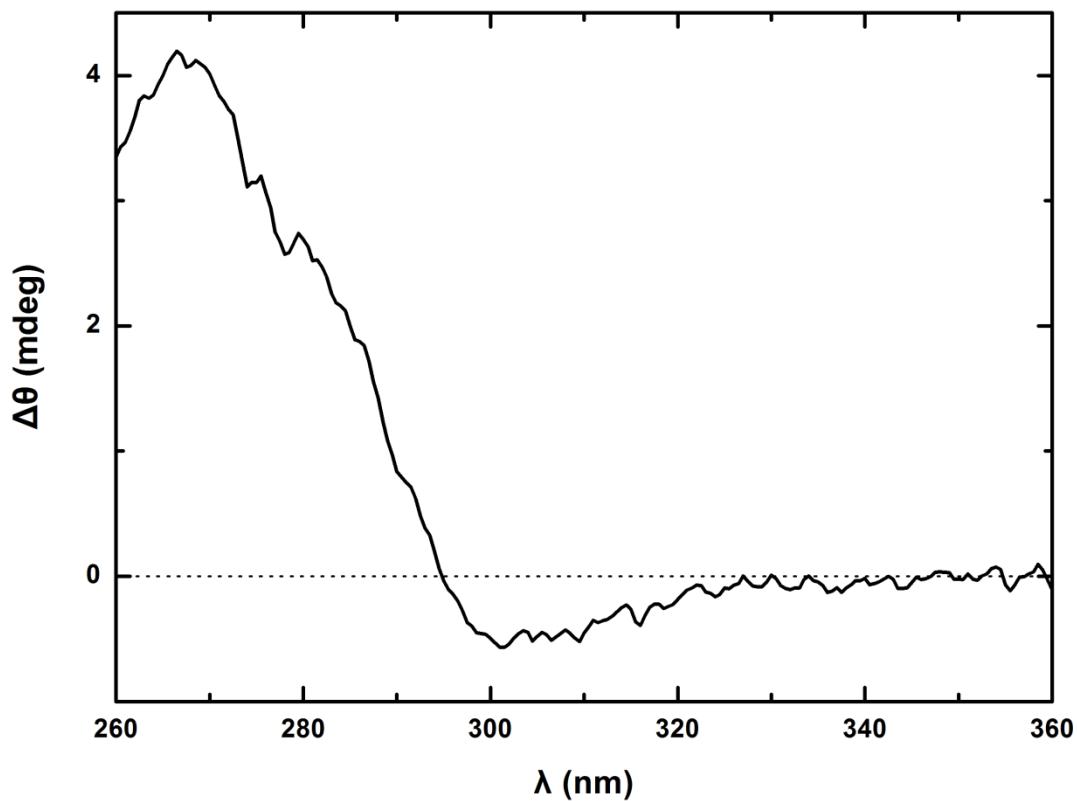
νων κορυφών και στην περίπτωση του μεταλλάγματος μπορεί να ερμηνευθεί στη βάση ενός μεγάλου ποσοστού χρωμοφόρων στο πρωτεϊνικό μόριο. Η θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση του μεταλλάγματος χαρακτηρίζεται, όπως και στην περίπτωση της αγρίου τύπου, από ελάττωση της έντασής του. Η σύγκριση φασμάτων στο near UV διαφορετικών πρωτεϊνών έχουμε αναφέρει ότι δεν έχει απόλυτα σαφές νόημα. Η περίπτωση όμως ενός μεταλλάγματος έστω και αν αυτό αφορά σε ολόκληρες πρωτεϊνικές περιοχές του μορίου διαφέρει και ίσως αποκτά κάποιο νόημα. Αφαιρώντας λοιπόν το φάσμα του μεταλλάγματος από το φάσμα της αγρίου τύπου χιτινάσης (Σχήμα 4.10, 25°C) προκύπτει ένα φάσμα με έντονες κορυφές στα 277 και 283 nm ενδεικτικό μεταβάσεων τυροσίνης. Τα φάσματα πριν την αφαίρεση κανονικοποίηθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων σε mol/l (M) και ανά αρωματικό κατάλοιπο. Δεδομένου ότι ο αριθμός των τρυπτοφανών δεν μεταβλήθηκε με την αφαίρεση των Ig-like περιοχών και ότι ο αριθμός των φαινυλαλανινών ελαττώθηκε κατά 4, αλλά η συνεισφορά των μεταβάσεών τους είναι αρκετά ασθενής, μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτές οι κορυφές αντανακλούν τις μεταβάσεις των 7 τυροσινών των Ig-like περιοχών στην αγρίου τύπου χιτινάση-60.



Σχήμα 4.8: Κανονικοποιημένα φάσματα CD στην περιοχή Far UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής μαύρη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (συνεχής κόκκινη γραμμή) 0.0856 mg/ml του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 mm. Αντιπαραβάλλονται τα φάσματα της αγρίου τύπου *MmChi60* στους 25 °C (διακεκομμένη μαύρη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή).



Σχήμα 4.9: Φάσματα CD στην περιοχή Near UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής μαύρη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή) 0.6 mg/ml του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 10 mm.



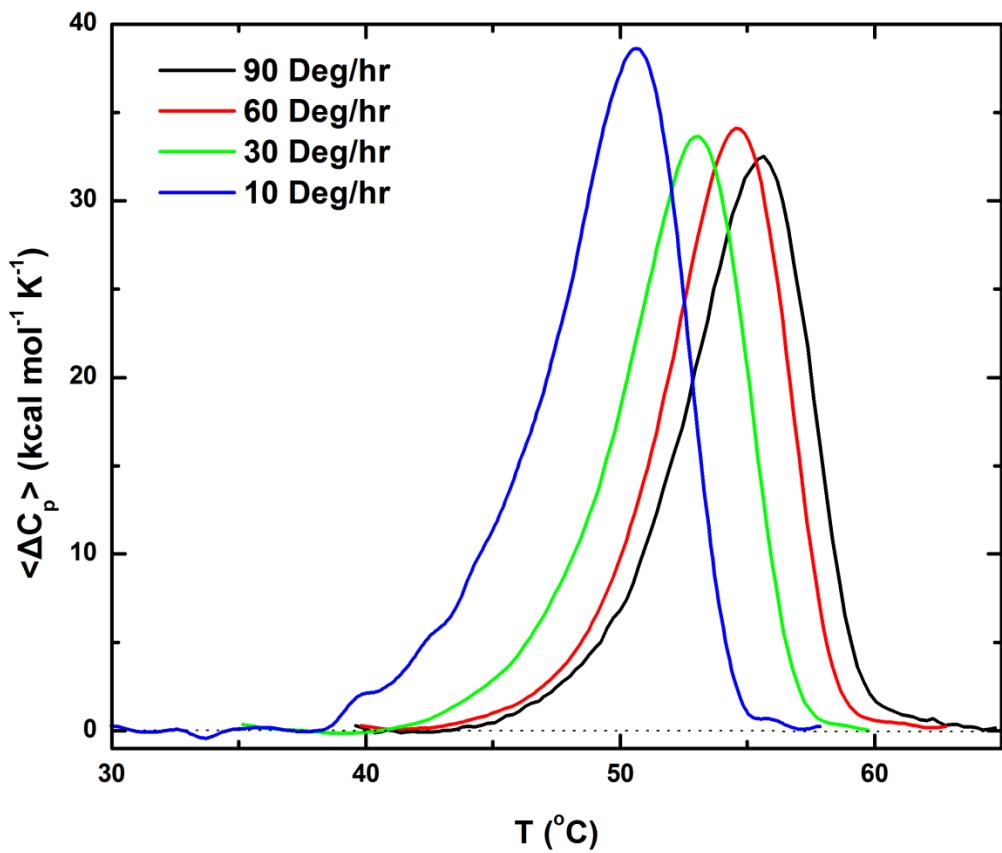
Σχήμα 4.10: Διαφορά των φασμάτων στο near UV της αγρίου τύπου *MmChi60* και του μεταλλάγματός της *MmChi60-[Ig-like domains]* στις ιθαγενείς τους καταστάσεις (25°C). Τα φάσματα πριν την αφαίρεση κανονικοποίηθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των πρωτεΐνικών διαλυμάτων σε mol/l (M) και ανά αρωματικό κατάλοιπο. Οι έντονες κορυφές στα 277 και 283 nm είναι ενδεικτικές μεταβάσεων τυροσίνης των Ig-like περιοχών.

4.2.5. Θερμική μετουσίωση της καταλυτικής περιοχής ($\beta\alpha$)₈-βαρέλι με εφαρμογή DSC

Με μεθόδους μοριακής βιολογίας εκφράστηκε αποκλειστικά και μόνο η καταλυτική περιοχή της χιτινάσης-60. Η θερμική μετουσίωση του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού πραγματοποιήθηκε με ρυθμούς θέρμανσης 90, 60, 30 και 10 Deg/hr χρησιμοποιώντας διαλύματα πρωτεΐνικής συγκέντρωσης 0.7, 1.0, 0.8 και 0.5 mg/ml αντίστοιχα σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσίας 1 mM EDTA (Σχήμα 4.11). Η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ήταν 92, 95, 89 και 70%, αντίστοιχα για τους ρυθμούς σάρωσης. Τα θερμιδομετρικά χαρακτηριστικά των θερμογραμμάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 4.3. Η απουσία των μεταβάσεων πριν την κύρια ενδόθερμη κορυφή που είχαν καταγραφεί στη θερμική μετουσίωση της αγρίου τύπου χιτινάσης-60 και του μεταλλάγματός της χωρίς τις Ig-like λειτουργικές περιοχές δείχνει ξεκάθαρα τη συσχέτιση των μεταβάσεων αυτών με τις προσαρτημένες στο βαρέλι πρωτεΐνικές περιοχές. Η χαμηλότερης θερμοκρασίας μετάβαση αφορά στη θερμική μετουσίωση της περιοχής πρόσδεσης και η μεταξύ αυτής και της κύριας ενδόθερμης κορυφής αφορά στη θερμική μετουσίωση των Ig-like περιοχών. Ο ανεξάρτητος τρόπος θερμικής μετουσίωσης του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού της χιτινάσης-60 από τη θερμική μετουσίωση των άλλων λειτουργικών περιοχών της ανοίγει το δρόμο για την αυτόνομη διερεύνησή του. Στα Σχήματα 4.12, 4.13, 4.14 και 4.15 παρουσιάζονται οι DSC καμπύλες της αγρίου τύπου χιτινάσης-60 και των μεταλλαγμάτων της στους ρυθμούς θέρμανσης 90, 60, 30 και 10 Deg/hr, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν ότι η κινητική εξάρτηση της θερμικής μετουσίωσης του πρωτεΐνικου μορίου προέρχεται σχεδόν αποκλειστικά από τη θερμική μετουσίωση της καταλυτικής λειτουργικής περιοχής του. Η συνολική ενθαλπία μετουσίωσης ανά αμινοξικό κατάλοιπο 0.84 kcal (mol res)⁻¹ ή 3.36 kJ (mol res)⁻¹ ($N_{res} = 322$) υπερβαίνει κατά 15% την προβλεπόμενη από τη βιβλιογραφία τιμή 2.92 ± 0.08 kJ (mol res)⁻¹, αύξηση όχι ιδιαίτερα σημαντική αν λάβει κανείς υπόψη ότι η R^2 τιμή της γραμμικής παλινδρόμησης στη συγκεκριμένη αναφορά είναι 0.735.

Η θερμοδυναμική ανάλυση της θερμικής μετουσίωσης του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού δεν είναι εφικτή για λόγους που έχουν εξηγηθεί. Παρόλα αυτά τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι σε κάποια υποθετική θερμική μετουσίωση με ρυθμό θέρμανσης μικρότερο από 10

Deg/hr και υψηλά ποσοστά θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας θα μπορούσε η μετουσίωση να λαμβάνει χώρα υπό τον έλεγχο της θερμοδυναμικής. Προς την ίδια κατεύθυνση δείχνει επίσης η ιδιαίτερα ικανοποιητική προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο ρυθμό θέρμανσης 10 Deg/hr (με υψηλό μάλιστα ποσοστό αντιστρεψιμότητας για έναν τόσο αργό ρυθμό θέρμανσης) σε ένα θερμοδυναμικό μοντέλο δύο ανεξάρτητων μεταβάσεων. Η προσαρμογή στο μοντέλο αυτό γίνεται όλο και λιγότερο επιτυχής όσο αυξάνεται ο ρυθμός θέρμανσης. Η προσαρμογή στο μοντέλο πρωτεϊνικής μετουσίωσης δύο ανεξάρτητων δομικών περιοχών μη συμπεριλαμβανομένου φαινομένων ΔC_p (βλ. Εξισώσεις αποσυνέλιξης DSC δεδομένων, κεφάλαιο 2) για τους 10 Deg/hr φαίνεται στο Σχήμα 4.16. Η μικρή απόκλιση της καμπύλης προσαρμογής από την πειραματική μετά το T_{max} , η οποία γίνεται σημαντικότερη πλησιάζοντας το άκρο της μετάβασης είναι πιθανό να οφείλεται σε φαινόμενα συσσωμάτωσης σ' αυτή την περιοχή θερμοκρασιών, τα οποία οδηγούν σε αύξηση της κλίσης της καμπύλης (Privalov & Potekhin, 1986). Εφόσον λοιπόν η υπόθεση αυτή ευσταθεί, ο μηχανισμός θερμικής μετουσίωσης του (βα)₈-βαρελιού φαίνεται να εμπλέκει δύο ανεξάρτητες συνεργατικές μονάδες του πρωτεϊνικού μορίου, η κάθε μία από τις οποίες μετουσιώνεται θερμικά χωρίς σημαντικό πληθυσμό θερμοδυναμικά ενδιάμεσων καταστάσεων, δηλαδή με έναν 2-καταστάσεων χαρακτήρα. Τα χαρακτηριστικά κάθε μετάβασης, όπως προβλέπονται από το εφαρμοζόμενο μοντέλο δίνονται στον Πίνακα 4.4. Η ανάλυση αυτή υποδεικνύει επομένως ότι κατά τη θερμική μετουσίωση της καταλυτικής περιοχής της χιτινάσης-60 εμφανίζονται σημαντικοί πληθυσμοί θερμοδυναμικά ενδιάμεσων καταστάσεων με τη μία εκ των δύο συνεργατικών μονάδων του μορίου να είναι μετουσιωμένη, ενώ η άλλη να βρίσκεται στην ιθαγενή της κατάσταση.

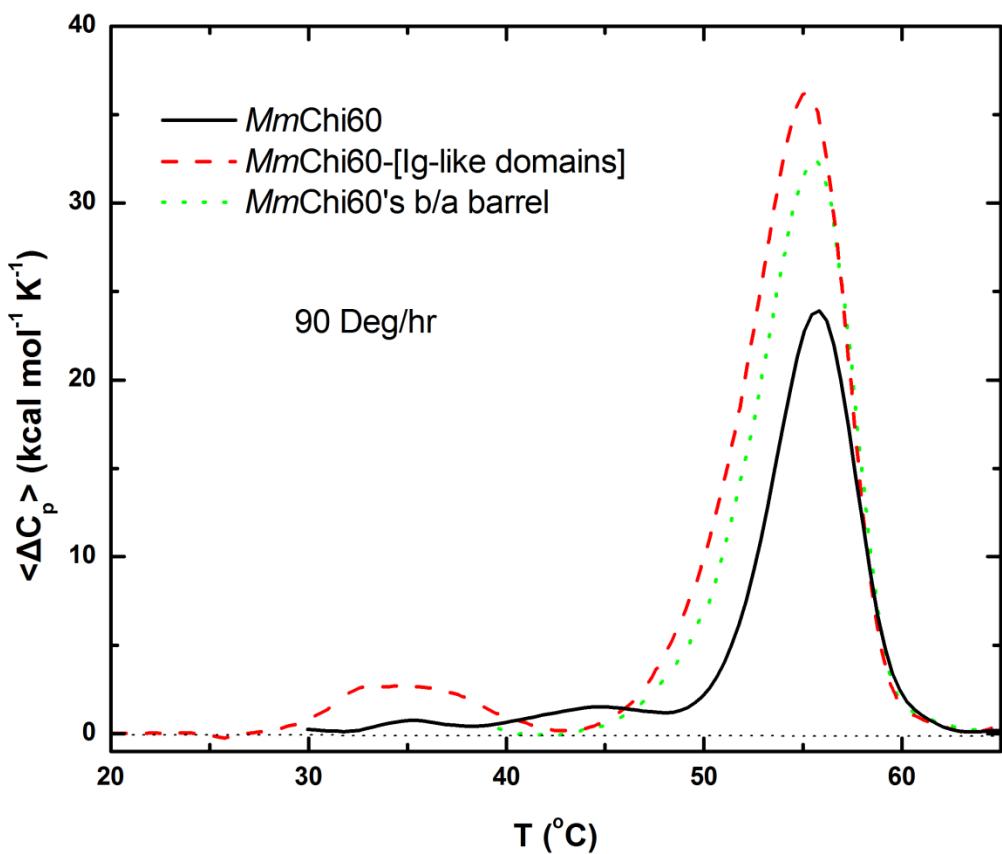


Σχήμα 4.11: Καμπύλες DSC για τη θερμική μετουσίωση του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της *MmChi60* με ρυθμούς θέρμανσης 90 Deg/hr (μαύρη συνεχής καμπύλη), 60 Deg/hr (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη), 30 Deg/hr (πράσινη στικτή καμπύλη) και 10 Deg/hr (μπλε διακεκομμένη-στικτή καμπύλη). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0.7, 1.0, 0.8 και 0.5 mg/ml αντίστοιχα σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσίας 1 mM EDTA.

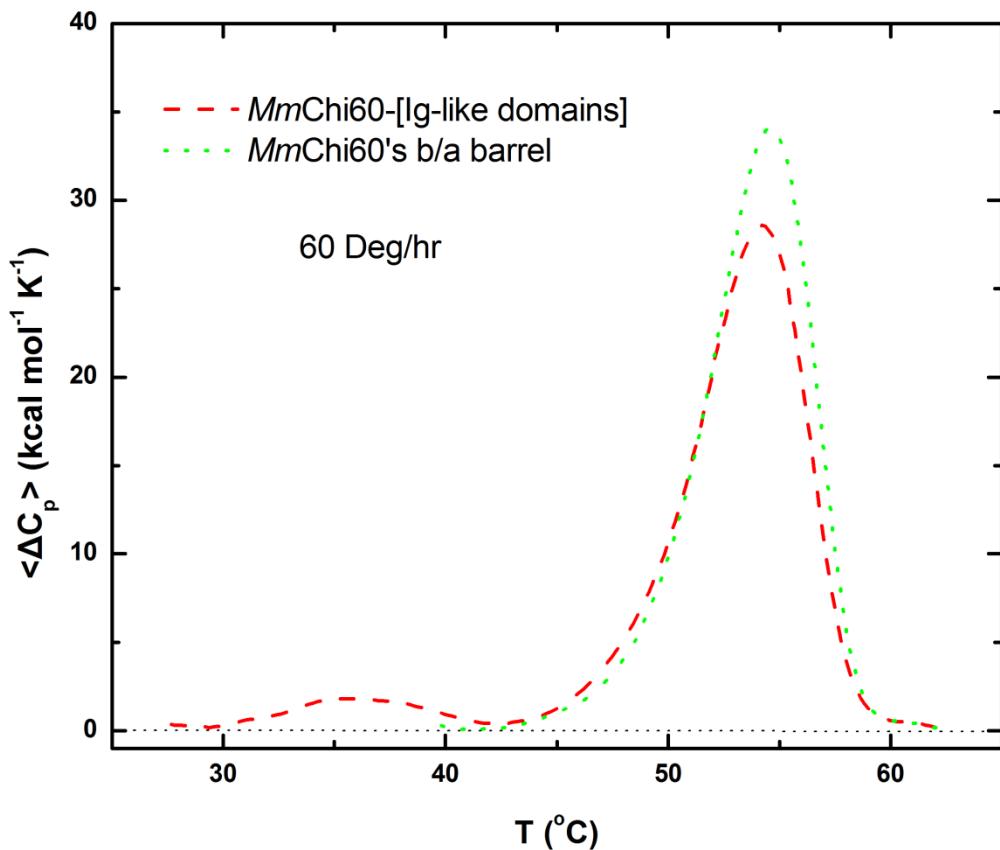
Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα DSC του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της *MmChi60*

| u (Deg/hr) | T_{max} ($^{\circ}$C) | ΔH_{cal} (kcal mol$^{-1}$) |
|-------------------|--|---|
| 90 | 55.6 | 203.7 |
| 60 | 54.7 | 207.6 |
| 30 | 52.9 | 210.0 |
| 10 | 50.7 | 259.0 |

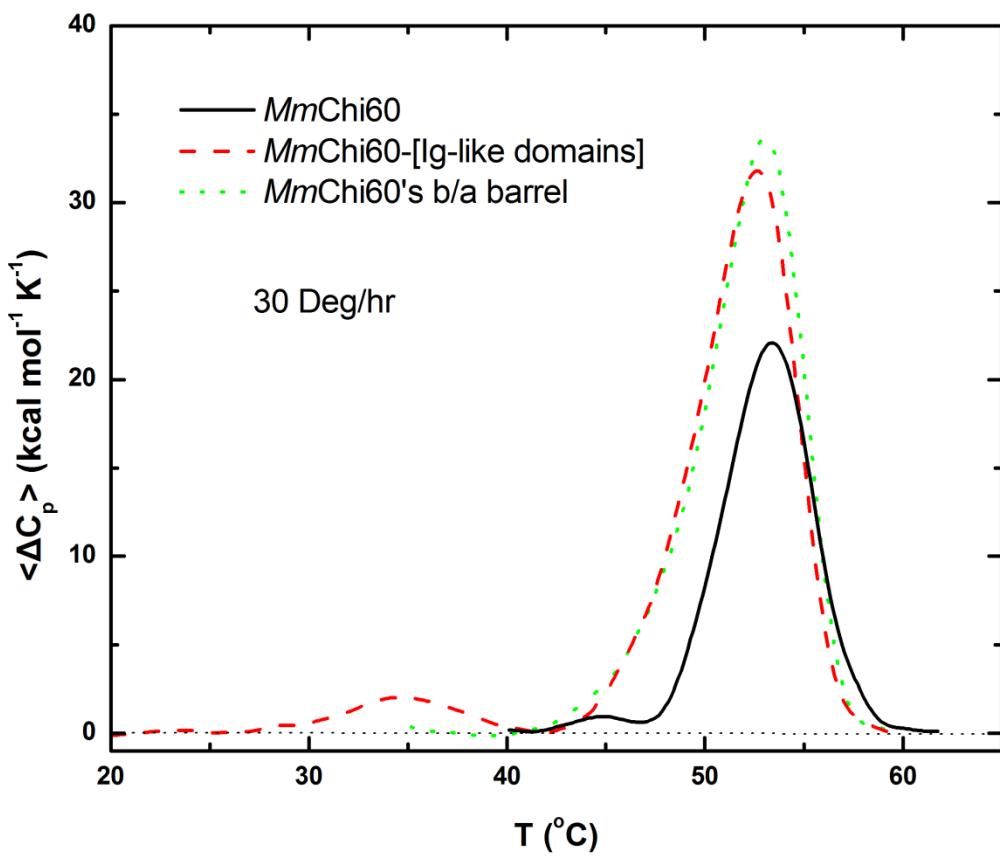
u: ο ρυθμός θέρμανσης, T_{max} : η θερμοκρασία που εμφανίζεται η μέγιστη τιμή $\langle \Delta C_p \rangle_{max}$, ΔH_{cal} : η ενθαλπία μετουσίωσης



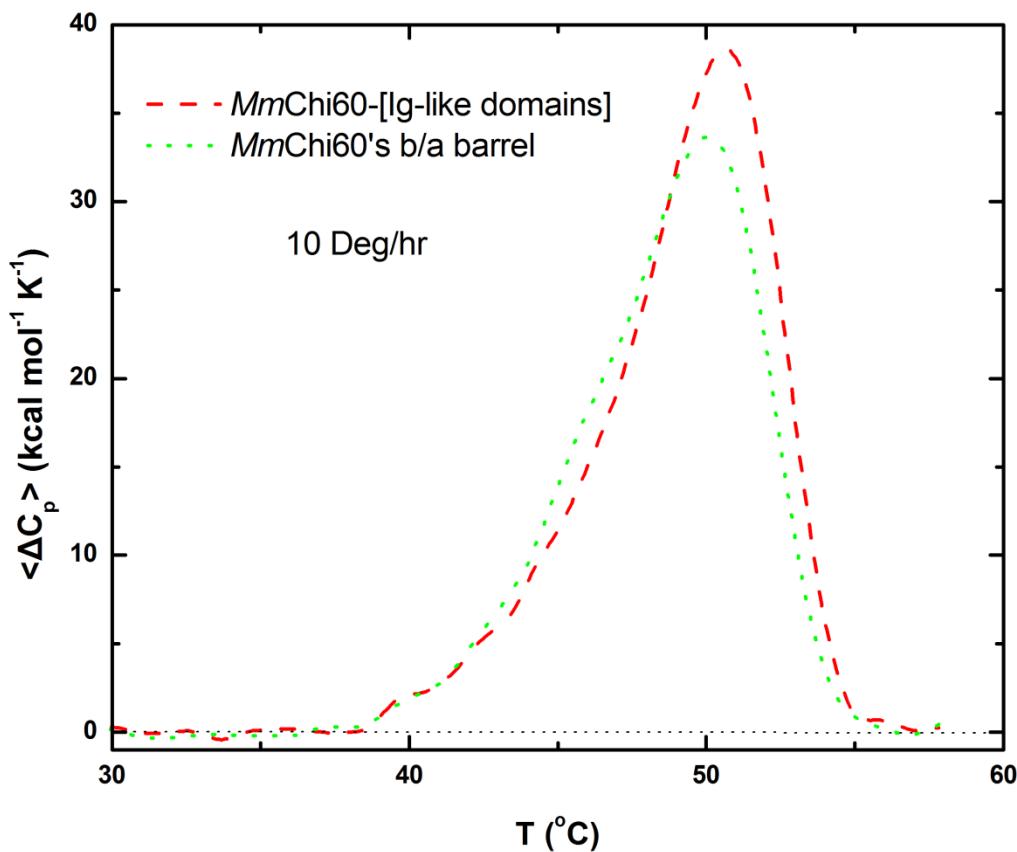
Σχήμα 4.12: Αντιπαραβολή των DSC καμπυλών της αγρίου τύπου *MmChi60* (μαύρη συνεχής καμπύλη) και των μεταλλαγμάτων της *MmChi60-[Ig-like domains]* (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη) και $(\beta\alpha)_8$ βαρελι (πράσινη στικτή καμπύλη) στους 90 Deg/hr.



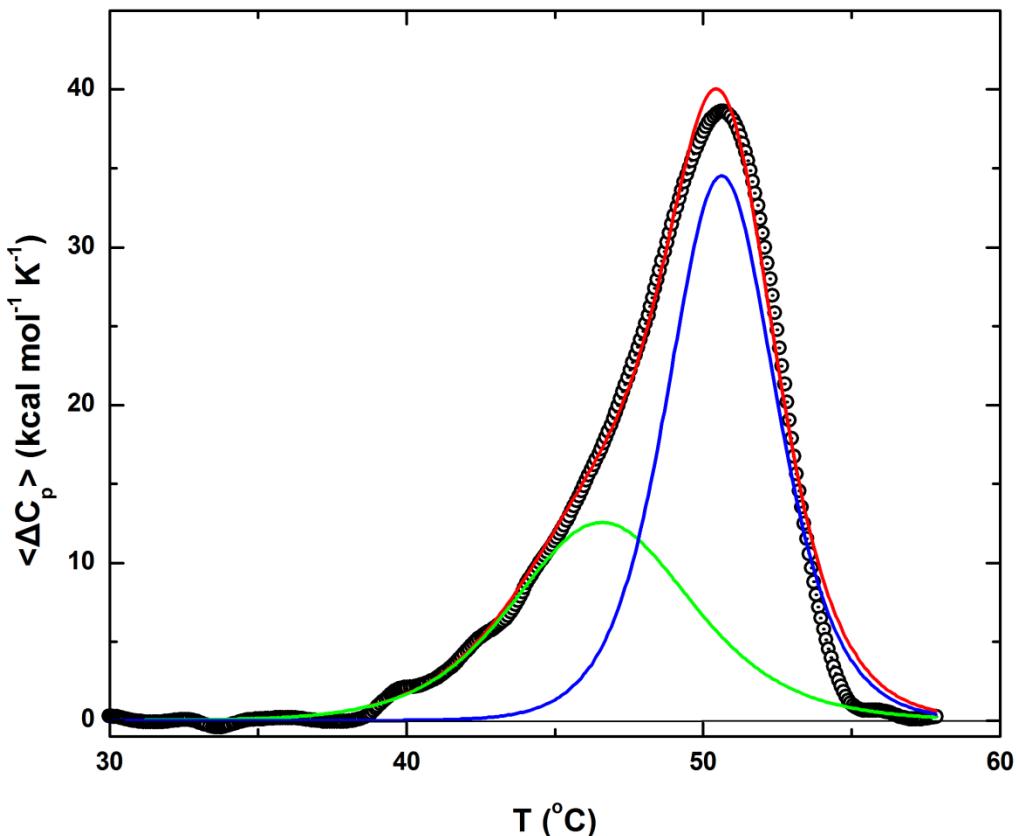
Σχήμα 4.13: Αντιπαραβολή των DSC καμπυλών των μεταλλαγμάτων της χιτινάσης-60 *MmChi60-[Ig-like domains]* (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη) vs $(\beta\alpha)_8$ βαρελι (πράσινη στικτή καμπύλη) στους 60 Deg/hr.



Σχήμα 4.14: Αντιπαραβολή των DSC καμπυλών της αγρίου τύπου *MmChi60* (μαύρη συνεχής καμπύλη) και των μεταλλαγμάτων της *MmChi60*-[Ig-like domains] (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη) και $(\beta\alpha)_8$ βαρελι (πράσινη στικτή καμπύλη) στους 30 Deg/hr.



Σχήμα 4.15: Αντιπαραβολή των DSC καμπυλών των μεταλλαγμάτων της χιτινάσης-60 *MmChi60-[Ig-like domains]* (κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη) vs $(\beta\alpha)_8$ βαρελι (πράσινη στικτή καμπύλη) στους 10 Deg/hr.



Σχήμα 4.16: Προσαρμογή (κόκκινη συνεχής γραμμή) της καμπύλης $\langle \Delta C_p \rangle$ του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της $MmChi60$ στους 10 Deg/hr (μαύροι κύκλοι) στο θερμοδυναμικό μοντέλο δύο ανεξάρτητων μεταβάσεων. Αναπαρίστανται οι προβλεπόμενες από το θεωρητικό μοντέλο μεταβάσεις χαμηλής (πράσινη καμπύλη) και υψηλής θερμοκρασίας (μπλε καμπύλη).

Πίνακας 5.4: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής μετουσίωσης με DSC του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της $MmChi60$ στους 10 Deg/hr (μοντέλο δύο ανεξάρτητων μεταβάσεων)

| | Μετάβαση Α | Μετάβαση Β |
|--|------------------|-------------|
| T_m (°C) | 46.64 ± 0.07 | 101 ± 1 |
| ΔH_{cal} (kcal mol ⁻¹) | 50.63 ± 0.02 | 170 ± 1 |

T_m : η θερμοκρασία μετάβασης, ΔH_{cal} : η ενθαλπία μετουσίωσης της μετάβασης

Συνήθως η εξάρτηση των DSC καμπυλών από το ρυθμό θέρμανσης οφείλεται σε φαινόμενα μη αντιστρεψιμότητας, τα οποία επιβεβαιώνονται κατά την επανάληψη της θερμικής μετουσίωσης του ίδιου πρωτεΐνικου διαλύματος. Παρά το γεγονός ότι θεωρητικές μελέτες έχουν προβλέψει ότι ακόμη και στην περίπτωση μιας πλήρους αντιστρεπτής θερμιδομετρικά θερμικής μετουσίωσης είναι δυνατόν να εμφανίζεται εξάρτηση των θερμογραμμάτων από το ρυθμό θέρμανσης (Lepock et al., 1992) πολύ λίγες βιβλιογραφικές αναφορές έχουν αναδείξει πειραματικά τέτοιες περιπτώσεις (Davoodi et al., 1998), (Grinberg et al., 2000), (Pyrgassopoulos et al., 2006). Στις δύο από αυτές ((Davoodi et al., 1998), (Pyrgassopoulos et al., 2006)) η εξάρτηση των θερμικών μεταβάσεων από το ρυθμό θέρμανσης θεωρήθηκε ως αποτέλεσμα μιας ιδιαίτερα αργής σε σχέση με τους συνηθισμένους ρυθμούς «ξεδίπλωσης» των πρωτεΐνικών μορίων και μάλιστα στη δεύτερη περίπτωση αποδείχθηκε ότι η DSC καμπύλη στο ρυθμό θέρμανσης 10 Deg/hr πρακτικά αντιστοιχεί στη θεωρητικά προβλεπόμενη για μηδενικό ρυθμό θέρμανσης, πράγμα που σημαίνει ότι η χημική ισορροπία «ξεδίπλωση» vs «δίπλωση» έχει αποκατασταθεί στο ρυθμό θέρμανσης των 10 Deg/hr. Η θερμική μετουσίωση του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της χιτινάσης-60, όπως έχουμε αναφέρει, είναι θερμιδομετρικά αντιστρεπτή σε μεγάλο ποσοστό σε όλους τους ρυθμούς θέρμανσης αλλά τα θερμογράμματα δε συγκλίνουν καθώς ελαττώνεται ο ρυθμός και ως εκ τούτου η χημική ισορροπία ακόμη και στους 10 Deg/hr δεν αποκαθίσταται. Παρά τις ενδείξεις για την εμφάνιση τριών τουλάχιστον θερμοδυναμικά σταθερών καταστάσεων κατά τη θερμική μετουσίωση του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού, επιχειρήθηκε η κινητική μελέτη της μετουσίωσης χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο δύο καταστάσεων.

Για μια αντιστρεπτή πρώτης τάξης αντίδραση



όπου N και D είναι η ιθαγενής και η μετουσιωμένη κατάσταση της πρωτεΐνης και k_1 και k_2 είναι οι ρυθμοί μετουσίωσης και ανάκτησης της ιθαγενούς κατάστασης ή αλλιώς «ξεδιπλώματος» και «διπλώματος». Ο χρονικός ρυθμός μεταβολής του βαθμού μετουσίωσης a περιγράφεται από τη διαφορική εξίσωση

$$\frac{da}{dt} = k_1(1 - a) - k_2 a \quad (4.2)$$

Ο βαθμός μετουσίωσης α σε μια δεδομένη θερμοκρασία T μπορεί να υπολογιστεί απευθείας από το θερμόγραμμα

$$\alpha(T) = \frac{\Delta h_{cal}(T)}{\Delta H_{cal}} \quad (4.3)$$

όπου $\Delta h_{cal}(T)$ είναι το εμβαδόν θερμογράμματος μέχρι τη θερμοκρασία T και ΔH_{cal} είναι το εμβαδό όλου του θερμογράμματος. Η χρονική παράγωγος της Εξίσωσης (4.3) δίνει

$$\frac{da}{dt} = \left(\frac{1}{\Delta H_{cal}} \right) \left[\frac{d\Delta h_{cal}(T)}{dT} \right] \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (4.4)$$

όπου $d\Delta h_{cal}(T)/dT = \langle \Delta C_p \rangle(T)$ και $dT/dt = u$. Επομένως, η Εξίσωση (4.2) μπορεί να γραφεί στη μορφή

$$\frac{u \langle \Delta C_p \rangle(T)}{\Delta H_{cal}} = k_1(T) - [k_1(T) + k_2(T)]a(T) \quad (4.5)$$

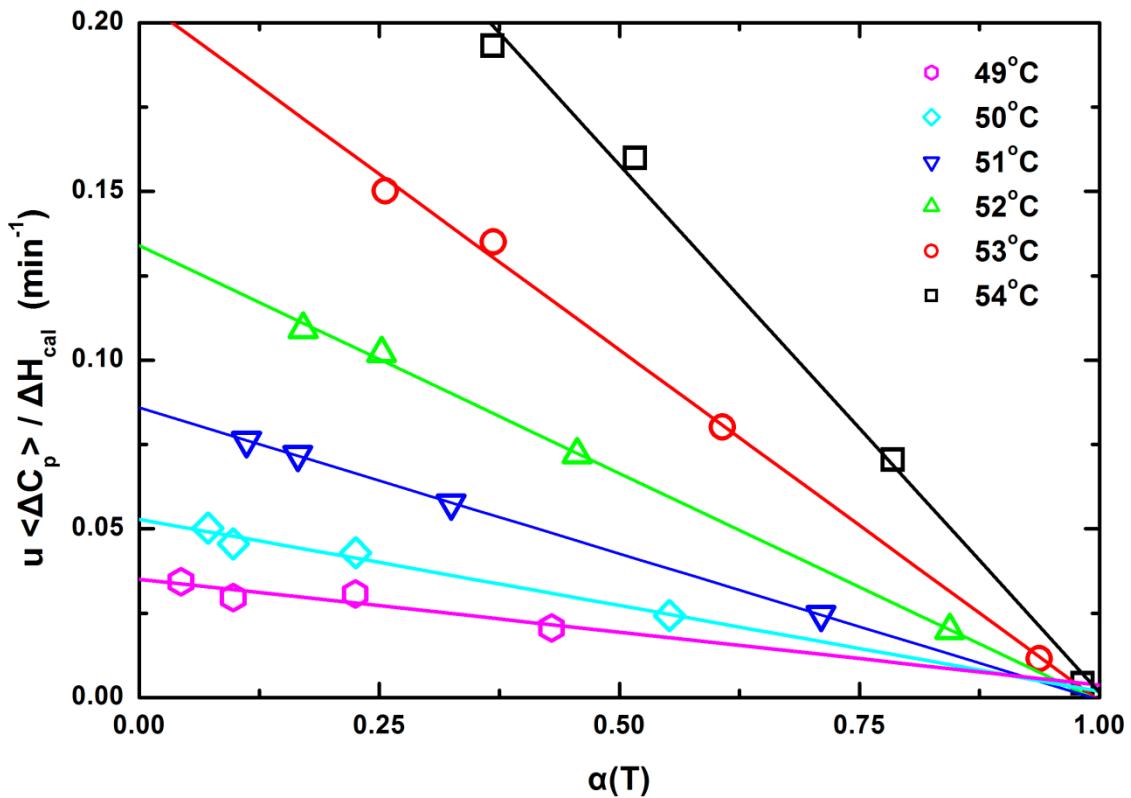
Προσδιορίζοντας τα $a(T_i)$, $\langle \Delta C_p \rangle(T_i)$ και ΔH_{cal} σε διαφορετικούς ρυθμούς θέρμανσης, είναι δυνατόν να κάνουμε το γράφημα $u \langle \Delta C_p \rangle(T_i)/\Delta H_{cal}$ vs $a(T_i)$ για θερμοκρασίες T_i μέσα στην περιοχή μετάβασης. Αυτή η εξάρτηση πρέπει να είναι γραμμική σύμφωνα με την Εξίσωση (4.5). Η κλίση της και η τεταγμένη επί την αρχή επιτρέπει το υπολογισμό των ρυθμών «ξεδιπλώματος» και «διπλώματος», $k_1(T_i)$ και $k_2(T_i)$, σε μια δεδομένη θερμοκρασία.

Στο Σχήμα 4.17 παρουσιάζεται η μεταβολή $u \langle \Delta C_p \rangle(T_i)/\Delta H_{cal}$ vs $a(T_i)$ για διάφορες θερμοκρασίες $T_i = 49, 50, 51, 52, 53, 54$ °C. Η γραμμική προσαρμογή των εξαρτήσεων σε όλες τις θερμοκρασίες είναι ιδιαίτερα επιτυχής με R τιμές σχεδόν 1. Σε κάθε θερμοκρασία υπολογίστηκαν οι ρυθμοί k_1 και k_2 , με τους ρυθμούς «δίπλωσης» k_2 να είναι σχεδόν μηδέν (περισσότερο από 2 τάξεις μεγέθους μικρότεροι από τους ρυθμούς «ξεδίπλωσης» k_1), Πίνακας 4.5. Επομένως, στο θερμοκρασιακό εύρος 49-54 °C $k_1 \gg k_2$. Σ' αυτή την περιοχή θερμοκρασιών η θερμική μετουσίωση του TIM βαρελιού της χιτινά-

σης-60 είναι μη αντιστρεπτή και άρα η Εξίσωση (4.1) πρέπει να αντικατασταθεί από την $N \xrightarrow{k_1} D$. Ο υψηλός βαθμός θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας των DSC καμπυλών υποδηλώνει ότι ο ρυθμός k_2 αυξάνεται σημαντικά στις χαμηλότερες θερμοκρασίες στις οποίες όμως τα δεδομένα μας δεν επαρκούν για τον υπολογισμό τους. Τέτοιες περιπτώσεις φαίνεται να είναι σπάνιες για τις θερμικές μετουσιώσεις των πρωτεϊνών γι' αυτό οι βιβλιογραφικές αναφορές τους είναι ελάχιστες (Grinberg et al., 2000). Η θερμοκρασία T_m της DSC καμπύλης ακόμα και στους 10 Deg/hr επηρεάζεται σημαντικά από τον κινητικό έλεγχο της διαδικασίας και άρα ο μηχανισμός θερμικής μετουσίωσης είναι υπό αίρεση. Το διάγραμμα $\ln(k_1/T)$ vs $(1/T)$ φαίνεται στο Σχήμα 4.18 και η κλίση του δίνει ενέργεια ενεργοποίησης 92.5 kcal/mol, σύμφωνα με τη σχέση Arrehnious (Εξίσωση 4.6)

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\#}{R} - \frac{\Delta H^\#}{R} \frac{1}{T} \quad (4.6)$$

όπου k_B η σταθερά Boltzmann, h η σταθερά του Planck, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, $\Delta S^\#$ και $\Delta H^\#$ η εντροπία και ενθαλπία ενεργοποίησης, αντίστοιχα.

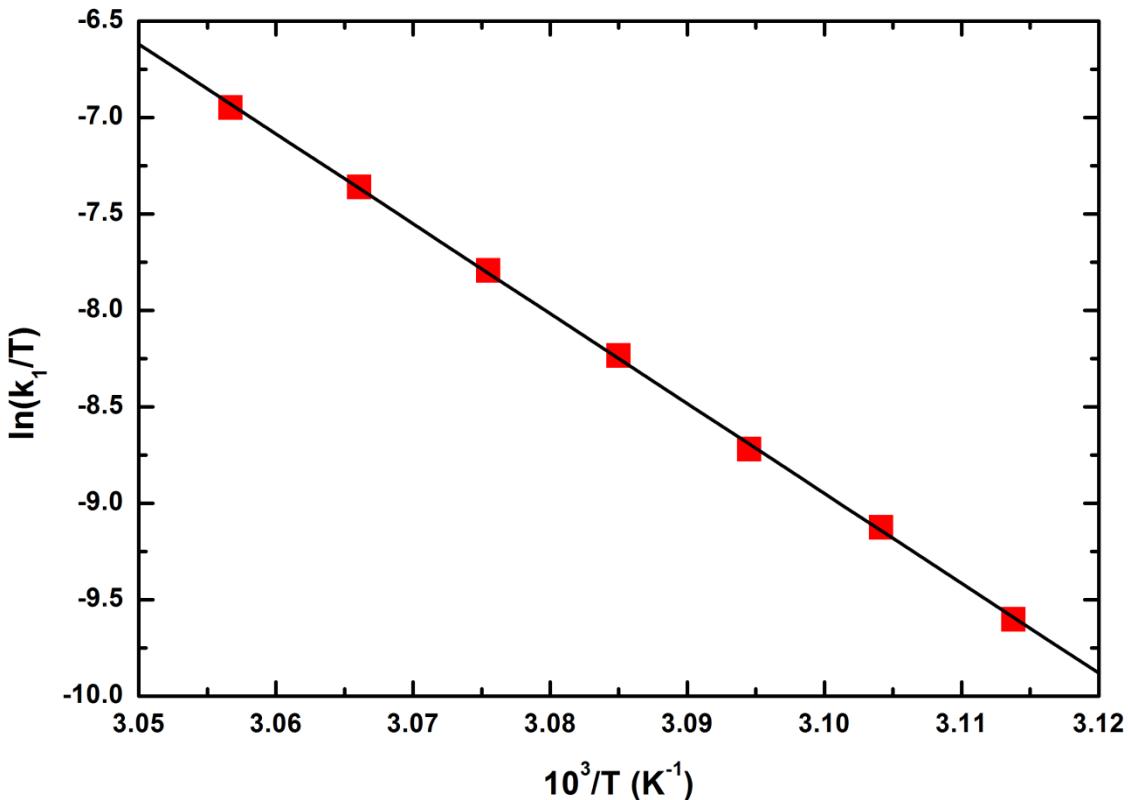


Σχήμα 4.17: Γράφημα $u \langle \Delta C_p \rangle (T_i) / \Delta H_{cal}$ vs $\alpha(T_i)$ από το οποίο σύμφωνα με την Εξίσωση 5.5 θα υπολογιστούν οι ρυθμοί «ξεδίπλωσης» και δίπλωσης του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της χιτινάσης-60. Ή: ο ρυθμός θέρμανσης, ΔH_{cal} : η ενθαλπία μετουσίωσης της μετάβασης στον ρυθμό θέρμανσης u , $\langle \Delta C_p \rangle (T_i)$ και $\alpha(T_i)$ η τιμή του $\langle \Delta C_p \rangle$ και ο βαθμός της πρωτεϊνικής μετουσίωσης στη θερμοκρασία T_i , αντίστοιχα, όπως προέκυψε από την επεξεργασία των DSC καμπυλών του Σχήματος 5.10. Οι τέσσερις ρυθμοί θέρμανσης εκφράστηκαν σε K/min, ενώ οι θερμοκρασίες στις οποίες προσδιορίστηκαν γραφικά τα $\langle \Delta C_p \rangle (T_i)$ και $\alpha(T_i)$ είναι $T_i = 49$ (πορφυρά εξάγωνα), 50 (ρόμβοι ανοικτού μπλε), 51 (μπλε τρίγωνα προς τα κάτω), 52 (πράσινα τρίγωνα προς τα πάνω), 53 (κόκκινοι κύκλοι) και 54 °C (μαύρα τετράγωνα). Οι ευθείες αναπαριστούν τις γραμμικές προσαρμογές των προσδιορισθέντων σημείων σε κάθε μία από τις θερμοκρασίες.

Πίνακας 4.5: Κινητικές παράμετροι θερμικής μετουσίωσης με DSC του ($\beta\alpha$)₈ βαρελιού της *MnChi60* (μοντέλο αντιστρεπτής πρώτης τάξης αντίδρασης)

| T(°C) | k ₁ (h ⁻¹) | k ₂ (h ⁻¹) |
|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 49 | 1.3 | ~ 0 |
| 50 | 2.1 | ~ 0 |
| 51 | 3.2 | ~ 0 |
| 52 | 5.2 | ~ 0 |
| 53 | 8.0 | ~ 0 |
| 54 | 12.4 | ~ 0 |

k_1 και k_2 : οι ρυθμοί «ξεδίπλωσης» και δίπλωσης στη θερμοκρασία T, όπως έχουν προσδιοριστεί από τις κλίσεις και τις τεταγμένες επί την αρχή των ενθειών του Σχήματος 4.17 σύμφωνα με την Εξίσωση 4.5.



Σχήμα 4.18: Γράφημα $\ln(k_1/T)$ vs $(1/T)$ από το οποίο υπολογίζεται η ενέργεια ενεργοποίησης της «ξεδίπλωσης» του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της χιτινάσης-60, σύμφωνα με την σχέση Arrhenius (Εξίσωση 4.6).

4.2.6. Θερμική μετουσίωση της καταλυτικής $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι με χρήση CD

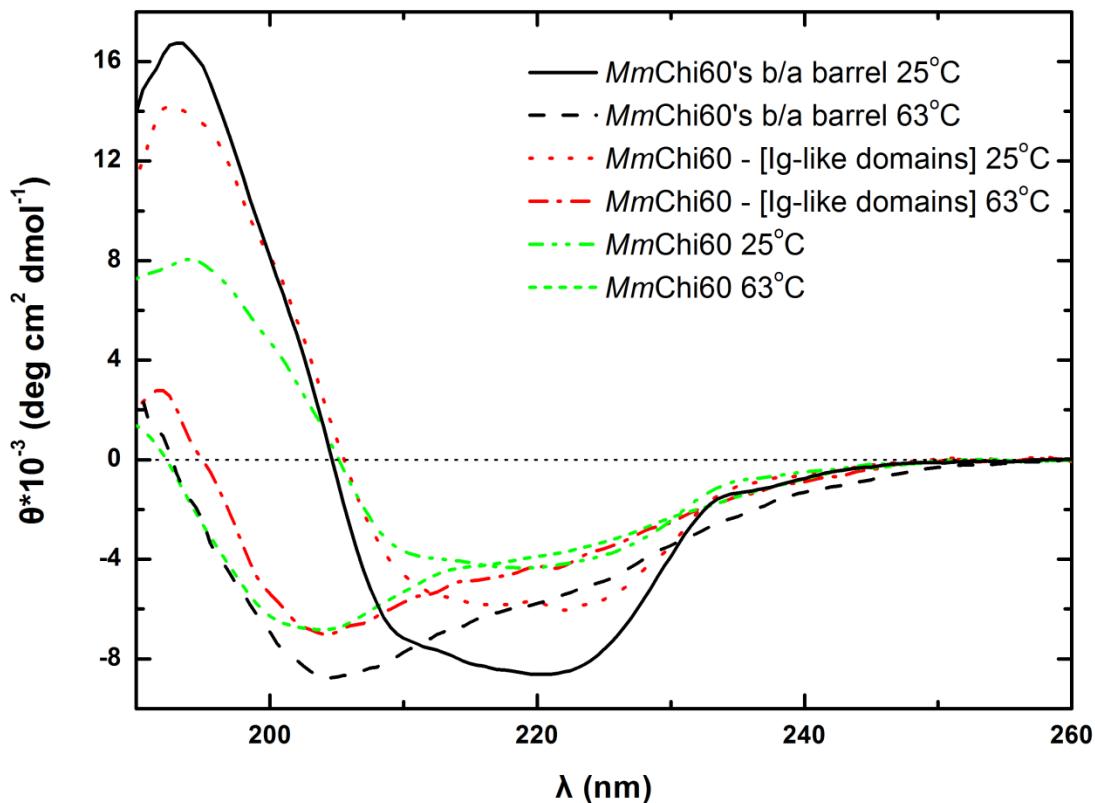
Τα φάσματα κυκλικού διχροϊσμού του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της *MmChi60* αντιπαραβάλλονται με αυτά της αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* στο Far UV στους 25°C (ιθαγενής κατάσταση) και στους 63°C (θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση) στο Σχήμα 4.19. Τα φάσματα του νέου μεταλλάγματος ελήφθησαν με συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος 0.1 mg/ml, με όλες τις υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος να είναι αυτές που περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες. Η σημαντική ενίσχυση του σήματος CD και η αύξηση της κλίσης του φάσματος στην περιοχή 210-222 nm θα μπορούσε να οφείλεται στην αύξηση κατά ~5% των αριθμού των αμινοξικών κα-

ταλοίπων που συμμετέχουν στις τυπικές δομές α-έλικα και β-φύλλο, με την αύξηση αυτή να αφορά σχεδόν αποκλειστικά στις α-έλικες (και το ~1% να αφορά στις 3_{10} -έλικες). Τα ποσοστά συνεισφοράς των α-ελίκων και των β-φύλλων στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνικών μορίων σύμφωνα με την ανάλυση που προέκυψε με τη μέθοδο CDNN είναι 30.5% και 18.5%, αντίστοιχα. Η σύγκλισή τους προς στα κρυσταλλογραφικά δεδομένα 36.0% α-έλικα και 17.4% β-φύλλο επιβεβαιώνεται μόνο για την περίπτωση των β-φύλλων (+6% vs +16% για το μετάλλαγμα δίχως τις Ig-like περιοχές), αλλά όχι για τις α-έλικες (-15.2% vs -9% για το μετάλλαγμα δίχως τις Ig-like περιοχές) παρότι η αρχιτεκτονική του νέου μεταλλάγματος πλησιάζει περισσότερο αυτή των σφαιρινών. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι τα πραγματικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα αφορούν μόνο στην αγρίου τύπου χιτινάση-60. Για τα μεταλλάγματά της η δευτεροταγής δομή υπολογίζεται από τις εναπομείνασες α-έλικες και β-φύλλα με την προϋπόθεση ότι κάθε πρωτεΐνική περιοχή διατηρεί ακέραια τη δευτεροταγή και τρίτοταγή του δομή.

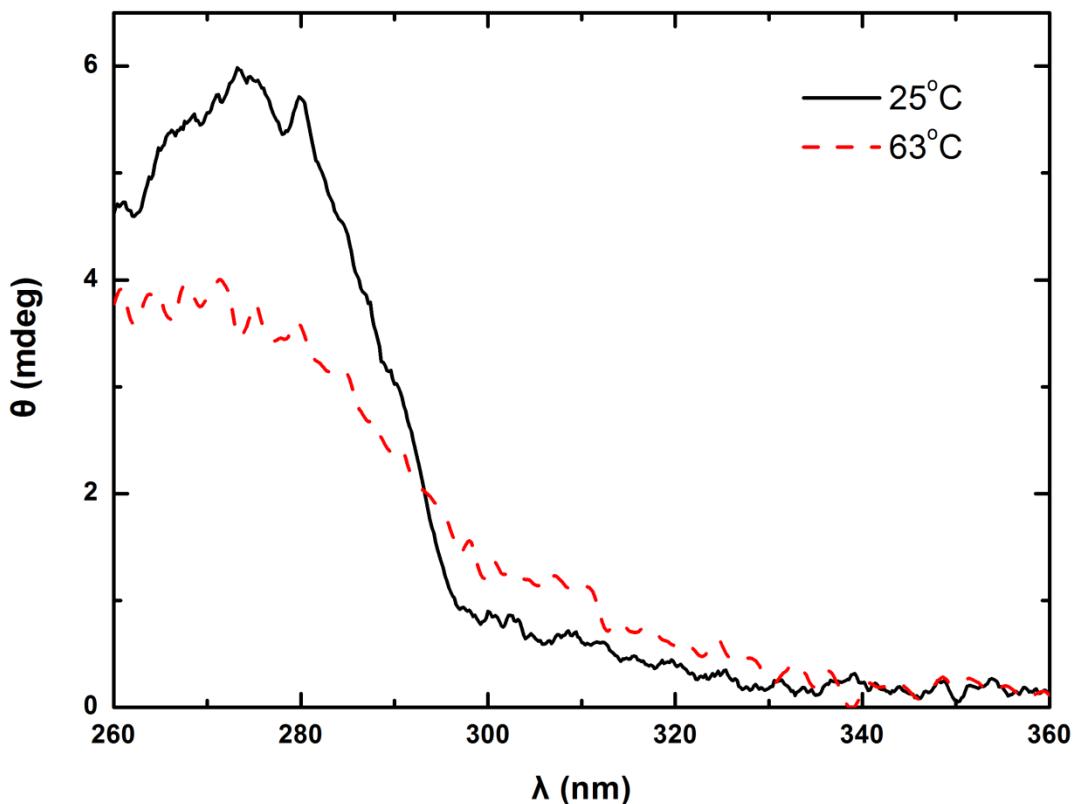
Δύσκολα μπορεί να φανταστεί κανείς να αλλάζει η δευτεροταγής δομή του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού με την αποκοπή των άλλων λειτουργικών περιοχών. Αυτό όμως δεν αποκλείει μεταβολές στη γεωμετρία ιδιαίτερα των β-φύλλων, η στροφή των οποίων έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αύξηση του πλάτους των CD ζωνών της (Sreerama & Woody, 2004a). Τέτοιες μεταβολές μάλιστα ενδεχομένως να συμβαίνουν μεταξύ των κρυσταλλωμένων πρωτεϊνικών μορίων και των πρωτεϊνικών μορίων σε αραιά ιδανικά υδατικά διαλύματα. Το φάσμα του θερμικά μετουσιωμένου $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού ποιοτικά δεν διαφέρει από τα αντίστοιχα της αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος χωρίς τις Ig-like περιοχές. Η διαφορά του ύψους των ζωνών απορρόφησης περί τα 204 nm στην θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση και περί τα 220 nm της ιθαγενούς κατάστασης φαίνεται να εξαλείφεται στο $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι αναδεικνύοντας τη συσχέτιση της διαφοράς αυτής με την απουσία/παρουσία β-φύλλων στις άλλες λειτουργικές περιοχές.

Τα φάσματα της ιθαγενούς και της μετουσιωμένης κατάστασης του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της χιτινάσης-60 στο near UV παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.20. Η συγκέντρωση του πρωτεΐνικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.3 mg/ml. Στο TIM-βαρέλι της χιτινάσης-60 απομένουν 39 αρωματικά κατάλοιπα σε ποσοστό 12.1% με 6 λιγότερες τρυπτοφάνες

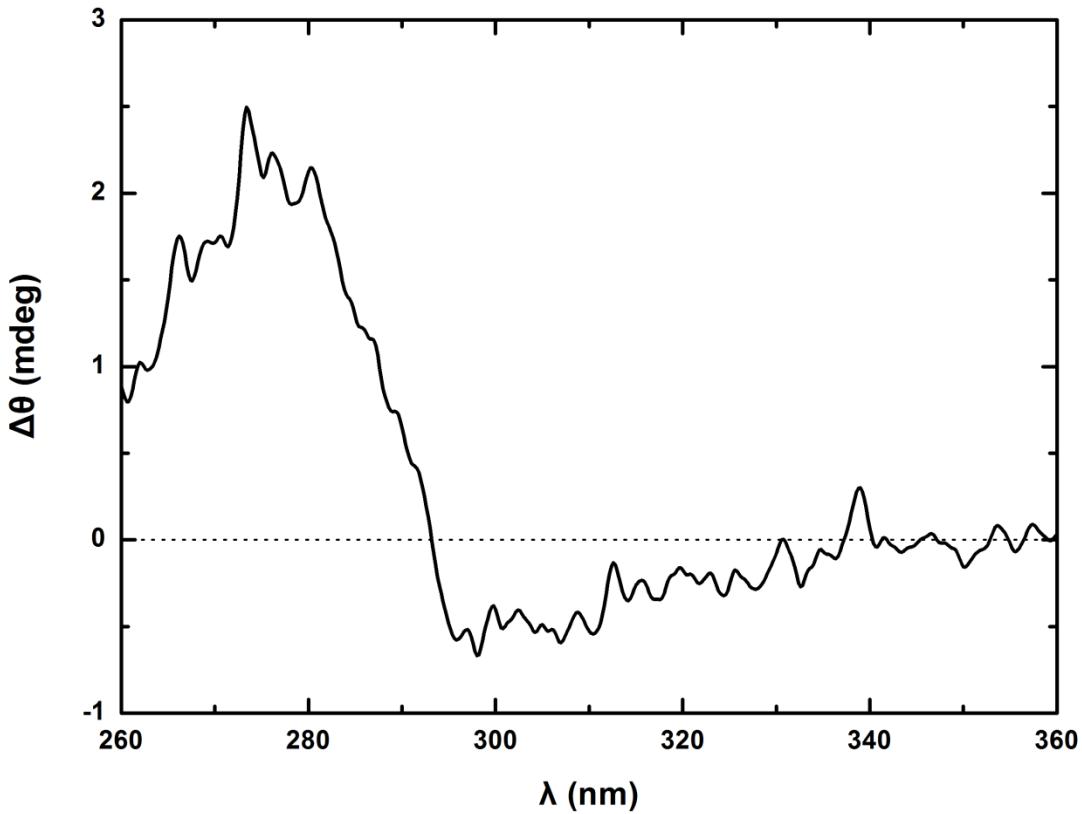
και μια λιγότερη τυροσίνη σε σχέση με το εκφρασμένο χωρίς τις Ig-like περιοχές μετάλλαγμα. Παρόλα αυτά διακρίνει κανείς στο φάσμα της ιθαγενούς κατάστασης του μεταλλάγματος μια περισσότερο και μια λιγότερο ξεκάθαρη ασθενή κορυφή στα 268 και στα 262 nm, αντίστοιχα, που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε μεταβάσεις φαινυλαλανινών. Γενικά η παρουσία τους καταδεικνύει το καλό «πακετάρισμά» τους στην 3-D δομή των πρωτεϊνικών μορίων (Pain, 2005). Το φάσμα του θερμικά μετουσιωμένου βαρελιού εμφανίζει επίσης ένα ασθενέστερο σήμα σε σχέση με αυτό της ιθαγενούς κατάστασης. Στο Σχήμα 4.21 η αφαίρεση των φασμάτων των δύο μεταλλάγματων με τη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στο εδάφιο του κυκλικού διχροϊσμού του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* δείχνει ενδιαφέρουσα. Οι έντονες αρνητικές μπάντες στα 273.2 και στα 280 nm είναι πολύ πιθανό να οφείλονται στην μετάβαση της μιας και μοναδικής τυροσίνης που βρίσκεται στην πρωτεϊνική περιοχή πρόσδεσης και πλέον απουσιάζει στο μετάλλαγμα του TIM-βαρελιού.



Σχήμα 4.19: Κανονικοποιημένα φάσματα CD στην περιοχή Far UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής μαύρη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (διακεκομμένη μαύρη γραμμή) 0.1 mg/ml του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της *MmChi60* σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 mm. Αντιπαραβάλλονται τα φάσματα της αγρίου τύπου *MmChi60* στους 25 °C (διακεκομμένη συνοδευόμενη από δύο στικτές πράσινη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (μικρού μήκους διακεκομμένη πράσινη γραμμή) και του μεταλλάγματος *MmChi60-[Ig-like domains]* στους 25 °C (στικτή κόκκινη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (διακεκομμένη συνοδευόμενη από μία στικτή κόκκινη γραμμή).



Σχήμα 4.20: Φάσματα CD στην περιοχή near UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής μαύρη γραμμή) και της μετουσιωμένης κατάστασης στους 63 °C (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή) 0.3 mg/ml του $(\beta\alpha)_8$ *MmChi60* σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 10 mm.

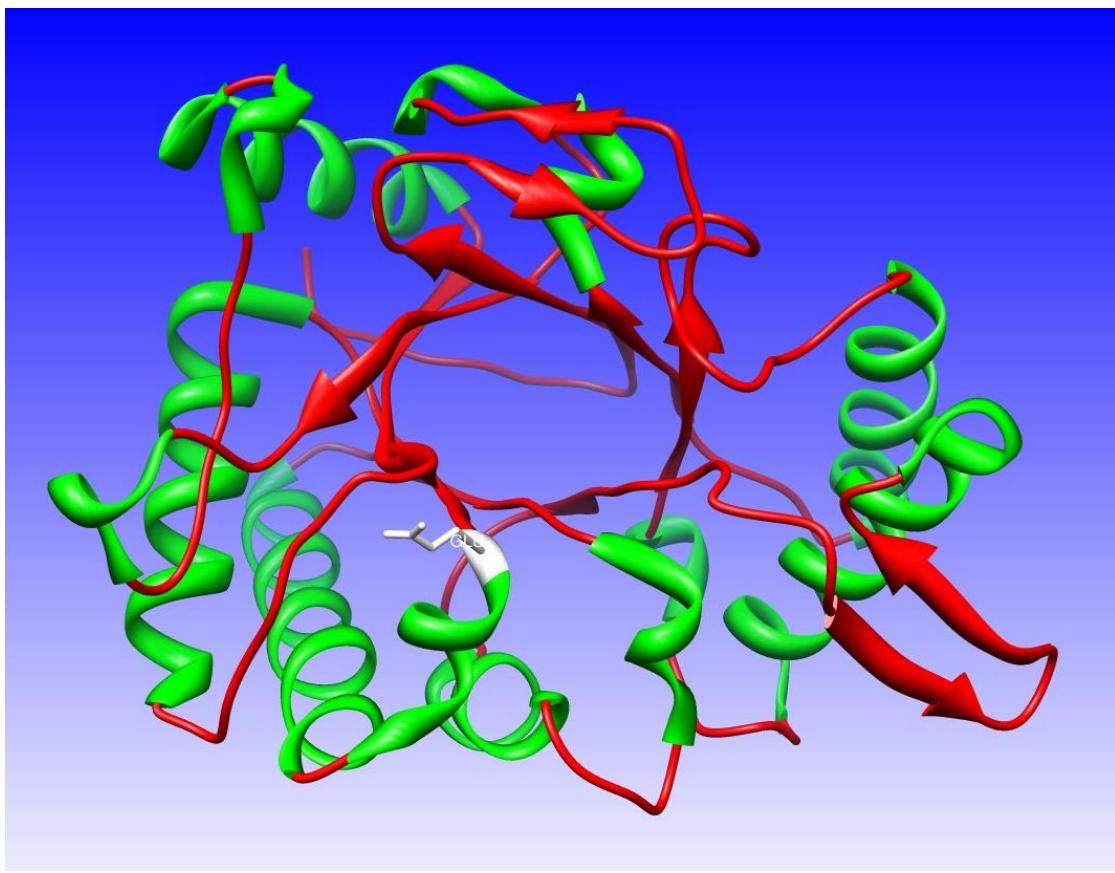


Σχήμα 4.21: Διαφορά των φασμάτων στο near UV των μεταλλαγμάτων της χιτινάσης-60 *MmChi60-[Ig-like domains]* και TIM βαρελιού στις ιθαγενείς τους καταστάσεις (25°C). Τα φάσματα πριν την αφαίρεση κανονικοποιήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των πρωτεΐνικών διαλυμάτων σε mol/l (M) και ανά αρωματικό κατάλοιπο. Οι έντονες αρνητικές μπάντες στα 273.2 και στα 280 nm είναι πολύ πιθανό να οφείλονται στην μετάβαση της μιας και μοναδικής τυροσίνης που βρίσκεται στην πρωτεΐνική περιοχή πρόσδεσης και πλέον απονοσιάζει στο μετάλλαγμα του TIM-βαρελιού.

4.2.7. Θερμική μετουσίωση του σημειακού μεταλλάγματος E153Q με εφαρμογή DSC

Οπως έχει ήδη έχει αναφερθεί, στην οικογένεια 18 των γλυκοζιτικών υδρολασών υπάρχει ένα συντηρημένο μοτίβο καταλοίπων που σχηματίζουν το καταλυτικό κέντρο των ενζύμων (DXDXE, όπου D=ασπαρτικό οξύ, E=γλουταμινικό οξύ και X=κάποιο άλλο αμινοξύ) στην καταλυτική πρωτεΐνική περιοχή του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού. Το αμινοξικό κατάλοιπο του γλουταμινικό οξύ είναι το ο δότης του απαιτούμενου πρωτονίου για την υδρόλυση του $\beta(1 \rightarrow 4)$ γλυκοζιτικού δεσμού στη χιτίνη. Αυτός είναι και ο λόγος που η σημειακή μετάλλαξη σ' αυτή τη θέση του καταλοίπου του γλουταμινικού οξέος στις ψευδοχιτινάσες στερεί την ενζυμική χιτινολιτική δραστικότητά τους όχι όμως και την ικανότητα πρόσδεσής τους στη χιτίνη με μεγάλη συγγένεια μιας και τα συντηρημένα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα του βαρελιού που εκφράζουν δομικά την ικανότητας πρόσδεσης παραμένουν ανεπηρέαστα (Schimpl et al., 2012). Στο Σχήμα 4.22 φαίνεται με λευκό χρώμα το υπό αντικατάσταση αμινοξικό κατάλοιπο στο $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι της χιτινάσης-60.

Τις μεταβολές που προκαλεί η αντικατάσταση του «κρίσιμου» γλουταμινικού οξέος από τη γλουταμίνη, δηλαδή η σημειακή μετάλλαξη E153Q, στη χιτινάση-60 μελετήσαμε με DSC και CD. Με μεθόδους μοριακής βιολογίας εκφράστηκε το σημειακό μετάλλαγμα *MmChi60E153Q*.



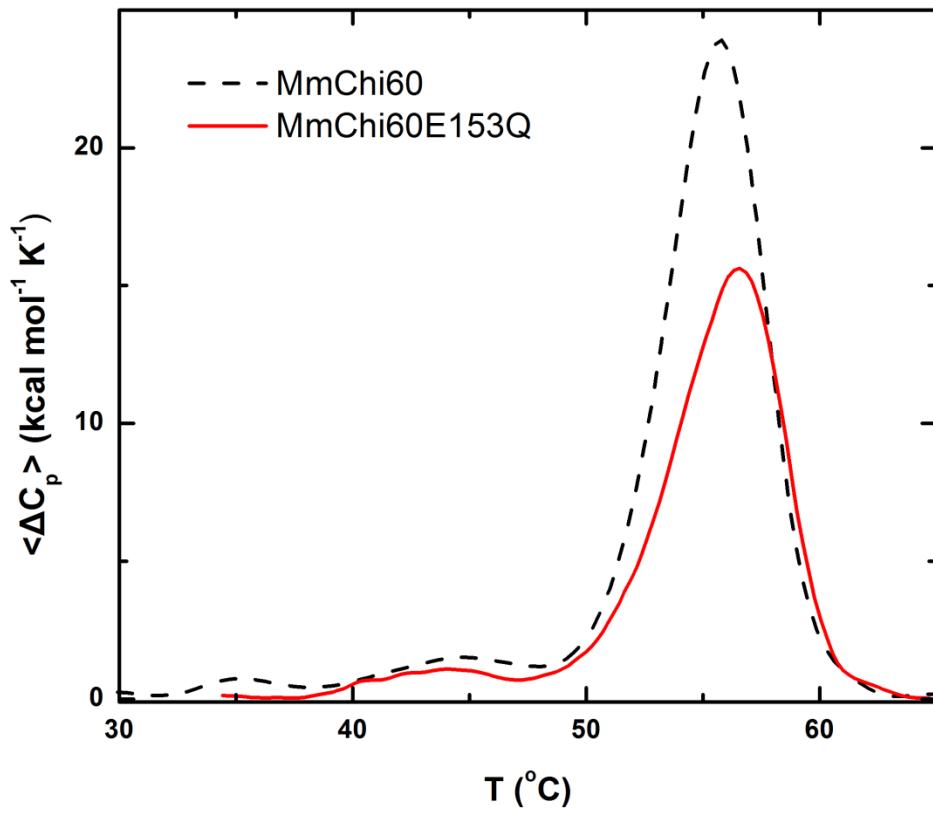
Σχήμα 4.92: Ταινιωτή αναπαράσταση της κρυσταλλογραφική δομής της καταλυτικής περιοχής της *MmChi60* (Malecki et al., 2013). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι α-έλικες και με κόκκινο χρώμα τα β-φύλλα του βαρελιού. Με λευκό χρώμα απεικονίζεται το αμινοξικό κατάλοιπο του γλουταμινικού οξέος στη θέση 153, το οποίο στο σημειακό μετάλλαγμα αντικαθίσταται από μια γλουταμίνη. Η δομή είναι καταχωρημένη στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων (Protein Data Bank) με τον κωδικό, 4HMC. Για την οπτικοποίηση της δομής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα UCSF Chimera 1.7. με τη βοήθεια του οποίου ήταν εφικτή η παρουσίαση μόνο της επιλεγμένης πρωτεϊνικής περιοχής.

Ενδιαφέρουσες μεταβολές επιφέρει η σημειακή μετάλλαξη στη θερμική μετουσίωση της χιτινάσης-60, όπως δείχνει το Σχήμα 4.23. Η θέρμανση έγινε με ρυθμό 90 Deg/hr και η θερμιδομετρική αντιστρεψιμότητα ήταν μεγαλύτερη από 90%. Χρησιμοποιήθηκε μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος 1 mg/ml, με σκοπό να περιορισθούν τα φαινόμενα συσσωμάτωσης, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσίας 1 mM EDTA. Το κύριο χαρακτηριστικό του νέου θερμογράμματος αποτελεί η ελάττωση της ενθαλπίας μετουσίωσης, η οποία πλησιάζει το 30% στην κύρια κορυφή. Το κύριο ενδόθερμο εμφανίζει μεγαλύτερη ασυμμετρία από το αντίστοιχο της αγρίου τύπου και μια μικρή αύξηση της θερμοκρασία T_{max} . Στον Πίνακα 4.5 αντιπαραβάλλονται τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά των θερμικών μεταβάσεων της αγρίου τύπου χιτινάσης-60 και του μεταλλάγματός της E153Q. Η απουσία της χαμηλότερης θερμοκρασίας μετάβασης στη θερμική μετουσίωση του σημειακού μεταλλάγματος πιθανώς οφείλεται στο μικρότερο ενθαλπικό περιεχόμενο της μετάβασης και στην μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 4.5: Αποτελέσματα DSC του μεταλλάγματος E153Q της χιτινάσης-60

| | T_{max} (°C) | ΔH_{cal} (kcal mol ⁻¹) | ΔH_{cal}^{tot} (kcal mol ⁻¹) |
|---------------------|----------------|--|--|
| MmChi60 | 55.8 | 127.8 | 146.0 |
| MmChi60E153Q | 56.6 | 94.8 | 102.3 |

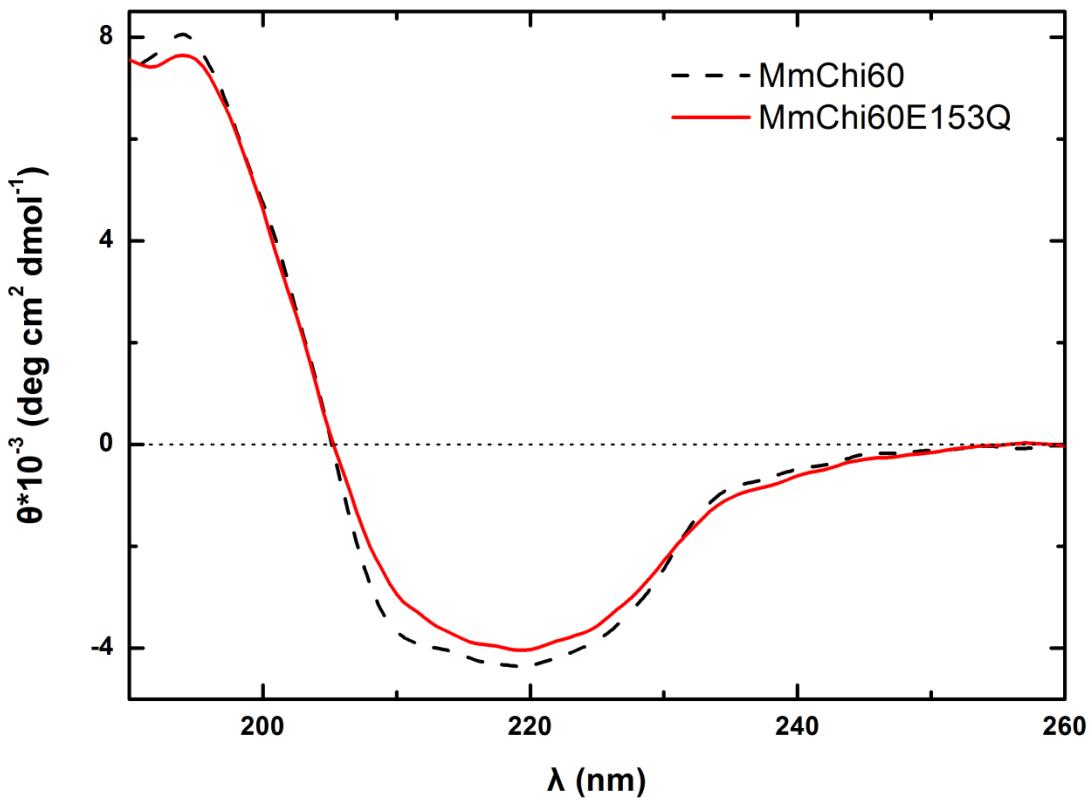
T_{max} : η θερμοκρασία που εμφανίζεται η μέγιστη τιμή $\langle \Delta C_p \rangle_{max}$, ΔH_{cal} : η ενθαλπία μετουσίωσης κύριας κορυφής, ΔH_{cal}^{tot} : η συνολική ενθαλπία μετουσίωσης



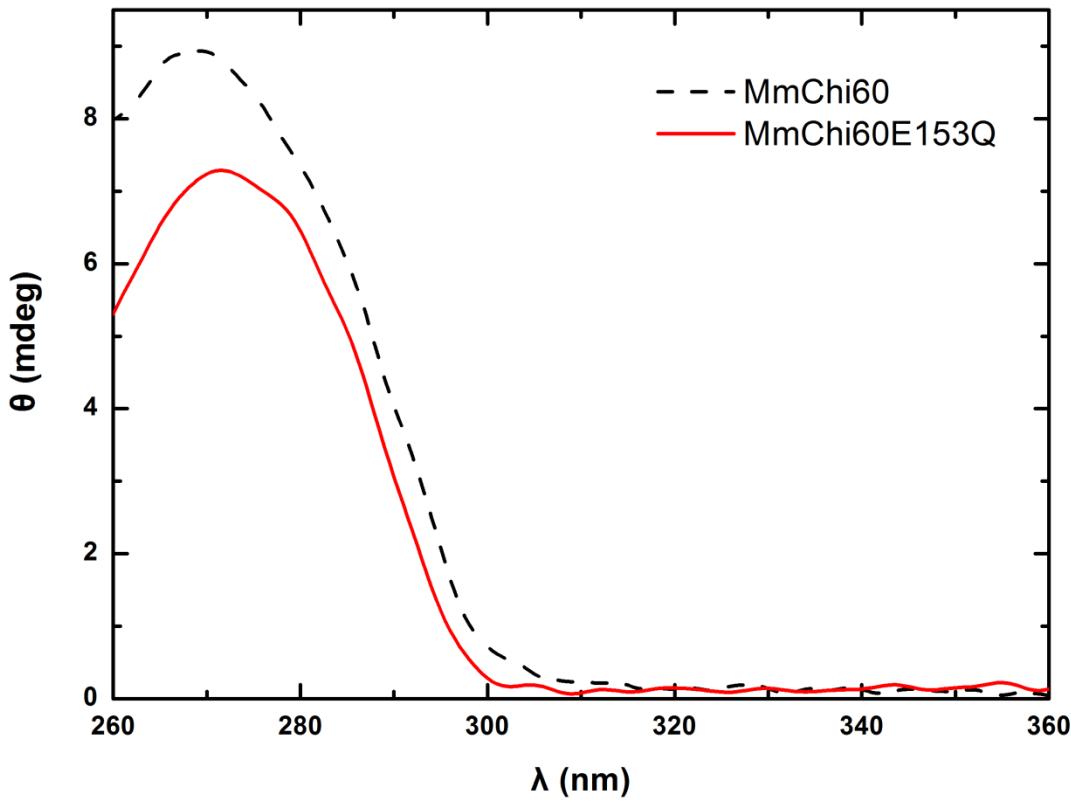
Σχήμα 4.23: Καμπύλη DSC για τη θερμική μετουσίωση 1 mg/ml του μεταλλάγματος E153Q της *MmChi60* σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού νατρίου σε pH 8.0 παρουσία 1 mM EDTA με ρυθμό θέρμανσης 90 Deg/hr (κόκκινη συνεχής καμπύλη). Αντιπαραβάλλεται η DSC καμπύλη της αγρίου τύπου χιτινάσης-60 στον ίδιο ρυθμό θέρμανσης (μαύρη διακεκομμένη καμπύλη).

4.2.8. Θερμική μετουσίωση του σημειακού μεταλλάγματος E153Q με χρήση CD

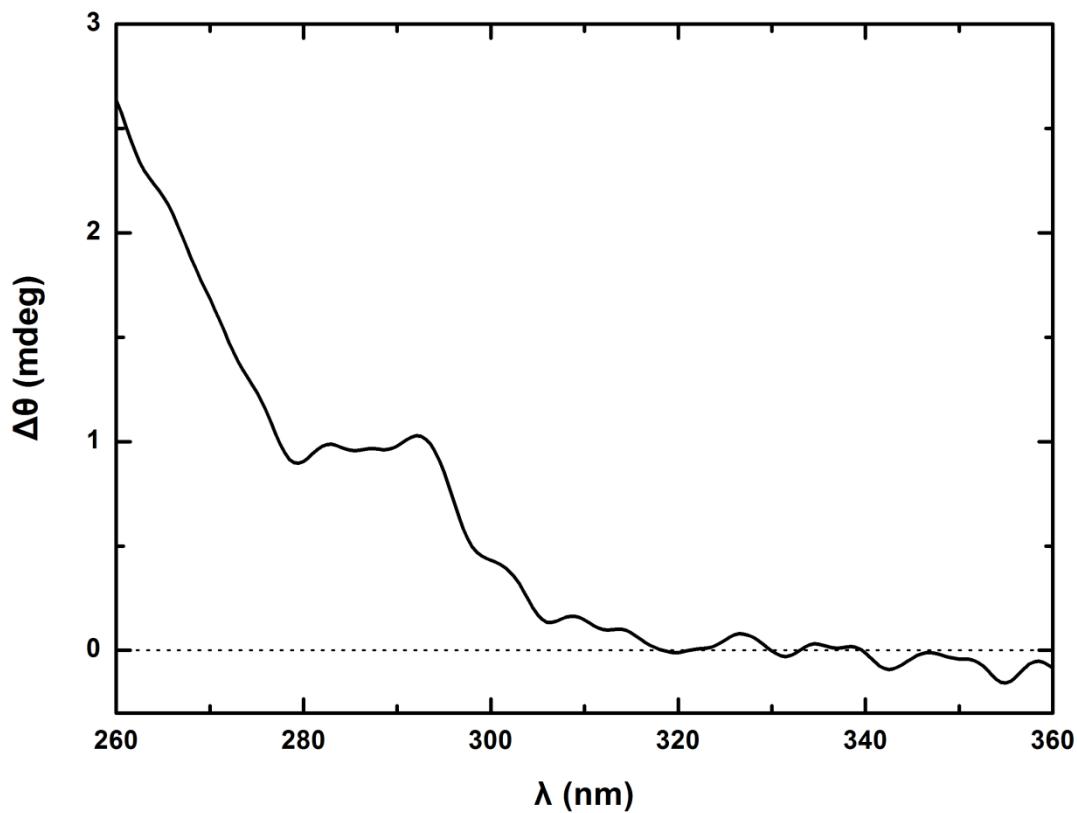
Όπως αποτυπώνουν τα CD φάσματα στο far και στο near UV (Σχήματα 4.24 και 4.25, αντίστοιχα) η σημειακή μετάλλαξη προκαλεί σχετικά μικρές μεταβολές τόσο στη δευτεροταγή όσο και στην τριτοταγή δομή του μορίου. Το γλουταμινικό οξύ-«κλειδί» για την ενζυμική ενεργότητα της χιτινάσης-60 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο και στην χωροδιατακτική διαμόρφωση του μορίου τουλάχιστον στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου του ($\beta\alpha_8$ -βαρελιού). Η μικρή απώλεια στοιχείων δευτεροταγούς δομής που καταγράφεται και οι σαφώς σημαντικότερες μεταβολές στην τριτοταγή δομή του μεταλλάγματος θα μπορούσε να δικαιολογεί την ελάττωση της ενθαλπίας μετουσίωσης αφήνοντας ανοικτό το ενδεχόμενο η μετάλλαξη αυτή να οδηγεί σε τοπική κατάρρευση κάποιου μικρού υδροφοβικού πυρήνα στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου. Παρόλα αυτά η τρισδιάστατη δίπλωση του μεταλλαγμένου πρωτεΐνικου μορίου δείχνει συνολικά να διατηρείται επιβεβαιώνοντας την υπόθεση της ανεξαρτησίας του υδροφοβικού πυρήνα που καθορίζει τη σταθερότητα του ενζύμου και του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Αξιοσημείωτο είναι επίσης πώς η παρουσία ενός καταλοίπου σε κάποιο βρόχο, όπως στην περίπτωση της χιτινάσης-60 του γλουταμινικού οξέος στη θέση 153 στον $\beta\alpha_6$ βρόχο, μπορεί να επιφέρει αλλαγές στη σταθερότητα κάποιων στοιχείων δευτεροταγούς δομής αλλά και του «πακεταρίσματος» αυτών στο χώρο, αναδεικνύοντας το συνεργατικό χαρακτήρα της δίπλωσης των πρωτεΐνων. Τα φάσματα ελήφθησαν με συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος 0.093 mg/ml στο far UV και 0.5 mg/ml στο near UV, 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 mm στο far UV και 1cm στο near UV. Από κάθε φάσμα έχει αφαιρεθεί το φάσμα αναφοράς (20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA, pH 8.0). Τα φάσματα της αγρίου τύπου και του σημειακού μεταλλάγματος της χιτινάσης-60 στο near UV (Σχήμα 4.25) έχουν κανονικοποιηθεί στη ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνικού διαλύματος για να έχει νόημα η σύγκρισή τους. Η διαφορά τους, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.26, εμφανίζει μια ξεκάθαρη κορυφή στα 292.5 nm, η οποία θα μπορούσε να οφείλεται στη μεταβολή του μικροπεριβάλλοντος μιας ή περισσότερων τρυπτοφανών.



Σχήμα 4.24: Κανονικοποιημένο φάσμα CD στην περιοχή far UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής κόκκινη γραμμή) 0.093 mg/ml του μεταλλάγματος E153Q της χιτινάσης-60 σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 mm. Αντιπαραβάλλεται το φάσμα της αγρίου τύπου *MmChi60* στους 25 °C (διακεκομμένη μαύρη γραμμή).



Σχήμα 4.25: Κανονικοποιημένο φάσμα CD στην περιοχή near UV της ιθαγενούς στους 25 °C (συνεχής κόκκινη γραμμή) 0.5 mg/ml του μεταλλάγματος E153Q της χιτινάσης-60 σε 20 mM φωσφορικού νατρίου, 1 mM EDTA σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας κυβέτες χαλαζία οπτικής διαδρομής 10 mm. Αντιπαραβάλλεται το φάσμα της αγρίου τύπου *MmChi60* στους 25 °C (διακεκομμένη μαύρη γραμμή).



Σχήμα 4.26: Διαφορά των φασμάτων στο near UV της αγρίου τύπου *MmChi60* και του σημειακού μεταλλάγματός της E153Q στις ιθαγενείς τους καταστάσεις (25°C). Τα φάσματα πριν την αφαίρεση κανονικοποιήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των πρωτεΐνικών διαλυμάτων σε mol/l (M). Η κορυφή στα 292.5 nm, θα μπορούσε να οφείλεται στη μεταβολή του μικροπεριβάλλοντος μιας ή περισσότερων τρυπτοφανών.

4.3. Χημική μετουσίωση της καταλυτικής περιοχής (βα)₈-βαρέλι της χιτινάσης-60

Η θερμική μετουσίωση του (βα)₈-βαρελιού της χιτινάσης-60 ανέδειξε μια πολύ ενδιαφέρουσα περίπτωση κινητικά ελεγχόμενης μετάβασης αφήνοντας ωστόσο ανοικτό το ζήτημα του μηχανισμού της μετουσίωσης και του προσδιορισμού της θερμοδυναμικής σταθερότητας του πρωτεϊνικού μορίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις η μετρούμενη μη αντιστρεπτότητα οφείλεται στις κινητικά ελεγχόμενες θερμικές μεταβάσεις των πρωτεϊνικών μορίων. Τα μετουσιωμένα πρωτεϊνικά μόρια δεν προλαβαίνουν να μεταπέσουν στην ιθαγενή τους κατάσταση, σε συνθήκες ευνοϊκές για αυτήν, διότι συσσωματώνονται. Σε τέτοιες περιπτώσεις η χημική μετουσίωση αποτελεί εναλλακτική μέθοδο για την ολοκλήρωση της θερμοδυναμικής μελέτης. Οι χημικοί αποδιατακτές εμποδίζουν φαινόμενα συσσωμάτωσης μεταξύ των μετουσιωμένων πρωτεϊνικών μορίων. Επίσης, η αποκατάσταση χημικής ισορροπίας σ' ένα πρωτεϊνικό διάλυμα με την προσθήκη κάποιας ποσότητας χημικού αποδιατακτή απαιτεί χρόνους που κυμαίνονται από χιλιοστά του δευτερολέπτου μέχρι ημέρες. Για το λόγο αυτόν οι χημικές μετουσιώσεις θεωρούνται θερμοδυναμικά ελεγχόμενες διαδικασίες. Το (βα)₈-βαρέλι της χιτινάσης-60 μετουσιώνεται θερμικά χωρίς ενδείξεις συσσωμάτωσης, αλλά η απόλυτη εξάρτηση των θερμιδομετρικών καμπυλών από την κινητική, καθιστά απαγορευτική τη χρήση της θερμοδυναμικής.

Η χημική μετουσίωση διαφαίνεται ως η πειραματική προσέγγιση επιλογής για τη θερμοδυναμική μελέτη της καταλυτικής περιοχής της χιτινάσης-60. Ο χημικός αποδιατακτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν η υδροχλωρική γουανιδίνη. Καταγράφηκαν οι μεταβολές στο φάσμα εκπομπής 300 - 450 nm μετά τη διέγερση των πρωτεϊνικών μορίων στα 295 nm που απορροφούν τα κατάλοιπα της τρυπτοφάνης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υδροχλωρικής γουανιδίνης. Προκαταρκτικά πειράματα με την καθιερωμένη μέθοδο της τιτλοδότησης μικρών ποσοτήτων του χημικού αποδιατακτή σε ένα πρωτεϊνικό διάλυμα κατέδειξαν ότι η χημική μετουσίωση του (βα)₈-βαρελιού είναι μια βραδεία διαδικασία. Οι μεταβολές των φασμάτων στην ίδια συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης ήταν σημαντικές ακόμη και μετά από 5-6 ώρες. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η συστηματική παρατήρησή τους και παρασκευάστηκαν 10 διαλύματα με συγκέντρωση πρω-

τείνης 0.08 – 0.04 mg/ml και υδροχλωρικής γουανιδίνης από 0 – 3 M. Τα φάσματα φθορισμού ελήφθησαν περίπου ανά 24-ωρο σε θερμοκρασία δωματίου και στα ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα τα διαλύματα αποθηκεύονταν σε ειδικά δοχεία (Eppendorf), ώστε να περιορίζονται τα φαινόμενα εξάτμισης, σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους. Το μέσο μήκος κύματος με στατιστικό βάρος την ένταση φθορισμού F_i , δηλαδή $\langle \lambda \rangle = \frac{\sum F_i \lambda_i}{\sum F_i}$ χρησιμοποιήθηκε ως το κατάλληλο μέγεθος για να καταγράψει τις μεταβολές του πληθυσμού των πρωτεϊνικών μορίων στις διάφορες συγκεντρώσεις υδροχλωρικής γουανιδίνης.

Στα Σχήματα 4.27, 4.28 και 4.29 παρουσιάζονται οι μεταβολές του $\langle \lambda \rangle$ συναρτήσει του χρόνου για τιμές υδροχλωρικής γουανιδίνης 1 M, 1.25 ως 2 M και 2.25 M ως 3 M, αντίστοιχα. Ένα σύνθετο προφίλ δύο διεργασιών φαίνεται ξεκάθαρα στις συγκεντρώσεις 1, 1.25, 1.5 και 1.75 M GuaHCl, ενώ λιγότερο ευδιάκριτος είναι ο διαχωρισμός τους στις συγκεντρώσεις 2, 2.25, 2.5, 2.75 και 3 M GuaHCl.

Η χρονικά πρωτοεμφανιζόμενη διεργασία είναι εκθετικού τύπου και καταγράφει την αύξηση των πρωτεϊνικών μορίων στη χημικά μετουσιωμένη κατάσταση. Η δεύτερη εμφανίζεται σε μεγαλύτερο χρόνο στην συγκέντρωση 1.75 M, ενώ στις άλλες συγκεντρώσεις σε μικρότερους χρόνους. Στην ίδια συγκέντρωση, αυτήν των 1.75 M GuaHCl, παρατηρείται και ο μεγαλύτερος χρονικός ρυθμός μεταβολής του $\langle \lambda \rangle$ από την εμβολή της δεύτερης διεργασίας. Η εκθετικού τύπου διεργασία είναι μονο-εκθετική, όπως δείχνει η ικανοποιητική προσαρμογή των πειραματικών σημείων στο μοντέλο μιας αντιστρεπτής 2-καταστάσεων μετάβασης. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η χρονική εξάρτηση του $\langle \lambda \rangle$ περιγράφεται από την σχέση $\langle \lambda \rangle = \langle \lambda \rangle_\infty - (\langle \lambda \rangle_\infty - \langle \lambda \rangle_0) \cdot e^{-k_{app} \cdot t}$, όπου $\langle \lambda \rangle_0$, $\langle \lambda \rangle_\infty$ η τιμή του $\langle \lambda \rangle$ όταν $t \rightarrow 0$, $\langle \lambda \rangle_\infty$ η τιμή του $\langle \lambda \rangle$ όταν $t \rightarrow \infty$, δηλαδή η τιμή ισορροπίας του $\langle \lambda \rangle$, σε κάθε συγκέντρωση του χημικού αποδιατακτή και k_{app} ο φαινόμενος ρυθμός προσέγγισης της ισορροπίας που ισούται με το άθροισμα των ρυθμών «ξεδιπλώματος» $k_{N \rightarrow D}$ και «δίπλωσης» $k_{D \rightarrow N}$ των πρωτεϊνικών μορίων, δηλαδή $k_{app} = k_{N \rightarrow D} + k_{D \rightarrow N}$. Οι τιμές $\langle \lambda \rangle_0$ για τις συγκεντρώσεις 1.25, 1.5 και 1.75 M συγκλίνουν σε μια τιμή (347.5 ± 0.1) nm. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η απόκλιση των προσδιοριζόμενων από τις

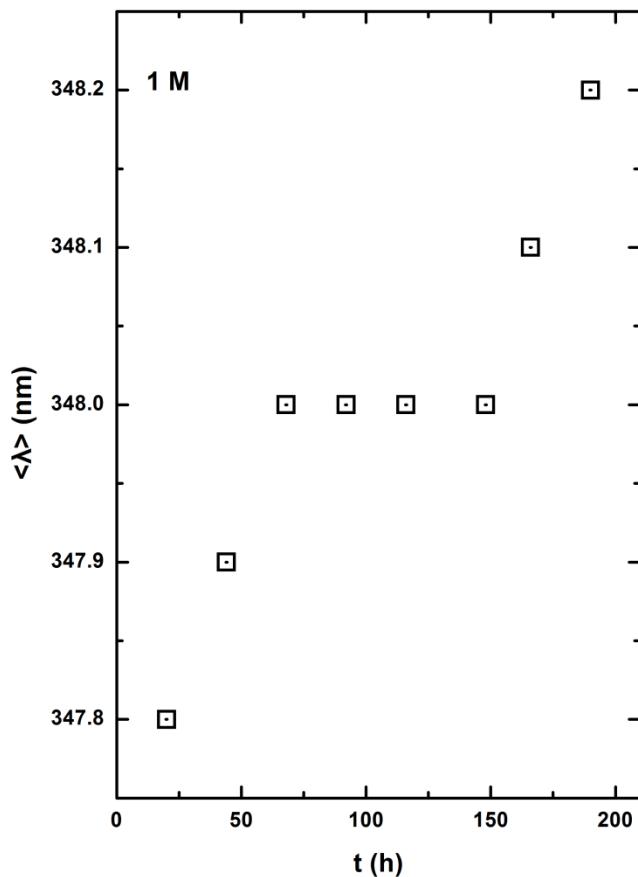
προσαρμογές τιμές είναι μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση και αποκλίνει από 0.4 nm για 2 M GuaHCl μέχρι 2 nm στα 3 M χημικού αποδιατακτή. Στα Σχήματα 4.28 και 4.29 φαίνονται οι προσαρμογές των πειραματικών δεδομένων που αφορούν στην 1^η διεργασία με την τιμή $\langle \lambda \rangle_0 = 347.5 \text{ nm}$ να συμπεριλαμβάνεται στις συγκεντρώσεις από 2 έως 3 M. Στον Πίνακα 4.6 καταγράφονται τα προσδιοριζόμενα από την προσαρμογή με τα σφάλματα $\delta \langle \lambda \rangle_0$, $\delta \langle \lambda \rangle_\infty$ και δk_{app} , των αντίστοιχων μεγεθών, ενώ στο Σχήμα 4.30 φαίνονται συγκεντρωτικά οι καμπύλες προσαρμογής στο μονο-εκθετικό μοντέλο των πειραματικών δεδομένων για τις συγκεντρώσεις GuaHCl από 1.25-3 M. Στις συγκεντρώσεις 1.25-1.75 M έχει συμπεριληφθεί η τιμή $\langle \lambda \rangle_0 = 347.5 \text{ nm}$, η παρουσία της οποίας αφήνει αμετάβλητες τις τιμές των προσδιοριζόμενων από την προσαρμογή μεγεθών.

Στην συγκέντρωση χημικού αποδιατακτή 1 M η αποκατάσταση της ισορροπίας λαμβάνει χώρα ταχέως και η παρατηρούμενη μεταβολή του $\langle \lambda \rangle$ είναι 0.2 nm, τιμή που βρίσκεται στα όρια του πειραματικού σφάλματος και η προσαρμογή των πειραματικών σημείων στο μοντέλο κινητικής στερείται νοήματος. Στην συγκέντρωση των 0.5 M GuaHCl η ισορροπία αποκαθίσταται εντός του χρονικού διαστήματος των 20 ωρών στο τέλος του οποίου πραγματοποιήθηκε η πρώτη μέτρηση, καθώς και η επόμενη μέτρηση έδειξε την σταθερή τιμή $\langle \lambda \rangle = 348 \text{ nm}$.

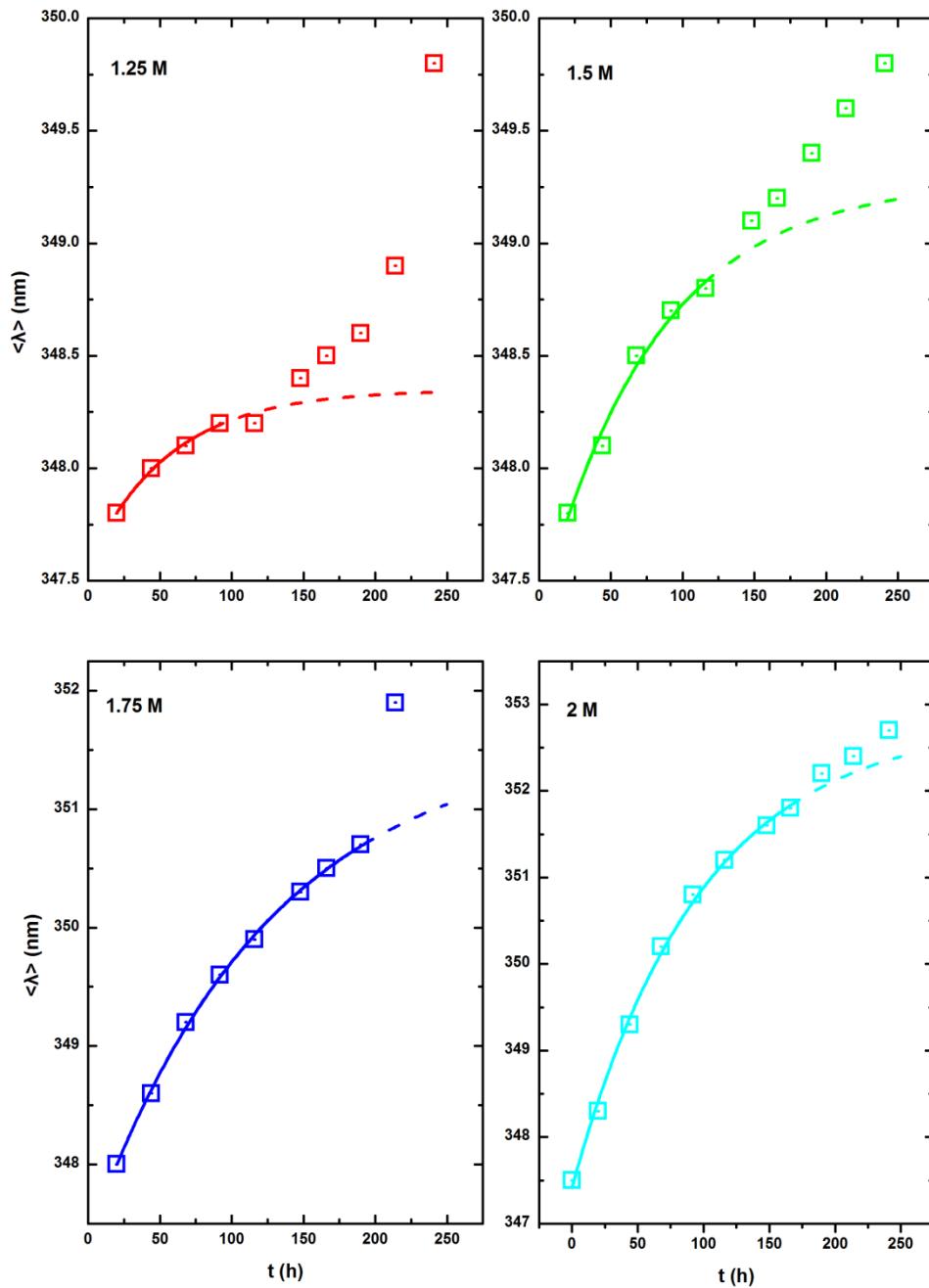
Τέλος, η τιμή $\langle \lambda \rangle = 348.8 \text{ nm}$ που μετρήθηκε στο άνευ GuaHCl πρωτεΐνικό διάλυμα 20 h μετά την παρασκευή του διαλύματος φαίνεται ότι δεν αντιστοιχεί στην τιμή του $\langle \lambda \rangle$ της ιθαγενούς κατάστασης, η οποία προσδιορίστηκε παραπάνω $\langle \lambda \rangle_0 = 347.5 \text{ nm}$. Η ελάττωση του καταγραφόμενου $\langle \lambda \rangle_0$ και εν συνεχείᾳ η αύξησή του με την προσθήκη μικρής ποσότητας χημικού αποδιατακτή σε μια πρωτεΐνική μετουσίωση δεν γίνεται εύκολα κατανοητή. Έχει όμως παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, είναι πιθανόν ότι η πέραν της πρωτεΐνικής μετουσίωσης διεργασία αφορά στον πληθυσμό των πρωτεΐνικών μορίων που δεν βρίσκονται στην ιθαγενή κατάσταση όπως επίσης και στην διάρκεια της παρουσίας τους εντός του πειραματικού χρόνου. Είναι πιθανό ότι σχετίζονται με φαινόμενα συσσωμάτωσης πρωτε-

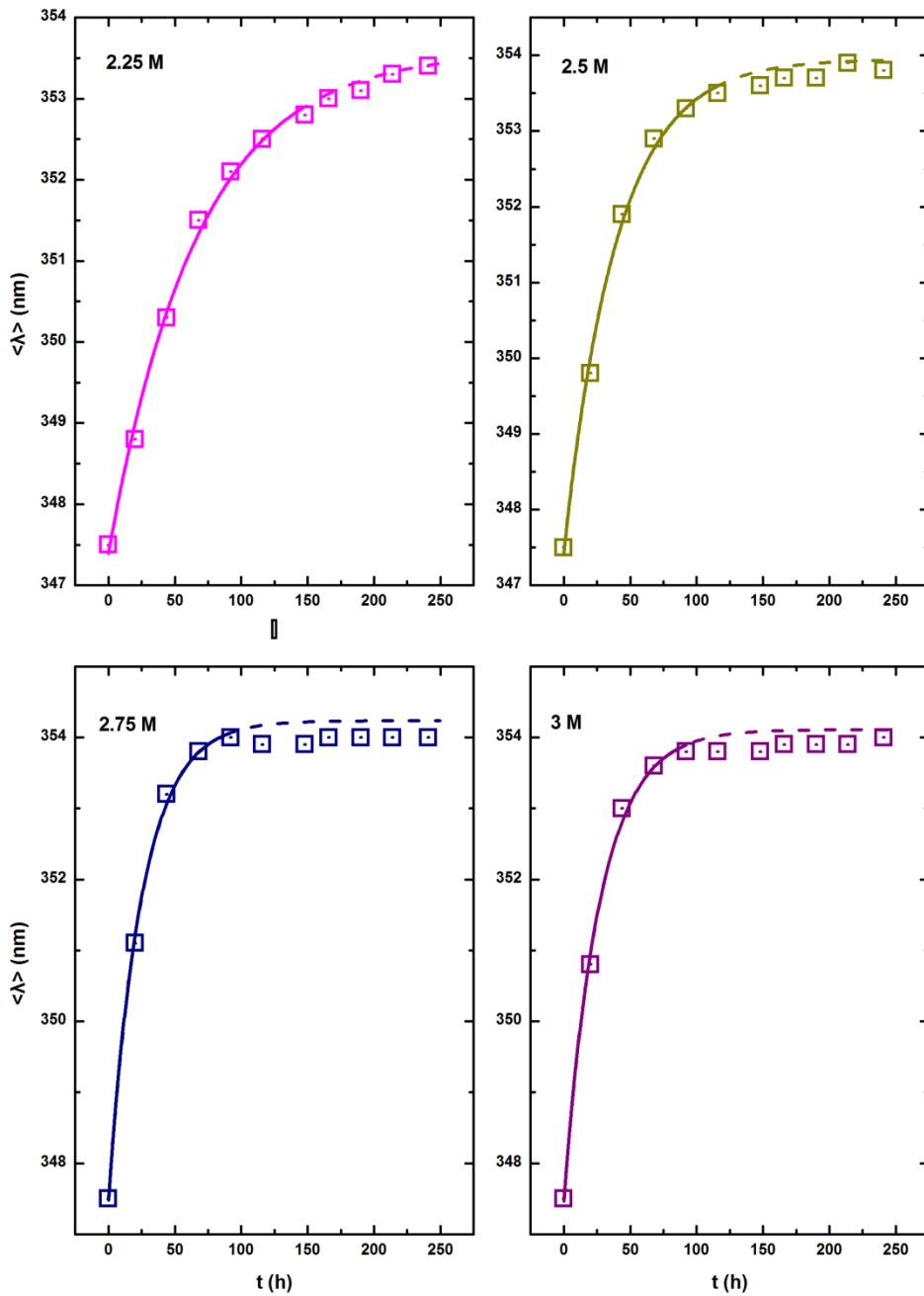
τηνικών μορίων τα οποία στις υψηλότερες συγκεντρώσεις χημικού αποδιατακτή εμποδίζονται. Ισως για το λόγο αυτό και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις GuaHCl η παρουσία της δεύτερης διεργασίας δεν επηρεάζει σημαντικά τα δεδομένα.



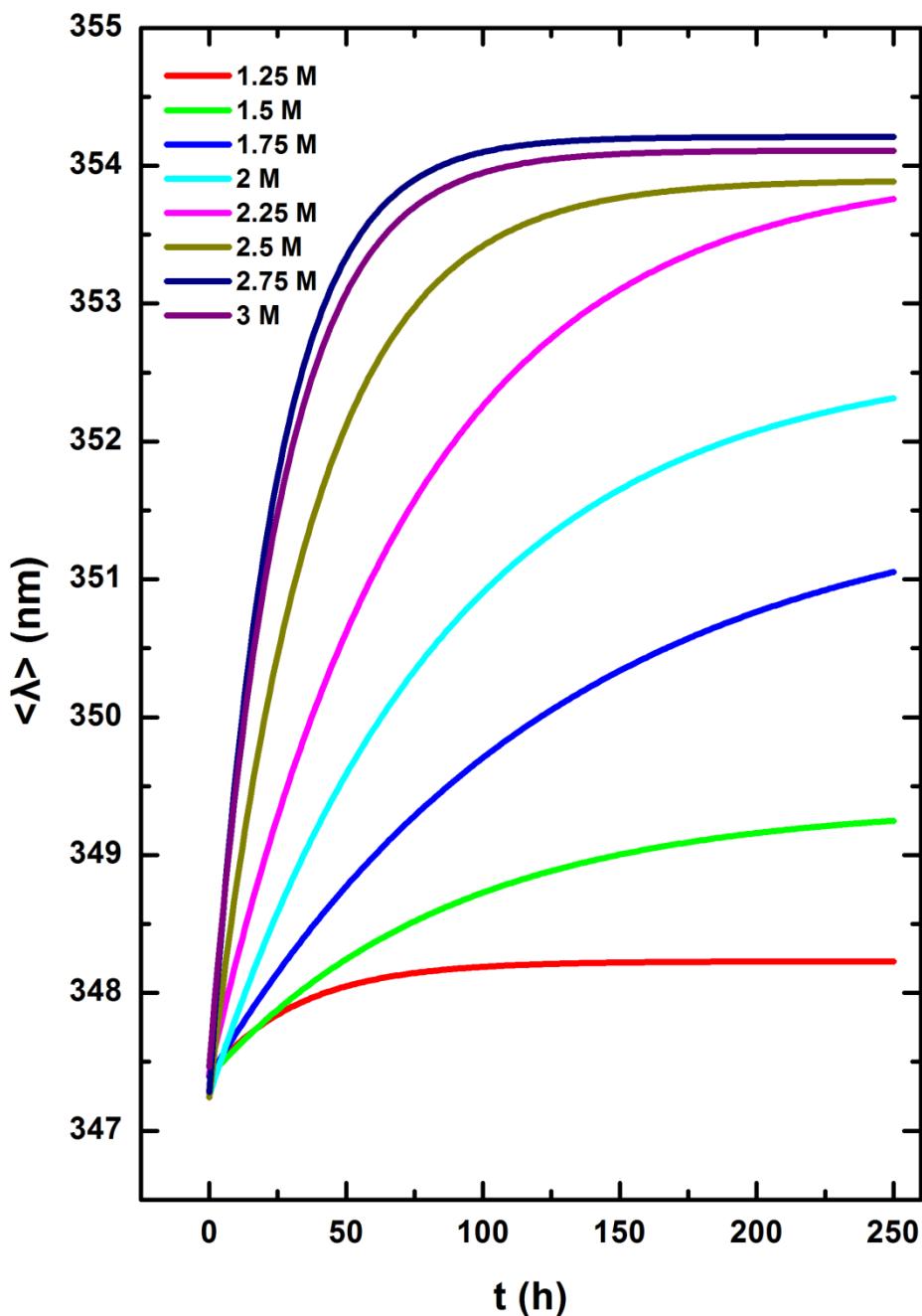
Σχήμα 4.27: Μεταβολή του $\langle \lambda \rangle$ των φασμάτων εκπομπής συναρτήσει του χρόνου σε συγκεντρώσεις GuaHCl 1 M (μαύρα τετράγωνα).



Σχήμα 4.28: Μεταβολή του $\langle \lambda \rangle$ των φασμάτων εκπομπής συναρτήσει του χρόνου σε συγκεντρώσεις GuaHCl 1.25 M (κόκκινα τετράγωνα), 1.5 M (πράσινα τετράγωνα), 1.75 M (μπλε τετράγωνα), 2 M (κυανά τετράγωνα). Στο σχήμα φαίνονται επίσης οι προσαρμογές των δεδομένων της χημικής μετουσίωσης στο μονο-εκθετικό μοντέλο (συνεχείς καμπύλες) και οι προεκβολές τους μέχρι τις 250 h (διακεκομμένες καμπύλες).



Σχήμα 4.29: Μεταβολή του $\langle \lambda \rangle$ των φασμάτων εκπομπής συναρτήσει του χρόνου σε συγκεντρώσεις GuaHCl 2.25 M (πορφυρά τετράγωνα), 1.5 M (σκούρου κίτρινου τετράγωνα), 1.75 M (σκούρου μπλε τετράγωνα), 2 M (μπορντό τετράγωνα). Στο σχήμα φαίνονται επίσης οι προσαρμογές των δεδομένων της χημικής μετουσίωσης στο μονο-εκθετικό μοντέλο (συνεχείς καμπύλες) και οι προεκβολές τους μέχρι τις 250 h (διακεκομμένες καμπύλες).



Σχήμα 4.30: Καμπύλες προσαρμογής στο μονο-εκθετικό μοντέλο της μεταβολής του $\langle\lambda\rangle$ των φασμάτων εκπομπής συναρτήσει του χρόνου σε συγκεντρώσεις GuaHCl 1.25 M (κόκκινο), 1.5 M (πράσινο), 1.75 M (μπλε), 2 M (κυανό), 2.25 M (πορφυρό), 2.5 M (σκούρο κίτρινο), 2.75 M (σκούρο μπλε) και 3 M (μπορντό).

Πίνακας 4.6: Κινητικές παράμετροι χημικής μετουσίωσης με φασματοσκοπία φθορισμού του (βα)₈ βαρελιού της MmChi60 (μονο-εκθετικό μοντέλο)³

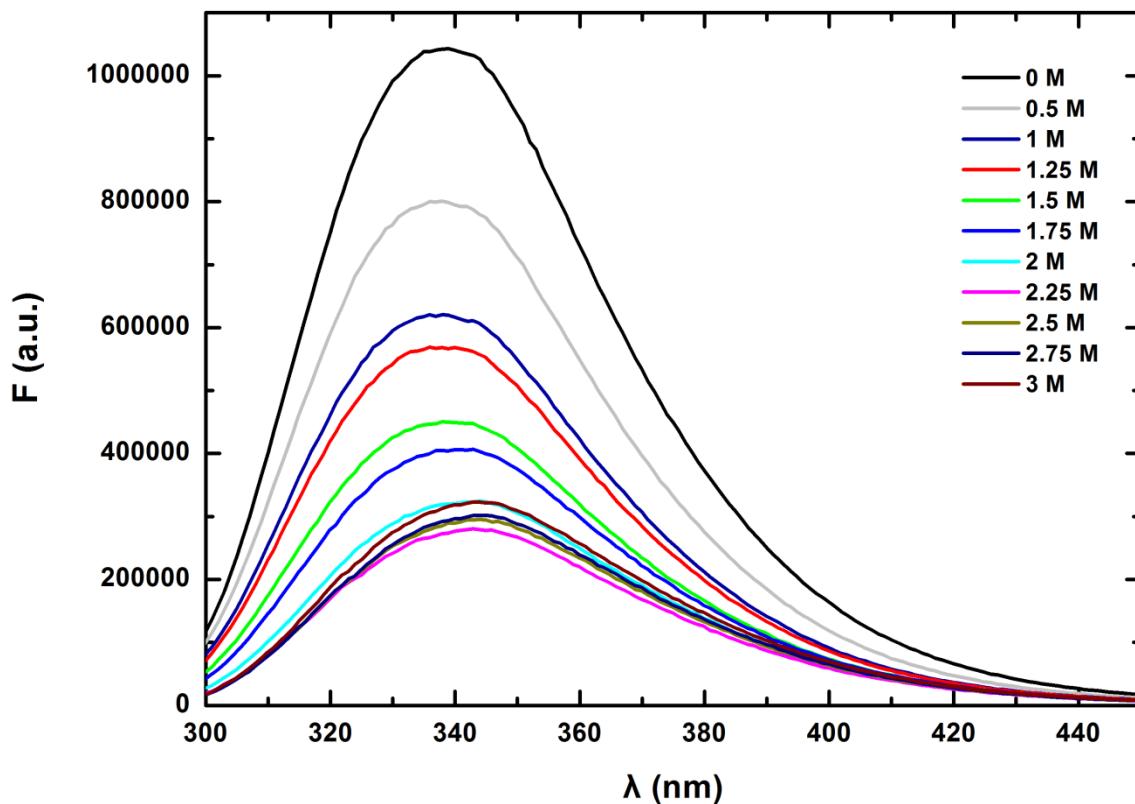
| $C_{GuaHCl} (M)$ | $\langle \lambda \rangle_0 (nm)$ | $\delta\langle \lambda \rangle_0 (nm)$ | $\langle \lambda \rangle_\infty (nm)$ | $\delta\langle \lambda \rangle_\infty (nm)$ | $k_{app} (hr^{-1})$ | $\delta k_{app} (hr^{-1})$ |
|------------------|----------------------------------|--|---------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|
| 0 | - | - | 347.5 | - | - | - |
| 0.5 | - | - | 348.0 | - | - | - |
| 1 | - | - | 348.0 | - | - | - |
| 1.25 | 347.6 | 0.1 | 348.3 | 0.1 | 0.017 | 0.006 |
| 1.5 | 347.4 | 0.2 | 349.3 | 0.4 | 0.012 | 0.006 |
| 1.75 | 347.4 | 0.1 | 351.6 | 0.1 | 0.0080 | 0.0006 |
| 2 | 347.4 | 0.1 | 352.8 | 0.3 | 0.0103 | 0.0001 |
| 2.25 | 347.4 | 0.1 | 353.6 | 0.3 | 0.015 | 0.002 |
| 2.5 | 347.4 | 0.2 | 353.9 | 0.2 | 0.025 | 0.003 |
| 2.75 | 347.5 | 0.1 | 354.2 | 0.1 | 0.040 | 0.003 |
| 3 | 347.5 | 0.2 | 354.1 | 0.2 | 0.037 | 0.004 |

$\langle \lambda \rangle_\infty$: η τιμή του $\langle \lambda \rangle$ όταν $t \rightarrow \infty$, δηλαδή η τιμή ισορροπίας του $\langle \lambda \rangle$, k_{app} ο φαινόμενος ρυθμός προσέγγισης της ισορροπίας, $\delta\langle \lambda \rangle_\infty$ και δk_{app} , τα σφάλματά τους αντίστοιχα και C_{GuaHCl} : η συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης σε M.

Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του Σχήματος 4.30 και τις τιμές του Πίνακα 4.6, η χημική μετουσίωση του (βα)₈-βαρελιού της χιτινάσης-60 είναι πάρα πολύ αργή με χρόνους ημίσειας ζωής πουν ξεπερνούν και τις 6 ημέρες.

Στο Σχήμα 4.31 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής στις διάφορες συγκεντρώσεις GuaHCl που πλησιάζουν περισσότερο την ισορροπία (ο χρόνος αντιστοιχεί στο τελευταίο πειραματικό σημείο του εκθετικού τμήματος των καμπυλών $\langle \lambda \rangle$ vs t). Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν στην αρχική συγκέντρωση του πρωτεΐνικου διαλύματος 0.08 mg/ml. Είναι εμφανής η μετατόπιση του «κέντρου βάρους» των καμπυλών προς μεγαλύτερα μήκη κύματος λόγω της έκθεσης των τρυποφανικών καταλοίπων στο διαλύτη. Η χημικά μετουσιωμένη κατάσταση χαρακτηρίζεται επίσης από μικρότερη ένταση φθορισμού σε σχέση με την ιθαγενή κατάσταση.

³ Χάρη πληρότητας έχουν συμπεριληφθεί και οι τιμές του $\langle \lambda \rangle_\infty$ στις συγκεντρώσεις 0, 0.5 και 1 M Gua-HCl που δεν έχουν προκύψει από προσαρμογή (περισσότερες λεπτομέρειες στο κείμενο)



Σχήμα 4.31: Κανονικοποιημένα ως προς τη στην αρχική συγκέντρωση του πρωτεΐνικου διαλύματος 0.08 mg/ml φάσματα εκπομπής στις διάφορες συγκεντρώσεις GuaHCl. Τα φάσματα είναι τα πλησιέστερα στην ισορροπία που ελήφθησαν κατά την πειραματική διαδικασία μετά από χρόνο που αντιστοιχεί στο τελευταίο πειραματικό σημείο του εκθετικού τμήματος των καμπυλών $\langle\lambda\rangle$ vs t.

Στο Σχήμα 4.32 φαίνεται οι μεταβολες $\langle\lambda\rangle_\infty$ vs C_{GuaHCl} που συνθέτουν μια τυπική καμπύλη πρωτεϊνικής μετουσίωσης. Γενικά για όποια παράμετρο για την παρακολούθηση μιας πρωτεϊνικής μετουσίωσης, οι χαρακτηριστικές της ιθαγενούς και της μετουσιωμένης κατάστασης τιμές της παραμέτρου y_N και y_D στην περιοχή της μετάβασης μπορούν να εξαχθούν προεκτείνοντας τις γραμμικές περιοχές της καμπύλης μετουσίωσης προς τις υψηλές και τις χαμηλές συγκεντρώσεις αποδιατακτή, αντίστοιχα. Για έναν μηχανισμό μετουσίωσης δύο-καταστάσεων, $f_N + f_D = 1$ και $y = y_N f_N + y_D f_D$, όπου f_N και f_D τα κλάσματα του πρωτεΐνικου πληθυσμού στην ιθαγενή και την μετουσιωμένη κατάσταση, αντίστοιχα. Συνδυάζοντας τις εξισώσεις αυτές

έχουμε $f_D = (y - y_N)/(y_D - y_N)$ και $f_N = (y - y_N)/(y_D - y)$. Έτσι η σταθερά ισορροπίας, K_{ND} , και η ελεύθερη ενέργεια μετουσίωσης, ΔG_{ND} , μπορούν να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας τις σχέσεις $K_{ND} = f_D/f_N = (y - y_N)/(y_D - y)$ και $\Delta G_{ND} = -RT\ln(K_{ND})$ (Pace, 1986).

Για την περίπτωση μιας χημικής μετουσίωσης η σταθερότητα της N ως προς την D, $\Delta G_{ND}([0])$, τυπικά υπολογίζεται μετρώντας το $\Delta G_{ND}([C])$ ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του αποδιατακτή [C] και προεκτείνοντας στο $[C]=0$ χρησιμοποιώντας την μέθοδο της γραμμικής προέκτασης (LEM). Η εξαρτώμενη από την συγκέντρωση μεταβολή στη σταθερότητα της ιθαγενούς κατάστασης, $\Delta G_{ND}([C])$ για τις σφαιροειδείς πρωτεΐνες είναι συνήθως μια γραμμική συνάρτηση του [C]. Έτσι $\Delta G_{ND}([C]) = \Delta G_{ND}([C]) + m[C]$, όπου $m = \partial\Delta G_{ND}([C])/\partial[C]$ είναι μια σταθερά, που έχει επικρατήσει να αποκαλείται ως η m-τιμή (O'Brien et al., 2009). Συνδυάζοντας τις παραπάνω εξισώσεις συσχετίζονται οι τιμές της παραμέτρου $\langle\lambda\rangle_\infty$ με τις συγκεντρώσεις του χημικού αποδιατακτή [C] σε μία έκφραση

$$\langle\lambda\rangle_\infty = \frac{(\langle\lambda\rangle_\infty^N + m_N[C]) + (\langle\lambda\rangle_\infty^D + m_D[C])\exp\{-m([C] - [C]_m)/RT\}}{1 + \exp\{-m([C] - [C]_m)/RT\}}$$

με τα $\langle\lambda\rangle_\infty^N$, $\langle\lambda\rangle_\infty^D$, m_N , m_D , m και $[C]_m$ να αποτελούν τις παραμέτρους προσαρμογής.

Οι παράμετροι m_N , m_D είναι οι m-τιμές των προεκβολών των σταθμών αναφοράς πριν και μετά την περιοχή μετάβασης και οι παράμετροι $\langle\lambda\rangle_\infty^N$, $\langle\lambda\rangle_\infty^D$ αναφέρονται στις αντίστοιχες τιμές τους στο $[C]=0$ (Santoro & Bolen, 1988).

Στο Σχήμα 4.32 φαίνεται η μη γραμμική προσαρμογή ελαχίστων τετραγώνων στην παραπάνω εξίσωση. Προσδιορίστηκαν οι σταθερές $[C]_m = 1.657 \pm 0.044 M$ και $m = 4.088 \pm 0.974 kcal mol^{-1} K^{-1}$. Από τις σταθερές αυτές υπολογίζεται η θερμοδυναμική σταθερότητα του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού της χιτινάσης-60 $\Delta G_{ND}([C]) = 6.744 \pm 1.624 kcal/mol$. Στο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε υπεισέρχονται ως παράμετροι και οι κλίσεις των

σταθμών αναφοράς πριν και μετά την περιοχή μετάβασης, m_N και m_D , αντίστοιχα. Οι τιμές βρέθηκαν $m_N = 0.4 \pm 0.3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ και $m_D = 0.9 \pm 0.4 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Η απόκλιση της υπολογιζόμενης τιμής της παραμέτρου m από την προβλεπόμενη από τη βιβλιογραφία τιμή $7.248 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Myers et al., 1995) ενδεχομένως υποδεικνύει ότι οι τιμές του $\langle \lambda \rangle_\infty$ στην περιοχή μετάβασης μάλλον υποεκτιμήθηκαν.

Στο Σχήμα 4.33 φαίνονται οι μεταβολές του $\ln k_{app}$ vs C_{GuaHCl} . Τέτοια διαγράμματα είναι γνωστά ως “chevron plot” (η μορφή τους θυμίζει στρατιωτικό σιρίτι) και προκύπτουν από πειραματικές τεχνικές κινητικής μελέτης πρωτεϊνικών μετουσιώσεων. Το χαμηλότερο σημείο του γραφήματος όπου $C_{GuaHCl} \approx 1.75 M$ αντιστοιχεί στην τιμή $C_{1/2}$, όπου $k_{app} \approx k_{N \rightarrow D}/2 \approx k_{D \rightarrow N}/2$. Η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη κατά 5.5% από αυτήν που υπολογίσθηκε από την σιγμοειδή καμπύλη του Σχήματος 4.32. Η μικρή απόκλιση επιβεβαιώνει έναν μηχανισμό κινητικής της χημικής μετουσιώσης του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της χιτινάσης-60 2-καταστάσεων. Παρά τον μικρό αριθμό πειραματικών σημείων κυρίως για $C_{GuaHCl} < 1.75 M$ επιχειρήθηκε προσαρμογή στο μοντέλο κινητικής 2-καταστάσεων.

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό (Fersht, 1999) το διάγραμμα του λογαρίθμου του ρυθμού ξεδιπλώματος k_u vs της συγκέντρωσης C του αποδιατακτή έχει βρεθεί για πολλές πρωτεΐνες να είναι σχεδόν γραμμικό για $C > C_{1/2}$:

$$\ln k_u = \ln k_u^{H_2O} + m_{k_u} C$$

όπου $k_u^{H_2O}$ είναι η τιμή της προεκβολής απουσία αποδιατακτή.

Για κάποιες επίσης πρωτεΐνες ο ρυθμός δίπλωσης k_u ακολουθεί μια παρόμοια εξάρτηση για $C < C_{1/2}$

$$\ln k_f = \ln k_f^{H_2O} - m_{k_f} C$$

Οι δύο καμπύλες σχηματίζουν μια καμπύλη σχήματος V , η αποκαλούμενη διάγραμμα chevron, συντιθέμενη από το συνδυασμό των ρυθμών:

$$\ln k_{app} = \ln \left(k_f^{H_2O} \exp(-m_{k_f} C) + k_u^{H_2O} \exp(m_{k_u} C) \right)$$

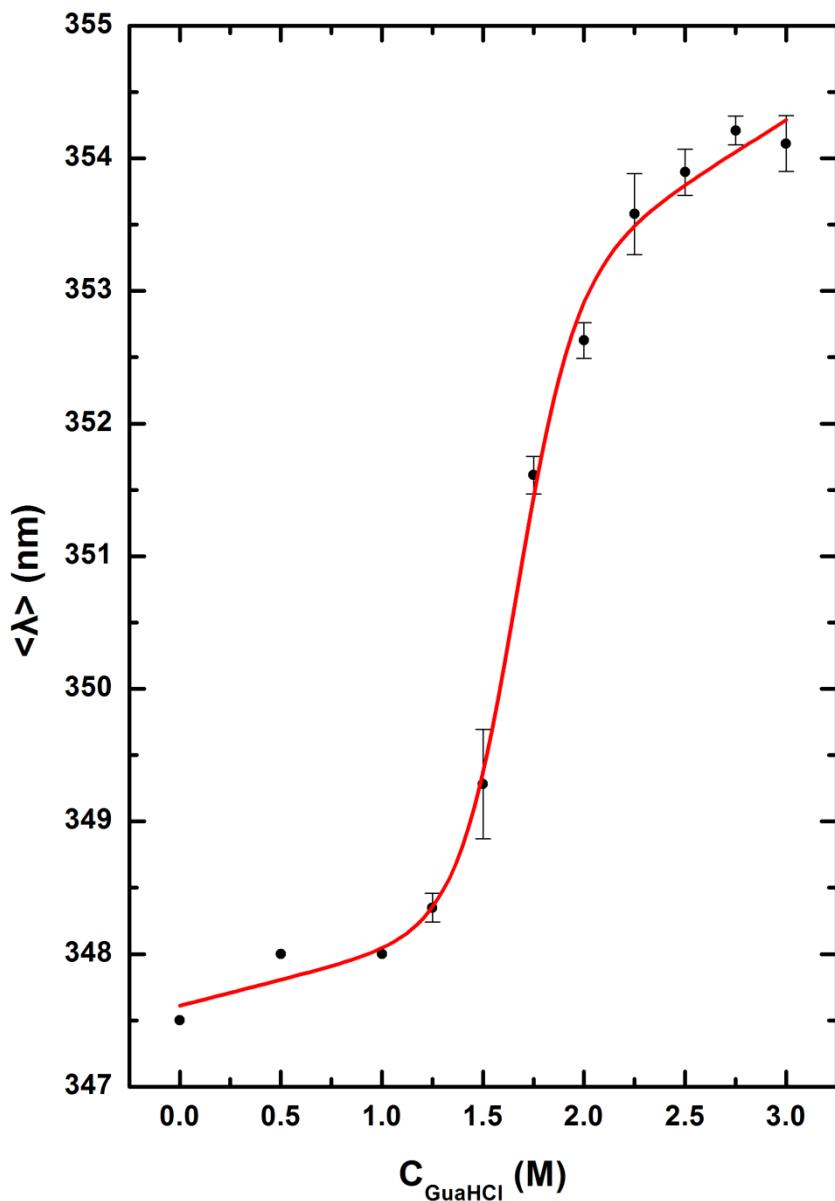
Στο Σχήμα 4.33 η συνεχής καμπύλη δείχνει την προσαρμογή των δεδομένων στο προαναφερθέν μοντέλο. Το σημείο που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση $C_{GuaHCl} = 3 M$ έχει

εξαιρεθεί από την προσαρμογή διότι εμφανώς αποκλίνει σημαντικά από την εν γένει συμπεριφορά. Η απόκλιση αυτή ενδεχομένως σχετίζεται με μεταβολές που αφορούν την χημικά μετουσιωμένη κατάσταση του συστήματος. Η προσαρμογή δείχνει ιδιαίτερα ικανοποιητική στην περιοχή μετά τη συγκέντρωση των 1.75 M GuaHCl. Από την άλλη, η παρατηρούμενη απόκλιση στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων GuaHCl ενδεχομένως σχετίζεται με την παρουσία κάποιου ενδιάμεσου, εντός ή εκτός της διαδρομής ιθαγενούς-μετουσιωμένης κατάστασης. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανόν ο πρωτεϊνικός πληθυσμός που καταλαμβάνει την ενδιάμεση κατάσταση να σχετίζεται με την εμφάνιση της πέραν της χωροδιατακτικής μετάβασης κινητικής διεργασίας που διαπιστώθηκε.

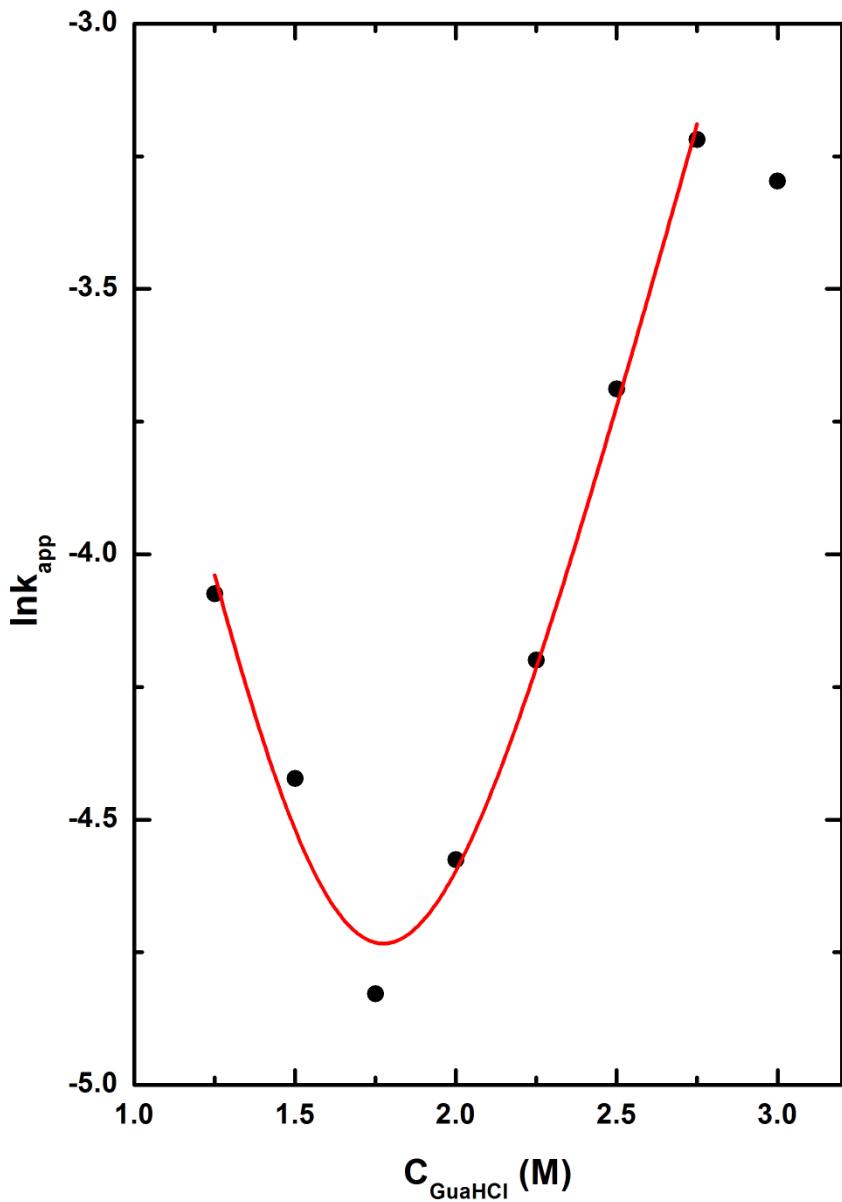
Η μεταβολή του πρωτεϊνικού πληθυσμού στη χημικά μετουσιωμένη κατάσταση λόγω της παρουσίας μιας κατά τα φαινόμενα μη αντιστρεπτής διεργασίας αυξάνει το $\langle \lambda \rangle$ σε όλες τις περιπτώσεις που γίνεται εμφανής στα πειραματικά δεδομένα. Όμως ο ρυθμός αύξησης διαφοροποιείται ανάλογα με την συγκέντρωση του αποδιατακτή στο πρωτεϊνικό διάλυμα και όπως αναφέραμε γίνεται μέγιστη στα 1.75 M GuaHCl. Μια πιθανή ερμηνεία του φαινομένου είναι η εξής: Η ελάττωση του πρωτεϊνικού πληθυσμού στη μετουσιωμένη κατάσταση επιφέρει μετά την αποκατάσταση της χημικής ισορροπίας κάποια ελάττωση του $\langle \lambda \rangle$, οποία όμως αντισταθμίζεται και με το παραπάνω από την μεγαλύτερη αύξηση $\langle \lambda \rangle$ που προκαλεί ο πληθυσμός που μετέχει στην μη αντιστρεπτή διεργασία. Στα 1.75 M GuaHCl όπως προκύπτει και από την προηγηθείσα ανάλυση ο μέσος χρόνος ζωής είναι μέγιστος και ως εκ τούτου η αποκατάσταση της νέας ισορροπίας καθυστερεί περισσότερο από κάθε άλλη συγκέντρωση και η αντιστάθμιση στην αύξηση του $\langle \lambda \rangle_{\mu\eta\text{ ant.}}$ επιτυγχάνεται σε μικρότερο βαθμό. Μια δυναμική ισορροπία φαίνεται να λαμβάνει χώρα μεταξύ των $\langle \lambda \rangle_{\mu\eta\text{ ant.}}$ και $\langle \lambda \rangle_{\text{isop.}}$ με το $\langle \lambda \rangle_{\mu\eta\text{ ant.}}$ να τείνει σε μια σταθερή τιμή πλησίον της $\langle \lambda \rangle_{\text{isop.}}$. Αυτή η σύγκλιση θα μπορούσε να εξηγεί το λόγο για τον οποίο στις μεγάλες συγκεντρώσεις η διάκριση των φαινομένων είναι δυσχερής.

Το ασυνήθιστα υψηλό χρονικό διάστημα αποκατάστασης χημικής ισορροπίας που χαρακτηρίζει την μετουσίωση του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της χιτινάσης-60 με GuaHCl υποδεικνύει ότι ένα πολύ υψηλό ενεργειακό φράγμα χωρίζει την ενεργειακή στάθμη των πρωτεϊνικών

μορίων στην ιθαγενή κατάσταση από την ενεργειακή στάθμη των μορίων στην μεταβατική κατάσταση.



Σχήμα 4.32: Μεταβολή του μέσου μήκους κύματος με στατιστικό βάρος την ένταση φθορισμού στην κατάσταση ισορροπίας προσδιορισμένη από την προσαρμογή της χρονικής εξέλιξης του μεγέθους σε ένα μονο-εκθετικό μοντέλο (τιμές στίλης $\langle \lambda \rangle_\infty$ του Πίνακα 4.6) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της GuaHCl. Τα σφάλματα έχουν προκύψει από την ίδια προσαρμογή. Η κόκκινη καμπύλη αναπαριστά την προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο ισορροπίας 2-καταστάσεων.



Σχήμα 4.33: Μεταβολή του λογαρίθμου του ρυθμού της χημικής μετουσίωσης του $(\beta\alpha)_8$ βαρελιού της χιτινάσης-60 σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του χημικού αποδιατακτή. Οι τιμές του k_{app} είναι αυτές που αναγράφονται στην αντίστοιχη στήλη του Πίνακα 4.6). Η μορφή του είναι τυπική ενός διαγράμματος Chevron (θυμίζει στρατιωτικό σιρίτι). Η κόκκινη καμπύλη αναπαριστά την προσαρμογή των δεδομένων στο κινητικό μοντέλο 2-καταστάσεων.

4.4. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η αδυναμία προσέγγισης της DSC καμπύλης ισορροπίας κατά τη θερμική μετουσίωση της χιτινάσης-60 και της καταλυτικής περιοχής της δεν επέτρεψε τον προσδιορισμό της θερμοδυναμικής τους σταθερότητας. Η πρωτεϊνική περιοχή που επιβάλει τον κινητικό έλεγχο των θερμικών μεταβάσεων είναι το TIM βαρέλι, όπως δείχνουν οι θερμικές μετουσιώσεις της ιθαγενούς μορφής της χιτινάσης-60 και των μεταλλαγμάτων της. Τα πειράματα αυτά έδειξαν καταρχήν ότι το TIM βαρέλι της χιτινάσης-60 είναι μια σταθερή πρωτεϊνική περιοχή. Επιπλέον έδειξαν ότι η φαινόμενη θερμοσταθερότητα του TIM-βαρελιού σε όλους τους ρυθμούς θέρμανσης διατηρείται πρακτικά ίδια, ανεξαρτήτως αν κάποια άλλη πρωτεϊνική περιοχή είναι ή δεν είναι προσαρτημένη πάνω του. Τέτοιο είδος αυτονομίας δε διαθέτει το TIM βαρέλι της χιτινάσης A καθώς, όπως αποδεικνύουν τα θερμιδομετρικά δεδομένα, η «αφαίρεση» της α+β παρεμβαλλόμενης περιοχής σε αυτό, είναι καθοριστική τόσο για τη σταθερότητα του μορίου όσο και τη θερμοσταθερότητά του (Zees et al., 2009). Από την άλλη, η ενθαλπία της θερμικής μετουσίωσης του βαρελιού φαίνεται εξαιρετικά ευαίσθητη στις προσαρτημένες στο βαρέλι περιοχές μιας και η απουσία των Ig-like περιοχών την αυξάνει εντυπωσιακά, σχεδόν κατά 75%. Δεν γνωρίζουμε κατά πόσο η δυνατότητα επιμήκυνσης της πρόσβασης της καταλυτικής περιοχής στο υπόστρωμα του ενζύμου με την παρουσία των Ig-like περιοχών ρυθμίζει τη θερμοδυναμική σταθερότητα του συστήματος με τρόπο μοναδικό για να είναι ενεργό το πρωτεΐνικό μόριο στις φυσιολογικές συνθήκες. Είναι αξιοσημείωτο πάντως ότι οι Ig-like περιοχές συνδέονται στην φερόμενη ως περιοχή που προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό τη θερμοδυναμική σταθερότητα των $(\beta/\alpha)_8$ -βαρελιών. Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα υπολογιστικών μοντέλων (protein docking) για τη χιτινάση-60 έχουν δείξει μια εντυπωσιακή ευκαμψία της «ουράς» του TIM-βαρελιού της σε ένα γωνιακό εύρος $\sim 64^\circ$. Ενδεχομένως η παρουσία αυτής ουράς μειώνει τον αριθμό ή την ισχύ των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων είτε στην περιοχή αυτή είτε σε ολόκληρο το βαρέλι. Ο μειωμένος αριθμός ή η μειωμένη ισχύς των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων φαίνεται να αποτελεί κοινό τόπο στα ψυχρόφιλα ένζυμα και θεωρείται αποτέλεσμα της εξέλιξης. Θεωρείται μάλιστα ότι έτσι εξασφαλίζεται η απαραίτητη «πλαστικότητα» των ψυχρόφιλων ενζύμων για να λειτουργούν στις χαμηλές θερμοκρασίες (Feller & Gerday, 2003), (D'Amico et al., 2005).

Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν διαμορφώσει ένα προτεινόμενο μοντέλο δομής-λειτουργίας για τις προερχόμενες από ψυχρόφιλα βακτήρια πρωτεΐνες. Σύμφωνα με αυτό ο πυθμένας της χοάνης του ενεργειακού ανάγλυφου για τα ψυχρόφιλα ένζυμα είναι ανώμαλος και απεικονίζει έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών διαμορφώσεων με μικρά ενεργειακά φράγματα να χωρίζουν τη μία κατάσταση από την άλλη. Η πρόσδεση στο υπόστρωμα ενός μέρους του πρωτεϊνικού πληθυσμού που καταλαμβάνει μια κατάσταση περισσότερο ευνοϊκή για αυτή την πρόσδεση μετατοπίζει τον υπόλοιπο πληθυσμό προς αυτήν κατάσταση. Αυτές οι χωροδιατακτικές μεταβάσεις απαιτούν μικρές ενθαλπικές μεταβολές αλλά πολύ μεγαλύτερες εντροπικές (Feller, 2010). Η ποικιλία των χωροδιατακτικών διαμορφώσεων της χιτινάσης-60 στην ιθαγενή της κατάσταση δείχνει να επιβεβαιώνει αυτό το μοντέλο.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι της χιτινάσης-60 αναδεικνύεται ως μια αυτόνομη πρωτεϊνική περιοχή με μεταβαλλόμενα χαρακτηριστικά, η οποία θα μπορούσε να αξιοποιηθεί από την πρωτεϊνική μηχανική σε ένα ρόλο plug in and play, δανειζόμενοι τον τεχνικό όρο της πληροφορικής, σε διάφορες εφαρμογές.

Η ανάλυση της κινητικής εξάρτησης της θερμικής μετουσίωσης του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της χιτινάσης-60 αποκάλυψε ένα υψηλό ενεργειακό φράγμα μεταξύ της ιθαγενούς και της θερμικά μετουσιωμένης κατάστασης. Η μη αντιστρεψιμότητα της μετάβασης που διαπιστώθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος 49-54 °C αντανακλά στην αδυναμία υπερπήδησης του φράγματος των πρωτεϊνικών μορίων στη διαδρομή D→N στη χρονική κλίμακα διεξαγωγής των DSC πειραμάτων και όχι στις συνήθως εμφανιζόμενες συσσωματώσεις. Οι περιπτώσεις πρωτεϊνικών θερμικών μετουσιώσεων με θερμιδομετρική αλλά όχι θερμοδυναμική αντιστρεψιμότητα δεν είναι συνηθισμένες (Grinberg et al., 2000), (Kaushik et al., 2002). Οι ρυθμοί επαναδίπλωσης της θερμικά μετουσιωμένης πρωτεΐνης PCP-OSH είναι τόσο μικροί που στη χρονική κλίμακα των DSC πειραμάτων οδηγούν σε μια φαινόμενη μη αντιστρεψιμότητα με την απουσία ενδόθερμης κορυφής στη δεύτερη θέρμανση που γίνεται για τον έλεγχο της θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας. Η αποθήκευση του πρωτεϊνικού διαλύματος για 36 h μετά τη θερμική του μετουσίωση αποκαλύπτει μια πλήρη ανάκτηση του DSC ενδόθερμου (Kaushik et al., 2002). Η πρωτεΐνη PCP-OSH α-

νήκει στην κατηγορία των υπερθερμόφιλων πρωτεΐνων (λειτουργούν σε ακραίες θερμοκρασίες, πλησίον των 100°C) οι οποίες εμφανίζουν εξαιρετικά αργά φαινόμενα κινητικής στις θερμικές μετουσιώσεις. Ηπιότερα φαινόμενα κινητικής εξάρτησης κατά τη θερμική μετουσίωση μια άλλης χιτινάσης, της θερμόφιλης χιτινάσης-40, έχουν παρατηρηθεί. Η δομή της δεν έχει λυθεί, αλλά προβλέπεται με βάση τη δομή άλλων χιτινασών της ίδιας οικογένειας ότι αποτελεί ένα TIM-βαρέλι με μια $\alpha+\beta$ παρεμβαλλόμενη περιοχή. Τα φαινόμενα T_m 's των ενδόθερμων της χιτινάσης-40 στους ρυθμούς θέρμανσης $90 - 10 \text{ Deg/hr}$ παρουσιάζουν μια μετακίνηση 2°C vs 5°C της χιτινάσης-60. Τα φαινόμενα T_m 's των ενδόθερμων της χιτινάσης-40 συγκλίνουν καθώς ελαττώνεται ο ρυθμός θέρμανσης και αποδεικνύεται ότι το DSC θερμόγραμμα στο ρυθμό θέρμανσης των 10 Deg/hr συμπίπτει ικανοποιητικά με το ενδόθερμο ισορροπίας που λαμβάνεται από την προεκβολή των πειραματικών αποτελεσμάτων σε μηδενικό ρυθμό θέρμανσης (Pyrgassopoulos et al., 2006). Η σύγκλιση αυτή δεν επιτυγχάνεται κατά τη θερμική μετουσίωση του TIM-βαρελιού της χιτινάσης-60 και δεν φαίνεται να σχετίζεται με τα φαινόμενα μερικής αντιστρεπτότητας στους 10 Deg/hr (η χιτινάση-40 παρουσιάζει αντιστρεπτότητα $\sim 90\%$ σε όλους τους ρυθμούς θέρμανσης), αλλά σε ένα ενδογενές χαρακτηριστικό του πρωτεΐνικού συστήματος.

Μια πολύ αργή αποκατάσταση ισορροπίας καταγράφηκε και κατά τη χημική μετουσίωση του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της χιτινάσης-60 στην προσπάθεια να προσδιοριστεί η θερμοδυναμική σταθερότητά του. Η μετατόπιση της «σιγμοειδούς» καμπύλης προς μικρότερα μήκη κύματος με την πάροδο του χρόνου υποδεικνύει ότι, σε αντιδιαστολή με τη θερμική μετουσίωση, η κινητική εξάρτηση αφορά στο ξεδίπλωμα των $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιών της χιτινάσης-60 και ότι ένα ιδιαίτερα υψηλό ενεργειακό φράγμα χωρίζει την ιθαγενή και την μετουσιωμένη κατάσταση. Οι πολύ μεγάλοι χρόνοι αποκατάστασης της ισορροπίας κάνουν εμφανή τα σημάδια υποβάθμισης των πρωτεϊνικών διαλυμάτων στις συνθήκες αποθήκευσής τους, με την εμφάνιση πρόσθετων φαινομένων κινητικής. Η φύση των φαινομένων αυτών δεν είναι ξεκάθαρη θα μπορούσαν όμως να οφείλονται σε φαινόμενα συσσωμάτωσης, παρά το ότι εν γένει η παρουσία χημικού αποδιατακτή παρεμποδίζει τέτοια φαινόμενα πολυμερισμού. Η πολύ μικρή ένταση φθορισμού και η μεγάλη μετατόπιση του κέντρου βάρους της καμπύλης του φάσματος εκπομπής προς μεγαλύτερα μήκη κύ-

ματος είναι τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά που αποτυπώνονται από την δράση του δεύτερου φαινομένου. Η αργή χημική μετουσίωση του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού της χιτινάσης-60 εκφράζει τρόπον τινά ένα είδος ανθεκτικότητας του πρωτεΐνικου μορίου σε χημικούς αποδιατακτές, μια ιδιότητα που σε συνδυασμό με την επιδεκτικότητά του στο plug in and play φαίνεται να ταιριάζει ιδανικά στο ρόλο του ενζύμου σε έναν βιομετατροπέα αποβλήτων χιτίνης. Χρόνοι χημικής μετουσίωσης της τάξης μεγέθους του ($\beta\alpha$)₈-βαρελιού της χιτινάσης-60 έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά σε λίγες περιπτώσεις (Junker et al., 2006), (Rosengarth et al., 1999) και από όσο γνωρίζουμε ειδικά για μονομερή TIM-βαρέλια μόνο μία. Πρόκειται για την πρωτεΐνη HisF, ένα ($\beta\alpha$)₈-βαρέλι του οποίου η καμπύλη χημικής μετουσίωσης με GuaHCl χρειάζεται 6 εβδομάδες για να απαλλαγεί από φαινόμενα κινητικής εξάρτησης (Carstensen et al., 2012). Η HisF είναι μια πρωτεΐνη προερχόμενη από θερμόφιλο βακτήριο, μετουσιώνεται χημικά με το μηχανισμό 2-καταστάσεων και έχει $\Delta G_D^0 = 12.80 \pm 0.41$ kcal/mol σαφώς μεγαλύτερο από το αντίστοιχο για το βαρέλι της χιτινάσης-60. Η πρωτεΐνη γΤΙΜ είναι επίσης ένα τέτοιο ($\beta\alpha$)₈-βαρέλι με «χρόνους ισορροπίας» πάνω από 10 ημέρες για τη χημική μετουσίωσή της με GuaHCl (Najera et al., 2003). Το γεγονός όμως ότι είναι διμερές σε συνθήκες ευνοϊκές για την ιθαγενή της κατάσταση προσθέτει το επιπλέον ενδεχόμενο μιας αργής κινητικής του ολιγομερισμού πέραν μιας ταυτόχρονης ή αποκλειστικής αργής κινητικής του ξεδιπλώματος των μονομερών.

Η ελάττωση του ρυθμού επαναδίπλωσης των πρωτεϊνών λόγω ισομερισμού trans ↔ cis του X-Pro πεπτιδικού δεσμού (όπου X οποιοδήποτε αμινοξικό κατάλοιπο) έχει διαπιστωθεί εδώ και καιρό (Brandts et al., 1975). Το υψηλό ενεργειακό φράγμα του ισομερισμού 14-20 kcal/mol που δείχνουν τόσο πειραματικά όσο και θεωρητικά αποτελέσματα αντανακλά στον σχεδόν διπλό πεπτιδικό δεσμό. Σε άλλες περιπτώσεις όπως της PCP-OSH τα πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η ασυνήθιστα αργή κινητική σχετίζεται με τις διαμορφώσεις της μεταβατικής κατάστασης και/ή των μερικώς ξεδιπλωμένων μορίων στην ενδιάμεση κατάσταση, οποία εικάζεται ότι αντιστοιχεί στη μετουσιωμένη κατάσταση της ισορροπίας N \rightleftharpoons D (Iimura et al., 2004). Η αργή αποκατάσταση ισορροπίας και στην περίπτωση της HisF αποδόθηκε στην εμφάνιση ενδιάμεσων καταστάσεων είτε στη διαδρομή folding/refolding είτε εκτός αυτής που ανιχνεύθηκαν με πειράματα κινητι-

κής. Τα δομικά χαρακτηριστικά της θερμικά μετουσιωμένης κατάστασης του TIM-βαρελιού της χιτινάσης-60, όπως δείχνουν τα δεδομένα του κυκλικού διχροϊσμού, υποδεικνύουν πρωτεΐνικές διαμορφώσεις που κατά μέσο όρο εμφανίζουν παραμένοντα στοιχεία δευτερογούς και τριτογούς δομής και δεν αποκλείεται να χαρακτηρίζουν ενδιάμεσες καταστάσεις στην διαδρομή δίπλωσης/επαναδίπλωσης.

Πρέπει να σημειώσουμε ότι η κινητική ανάλυση του TIM-βαρελιού της χιτινάσης-60 είναι έμμεση μιας και υλοποιήθηκε με πειραματικές μεθόδους ισορροπίας που αφορούν μάλιστα μόνο τη μετάβαση της μετουσίωση, ενώ απουσιάζουν δεδομένα που αφορούν τη μετάβαση της επαναδίπλωσης. Κάτι τέτοιο αυξάνει την αβεβαιότητα στις λεπτομέρειες του μηχανισμού folding/refolding, αλλά θεωρούμε όχι τη γενική εικόνα των συμπερασμάτων μας. Μια ακριβής μελέτη της κινητικής θα απαιτούσε τις εξειδικευμένες μεθόδους που είναι παγιωμένες στο πεδίο αυτό.

5. Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή παρουσίασε μεθοδολογία και πειραματικά αποτελέσματα για τη συστηματική θερμοδυναμική ανάλυση της δίπλωσης πρωτεΐνων και την ακριβή μέτρηση της θερμοδυναμικής τους σταθερότητας. Ανέδειξε τη σημαντικότητα των συμπερασμάτων αυτών σε δύο ιδιαίτερα ενδιαφέροντα προβλήματα στη σύγχρονη βιοφυσική των πρωτεΐνων: στην κρυστάλλωσή τους στη διασύνδεση της δομής τους με τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητά τους.

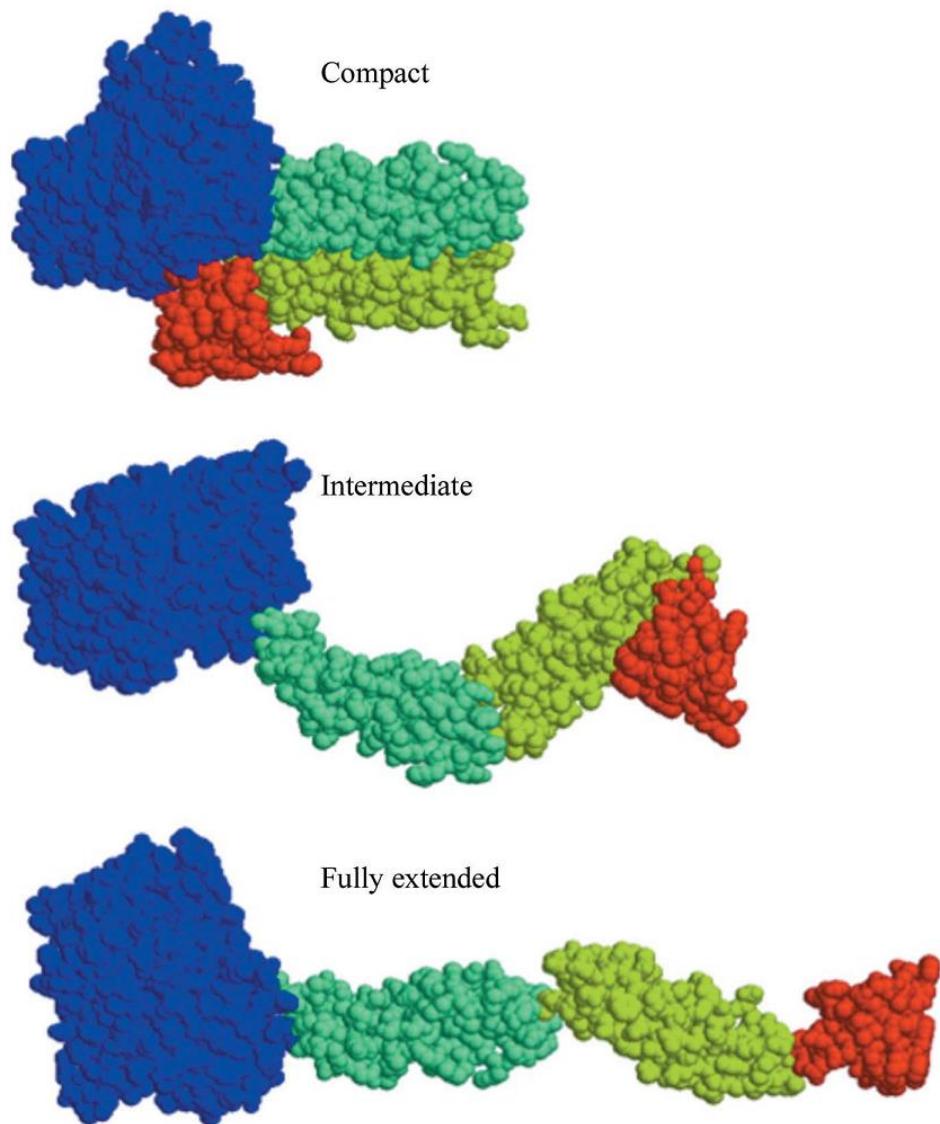
Συνοψίζοντας τα σημαντικότερα συμπεράσματα ξεκινάμε με αυτά που προέκυψαν από τη μέτρηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης σε συνθήκες κρυστάλλωσης. Διαπιστώθηκε καταρχάς ότι η παρουσία μη αποδιατακτικών αλάτων σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφέρει αξιοσημείωτη μεταβολή των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών της λυσοζύμης. Από τις πειραματικά προσδιοριζόμενες παραμέτρους του DSC (T_m , ΔH , ΔC_p), οι τιμές του $\Delta C_p = C_{p,U} - C_{p,N}$ είναι αυτές που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις. Η πιθανότερη προέλευση των μεταβολών του ΔC_p είναι από τις αλλαγές που συμβαίνουν στο διαλύτη, δηλαδή στο νερό, παρουσία των αλάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι τιμές του ΔC_p είναι αυτές που διαμορφώνουν την καμπύλη θερμοδυναμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης στις διάφορες συνθήκες. Για τα δύο άλατα που κρυσταλλώνουν τη λυσοζύμη, το NaCl και το Na₂SO₄, διαπιστώθηκε αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης στις υψηλές συγκεντρώσεις, η οποία οφείλεται στην ελάττωση του ΔC_p . Η αύξηση της εντροπικής συνιστώσας του ΔG είναι πιθανό ότι οφείλεται στην ελάττωση της εντροπίας της λυσοζύμης στη φυσιολογική κατάσταση, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το εντροπικό κόστος της κρυστάλλωσης. Η αντίθετη τάση καταγράφηκε για τα δύο άλατα που δεν κρυσταλλώνουν τη λυσοζύμη, το (NH₄)₂HPO₄ και το Li₂SO₄. Η διαφαινόμενη συσχέτιση μεταξύ θερμοδυναμικής σταθερότητας και συνθηκών κρυστάλλωσης αποτελεί μείζον ζήτημα για την Πρωτεϊνική Κρυστάλλωση, διότι θέτει για πρώτη ίσως φορά τις κρυσταλλογραφικές δοκιμές σε μια περισσότερο ορθολογική βάση. Στο μέλλον, η μελέτη άλλων πρωτεϊνικών συστημάτων – πέραν της λυσοζύμης, αλλά και η μελέτη της λυσοζύμης παρουσία άλλων κατακρημνιστικών παραγόντων – πέραν των αλάτων – όπως για παράδειγμα του PEG, θα αναδείξει αν η διαφαινόμενη συ-

σχέτιση αποτελεί κοινό τόπο όλων των πρωτεϊνικών συστημάτων ή έστω μιας κλάσης πρωτεϊνών με κάποια παρόμοια – άγνωστα προς το παρόν – φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με αυτά της λυσοζύμης ή αν αποτελεί το μηχανισμό κρυστάλλωσης της λυσοζύμης (Stavros, 2014b).

Η μέτρηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της χιτινάσης-60 ανέδειξε καταρχάς ότι η θερμοδυναμική ανάλυση μιας πρωτεϊνικής μετουσίωσης μπορεί να είναι μια ιδιαίτερα δύσκολη υπόθεση όταν εμφανίζονται μη αντιστρεπτά φαινόμενα. Στις περισσότερες περιπτώσεις η υπόθεση αυτή ελέγχεται μέχρι το βαθμό της θερμιδομετρικής αντιστρεψιμότητας σε ένα πείραμα DSC. Η ανάκτηση σε σημαντικό βαθμό του ενθαλπικού περιεχομένου της ενδόθερμης κορυφής σε μια δεύτερη συνεχόμενη σάρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος συχνά θεωρείται αρκετή για να προχωρήσει η θερμοδυναμική ανάλυση. Ο έλεγχος της υπόθεσης της θερμοδυναμικής ισορροπίας εντός του πειραματικού χρόνου πρέπει να γίνεται ακόμη και σε αυτές τις περιπτώσεις, διαφορετικά τα χαρακτηριστικά του προφίλ της μετουσίωσης θα είναι παραπλανητικά, με το να γίνεται η σάρωση σε διαφορετικούς ρυθμούς. Επιπρόσθετα σε ένα πείραμα χημικής μετουσίωσης μιας πρωτεΐνης η ίδια υπόθεση πρέπει να ελέγχεται. Οι χρόνοι αποκατάστασης της χημικής ισορροπίας ενός πρωτεϊνικού διαλύματος κατά την τιτλοδότησή του με ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης χημικού αποδιατακτή δεν είναι πάντα μικροί, της τάξης των λίγων λεπτών, αλλά φτάνουν ακόμη τις ημέρες ή και τις εβδομάδες. Και αυτή η παράμετρος είναι κρίσιμη για την αξιόπιστη θερμοδυναμική ανάλυση μιας σιγμοειδούς καμπύλης πρωτεϊνικής μετουσίωσης. Τόσο η θερμική όσο και η χημική μετουσίωση της καταλυτικής περιοχής της χιτινάσης-60, διπλωμένης στην αρχιτεκτονική $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι, εμφάνισαν όλα τα παραπάνω ιδιάζοντα χαρακτηριστικά.

Τα θερμιδομετρικά αποτελέσματα της χιτινάσης-60 σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του κυκλικού διχροϊσμού, στη Far και στη Near UV περιοχή, υπέδειξαν ένα πρωτεϊνικό μόριο που διαθέτει την απαραίτητη, για τη λειτουργία του σε χαμηλές θερμοκρασίες ως ψυχρόφιλο ένζυμο, «πλαστικότητα». Λίαν προσφάτως δημοσιευμένα αποτελέσματα από πειράματα SAXS για τη χιτινάση-60 έδειξαν ότι η *MmChi60* υιοθετεί ένα εύρος διαμορφώσεων σε υδατικό περιβάλλον που κυμαίνεται από μια συμπαγή διαμόρφωση στην ο-

ποία όλες οι λειτουργικές περιοχές βρίσκονται κοντά η μία με την άλλη, σε μια άλλη ενός εκτεταμένου πετάλου χωροδιάταξη, παρόμοια με αυτήν στον κρύσταλλο, μέχρι μια πλήρως εκτεταμένη διαμόρφωση (Σχήμα 5.1) (Malecki et al., 2014).

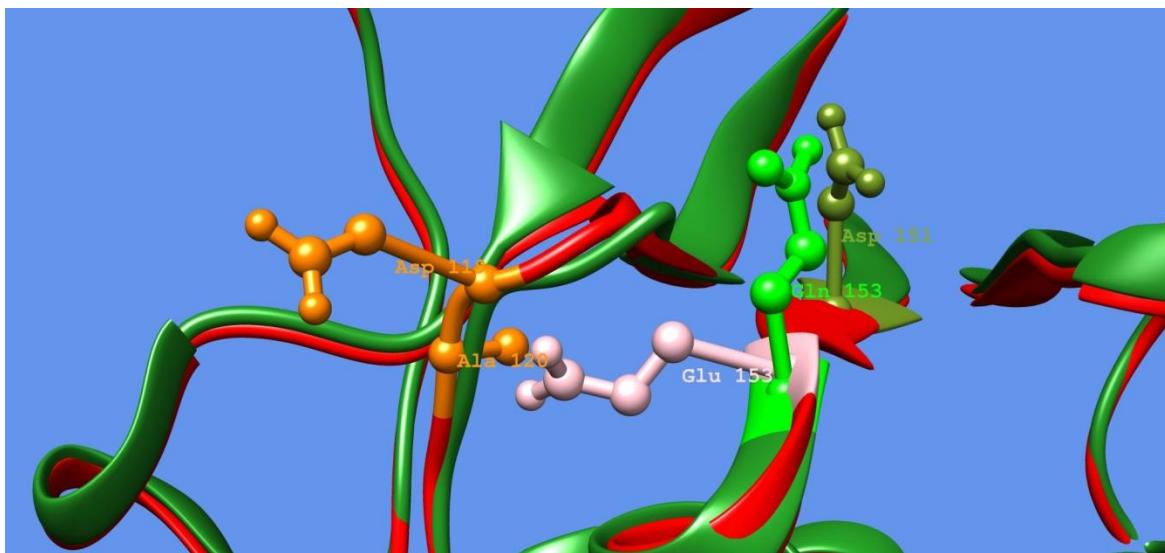


Σχήμα 5.1: Οι χωροδιατάξεις της *MmChi60*.

Τα αποτελέσματα του κυκλικού διχροϊσμού, στη Far και στη Near UV περιοχή, για τη χιτινάση-60 και το σημειακό της μετάλλαγμα E153Q, έδειξαν ότι η δομή του σημειακού μεταλάγματος συνολικά διατηρείται. Από την άλλη, τα θερμιδομετρικά αποτελέσματα του σημειακού μεταλλάγματος E153Q έδειξαν ότι η ενθαλπία μετουσίωσης ελαττώνεται

στο 70% της τιμής της αγρίου τύπου χιτινάσης-60, υποδεικνύοντας μια ενδεχόμενη τοπική δομική μεταβολή και φυσικά τον συνεργατικό χαρακτήρα του δικτύου των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν ένα πρωτεΐνικό σύστημα.

Η κρυσταλλογραφική δομή του σημειακού μεταλλάγματος E153Q της χιτινάσης-60 επιλύθηκε λίαν προσφάτως αποκαλύπτοντας μια δομή η οποία συνολικά ομοιάζει προς αυτήν της αγρίου τύπου χιτινάσης-60 (Malecki et al., 2014). Η αντιπαραβολή της δομής του μεταλλάγματος με την αγρίου τύπου αναδεικνύει όμως μια αξιοσημείωτη μεταβολή: Τα άτομα οξυγόνου του ενεργού καταλοίπου Glu153 στην αγρίου τύπου χιτινάση-60 προσανατολίζονται προς τα άτομα αζώτου των κύριων αλυσίδων των καταλοίπων Asp119 και Asp120 που ανήκουν στο γειτονικό εύκαμπτο βρόχο. Στο σημειακό μετάλλαγμα, η γλουταμίνη Gln153 δεν προσανατολίζεται προς την χαράδρα πρόσδεσης του υποστρώματος και πραγματοποιεί έναν δεσμό υδρογόνου με το δεύτερο κατά σειρά ασπαρτικό οξύ του μορίου DXDXE (Asp151) (Malecki et al., 2014). Τα χαρακτηριστικά αυτά παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.2.



Σχήμα 5.2: Χωροδιατακτική σύγκριση των δομών του ενεργού κέντρου της MmChi60 (κόκκινο) και του σημειακού μεταλλάγματός της E153Q (πράσινο του δάσους). Ο προσανατολισμός του καταλοίπου Glu153 (πράσινο) που αντικαθιστά το ενεργό κατάλοιπο Glu153 (ροζ), διαφοροποιείται σημαντικά (περισσότερες πληροφορίες στο κείμενο). (Η εικόνα δημιουργήθηκε στο πρόγραμμα UCSF chimera).

Τα παραπάνω αναδεικνύουν τη σπουδαιότητα του προσδιορισμού της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεΐνων και των χαρακτηριστικών που προκύπτουν από τις μεθόδους προσδιορισμού της. Οι κρυσταλλογραφικές δομές, παρά τη μοναδικότητα της πληροφορίας που παρέχουν, δίνουν μια στατική εικόνα δυναμικών συστημάτων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, και μάλιστα όχι στο πραγματικό περιβάλλον αυτών, δηλαδή σε διάλυμα. Αν η μοντελοποίηση της ευκινησίας των πρωτεΐνων σε διάλυμα με SAXS είναι εφικτή, δημιουργείται ξεκάθαρα μια περισσότερο ολοκληρωμένη εικόνα. Όμως, ακόμα και αυτή η εικόνα είναι ελλειμματική ως προς τη σχέση δομής-λειτουργίας των πρωτεΐνων, που αποτελεί το κλειδί για την κατανόηση της πρωτεϊνικής δίπλωσης και την επακόλουθη ανάπτυξη των ποικίλων εφαρμογών των πρωτεΐνων. Τοπικές δομικές μεταβολές, που αφήνουν μια συνολική πρωτεϊνική δομή σχεδόν αδιατάρακτη, μπορούν να έχουν δραματικές μεταβολές στα ενεργειακά χαρακτηριστικά τους. Πόσο μάλλον όταν οι μεταβολές στη συμπεριφορά ενός πρωτεϊνικού συστήματος αφορούν στις ιδιότητες του διαλύτη και όχι σε αυτή καθεαυτή την πρωτεϊνική αλυσίδα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της λυσιζύμης παρουσία διαφορετικών αλάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επίσης, καμία πληροφορία για το μηχανισμό την πρωτεϊνικής δίπλωσης-αποδίπλωση δεν μπορεί να εξαχθεί από πειράματα σκέδασης ακτίνων X είτε σε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους, είτε σε πρωτεϊνικά μόρια σε διάλυμα. Εξάλλου, ας μην παραβλέπεται το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις η κρυστάλλωση των πρωτεΐνων είναι μια εξαιρετικά δύσκολη υπόθεση και τα πειράματα SAXS προς το παρόν όχι τόσο διαδεδομένα.

Η καταλυτική περιοχή της χιτινάσης-60, διπλωμένη στην αρχιτεκτονική $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι, αποδείχθηκε ότι αποτελεί μια αυτόνομη θερμοδυναμική οντότητα. Μάλιστα η σταθερότητα του βαρελιού αυξάνεται σημαντικά, όταν αποκόπτεται η «ουρά» των Ig-like λειτουργικών περιοχών, που προσδίδουν στη χιτινάση-60 τη μορφολογία ενός εκτεταμένου πετάλου. Το $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι λοιπόν προβάλει επιδεκτικό σε έναν ρόλο ‘plug in and play’ στην υπηρεσία της Πρωτεϊνικής Μηχανικής που μπορεί, δηλαδή, αυτοδύναμα να εκφραστεί στη δομή άλλης πρωτεΐνης εξελίσσοντας τη λειτουργικότητά της. Σε συνδυασμό μάλιστα με την εντυπωσιακή ανθεκτικότητά του σε χημικούς αποδιατάκτες, το TIM-βαρέλι της *MmChi60* καθίσταται ως υποψήφιος βιομετατροπέας των αποβλήτων χιτίνης δίνοντας λύση στο περιβαλλοντικό πρόβλημα που προκαλούν οι μονάδες επεξεργασίας

θαλασσινών. Από τη μία, οι πρωτοφανείς, για ψυχρόφιλο ένζυμο, χρόνοι ημιζωής που φτάνουν τις 6 ημέρες σε ορισμένες συγκεντρώσεις χημικού αποδιατακτή και το υψηλό ενεργειακό φράγμα 92.5 kcal/mol μεταξύ της ιθαγενούς και την χημικά μετουσιωμένης κατάστασης του βαρελιού και από την άλλη η σχετικά μικρή τιμή ~ 7 kcal/mol της θερμοδυναμικής σταθερότητας του βαρελιού, όπως μετρήθηκε κατά τη χημική μετουσίωσή του και του κυκλικού διχροϊσμού αφήνουν ανοικτό το ενδεχόμενο της παρουσίας κινητικά παγιδευμένων ενδιάμεσων καταστάσεων. Στο μέλλον, η έκφραση του βαρελιού της χιτινάσης-60 με τη σημειακή μετάλλαξη E153Q και με σειρά άλλων επιλεγμένων μεταλλάξεων, θα διαλευκάνει ενδεχομένως περισσότερο το μηχανισμό της μετουσίωσής του και θα αναδείξει ακόμη περισσότερο τις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες της καταλυτικής αυτής περιοχής (Stavros, 2014a).

Βιβλιογραφία

- ALEXANDRAKIS, Z., KATSAROS, G., STAVROS, P., KATAPODIS, P., NOUNESIS, G. & TAOUKIS, P. (2014). Comparative Structural Changes and Inactivation Kinetics of Pectin Methylesterases from Different Orange Cultivars Processed by High Pressure. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), 853-867.
- ALEXANDRAKIS, Z., KATSAROS, G., STAVROS, P., NOUNESIS, G. & TAOUKIS, P. (2014b). Inactivation Kinetics and Structural Changes of High Pressure Treated Actinin. *Food and Bioprocess Technology* (Accepted Pending).
- ALTAMIRANO, M. M., BLACKBURN, J. M., AGUAYO, C. & FERSHT, A. R. (2000). Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. *Nature*, 403(6770), 617-622.
- ARAKAWA, T. & TIMASHEFF, S. N. (1984). Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, 23(25), 5912-5923.
- ASHERIE, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 34(3), 266-272.
- ATKINS, P. & DE PAULA, J. (2010). *Physical Chemistry*: W. H. Freeman.
- BALDWIN, R. L. (1996). How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, 71(4), 2056-2063.
- BALDWIN, R. L., FRIEDEN, C. & ROSE, G. D. (2010). Dry molten globule intermediates and the mechanism of protein unfolding. *Proteins*, 78(13), 2725-2737.
- BALDWIN, R. L. & ROSE, G. D. (2013). Molten globules, entropy-driven conformational change and protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 23(1), 4-10.
- BECKTEL, W. J. & SCHELLMAN, J. A. (1987). Protein stability curves. *Biopolymers*, 26(11), 1859-1877.
- BLAKE, C. C. F., KOENIG, D. F., MAIR, G. A., NORTH, A. C. T., PHILLIPS, D. C. & SARMA, V. R. (1965). Structure of Hen Egg-White Lysozyme - a 3-Dimensional Fourier Synthesis at 2a Resolution. *Nature*, 206(4986), 757-&.
- BOHM, G., MUHR, R. & JAENICKE, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng*, 5(3), 191-195.
- BRANDTS, J. F., HALVORSON, H. R. & BRENNAN, M. (1975). Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, 14(22), 4953-4963.
- BRYNGELSON, J. D., ONUCHIC, J. N., SOCCI, N. D. & WOLYNES, P. G. (1995). Funnels, Pathways, and the Energy Landscape of Protein-Folding - a Synthesis. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 21(3), 167-195.
- CARSTENSEN, L., ZOLDAK, G., SCHMID, F. X. & STERNER, R. (2012). Folding mechanism of an extremely thermostable (betaalpha)(8)-barrel enzyme: a high kinetic barrier protects the protein from denaturation. *Biochemistry*, 51(16), 3420-3432.
- COLLINS, K. D. (2004). Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, 34(3), 300-311.
- COOPER, A. (2010). Protein Heat Capacity: An Anomaly that Maybe Never Was. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 1(22), 3298-3304.

- COOPER, A., EYLES, S. J., RADFORD, S. E. & DOBSON, C. M. (1992). Thermodynamic consequences of the removal of a disulphide bridge from hen lysozyme. *J Mol Biol*, 225(4), 939-943.
- COTTERILL, R. (2002). Biophysics: an Introduction: Turtleback Books.
- CURTIS, R. A. & LUE, L. (2006). A molecular approach to bioseparations: Protein–protein and protein–salt interactions. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 907-923.
- D'AMICO, S., GEORLETTE, D., COLLINS, T., FELLER, G. & GERDAY, C. (2005). Microcalorimetry as Applied to Psychrophilic Enzymes. In *Biocalorimetry 2*, pp. 231-240: John Wiley & Sons, Ltd.
- DAVOODI, J., WAKARCHUK, W. W., SUREWICZ, W. K. & CAREY, P. R. (1998). Scan-rate dependence in protein calorimetry: the reversible transitions of *Bacillus circulans* xylanase and a disulfide-bridge mutant. *Protein Sci*, 7(7), 1538-1544.
- DEREWENDA, Z. S. & VEKILOV, P. G. (2006). Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 62(Pt 1), 116-124.
- DILL, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133-7155.
- DILL, K. A. & MACCALLUM, J. L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. *Science*, 338(6110), 1042-1046.
- DILL, K. A., OZKAN, S. B., SHELL, M. S. & WEIKL, T. R. (2008). The protein folding problem. *Annu Rev Biophys*, 37, 289-316.
- ECHENIQUE, P. (2007). Introduction to protein folding for physicists. *Contemporary Physics*, 48(2), 81-108.
- EFTINK, M. R. (1994). The Use of Fluorescence Methods to Monitor Unfolding Transitions in Proteins. *Biophysical Journal*, 66(2), 482-501.
- EFTINK, M. R. (1995). Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins. *Energetics of Biological Macromolecules*, 259, 487-512.
- FELLER, G. (2010). Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *J Phys Condens Matter*, 22(32), 323101.
- FELLER, G. & GERDAY, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol*, 1(3), 200-208.
- FERSHT, A. (1999). Structure and mechanism in protein science : a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: Freeman.
- FRAUENFELDER, H. & WOLYNES, P. G. (1994). Biomolecules - Where the Physics of Complexity and Simplicity Meet. *Physics Today*, 47(2), 58-64.
- FREIRE, E. (1995). Thermal denaturation methods in the study of protein folding. *Methods Enzymol*, 259, 144-168.
- GREENFIELD, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 1(6), 2876-2890.
- GRINBERG, V. Y., BUROVA, T. V., HAERTLE, T. & TOLSTOGUZOV, V. B. (2000). Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects. *J Biotechnol*, 79(3), 269-280.
- GUNTON, J. D., SHIRYAYEV, A. & PAGAN, D. L. (2007). Protein Condensation: Kinetic Pathways to Crystallization and Disease: Cambridge University Press.
- HARDING, S. E. & CHOWDHRY, B. Z. (2001). Protein-ligand Interactions: A Practical Approach: Oxford University Press.

- HIRANO, A., HAMADA, H., OKUBO, T., NOGUCHI, T., HIGASHIBATA, H. & SHIRAKI, K. (2007). Correlation between thermal aggregation and stability of lysozyme with salts described by molar surface tension increment: an exceptional propensity of ammonium salts as aggregation suppressor. *Protein J*, 26(6), 423-433.
- <HTTP://WWW.RCSB.ORG/PDB/EXPLORE/REMEDIATEDSEQUENCE.DO?STRUCTUREID=4HMC>.
- IBARRA-MOLERO, B. & SANCHEZ-RUIZ, J. (2006). Differential Scanning Calorimetry of Proteins: an Overview and Some Recent Developments. In Advanced Techniques in Biophysics, vol. 10 eds. J. Arrondo and A. Alonso), pp. 27-48: Springer Berlin Heidelberg.
- IIMURA, S., YAGI, H., OGASAHARA, K., AKUTSU, H., NODA, Y., SEGAWA, S. & YUTANI, K. (2004). Unusually slow denaturation and refolding processes of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile are highly cooperative: real-time NMR studies. *Biochemistry*, 43(37), 11906-11915.
- ISRAELACHVILI, J. N. (2011). Intermolecular and Surface Forces: Revised Third Edition: Elsevier Science.
- JELESAROV, I. & BOSSHARD, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, 12(1), 3-18.
- JUNKER, M., SCHUSTER, C. C., MCDONNELL, A. V., SORG, K. A., FINN, M. C., BERGER, B. & CLARK, P. L. (2006). Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13), 4918-4923.
- KAO, P.-M., HUANG, S.-C., CHANG, Y.-C. & LIU, Y.-C. (2007). Development of continuous chitinase production process in a membrane bioreactor by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Process Biochemistry*, 42(4), 606-611.
- KAUSHIK, J. K., OGASAHARA, K. & YUTANI, K. (2002). The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *J Mol Biol*, 316(4), 991-1003.
- KELLY, S. M., JESS, T. J. & PRICE, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119-139.
- KELLY, S. M. & PRICE, N. C. (2000). The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr Protein Pept Sci*, 1(4), 349-384.
- LADBURY, J. E. & CHOWDHRY, B. Z. (1998). Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences: Wiley.
- LAKOWICZ, J. R. (2007). Principles of Fluorescence Spectroscopy: Springer.
- LEPOCK, J. R., RITCHIE, K. P., KOLIOS, M. C., RODAHL, A. M., HEINZ, K. A. & KRUUV, J. (1992). Influence of transition rates and scan rate on kinetic simulations of differential scanning calorimetry profiles of reversible and irreversible protein denaturation. *Biochemistry*, 31(50), 12706-12712.

- LI, H. & GREENE, L. H. (2010). Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding. *PLoS One*, 5(1), e8654.
- LOLADZE, V. V., ERMOLENKO, D. N. & MAKHATADZE, G. I. (2002). Thermodynamic consequences of burial of polar and non-polar amino acid residues in the protein interior. *J Mol Biol*, 320(2), 343-357.
- MAKHATADZE, G. I. (2001). Measuring protein thermostability by differential scanning calorimetry. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 7, Unit 7 9.
- MAKHATADZE, G. I. (2008). Thermal Unfolding of Proteins Studied by Calorimetry. In *Protein Folding Handbook*, pp. 70-98: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- MAKHATADZE, G. I. & PRIVALOV, P. L. (1995). Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem*, 47, 307-425.
- MALECKI, P. H., RACZYNSKA, J. E., VORGIAS, C. E. & RYPNIEWSKI, W. (2013). Structure of a complete four-domain chitinase from *Moritella marina*, a marine psychrophilic bacterium. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69(Pt 5), 821-829.
- MALECKI, P. H., VORGIAS, C. E., PETOUKHOV, M. V., SVERGUN, D. I. & RYPNIEWSKI, W. (2014). Crystal structures of substrate-bound chitinase from the psychrophilic bacterium *Moritella marina* and its structure in solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70(Pt 3), 676-684.
- MATSUO, K., SAKURADA, Y., YONEHARA, R., KATAOKA, M. & GEKKO, K. (2007). Secondary-structure analysis of denatured proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *Biophysical Journal*, 92(11), 4088-4096.
- MCPHERSON, A. (2001). A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Sci*, 10(2), 418-422.
- MICROCAL. (1995). *DSC Data Analysis in Origin, Tutorial Guide, Version 5.0*, Microcal.
- MYERS, J. K., PACE, C. N. & SCHOLTZ, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci*, 4(10), 2138-2148.
- NAJERA, H., COSTAS, M. & FERNANDEZ-VELASCO, D. A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem J*, 370(Pt 3), 785-792.
- NÖLTING, B. (2006). *Protein Folding Kinetics: Biophysical Methods*: Springer.
- O'BRIEN, E. P., MORRISON, G., BROOKS, B. R. & THIRUMALAI, D. (2009). How accurate are polymer models in the analysis of Forster resonance energy transfer experiments on proteins? *Journal of Chemical Physics*, 130(12).
- PACE, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*, 131, 266-280.
- PAIN, R. (2005). Determining the CD spectrum of a protein. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 7, Unit 7 6.
- PETSKO, G. A. & RINGE, D. (2004). *Protein Structure and Function*: NSP, New Science Press.
- PLOTNIKOV, V. V., BRANDTS, J. M., LIN, L. N. & BRANDTS, J. F. (1997). A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Anal Biochem*, 250(2), 237-244.

- POON, W. C. K., EGELHAAF, S. U., BEALES, P. A., SALONEN, A. & SAWYER, L. (2000). Protein crystallization: scaling of charge and salt concentration in lysozyme solutions. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 12(35), L569-L574.
- PRICE II, W. N., CHEN, Y., HANDELMAN, S. K., NEELY, H., MANOR, P., KARLIN, R., NAIR, R., LIU, J., BARAN, M., EVERETT, J., TONG, S. N., FOROUHAR, F., SWAMINATHAN, S. S., ACTON, T., XIAO, R., LUFT, J. R., LAURICELLA, A., DETITTA, G. T., ROST, B., MONTELIONE, G. T. & HUNT, J. F. (2009). Understanding the physical properties that control protein crystallization by analysis of large-scale experimental data. *Nat Biotech*, 27(1), 51-57.
- PRIVALOV, P. L. (1996). Intermediate states in protein folding. *J Mol Biol*, 258(5), 707-725.
- PRIVALOV, P. L. & KHECHINASHVILI, N. N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J Mol Biol*, 86(3), 665-684.
- PRIVALOV, P. L. & POTEKHIN, S. A. (1986). Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol*, 131, 4-51.
- PTITSYN, O. B. & UVERSKY, V. N. (1994). The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules. *FEBS Lett*, 341(1), 15-18.
- PYRPASSOPOULOS, S., VLASSI, M., TSORTOS, A., PAPANIKOLAU, Y., PETRATOS, K., VORGIAS, C. E. & NOUNESIS, G. (2006). Equilibrium heat-induced denaturation of chitinase 40 from *Streptomyces thermophilus*. *Proteins*, 64(2), 513-523.
- RIES-KAUTT, M. M. & DUCRUIX, A. F. (1989). Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *J Biol Chem*, 264(2), 745-748.
- ROBERTSON, A. D. & MURPHY, K. P. (1997). Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem Rev*, 97(5), 1251-1268.
- ROSENGARTH, A., ROSGEN, J. & HINZ, H. J. (1999). Slow unfolding and refolding kinetics of the mesophilic Rop wild-type protein in the transition range. *Eur J Biochem*, 264(3), 989-995.
- ROYER, C. (1995). Fluorescence Spectroscopy. In *Protein Stability and Folding*, vol. 40 (ed. B. Shirley), pp. 65-89: Humana Press.
- ROYER, C. A., MANN, C. J. & MATTHEWS, C. R. (1993). Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of trp aporepressor using single tryptophan mutants. *Protein Sci*, 2(11), 1844-1852.
- SANTORO, M. M. & BOLEN, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27(21), 8063-8068.
- SCHIMPL, M., RUSH, C. L., BETOU, M., EGGLESTON, I. M., RECKLIES, A. D. & VAN AALDEN, D. M. (2012). Human YKL-39 is a pseudo-chitinase with retained chitooligosaccharide-binding properties. *Biochem J*, 446(1), 149-157.
- SHARP, K. A. & VANDERKOOI, J. M. (2010). Water in the half shell: structure of water, focusing on angular structure and solvation. *Acc Chem Res*, 43(2), 231-239.
- SHAW, K., SCHOLTZ, J. M., PACE, C. N. & GRIMSLEY, R. G. (2009). Determining the Conformational Stability of a Protein Using Urea Denaturation Curves. In

- Protein Structure, Stability, and Interactions, vol. 490 (ed. J. W. Shriver), pp. 41-55: Humana Press.
- SHIAO, D. F., LUMRY, R. & FAHEY, J. (1971). Studies of the chymotrypsinogen family of proteins. XI. Heat-capacity changes accompanying reversible thermal unfolding of proteins. *J Am Chem Soc*, 93(8), 2024-2035.
- SHUHUI, L., MOK, Y. K. & WONG, W. S. (2009). Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 149(4), 369-377.
- SKERRA, A. (2000). Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J Mol Recognit*, 13(4), 167-187.
- SOCHAVA, I. V. & SMIRNOVA, O. I. (1993). [Heat capacity of hydrated and dehydrated globular proteins. The denaturing increment of heat capacity]. *Mol Biol (Mosk)*, 27(2), 348-357.
- SONGSIRIRITTHIGUL, C., PESATCHA, P., EIJSINK, V. G. & YAMABHAI, M. (2009). Directed evolution of a *Bacillus* chitinase. *Biotechnol J*, 4(4), 501-509.
- SREERAMA, N. & WOODY, R. W. (2004a). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol*, 383, 318-351.
- SREERAMA, N. & WOODY, R. W. (2004b). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Numerical Computer Methods*, Pt D, 383, 318-351.
- STAVROS, P., MALECKI, P. H., THEODORIDOU, M., RIPNIEWSKI, W., VORGIAS, C. E. & NOUNESIS, G. (2014a). The Stability of the TIM-barrel Domain of a Psychrophilic Chitinase. *Proteins (Under Review)*.
- STAVROS, P., SARIDIAKIS, E. & NOUNESIS, G. (2014b). Influence of precipitating agents on the thermodynamic parameters of protein crystallisation solutions. *Acta Crystallographica Part D (In preparation)*.
- STEFANIDI, E. & VORGIAS, C. E. (2008). Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles*, 12(4), 541-552.
- STERNER, R. & HOCKER, B. (2005). Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)8-barrel enzyme fold. *Chem Rev*, 105(11), 4038-4055.
- STURTEVANT, J. M. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(6), 2236-2240.
- STURTEVANT, J. M. (1987). Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry. *Annual Review of Physical Chemistry*, 38, 463-488.
- THANASSOULAS, A., NOMIKOS, M., THEODORIDOU, M., STAVROS, P., MASTELLOS, D. & NOUNESIS, G. (2011). Thermal and chemical denaturation of the BRCT functional module of human 53BP1. *Int J Biol Macromol*.
- TIMASHEFF, S. N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 22, 67-97.
- UBHAYASEKERA, W. (2011). Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. *Polymer International*, 60(6), 890-896.
- VEGA, K. & KALKUM, M. (2012). Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *Int J Microbiol*, 2012, 920459.
- VEKILOV, P. G. (2003). Solvent entropy effects in the formation of protein solid phases. *Methods Enzymol*, 368, 84-105.

- WHITMORE, L. & WALLACE, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392-400.
- YEH, J. I. & BEALE, S. I. (2007). Calorimetric approaches to characterizing effects of additives on protein crystallization. *Crystal Growth & Design*, 7(11), 2134-2139.
- ZEES, A. C., PYRPASSOPOULOS, S. & VORGIAS, C. E. (2009). Insights into the role of the (alpha+beta) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of chitinase A from *Serratia marcescens*. *Biochim Biophys Acta*, 1794(1), 23-31.
- ZHOU, Y. Q., HALL, C. K. & KARPLUS, M. (1999). The calorimetric criterion for a two-state process revisited. *Protein Science*, 8(5), 1064-1074.
- ZIELENKIEWICZ, W., SWIERZEWSKI, R., ATTANASIO, F. & RIALDI, G. (2006). Thermochemical, volumetric and spectroscopic properties of lysozyme-poly(ethylene) glycol system. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 83(3), 587-595.

Περίληψη

Η συσχέτιση της θερμοδυναμικής σταθερότητας με τη δομή και την εξειδικευμένη λειτουργικότητα αποτελεί, τις τελευταίες δεκαετίες, μία από τις μεγαλύτερες ερευνητικές προκλήσεις στην επιστήμη των Πρωτεϊνών. Η κατανόηση αυτής της συσχέτισης πυροδοτεί την ανάπτυξη πλήθους εφαρμογών στη βιοτεχνολογία, στη νανοτεχνολογία, στο περιβάλλον και στην υγεία. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιείται τόσο η θερμική όσο και η χημική μετουσίωση, για να διερευνηθεί η ενδεχόμενη συσχέτιση της θερμοδυναμικής σταθερότητας α) της πρωτεΐνης λυσοζύμη με τη συγκέντρωση των αλάτων NaCl και Na_2SO_4 , που την κρυσταλλώνουν και των αλάτων, Li_2SO_4 και $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, που δεν την κρυσταλλώνουν και β) με την εξαιρετικής σημασίας αρχιτεκτονική δίπλωσης, $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι της καταλυτικής περιοχής της πρωτεΐνης χιτινάση-60. Η μελέτη της θερμικής και η χημικής μετουσίωσης των πρωτεϊνών, δηλαδή η μετάβασή τους από τη φυσική, λειτουργική, διπλωμένη κατάσταση στη μη λειτουργική, μερικώς ή πλήρως ξεδιπλωμένη, πραγματοποιείται μέσω θερμιδομετρικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Αυτές συμπεριλαμβάνουν υψηλής ακρίβειας αδιαβατική θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC), φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού (CD) και φασματοσκοπία φθορισμού. Για τα άλατα που κρυσταλλώνουν τη λυσοζύμη διαπιστώθηκε αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, η οποία ενδεχομένως οφείλεται στην ελάττωση της εντροπίας της φυσικής κατάστασης της λυσοζύμης. Στην περίπτωση αυτή η μεγαλύτερη οργάνωση της φυσικής κατάστασης της λυσοζύμης αυξάνει το εντροπικό όφελος της κρυστάλλωσης. Η απελευθέρωση μορίων νερού από την πρωτεϊνική επιφάνεια θεωρείται η κύρια θερμοδυναμική καθοδηγητική τάση της κρυστάλλωσης. Η καταλυτική περιοχή της χιτινάσης-60 αποδείχθηκε μια αυτόνομη θερμοδυναμική οντότητα, η οποία επιδεικνύει μια εντυπωσιακή ανθεκτικότητα σε χημικούς αποδιατάκτες. Η θερμοδυναμική του σταθερότητα προσδιορίστηκε $\Delta G \sim 7 \text{ kcal/mol}$. Η προοπτική αξιοποίησης του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της χιτινάσης-60 σε έναν ρόλο “plug and play” σε συνδυασμό με την εντυπωσιακή ανθεκτικότητά του σε χημικούς αποδιατακτές προσδίδει στην πρωτεϊνική αυτή περιοχή ελκυστικές ιδιότητες για περιβαλλοντικές και άλλες εφαρμογές.

Abstract

In Protein Science, one of the major research challenges has been the correlation of the thermodynamic stability with structural elements, leading to specific molecular functionalities *in vivo*. Advancing our understanding of this association has helped the development of a series of applications in the fields of biotechnology, nanotechnology, the environment and health. In this Thesis, heat-induced as well as chemical denaturation is employed in order to accurately measure the thermodynamic stability of (a) lysozyme in solutions containing various concentrations of NaCl and Na₂SO₄, two salts that promote the crystallization of the molecules and of Li₂SO₄ and (NH₄)₂HPO₄, two salts that obstruct crystallization and (b) the catalytic domain of the psychrophilic chitinase-60, a (b/a)₈-barrel fold, which is of great importance in protein engineering mainly for its function in polymer hydrolysis. Both the thermal and the chemical denaturation explore the transition between the native, functional and fully folded state of the protein and the non-functional, denatured, partially or fully unfolded state. High-accuracy adiabatic differential scanning calorimetry, circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy have all been used to systematically study the structural transitions. In the case of lysozyme in solution with crystallization-promoting salts, the thermodynamic stability is found to increase with the salt concentration, which can be directly attributed to the decreasing entropy of the native state. In this case the higher degree of organization of the native state in solution leads to a higher entropic-gain upon crystallization which is the driving force of the process. In the second part of the Thesis, the catalytic domain of chitinase-60 is shown to exhibit a thermodynamic autonomy as well as an extraordinary resistivity to chemical denaturants. The thermodynamic stability was measured $\Delta G \sim 7$ kcal/mol, while both thermal and chemical unfolding processes were characterized by high kinetic barriers. The (b/a)₈-barrel fold of chitinase-60 is thus found to exhibit a “plug-and-play-domain” profile which combined to its chemical resistivity establishes it as a very attractive molecule for biotechnological environmental applications .