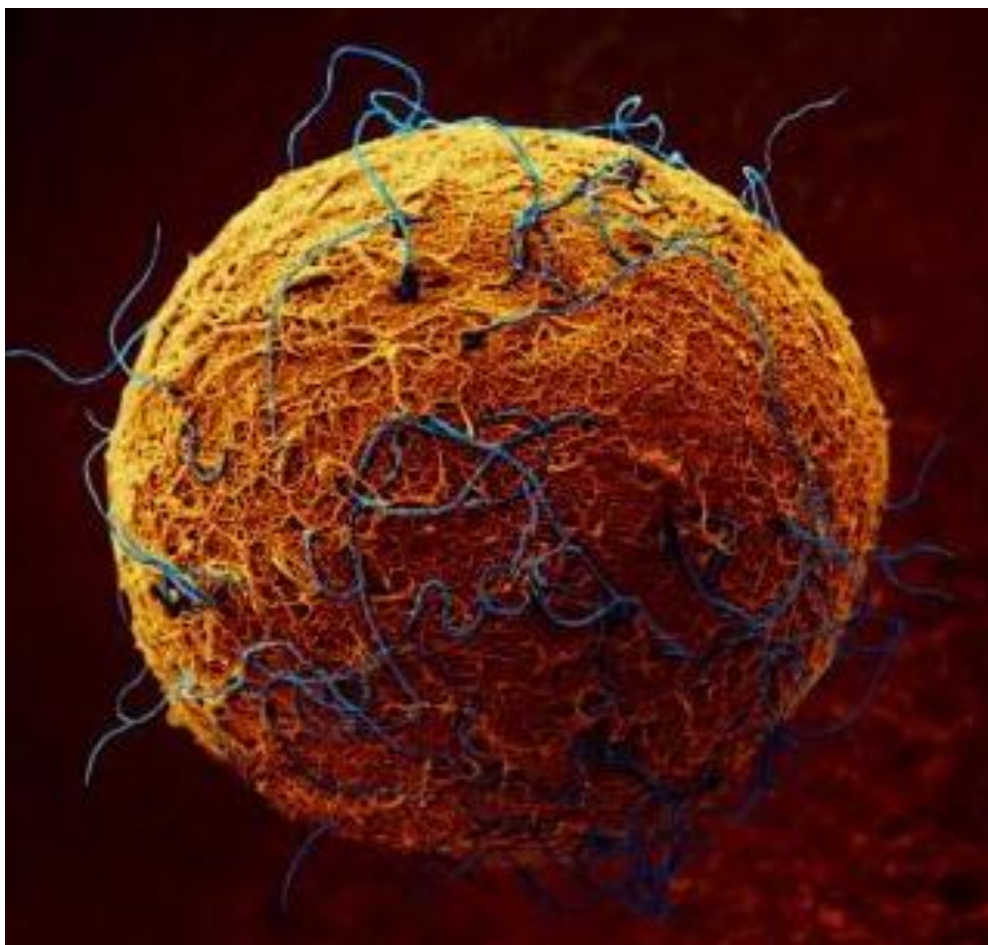




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ-ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΩΝ
ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΗΣ ΖΟΝΑ *PELLUCIDA* ΜΕ
ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΓΕΝΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

ΛΟΥΡΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής : Καθ. Σ.Ι. ΧΑΜΟΔΡΑΚΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Καθ. Σ.Ι. Χαμόδρακα για την ανεκτίμητη καθοδήγηση και υποδείξεις του κατά την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Κυρίως ωστόσο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που μου έδειξε πόσο σημαντικό και απαραίτητο είναι το ευχάριστο κλίμα και η υγιής συνεργασία στον ερευνητικό τομέα, όπως επίσης και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου κατά την διάρκεια πραγματοποίησης της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ επίσης την Λέκτορα Βασιλική Οικονομίδου για την συλλογή των δεδομένων της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης και των ακτίνων-Χ από το EMBL της Χαϊδελβέργης, όπως επίσης και για τη διαρκή και πολύτιμη της υποστήριξη, βοήθεια και συνεργασία, στοιχεία χωρίς τα οποία η εργασία αυτή θα ήταν δύσκολο να πραγματοποιηθεί.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω επίσης τους Δρ. Νίκο Παπανδρέου και Δρ. Ζωή Λίτου, για την συνεισφορά τους όποτε αυτή χρειάστηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία και βοήθεια τους όπου αυτή ήταν απαραίτητη όπως και για το υπέροχο κλίμα που διατηρούν στους χώρους του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *zona pellucida* (ZP) που είναι γνωστή και ως διαφανής ζώνη (στα λατινικά *pellucida* σημαίνει διαφανής), είναι μια δομή γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως που περικλείει τα ωκύτταρα των θηλαστικών και τα προστατεύει από μηχανικές πιέσεις και ταυτόχρονα διατηρεί σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της ωογένεσης και γονιμοποίησης. Η πορώδης αυτή δομή στα θηλαστικά συγκροτείται από 3 πρωτεΐνες τις ZP1, ZP2 και ZP3. Σε ορισμένα θηλαστικά βέβαια, έχει βρεθεί και μία επιπλέον πρωτεΐνη, η ZP4, παρόμοια με την ZP1. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μια χαρακτηριστική αυτοτελή δομική περιοχή κοντά στο C-τελικό τους άκρο. Το δομικό αυτό στοιχείο είναι γνωστό ως ZP domain και παρουσιάζεται σε μια ευρεία οικογένεια εξωκυτταρικών πρωτεϊνών που ονομάζονται ZP domain πρωτεΐνες και εμφανίζουν ποικίλες λειτουργίες. Αποτελείται από ~260 αμινοξικά κατάλοιπα με 8 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys), που σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (στα θηλαστικά, οι πρωτεΐνες ZP1-2 έχουν 10 κατάλοιπα Cys). Χωρίζεται σε ZP-N και ZP-C 'υπο'-δομικές αυτοτελείς περιοχές, από μια περιοχή ευαίσθητη σε πρωτεάσες. Η ZP-N, είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό, ενώ η δεύτερη, ZP-C, σχετίζεται με την λειτουργία της πρωτεΐνης. Η μελέτη της 'λυμένης' κρυσταλλογραφικά δομής της ZP-N υπομονάδας της ZP3 πρωτεΐνης του ποντικού σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την επεξεργασία της ακολουθίας με τον συνεναιτικό αλγόριθμο πρόγνωσης "αμυλοειδογενών καθοριστών" "AMYLPRED", που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας, μας οδήγησαν στο να εντοπίσουμε ορισμένες πιθανές

αμυλοειδογενείς περιοχές, που αντιστοιχούν στην ZP-N της ZP1 πρωτεΐνης του ανθρώπου. Ορισμένα από τα προγνωσθέντα ως ‘πιθανώς αμυλοειδογενή’ πεπτίδια συντέθηκαν και μελετήθηκαν συνεπώς σε επόμενο στάδιο με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανή αμυλοειδική φύση τους. Τα αποτελέσματα αυτά είναι τεράστιας σημασίας καθώς σε μια τέτοια περίπτωση πιθανότατα υποδεικνύουν πως εκτός από το χόριο των ωοθυλακίων των μεταξοσκωλήκων και των ιχθύων και η *zona pellucida* των ωοκυττάρων των θηλαστικών είναι ένα φυσικό προστατευτικό αμυλοειδές.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ZONA PELLUCIDA.....	7
1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
1.1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΤΗΣ ZONA PELLUCIDA.....	10
1.1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΖΡ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (ZPG's).....	15
1.2 ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ	24
1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	24
1.2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ	26
1.2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ.....	32
1.2.4 ΣΥΚΡΟΤΗΣΗ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ.....	35
1.2.4.1 ΜΟΝΤΕΛΟ REFOLDING.....	35
1.2.4.2 NATIVELY UNFOLDED	36
1.2.4.3 GAIN OF INTERACTION.....	36
1.2.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ.....	40
1.2.6 ΦΥΣΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ	44
1.3 ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	46
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.1 ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	49
2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ (ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ)	51
2.3 ΧΡΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟ ΤΟΥ ΚΟΝΓΚΟ (CONGO RED).....	52
2.4 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ.....	53
2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΕΡΥΘΡΟΥ (ATR FT-IR).....	55
2.6 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (MODELING)	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
3.1.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ	60
3.1.2 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ.....	64
3.1.3 ΧΡΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟ ΤΟΥ ΚΟΝΓΚΟ (CONGO RED)	67
3.1.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΕΡΥΘΡΟΥ (ATR FT-IR)	69
3.2 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (MODELING)	72
3.2.1 ΟΜΟΛΟΓΗ ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ.....	72
3.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΚΥΡΟΒΟΛΗΣΗΣ (DOCKING).....	72
3.2.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΕΛΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ.....	75
3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	78
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	83

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ZONA PELLUCIDA

1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΤΗΣ ZONA PELLUCIDA

1.1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΖΡ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ZPG's)

1.2 ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ

1.2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ

1.2.4 ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ

1.2.4.1 ΜΟΝΤΕΛΟ REFOLDING

1.2.4.2 NATIVELY UNFOLDED

1.2.4.3 GAIN OF INTERACTION

1.2.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ

1.2.6 ΦΥΣΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ

1.3 ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ZONA PELLUCIDA

1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

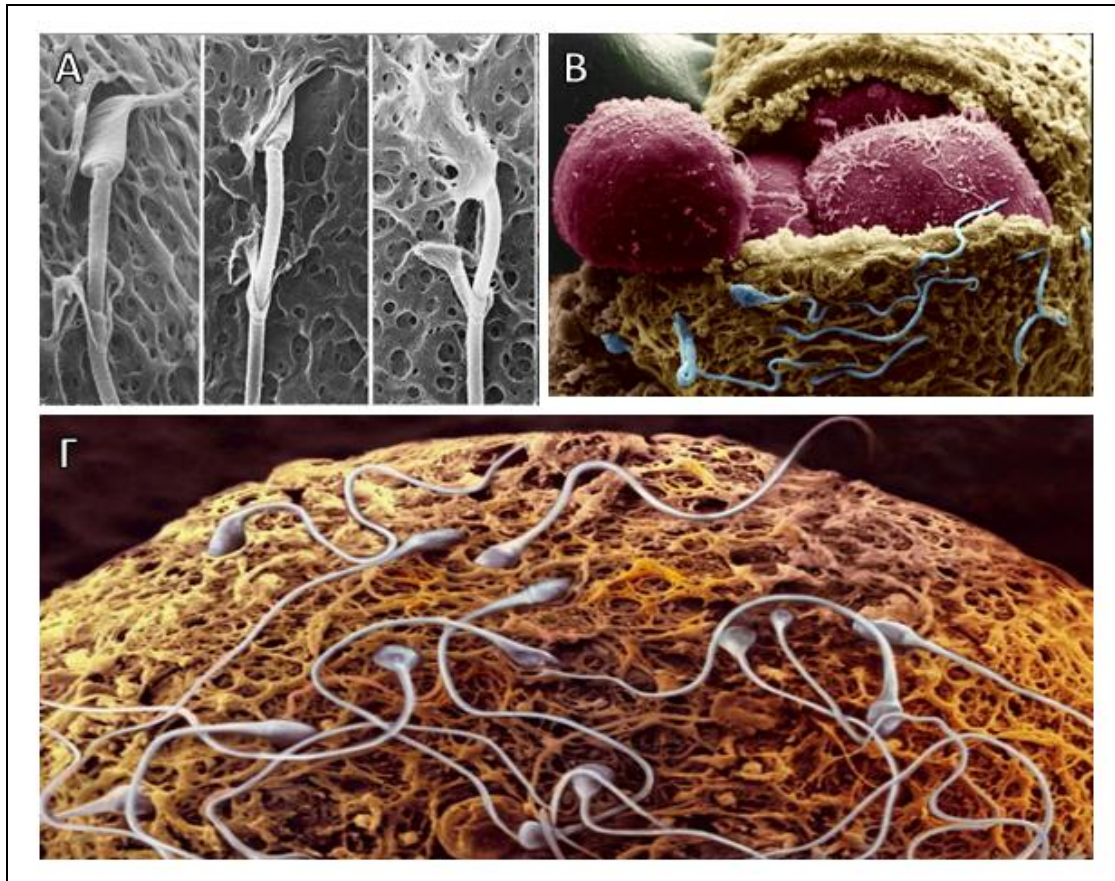
Η zona pellucida (ZP), γνωστή επίσης και ως διαφανής ζώνη (στα λατινικά pellucida σημαίνει διαφανής), είναι μια γλυκοπρωτεϊνικής κυρίως φύσεως δομή, που περιβάλλει τα ωκύτταρα όλων των θηλαστικών και κατέχει σημαντικό ρόλο κατά τις διαδικασίες της ωογένεσης και της γονιμοποίησης (1-3). Πρόκειται για μία ελαστική και πορώδης δομή, το πάχος της οποίας κυμαίνεται μεταξύ των ειδών από 1-25 μm ή ακόμα και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους (4,5), ενώ αντίστοιχη διακύμανση παρουσιάζει και η περιεκτικότητα της σε πρωτεΐνη (~1-30 ng). Η σύνθεση της εντοπίζεται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του ωκυττάρου και αυξάνει σε μέγεθος ανάλογα με τα στάδια ανάπτυξης του ωκυττάρου, ενώ παραμένει και μετά την γονιμοποίηση, προστατεύοντας το αναπτυσσόμενο έμβρυο μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης (6). Επεξεργασία της ZP σε χαμηλό pH (~2,5 - 3,5) ή με αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε πλήρη αποδιάταξη της, κάτι που αποτελεί ένδειξη πως οι πρωτεΐνες που την συγκροτούν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν από την επεξεργασία της με αποδιατακτικούς παράγοντες (π.χ. μερκαπτοαιθανόλη) υποδεικνύοντας την παρουσία δισουλφιδικών δεσμών απαραίτητων για την διατήρηση της δομής (7).



Εικόνα 1. Η zona pellucida ωκυττάρου όπως εμφανίζεται σε μικρογραφία από μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής Nomarski (8).

Εκτός του προστατευτικού ρόλου που εμφανίζει πριν και μετά την γονιμοποίηση, η ZP έχει πρωταγωνιστικό ρόλο και κατά την γονιμοποίηση, διότι μέσω αυτής είναι δυνατή η ειδοειδική αναγνώριση του σπερματοζωαρίου. Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι αφαιρώντας την δομή αυτή από το ωκύτταρο δεν είναι δυνατή η αναγνώριση και συνεπώς σε επόμενο στάδιο η σύντηξη σπερματοζωαρίου με το ωκυττάρου (9). Επιπλέον είναι υπεύθυνη για την παρεμπόδιση της πολυσπερμίας, δηλαδή της γονιμοποίησης του ωκυττάρου από περισσότερα του ενός σπερματοζωάρια ενώ ταυτόχρονα παρεμποδίζει και την πραγματοποίηση της

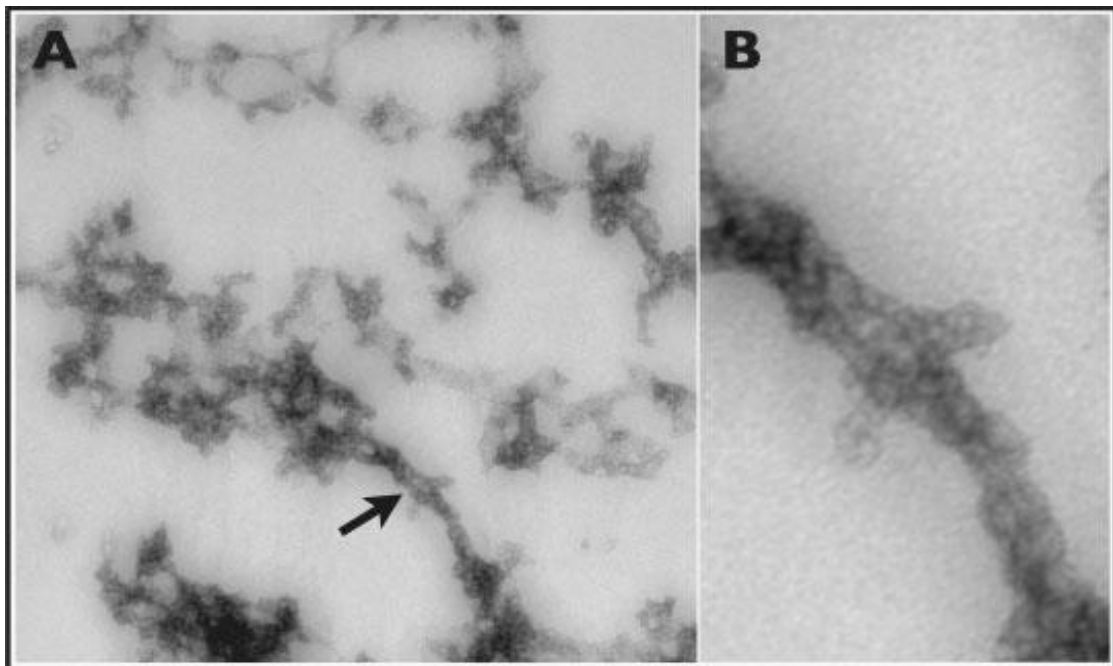
διαειδικής γονιμοποίησης δηλαδή της γονιμοποίησης του ωαρίου από σπερματοζωάρια διαφορετικού είδους.



Εικόνα 2. Οι λειτουργίες της zona pellucida. (A) Η δομή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσδεση του σπερματοζωαρίου, (B) προστατεύει το ωκύτταρο από μηχανικές πιέσεις και ταυτόχρονα παρεμποδίζει το φαινόμενο της πολυσπερμίας (Γ).

1.1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΤΗΣ ΖΟΝΑ PELLUCIDA

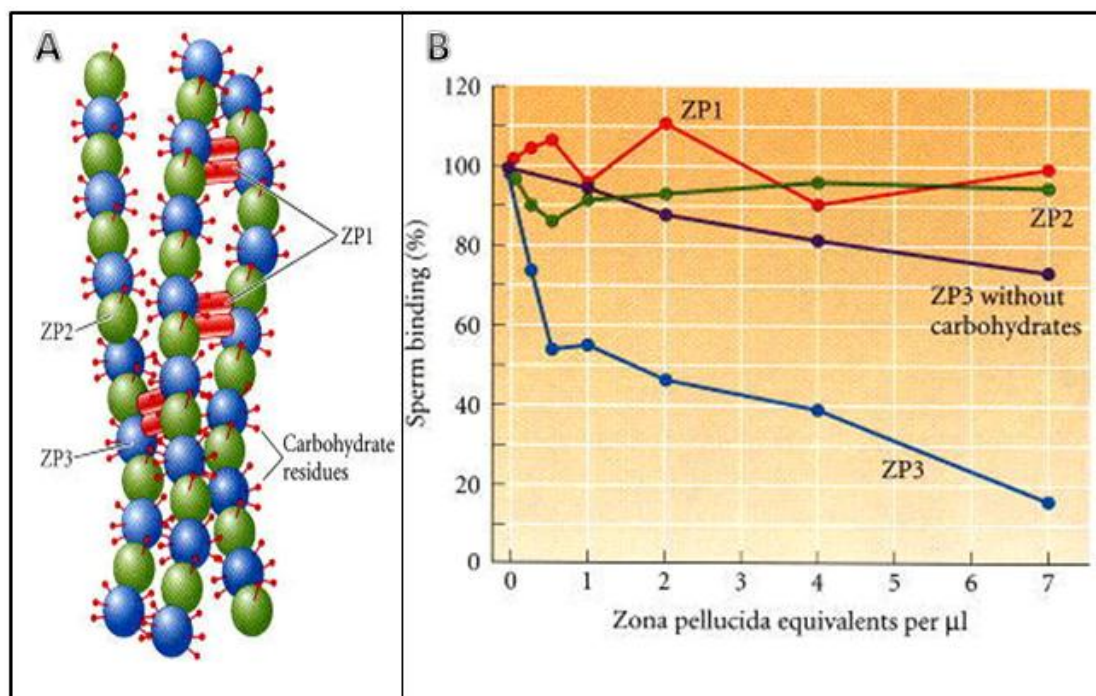
Σχετικά με την δομή της ΖΡ, λίγα πράγματα ήταν γνωστά πριν την πρόταση των Dietl & Czuppon το 1984, πως αποτελείται από ινίδια τα οποία σχηματίζονται από σφαιρικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με σύνδεση τύπου κεφαλής-ουράς (10). Αυτή η πρόταση επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των Greve & Wassarman, οι οποίοι το 1985 παρατήρησαν απομονωμένα, από zona pellucida ποντικού, ινίδια σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με την μέθοδο της κυκλικής σκίασης και εντόπισαν πως οι σφαιρικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό αυτών των ινιδίων είναι τρεις γλυκοπρωτεΐνες (ZPG's) που ονομάζονται ZP1, ZP2 και ZP3 (11).



Εικόνα 3. (A) Ηλεκτρονική μικρογραφία πολυμερών ZP3 πρωτεΐνης. (B) Σε μεγέθυνση μια περιοχή (βέλος) όπου φαίνεται ο σχηματισμός ινιδίου (12).

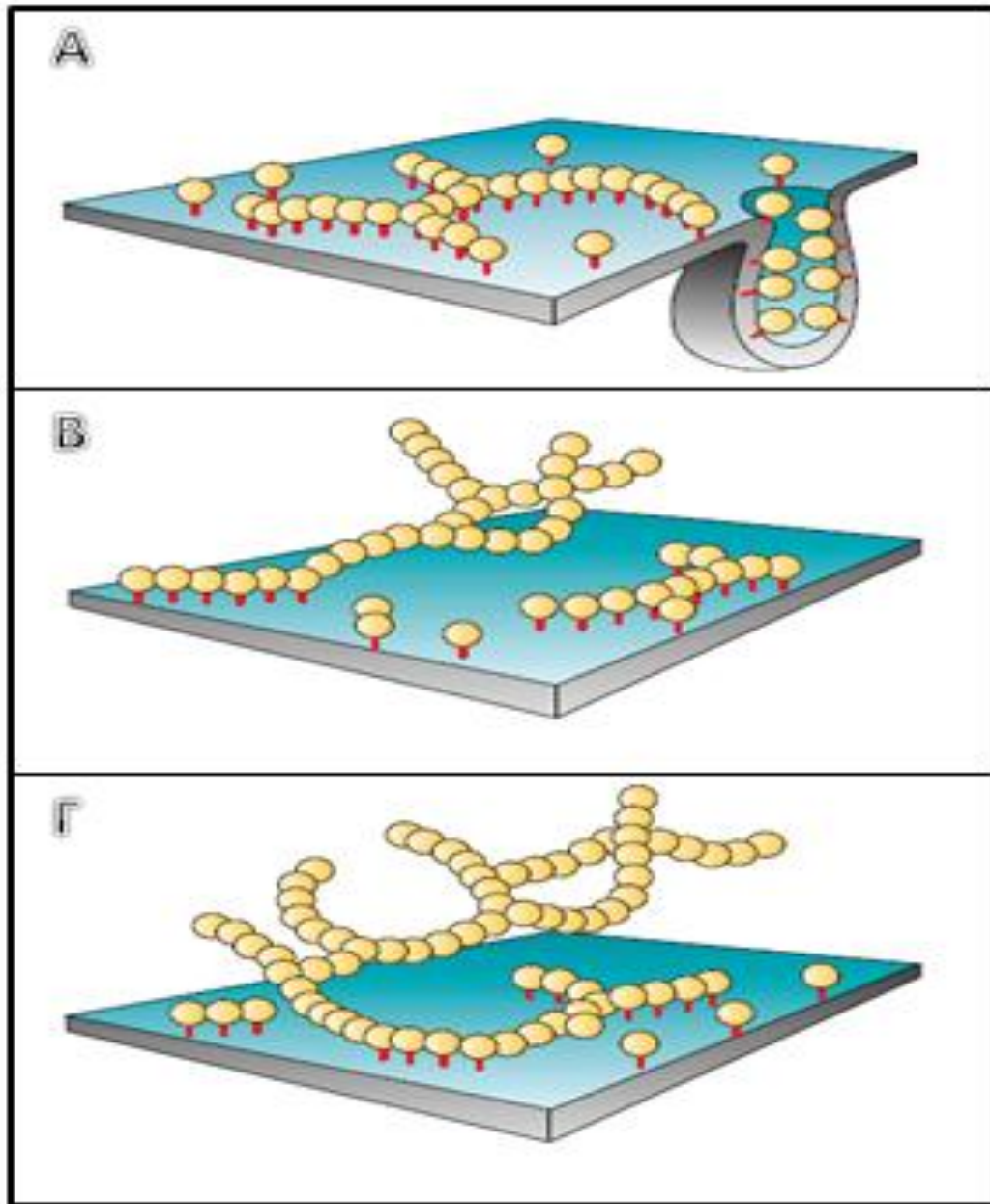
Τρεις γλυκοπρωτεΐνες, αντίστοιχες αυτών του ποντικού (με μικροδιαφορές στην ονοματολογία), είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό της zona pellucida σε όλα τα είδη των θηλαστικών (σε μερικά είδη συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου έχει βρεθεί και μια τέταρτη, η ZP4, που είναι παρόμοια σε δομή και ρόλο με την ZP1). Με βάση τα αποτελέσματα που υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες ZP2 και ZP3 αποτελούν περίπου το 90% της zona pellucida με την ZP1 (ή/και ZP4) να αποτελεί αντίστοιχα το 10%, ο Wassarman πρότεινε ένα μοντέλο, το οποίο επικρατεί έως και σήμερα, για το σχηματισμό των ινιδίων. Συγκεκριμένα πρότεινε πως τα ινίδια σχηματίζονται από επαναλαμβανόμενα ετεροδιμερή των ZP2 και ZP3 πρωτεϊνών (που βρίσκονται σε ισομοριακές ποσότητες ~45%), ενώ διασυνδέονται μεταξύ τους μέσω ομοδιμερών της ZP1 πρωτεΐνης (13). Αργότερα, παρατηρήθηκε πως zona pellucida σχηματίζεται και σε knock out ποντικούς για το γονίδιο της ZP2 πρωτεΐνης και βρέθηκε πως τη θέση της εν μέρει καταλαμβάνει η ZP1, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας πολύ λεπτής στιβάδας η οποία όμως δεν διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, κάτι που δεν συμβαίνει σε knock out ποντίκια για το γονίδιο της ZP3, όπου δεν σχηματίζεται σε καμία περίπτωση zona pellucida (14). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην τροποποίηση του αρχικού μοντέλου του Wassarman που πρότεινε πως τα ομοδιμερή ZP1 βρίσκονται μεταξύ των ινιδίων, υποδεικνύοντας πως όπου αυτά εμφανίζονται αντικαθιστούν μονομερή της ZP2 πρωτεΐνης ενώ η διασύνδεση των ινιδίων πραγματοποιείται πιθανότατα μέσω μιας συγκεκριμένης και χαρακτηριστικής αυτοτελούς δομικής περιοχής που φέρουν μόνο η ZP1 πρωτεΐνες, γνωστή ως trefoil domain (η τριτοταγής δομή της φέρει σχήμα τριφυλλιού).

Σχετικά με τη συγκρότηση της δομής αυτής, διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί μέχρι σήμερα χωρίς ακόμα να έχει διευκρινιστεί πλήρως ποιο είναι αυτό που επικρατεί στη πραγματικότητα. Οι πρωτεΐνες παράγονται κατά κύριο λόγο από τα θυλακοκύτταρα που περιβάλλουν το ωάριο, αν και δεδομένα τελευταία υποδεικνύουν ότι σημαντικές ποσότητες παράγονται και από το ίδιο το ωοκύτταρο. Οι πρωτεΐνες που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα αρχικά, μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου υφίστανται N-γλυκοζυλίωση σε πολλαπλές θέσεις. Σε επόμενο στάδιο μεταφέρονται στο σύστημα Golgi όπου πραγματοποιείται περαιτέρω O-γλυκοζυλίωση και από εκεί μεταφέρονται μέσω κυστιδίων, στην μεμβράνη των οποίων παραμένουν αγκυστρωμένες μέσω ενός διαμεμβρανικού τμήματος, στην πλασματική μεμβράνη του ωοκυττάρου (είτε παράγονται από το ωοκύτταρο είτε από τα θυλακοκύτταρα).



Εικόνα 4. (A) Το μοντέλο σχηματισμού των ινιδίων της zona pellucida όπως το πρότεινε ο Paul Wassarman. (B) Τα πρώτα πειραματικά αποτελέσματα που συνέδεσαν τη ZP3 με την πρόσδεση σπερματοζωαρίων. Είναι φανερό πως το ποσοστό πρόσδεσης σπερματοζωαρίων μειώνεται αισθητά απουσία της ZP3 (9,15).

Ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες συγκροτούν μετέπειτα τα ινίδια παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. Το επικρατέστερο σήμερα μοντέλο προτείνει πως οι μονομερείς πρωτεΐνες απελευθερώνονται αμέσως από τη μεμβράνη του ωοκυττάρου και η συγκρότηση λαμβάνει μέρος στο διαμεμβρανικό χώρο μεταξύ ωοκυττάρου και θυλακοκυττάρων (16). Μία εναλλακτική πρόταση είναι πως η συγκρότηση λαμβάνει μέρος όσο οι πρωτεΐνες παραμένουν αγκυστρωμένες πάνω στην πλασματική μεμβράνη του ωοκυττάρου και απελευθερώνονται σε επόμενο στάδιο τα ινίδια που έχουν σχηματιστεί, πρόταση που παρότι αρχικά υποστηριζόταν από ορισμένα πειραματικά δεδομένα που υποδεικνύουν την ύπαρξη νησίδων στην επιφάνεια ωοκυττάρου σε αρχικά στάδια, συγκεντρώνει πια ελάχιστες πιθανότητες μετά και την λύση της κρυσταλλικής δομής μιας εκ των ZPG που υπέδειξε πως αφού αυτές απελευθερωθούν από την μεμβράνη, υφίστανται χαρακτηριστική στερεοδιαταξική αλλαγή και αποκτούν την κατάλληλη στερεοδομή που τους επιτρέπει να πολυμεριστούν σε ινίδια (16). Μία επιπλέον πρόταση, υποστήριζε πως ο πολυμερισμός λάμβανε μέρος εντός των κυστιδίων, πριν την εξωκύτωση των μονομερών στην επιφάνεια του ωοκυττάρου, ωστόσο έχει απορριφθεί καθώς πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν πως η πρωτεΐνη σχηματίζει διμερή εντός των κυστιδίων που εμποδίζουν την αυτοσυγκρότηση σε ινίδια (17).



Εικόνα 5. Τα επικρατέστερα μοντέλα σχετικά με το μηχανισμό συγκρότησης της zona pellucida. (Α) Πρόταση που υποστηρίζει πως ο πολυμερισμός ξεκινά εντός των κυστιδίων. (Β) Η τελική θεωρία που υποστηρίζει πως ο πολυμερισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται, στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ ωοκυττάρου και θυλακοκυττάρων, αφού απελευθερωθούν. (Γ) Η αρχική πρόταση πως η συγκρότηση συμβαίνει στην επιφάνεια του ωοκυττάρου με το σχηματισμό νησίδων πριν οι ΖΡ πρωτεΐνες απελευθερωθούν από την μεμβράνη (16).

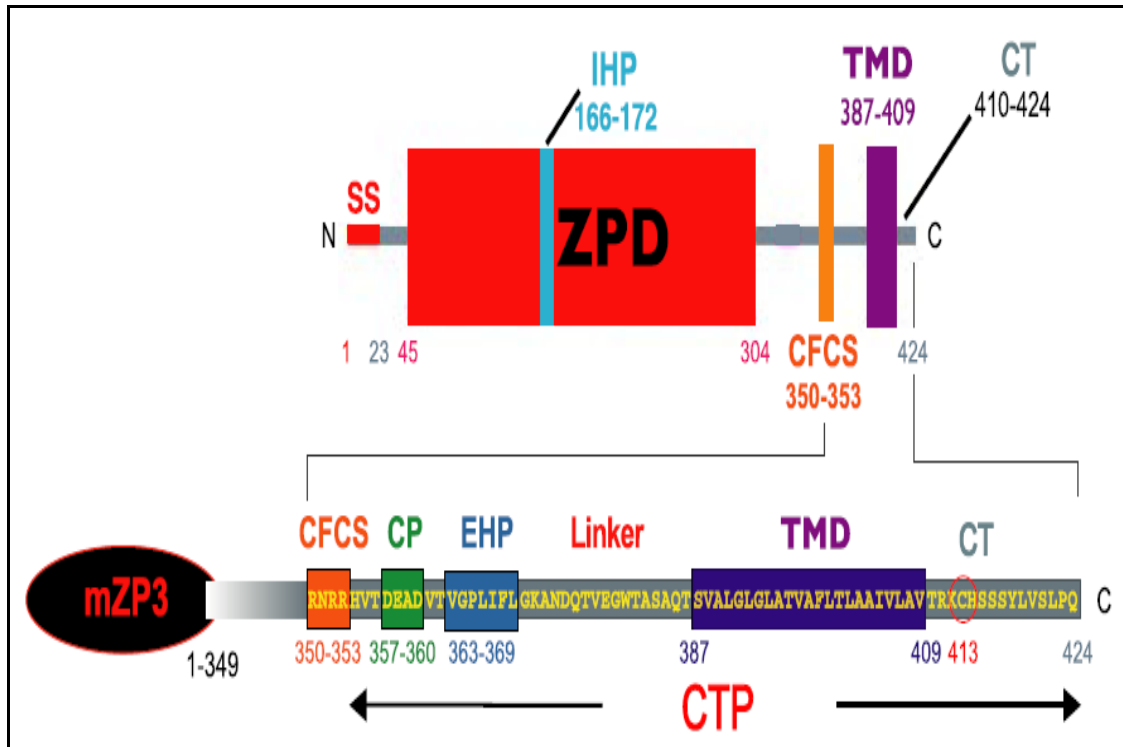
1.1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ZP ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (ZPG's)

Όλες οι πρόδρομες ZP πρωτείνες φέρουν κάποια βασικά κοινά χαρακτηριστικά στη μοριακή τους οργάνωση. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, διακρίνεται η παρουσία ενός πεπτιδίου οδηγητή (SP), μεγέθους ~20-25 αμινοξικών καταλοίπων, του οποίου ο ρόλος περιορίζεται καθαρά στο να κατευθύνει την πρωτεΐνη στο εκκριτικό μονοπάτι, κάτι που επιτυγχάνει με το να την κατευθύνει προς το ενδοπλασματικό δίκτυο μετά την σύνθεσή της, όπου και αποκόπτεται. Επιπλέον διαθέτουν μια χαρακτηριστική δομική αυτοτελή μονάδα, η οποία είναι γνωστή ως ZP domain και η οποία πιστεύεται πως είναι υπεύθυνη για την λειτουργία αλλά και τον πολυμερισμό των ZP πρωτεϊνών.

Το δομικό αυτό στοιχείο χωρίζεται σε δύο δομικές υπομονάδες που ονομάζονται ZPN και ZPC ανάλογα με το αν βρίσκονται προς το αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο του ZP domain. Οι δύο αυτές υπομονάδες χωρίζονται από μια μικρού μήκους υδρόφοβη περιοχή γνωστή ως IHP (Internal Hydrophobic Patch) με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο κατά τα πρώτα στάδια της πρωτεΐνης (πριν βρεθεί στην επιφάνεια του ωοκυττάρου) και ένα επιπλέον τμήμα σύνδεσης (linker).

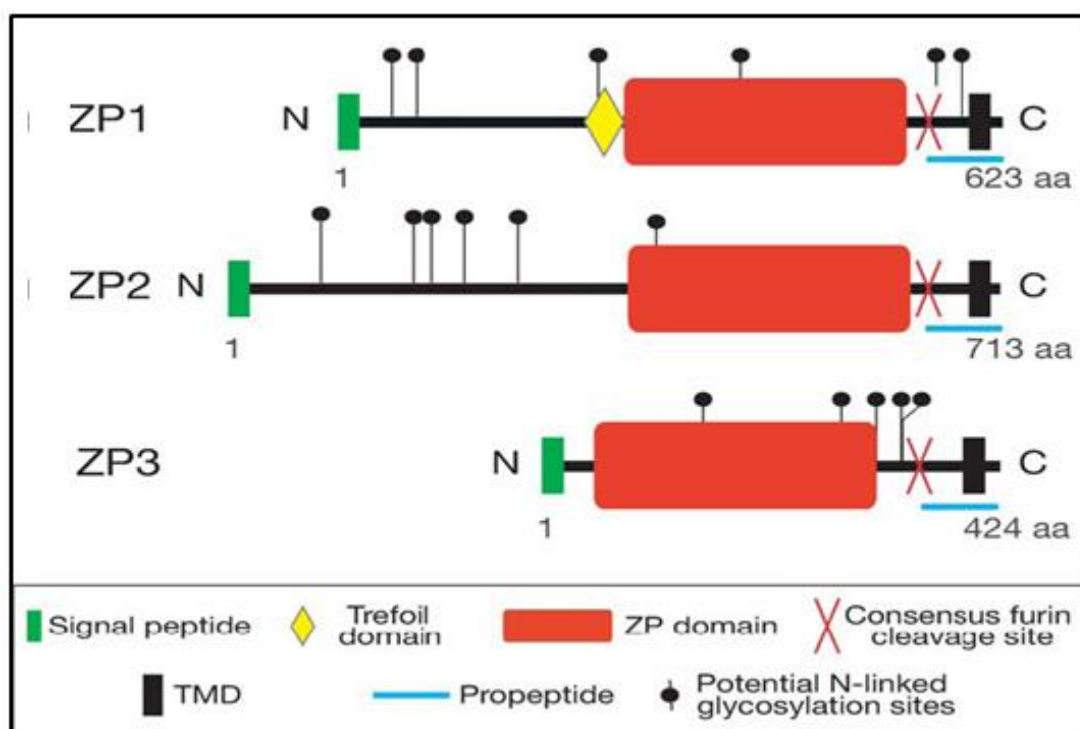
Ακολουθεί η παρουσία ενός διαμεμβρανικού τμήματος (TMD), που διατηρεί την πρωτεΐνη αγκυροβολημένη με την μεμβράνη αρχικά του κυστιδίου και εν συνεχεία την πλασματική μεμβράνη του ωοκυττάρου, ενώ μεταξύ αυτού και του ZP domain υπάρχει μια ακολουθία εκτομής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (πραγματοποιείται από ένα ειδικό ένζυμο, παρόμοιο φουρίνης) που ονομάζεται CFCS (Consensus Furin Cleavage Site).

Τέλος, ακολουθεί μία ακόμα μικρή υδρόφοβη περιοχή που ονομάζεται EHP (External Hydrophobic Patch) η οποία και αλληλεπιδρά με την IHP και εμποδίζει την πρόδρομη ZP πρωτεΐνη να αποκτήσει την τελική της διαμόρφωση.



Εικόνα 6. Ανάλυση των βασικών δομικών χαρακτηριστικών που φέρουν όλες οι ZP πρωτεΐνες και λεπτομερέστερη ανάλυση του καρβοξυλικού τους άκρου. SS: Signal sequence (πεπτικό οδηγητής), ZPD: ZP Domain, CFCS: Furin-like cleavage site (σημείο εκτομής), TMD: Transmembrane Domain (διαμεμβρανικό τμήμα), IHP-EHP (Internal-External Hydrophobic Patch), CP (υδρόφιλο τμήμα).

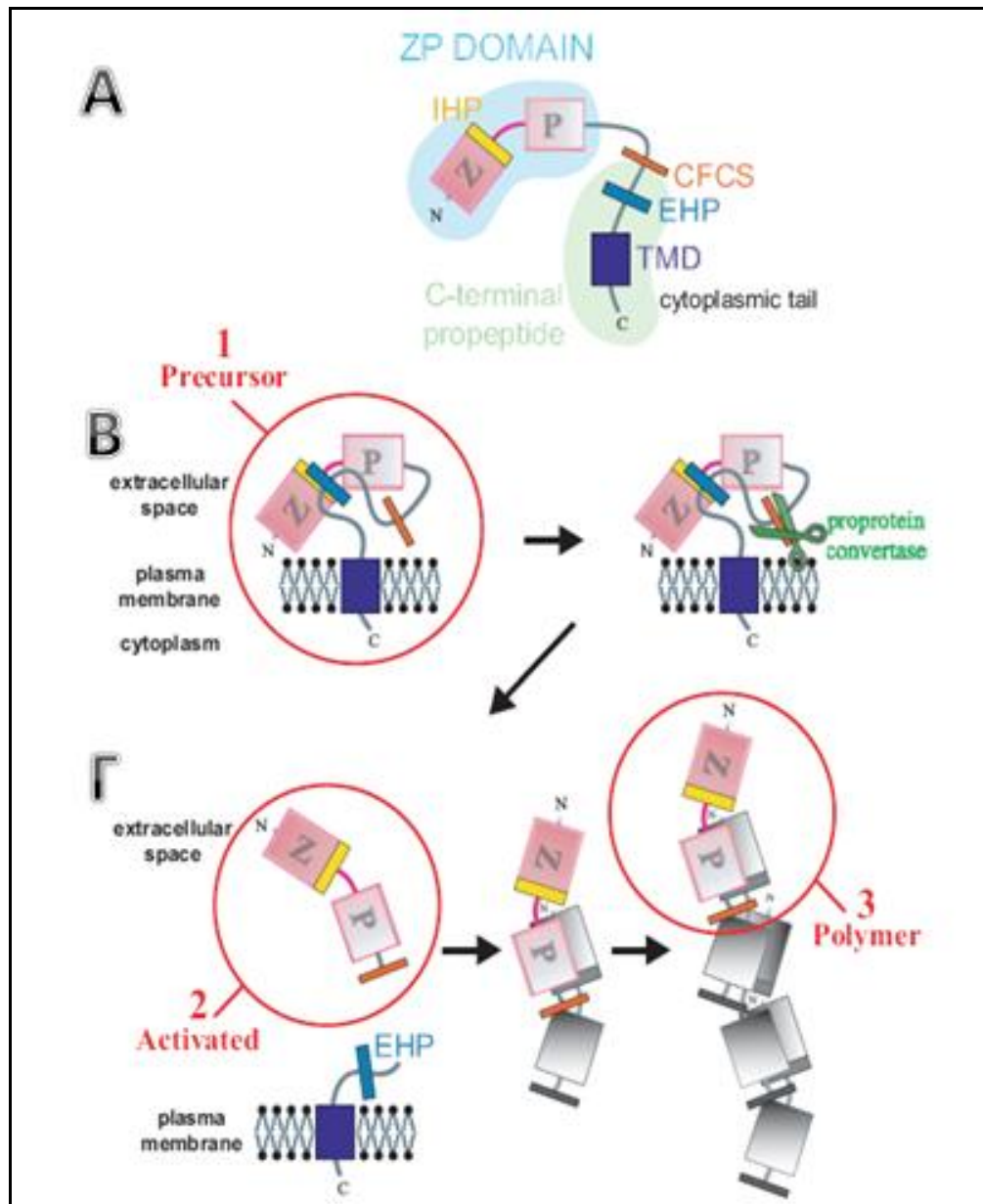
Πρέπει να τονιστεί πως όλες οι ZP πρωτεΐνες φέρουν διάφορες καθορισμένες θέσεις N-γλυκοζυλίωσης και O-γλυκοζυλίωσης, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σχετικά με την λειτουργία τους κυρίως. Ακόμα, όπως προαναφέρθηκε, μόνο στην περίπτωση των ZP1 (ή/και ZP4) υπάρχει μια επιπλέον αυτοτελής δομική περιοχή γνωστή ως trefoil domain, που προηγείται του ZP domain και θεωρείται ως υπεύθυνη για την διασύνδεση των ινιδίων (Εικ. 7).



Εικόνα 7. Οι πολλαπλές θέσεις γλυκοζυλίωσης που διαφέρουν ανάμεσα στις τρεις ZP πρωτεΐνες και το trefoil domain, που διαχωρίζει την ZP1 από τις υπόλοιπες και είναι υπεύθυνο για την διασύνδεση των ινιδίων της zona pellucida (18).

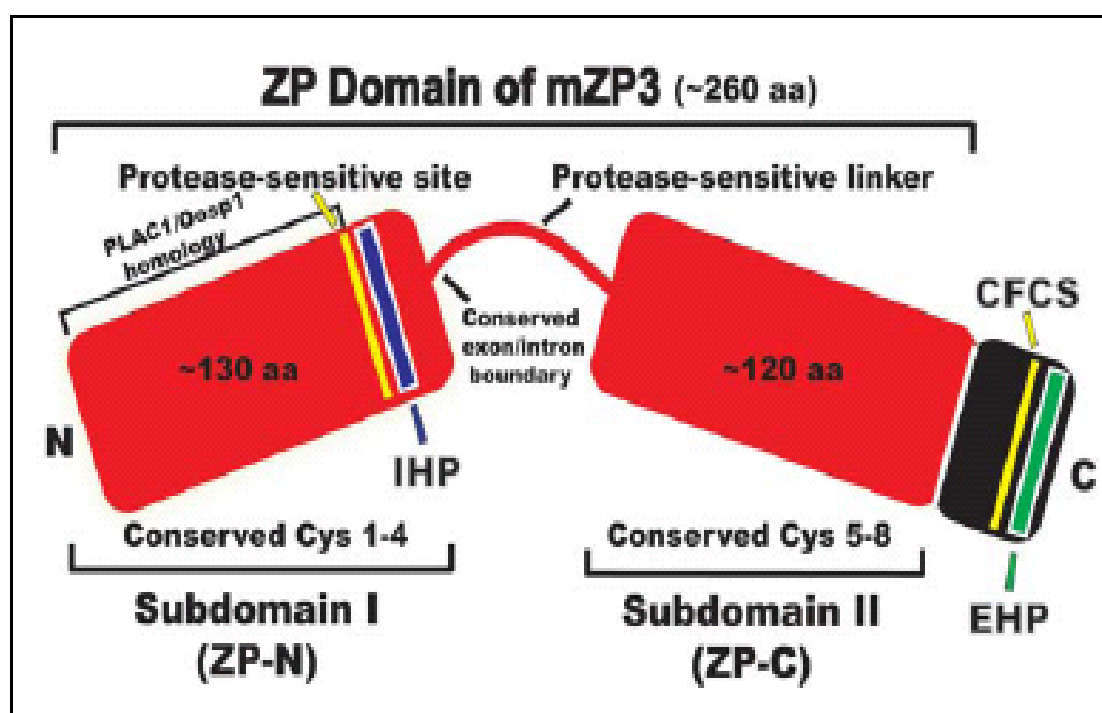
Με την εξωκύτωση στην επιφάνεια του ωοκυττάρου, οι ZP πρωτεΐνες γίνονται προσβάσιμες στην δράση ενζύμων παρόμοιων φουρίνης (furin-like enzymes) που αναγνωρίζουν την περιοχή CFCS και προκαλούν την εκτομή της πρωτεΐνης, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια όλου του υπολοίπου καρβοξυτελικού άκρου που περιέχει εκτός των άλλων το TMD

αλλά και την EHP περιοχή. Σαν επακόλουθο της απώλειας του TMD, η πρωτεΐνη απελευθερώνεται από την πλασματική μεμβράνη, ενώ λόγω της απώλειας του EHP αποκτά πια την τελική της διαμόρφωση που ευνοεί και τον πολυμερισμό της σε ινίδια (19).



Εικόνα 8. Η στερεοδιαταξική αλλαγή που υφίστανται οι ZP πρωτεΐνες κατά την μεταφορά τους στην επιφάνεια του ωκυττάρου. (Α) Η αρχική δομή της ZP πρωτεΐνης όσο αυτή παραμένει εντός του κυστιδίου μεταφοράς. (Β) Το κυστίδιο συντίκεται με την πλασματική μεμβράνη του ωκυττάρου και η πρωτεΐνη εκτίθεται στο διακυτταρικό περιβάλλον. Δράση ενζύμων (παρομοίων φουρίνης) προκαλούν τομή στο CFCS, η πρωτεΐνη χάνει το καρβοξυτελικό της τμήμα και απελευθερώνεται. (Γ) Η νέα στερεοδιάταξη που έχει αποκτήσει η ZP πρωτεΐνης της επιτρέπει πλέον να πολυμεριστεί σε ινίδια (20).

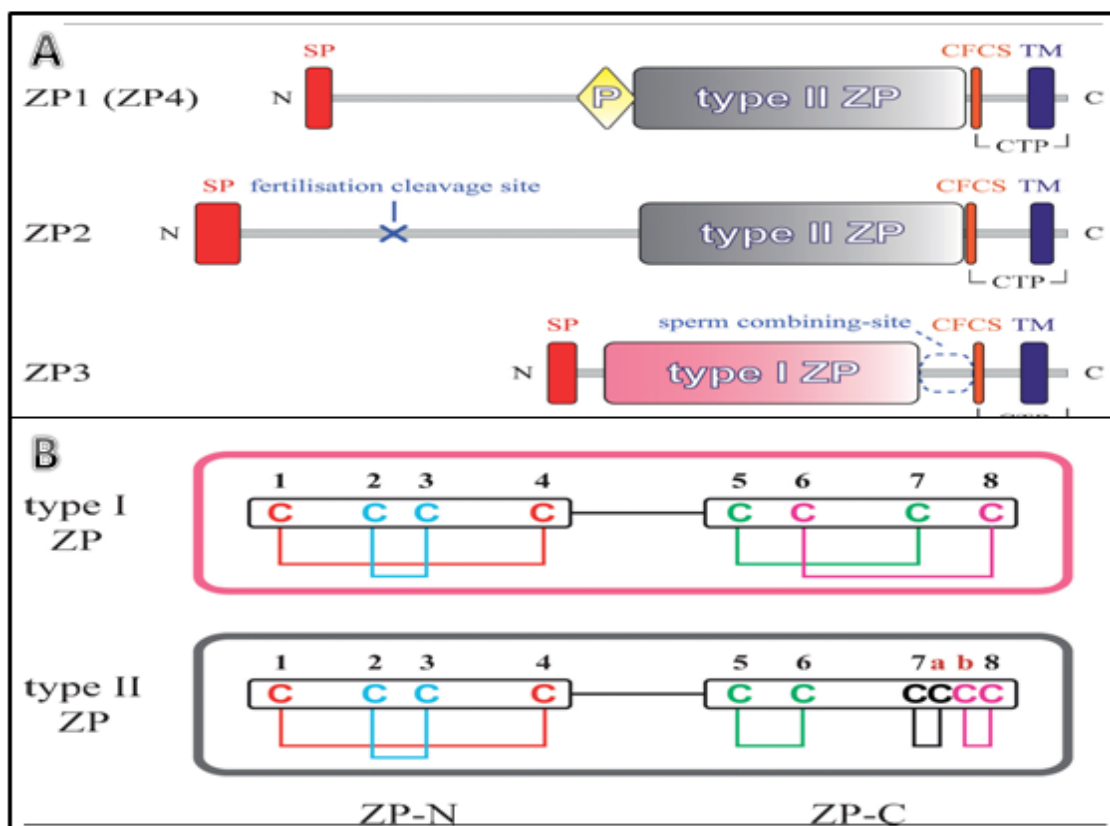
Όπως αναφέρθηκε, το σημαντικότερο τμήμα που είναι υπεύθυνο για τις λειτουργίες αλλά και τον πολυμερισμό των ZP πρωτεϊνών είναι το ZP domain. Το δομικό αυτό στοιχείο, που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά από τους Bork και Sander το 1992 στις πρωτεΐνες της zona pellucida, έχει βρεθεί επίσης και σε έναν μεγάλο αριθμό διαφόρων πρωτεϊνών με ποικίλες λειτουργίες, οι οποίες ονομάζονται ZP domain πρωτεΐνες (21). Τα βασικά χαρακτηριστικά του δομικού αυτού στοιχείου είναι πως αποτελείται κατά κανόνα από περίπου 260 αμινοξικά κατάλοιπα ενώ βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερη σημασία εμφανίζουν τα 8 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys) που σχηματίζουν ένα σταθερό πρότυπο ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών.



Εικόνα 9. Τα βασικά χαρακτηριστικά του ZP Domain (18).

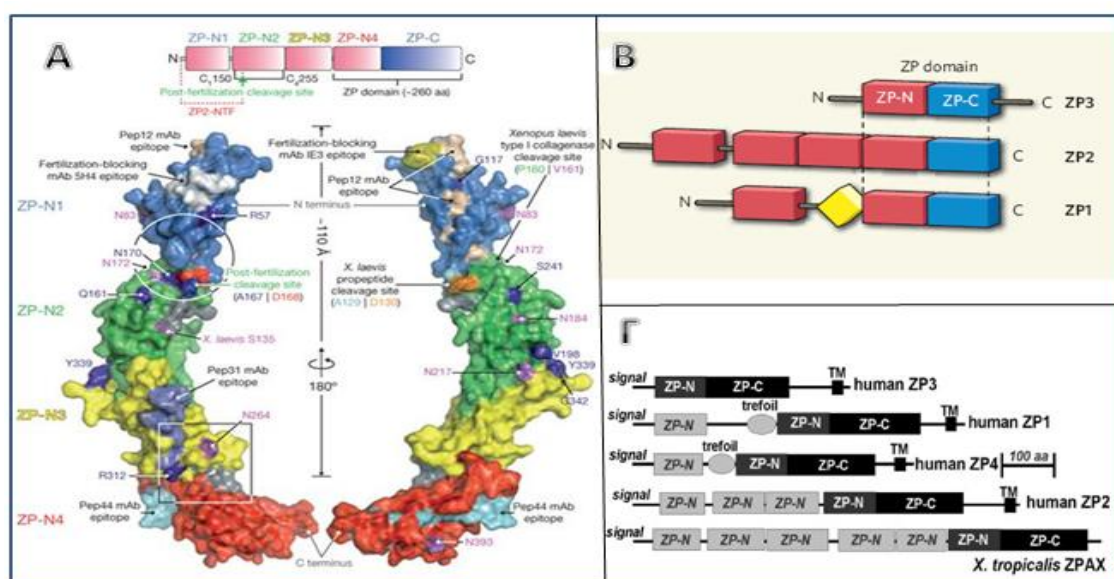
Οι ZP1 και ZP2 πρωτεΐνες ωστόσο, εμφανίζουν μια διαφοροποίηση σε αυτό το πρότυπο, που εντοπίζεται στην ZPC υπομονάδα τους και όχι στην ZPN, καθώς περιέχουν 10 κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν ένα

ελαφρώς διαφοροποιημένο πρότυπο δισουλφιδικών δεσμών (τύπου I ZP πρωτεΐνες), σε αντίθεση με την ZP3 (τύπου II ZP πρωτεΐνη) που ακολουθεί το σταθερό πρότυπο των 8 καταλοίπων Cys (19,22,23). Οι δεσμοί αυτοί, όπως προαναφέρθηκε φέρεται να παίζουν σημαντικότερο ρόλο στη διαμόρφωση της στερεοδιάταξης των ZP πρωτεϊνών και κατ' επέκταση ολόκληρης της zona pellucida. Το γεγονός ότι η διαφοροποίηση των ZP1 και ZP2 σε σχέση με την ZP3 αναφορικά με το πρότυπο των δισουλφιδικών δεσμών εντοπίζεται στην ZP-C υπομονάδα και όχι στην ZP-N, ταυτόχρονα με τα αποτελέσματα πειραμάτων απομόνωσης και μελέτης των δύο υπομονάδων χωριστά οδηγεί στην γενικότερη πεποίθηση πως η ZP-N υπομονάδα είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό των ZP πρωτεϊνών σε αντίθεση με την ZP-C υπομονάδα που είναι υπεύθυνη για την λειτουργία της πρωτεΐνης (24).



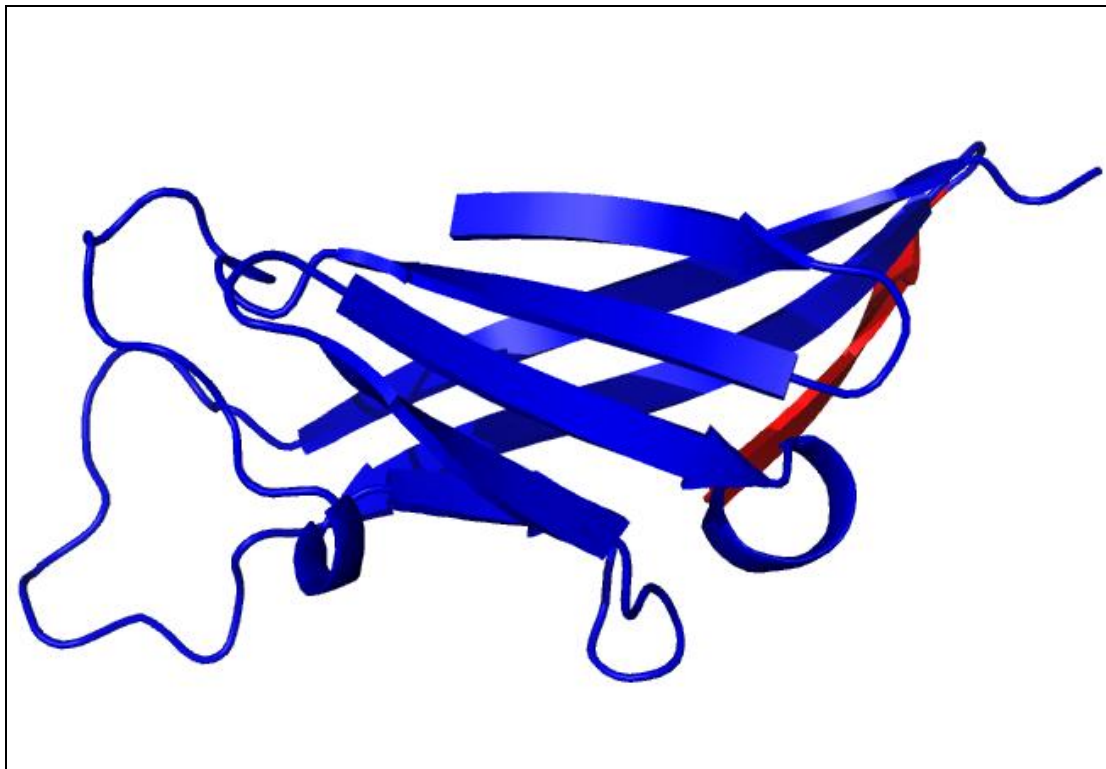
Εικόνα 10. (A) Οι δύο τύποι ZP πρωτεϊνών. (B) Η διαφορά στο πρότυπο των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των δύο τύπων ZP πρωτεϊνών(21).

Σχετικά με την λειτουργία τους, έχει δειχθεί πως η ZP3 πρωτεΐνη λειτουργεί ως ο πρωτογενής υποδοχέας αναγνώρισης σπερματοζωαρίων, μέσω μιας συγκεκριμένης Ο-γλυκοζυλιωμένης θέσης της ZP-C υπομονάδας που αναγνωρίζει και προσδένει ειδοειδικά το σπερματοζωάριο. Επιπροσθέτως, η ZP2 λειτουργεί ως δευτερογενής υποδοχέας καθώς η σύνδεση της με το σπερματοζωάριο είναι επίσης απαραίτητη για την έναρξη της ακροσωμικής αντίδρασης, ενώ ταυτόχρονα είναι υπεύθυνη για την σκλήρυνση της zona pellucida μετά την γονιμοποίηση (9,12,25). Η ιδιότητα της σκλήρυνσης της zona pellucida οφείλεται στην παρουσία των λεγόμενων ZP-N extensions. Πρόκειται για επαναλήψεις της ZP-N υπομονάδας που έχουν βρεθεί στην ακολουθία της ZP2 πρωτεΐνης των θηλαστικών και οι οποίες προηγούνται του ZP domain. Με την εισροή ιόντων Ca^{2+} που πραγματοποιείται μετά την γονιμοποίηση του ωοκυττάρου προκαλείται ενεργοποίηση ειδικών ενζύμων που τέμνουν την ZP2 της zona pellucida απομακρύνοντας την πρώτη ZP-N υπομονάδα της κάτι που οδηγεί τελικά στην σκλήρυνση της δομής της zona pellucida (23,24,26).



Εικόνα 11. (Α) Τα ZP-N extensions και το σημείο τομής της πρώτης υπομονάδας.(Β) Τα ZP-N extensions των ZP πρωτεϊνών.(Γ) ZP-N extensions σε ZP domain πρωτεΐνες (26-28).

Η δομή της ZP-N υπομονάδας έχει λυθεί κρυσταλλογραφικά και είναι γνωστή. Πρόκειται για μια αντιπαράλληλου β-sandwich πρωτεΐνη (ανήκει στην οικογένεια των Ig-like πρωτεϊνών). Συγκεκριμένα αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, οι οποίες σχηματίζουν αυτό το β-sandwich, που ονομάζονται N1 και N2, και αποτελούνται από τους αντιπαράλληλους β-κλώνους A-B-E-D και C-E'-F-G αντίστοιχα. Διαφέρει από την δομή των κλασικών Ig πρωτεϊνών δεδομένου του ότι ο C β-κλώνος είναι πολύ μικρότερος σε μήκος συγκριτικά με τους F και G γεγονός που επιτρέπει την παρουσία ενός επιπλέον β-κλώνου, του E' β-κλώνου. Έχει αποδειχθεί, επίσης κρυσταλλογραφικά, πως ο επιπλέον αυτός κλώνος είναι ιδιαίτερης σημασίας μιας και συμμετέχει στον σχηματισμό διμερών ZP-N μέσω αλληλεπίδρασης με τον αντίστοιχο E' β-κλώνο της άλλης υπομονάδας (23).



Εικόνα 12. Η δομή της ZP-N υπομονάδας της ZP3 πρωτεΐνης του ποντικού. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνεται ο E' β-κλώνος που φέρεται να συμμετέχει στον σχηματισμό διμερών ZP-N υπομονάδων.

Τέλος, πρόσφατα λύθηκε κρυσταλλογραφικά και η δομή ολόκληρου του ZP domain της ZP3 πρωτεΐνης του ποντικού, όπου γίνεται εμφανής και πειραματικά η αδυναμία της πρωτεΐνης να σχηματίσει ινίδια μέσω του πολυμερισμού της εξαιτίας του στερεοδιαταξικού παρεμποδισμού που προκαλείται από την σύνδεση του IHP με το EHP (29).



Εικόνα 13. Η δομή ολόκληρης της ZP3 πρωτεΐνης του ποντικού. Με μπλε εμφανίζεται η ZP-N υπομονάδα ενώ η αντίστοιχη ZP-C με πράσινο. Αυτή η στερεοδιάταξη της ZP πρωτεΐνης (εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του IHP με το EHP) εμποδίζει τον πολυμερισμό της υπομονάδας μέσω του E' β-κλώνου (κόκκινο χρώμα).

1.2 ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Με τον όρο “αμυλοειδή” περιγράφονται χαρακτηριστικές εξωκυτταρικές ή ενδοκυτταρικές εναποθέσεις αδιάλυτων ινιδίων που δημιουργούνται από διαλυμένες πρωτεΐνες ή και πεπτίδια, όταν διπλώνουν κατά μη φυσιολογικό τρόπο και αυτοσυγκροτούνται σε ινίδια.

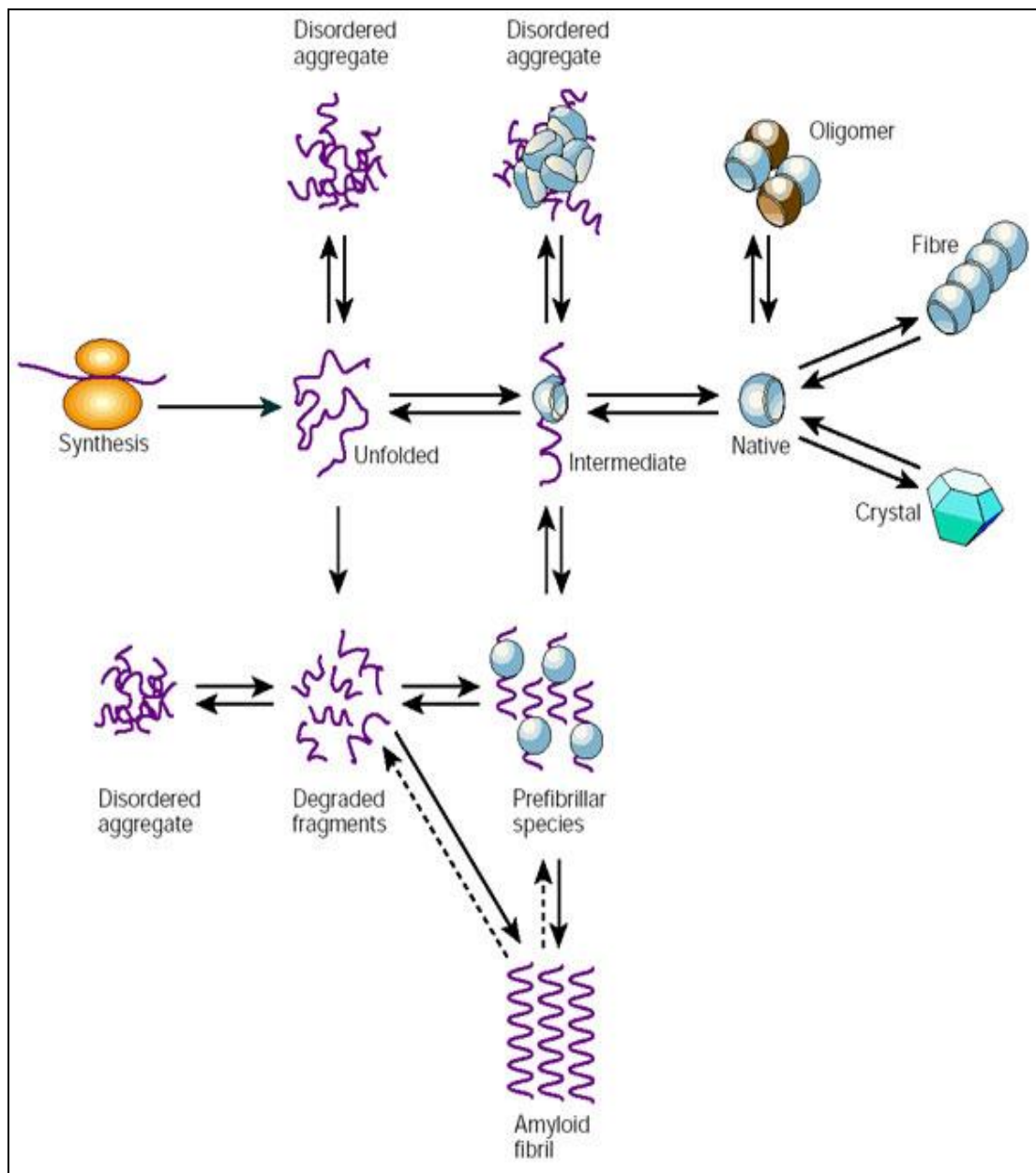
Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε λανθασμένα για πρώτη φορά από τον R. Virchow το 1854, ο οποίος παρατήρησε χαρακτηριστικές τέτοιες εναποθέσεις οι οποίες δέσμευαν την χρωστική ιωδίου, που αποτελεί τυπικό δείκτη παρουσίας αμύλου. Ακολούθησε η χρήση ειδικών ιστοχημικών χρώσεων (30) αλλά και τεχνικές που προϋποθέτουν την χρήση πολωτικού μικροσκοπίου, με τις οποίες διαπιστώθηκε πως ένα από τα χαρακτηριστικά των αμυλοειδών εναποθέσεων είναι η παρουσία μίας έντονης διπλοθλαστικότητας. Ο W. Astbury ήταν ο πρώτος ερευνητής που υπέδειξε πως πιθανώς όλες οι πρωτεΐνες μπορούν να βρεθούν σε ινιδιακή αλλά και σε σφαιρική κατάσταση και επιχείρησε να περιγράψει την “cross-β” δομή που σήμερα γνωρίζουμε πως επικρατεί στα αμυλοειδή (31), ενώ οι Cohen & Calkins ήταν που με την βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας εντόπισαν πως πρόκειται όντως για εναποθέσεις πρωτεϊνικών ινιδίων και αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην παρόμοια μορφολογία που εμφανίζουν, ανεξαρτήτως προέλευσης, τα αμυλοειδή ινίδια (32). Τέλος, το πρώτο περιθλασίγραμμα χαρακτηριστικής “cross-β” δομής των αμυλοειδών πάρθηκε σχεδόν μια δεκαετία αργότερα, υποδεικνύοντας με αυτό το τρόπο πως η δομή των

αμυλοειδών οφείλεται στην παρουσία β-πτυχωτών φύλλων, παράλληλων προς τον άξονα του ινιδίου (33).

Αρχικά, εδώ και δεκαετίες, η ύπαρξη αμυλοειδών είχε συσχετισθεί με ένα πλήθος ασθενειών που είναι γνωστές ως αμυλοειδώσεις, όπως η νόσος Alzheimer και Huntington, η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια ή ο διαβήτης τύπου II και πολλές ακόμα. Ωστόσο, η μελέτη της δομής και των ιδιοτήτων των αμυλοειδών ινιδίων σε συνδυασμό με την πρόσφατη ανακάλυψη προστατευτικών αντίστοιχων εναποθέσεων (34,35), έχει ως αποτέλεσμα στη διεθνή βιβλιογραφία ο όρος αυτός σήμερα να χρησιμοποιείται γενικότερα για να περιγράψει ινώδεις δομές που εμφανίζουν κάποια κοινά βασικά χαρακτηριστικά.

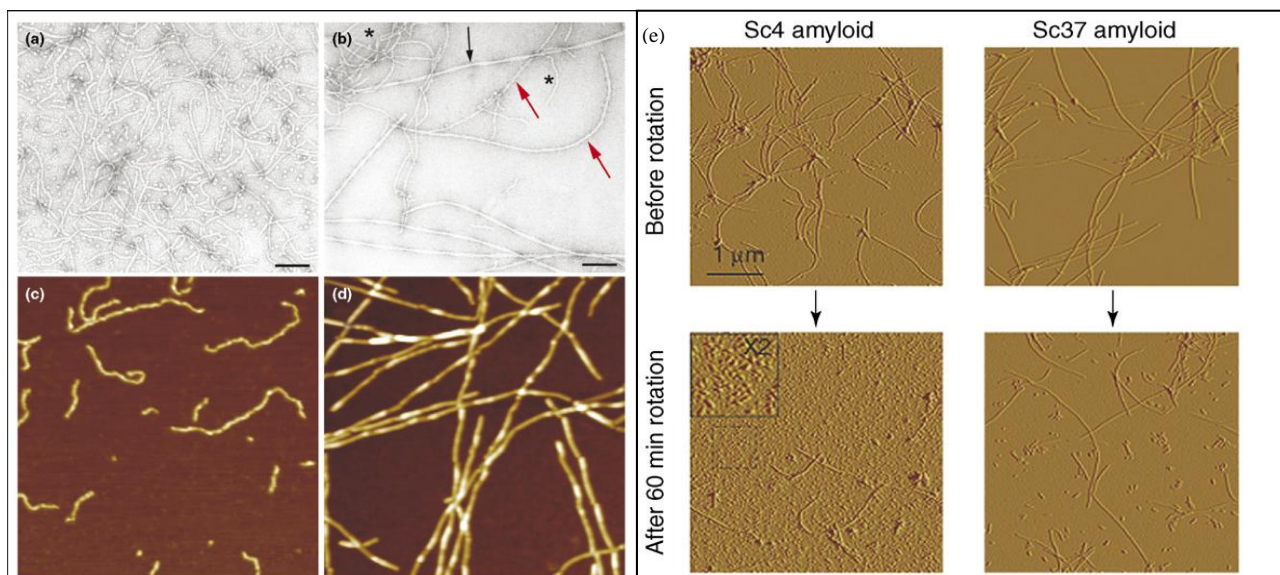
1.2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων είναι ο δομικός πολυμορφισμός που εμφανίζουν (36,37). Αμυλοειδή ινίδια προκύπτουν όταν μόρια ορισμένης πρωτεΐνης, πολυμερίζονται οδηγώντας στον σχηματισμό τους. Τα ινίδια αυτά, είναι αδιάλυτα στο νερό, κινητικά εξαιρετικά σταθερά ενώ είναι ανθεκτικά και στην δράση πρωτεασών (38).

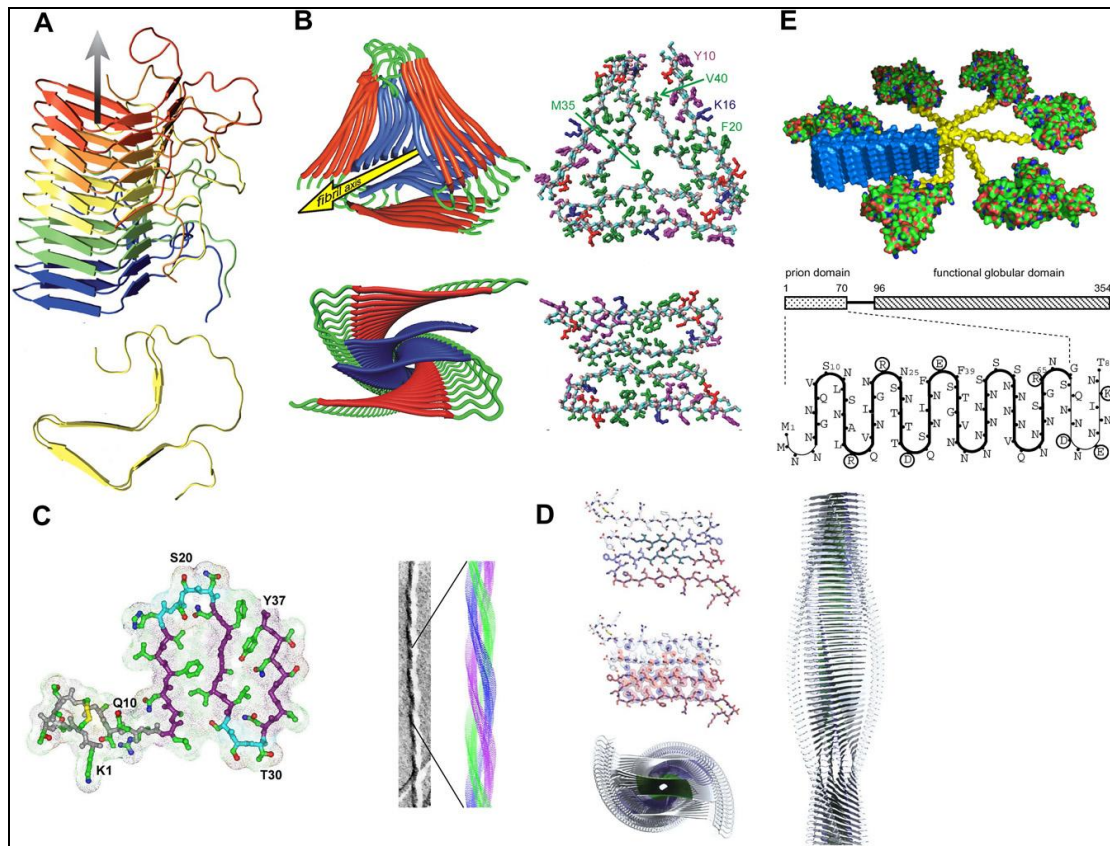


Εικόνα 14. Τα πιθανά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει μια μερικώς ή κατά ανώμαλο τρόπο διπλωμένη πρωτεΐνη στο κύτταρο (38).

Η ποικιλία των συνθηκών στις οποίες υπόκειται μια πρωτεΐνη επηρεάζουν την στερεοδιαμόρφωσή της και κατ' επέκταση μια πρωτεΐνη έχει την δυνατότητα να σχηματίζει ινίδια διαφορετικής μορφολογίας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Η διακύμανση αυτή μπορεί να αναφέρεται στην ίδια την δομή του ινιδίου, αν και συνήθως σχετίζεται με τον τρόπο που πακετάρονται τα πρωτοϊνίδια. Το εύρος που παρατηρείται στον αριθμό των πρωτοινιδίων αλλά και η δυνατότητα τους να αλληλεπιδρούν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους είναι χαρακτηριστικά που επιτρέπουν τον σχηματισμό ποικίλων μορφών ινιδίων (37,39). Συνεπώς, τα ίδια τα ινίδια εμφανίζουν χαρακτηριστική ποικιλομορφία ως προς την δομή τους ενώ επιπρόσθετα οι πρωτεΐνες που σχηματίζουν αμυλοειδή δεν εμφανίζουν καμία διακριτή ομοιότητα τόσο ως προς την αμινοξική τους ακολουθία όσο και ως προς την δομή τους.

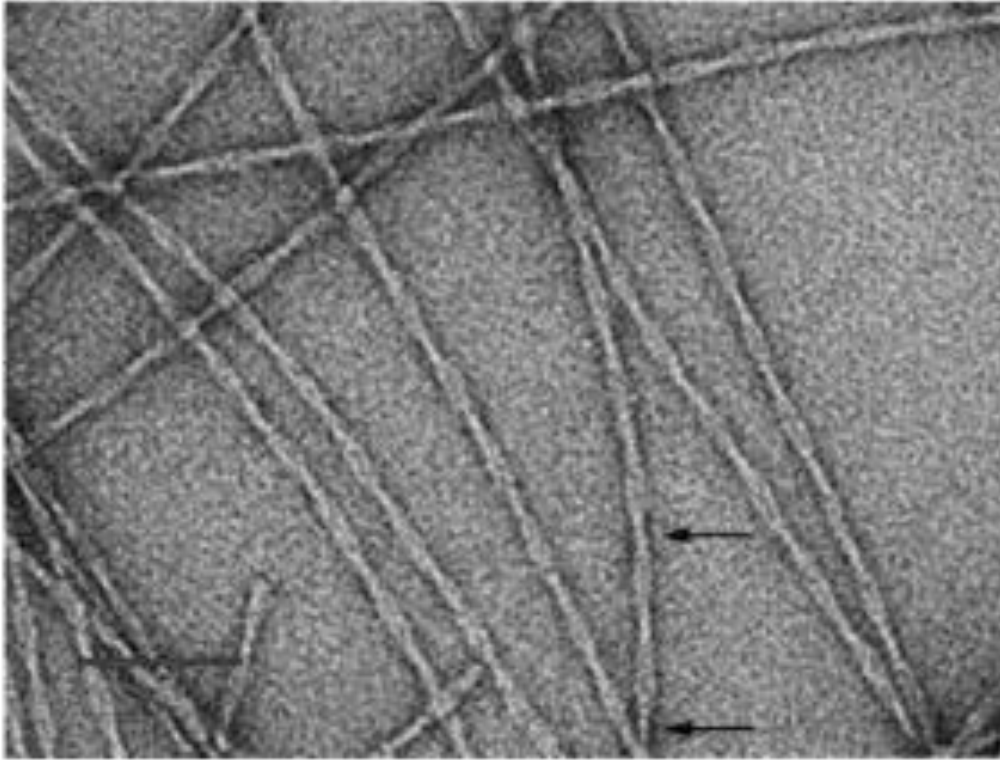


Εικόνα 15. Ο πολυμορφισμός που εμφανίζουν τα αμυλοειδή ινίδια. (a),(b) Ο πολυμορφισμός των αμυλοειδών ινιδίων που σχηματίζονται από το Αβ (1-40) αμυλοειδογενές πεπτιδίδιο. Με βέλη απεικονίζονται ινίδια διαφορετικών χρονικών περιόδων. (c),(d) AFM μικρογραφίες σε τελικά στάδια σχηματισμού ινιδίων της β2M, σε pH 3,5 και 1,5 αντίστοιχα. Είναι εμφανώς ισχυρότερος ο πολυμερισμός στην δεύτερη περίπτωση. (e) Απεικόνιση του σχηματισμού ινιδίων της Sup 35 και πως επηρεάζεται από την θερμοκρασία (αριστερή στήλη 4 C°, δεξιά στήλη 37 C°) αλλά και από επεξεργασία με υπερήχους (πάνω χωρίς επεξεργασία, κάτω επεξεργασία για 60 min) (40).



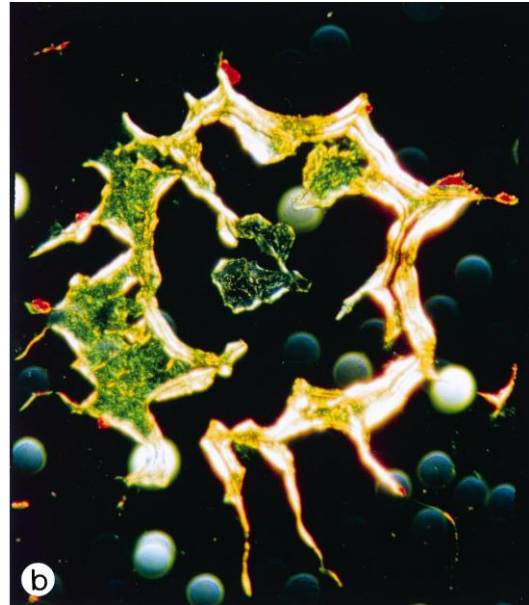
Εικόνα 16. Διάφορα προτεινόμενα μοντέλα σχετικά με τον πολυμερισμό ποικίλων πρωτεϊνών σε ινίδια, δείγμα του πολυμορφισμού που επικρατεί στα αμυλοειδή ινίδια (37).

Ωστόσο, όλα τα ινίδια εμφανίζουν ορισμένες κοινές ιδιότητες, οι οποίες αποτελούν κριτήρια για την κατάταξή τους ως αμυλοειδή. Όλα τα αμυλοειδή ινίδια, παρατηρούμενα με την μέθοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας εμφανίζονται ως αδιακλάδιστικά ινίδια, με απροσδιόριστο μήκος και διάμετρο της τάξης των ~ 100 Å (εύρος μεταξύ 70-120 Å) και αποτελούνται από αριθμό πρωτοινιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Σε ότι αφορά τα πρωτοινίδια, όλα έχουν κοινή διάμετρο της τάξης των ~ 40 Å (εύρος μεταξύ 30-50 Å), ωστόσο όπως προαναφέρθηκε, ο αριθμός τους ποικίλει (οι παραπάνω μετρήσεις δεν είναι απόλυτα ακριβείς διότι προκύπτουν συνήθως από φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετά από αρνητική χρώση).



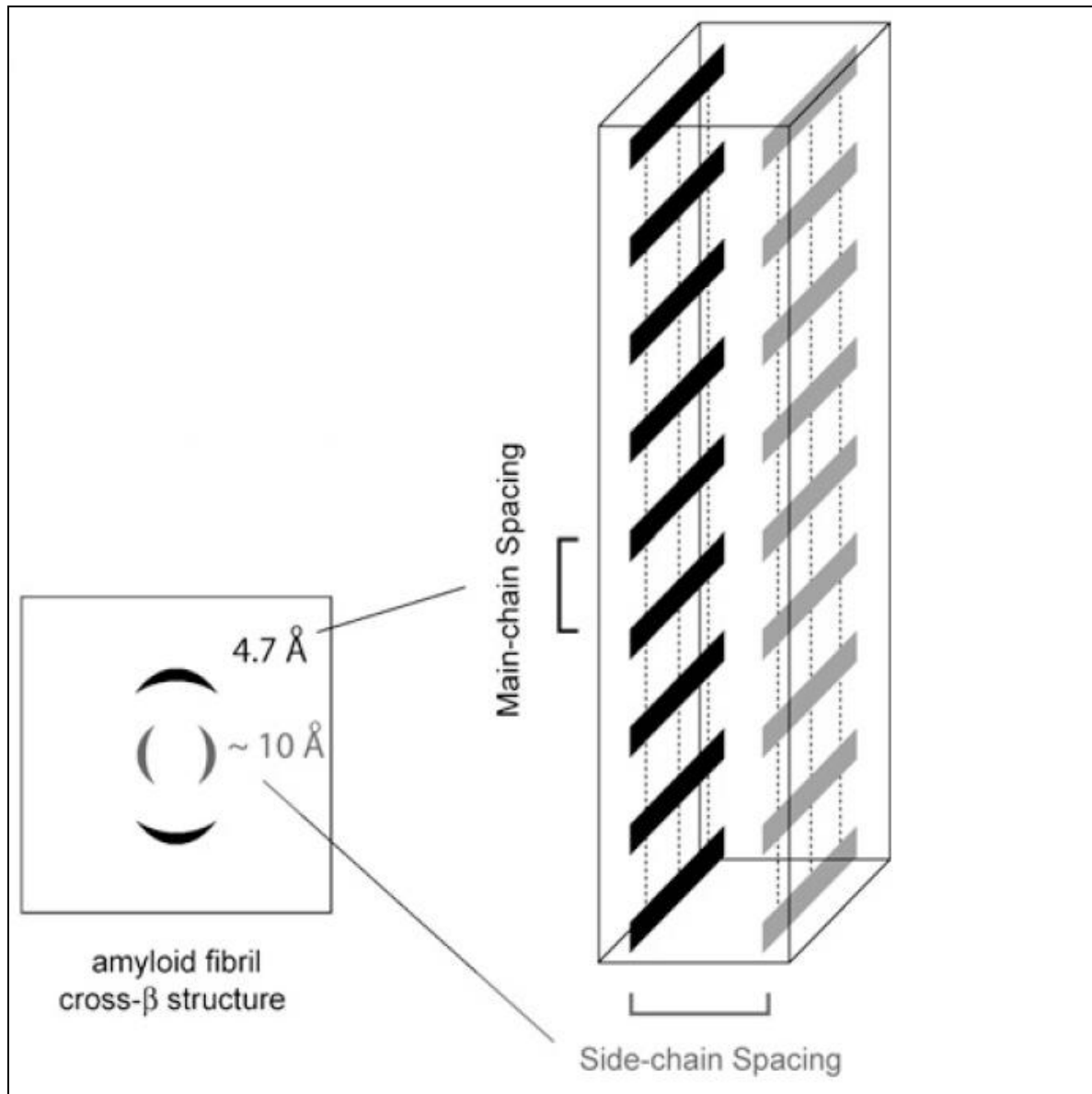
Εικόνα 17. Η εικόνα των αμυλοειδών ινιδίων όπως παρατηρούνται με την ΗΜΔ. Τα ινίδια είναι ευθύγραμμα, αδιακλάδιστα και ακαθορίστου μήκους. Bar 800 Å (34).

Ένα επιπλέον βασικό τους χαρακτηριστικό, είναι πως δεσμεύουν την χρωστική Ερυθρό του Congo (Congo red), η οποία κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλυτή πολωτικού μικροσκοπίου εμφανίζει μια χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα, που αποτελεί σήμερα ισχυρό κριτήριο ένδειξης αμυλοειδών ινιδίων, σε αντιδιαστολή με την κόκκινη απόχρωση που παρουσιάζει όταν αυτοί δεν είναι διασταυρωμένοι (41,42). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες διαθέσιμες χρωστικές που προσδένονται σε αμυλοειδή όπως είναι η φθορίζουσα χρωστική θειοφλαβίνη Τ (Thioflavin T), χωρίς ωστόσο να αποτελούν απαραίτητα κριτήριο παρουσίας αμυλοειδών (43).



Εικόνα 18. Χρώση Congo red αμυλοειδών εναποθέσεων και παρατήρηση σε πολωτικό μικροσκόπιο, όπου είναι εμφανής η χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα που εμφανίζουν τα αμυλοειδή ινίδια. (a) Μη διασταυρωμένοι πολωτής-αναλυτής. (b) Διασταυρωμένοι πολωτής-αναλυτής (44).

Τέλος, τα περιθλασιγράμματα που προκύπτουν από προσανατολισμένες ίνες αμυλοειδών ινιδίων αποτελούν χαρακτηριστικό τους γνώρισμα. Τα παραπάνω περιθλασιγράμματα, που ονομάζονται “cross-β” δομής, εμφανίζουν μια χαρακτηριστική μεσημβρινή ανάκλαση, κατά μήκος του άξονα της ίνας, στα $\sim 4.7 \text{ \AA}$, η οποία αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών β-κλώνων και μια επιπλέον ισημερινή στα $\sim 8-12 \text{ \AA}$ που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών, με την διακύμανση να οφείλεται και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων που συμμετέχουν (33,45).



Εικόνα 19. Η “cross- β ” δομή που χαρακτηρίζει τα αμυλοειδή ινίδια. Οι β -κλώνοι είναι κάθετοι στον άξονα του ινιδίου και η μεταξύ τους απόσταση είναι στα $\sim 4.7 \text{ \AA}$, ενώ οι β -πτυχωτές επιφάνειες είναι παράλληλες προς τον άξονα του ινιδίου και απέχουν $\sim 8-12 \text{ \AA}$.

1.2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ

Η δομή που φαίνεται να επικρατεί στα αμυλοειδή ινίδια είναι αυτή της αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας σύμφωνα με την οποία, οι β-κλώνοι διατάσσονται κάθετα ως προς τον άξονα του ινιδίου και είναι μεταξύ τους διαδοχικά αντιπαράλληλοι, ενώ αντίθετα οι β-πτυχωτές επιφάνειες που σχηματίζονται είναι παράλληλες ως προς τον άξονα του ινιδίου. Η μέση απόσταση μεταξύ διαδοχικών αντιπαράλληλων β-κλώνων είναι $\sim 4.7 \text{ \AA}$ ενώ η αντίστοιχη απόσταση μεταξύ β-πτυχωτών φύλλων κυμαίνεται μεταξύ $\sim 8-12 \text{ \AA}$ (46).

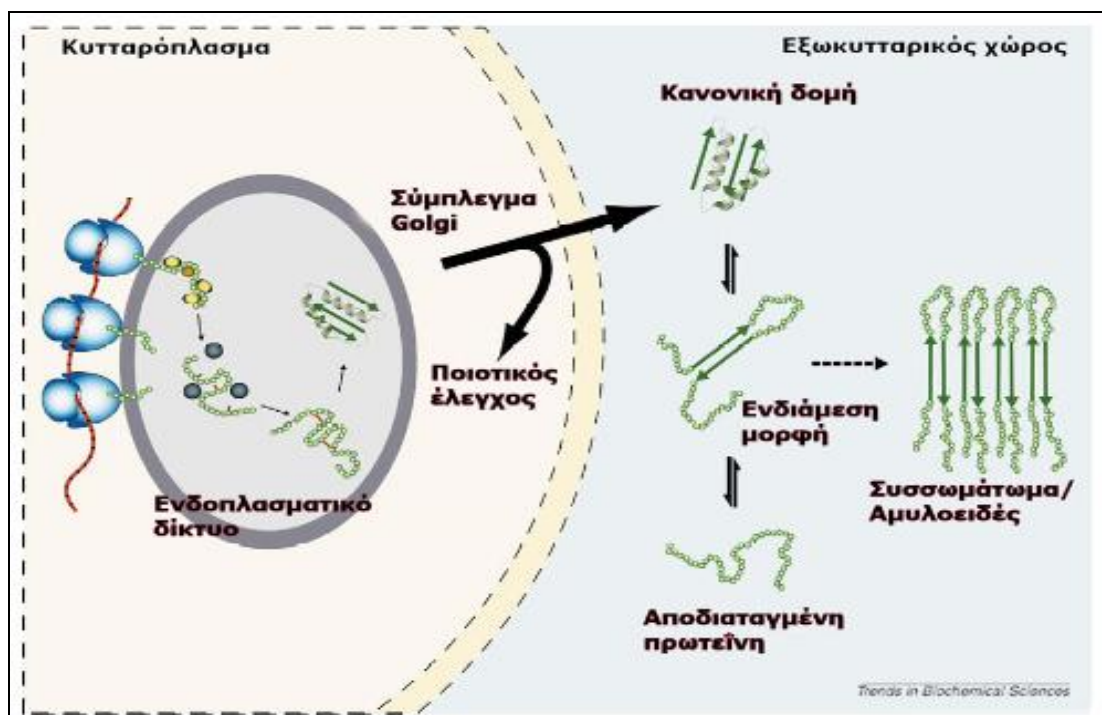
Σε επίπεδο στεροδιάταξης, η δομή που αποκτούν οι πρωτεΐνες σε φυσιολογικές συνθήκες συνήθως αντιστοιχεί στο ολικό ενεργειακό ελάχιστο και αποτελεί την σταθερότερη διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (47). Αυτό ωστόσο δεν ισχύει στην περίπτωση των αμυλοειδών ινιδίων. Φαίνεται πως για να πραγματοποιηθεί αμυλοειδογένεση είναι απαραίτητο να προηγηθεί κάποια στεροδιαταξική αλλαγή που προκαλεί την μετάπτωση της πρωτεΐνης από την φυσιολογική της δομή σε μια μερικώς ή ολικά αποδιαταγμένη μορφή (48,49).

Μελέτες προτείνουν πως ο πολυμερισμός των μορίων πρωτεϊνών υπεύθυνων για σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων προκύπτει όταν αυτές αποτυγχάνουν να αποκτήσουν την φυσιολογική τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή τους ενώ ταυτόχρονα οι μοριακοί προστατευτικοί μηχανισμοί του κυττάρου (πρωτεάσωμα, μοριακοί συνοδοί πρωτεϊνών, κ.τ.λ.), αδυνατούν να την αποικοδομήσουν ή να συνδράμουν στο σωστό δίπλωμα της (50). Τα ενεργειακά ασταθή αυτά μόρια έχουν την τάση, εξαιτίας νέων διαμοριακών

αλληλεπιδράσεων που προκύπτουν από το εναλλακτικό δίπλωμα της πρωτεΐνης, να σχηματίζουν ολιγομερείς πυρήνες οι οποίοι είναι ενεργειακά ασύμφοροι. Έτσι υποστηρίζεται ενεργειακά η επιμήκυνση αυτών των πυρήνων που οδηγεί τελικά στον σχηματισμό δομικά και μεταβολικά σταθερών ινιδίων (51). Έχει προταθεί επίσης πως η ικανότητα δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων αποτελεί πιθανότατα καθολική ιδιότητα του συνόλου των πρωτεϊνών (50,52).

Η αποσταθεροποίηση της στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης οφείλεται σε ένα μείγμα παραγόντων που εξαρτάται κάθε φορά από το είδος της. Μια υπόθεση, υποδηλώνει πως ο σχηματισμός των ίδιων των ολιγομερών είναι που προκαλεί το “λάθος” δίπλωμα των μορίων της πρωτεΐνης με μία πορεία παρόμοια με εκείνη που ακολουθείται κατά την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών. Εναλλακτική υπόθεση βασίζεται σε δεδομένα που υποστηρίζουν πως ορισμένα τμήματα πρωτεϊνών έχουν την ικανότητα να μεταπίπτουν από μια αρχική α-ελικοειδή δομή σε β-κλώνους. Οι περιοχές αυτές, που ονομάζονται και στερεοδιαταξικοί διακόπτες (conformational switches), αν βρίσκονται στην επιφάνεια του μορίου, μπορούν όταν μεταπίπτουν σε β-δομή να οδηγούν στον σχηματισμό ινιδίων (53). Μια τρίτη υπόθεση, υποστηρίζει πως η αλλαγή στην στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης αποκαλύπτει νέα τμήματα στην επιφάνεια της, τα οποία λόγω υψηλής υδροφοβικότητας έχουν την τάση να συσσωματώνονται σε ολιγομερή β-πτυχωτών φύλλων. Δεδομένα που υποστηρίζουν αυτή την θεωρία προκύπτουν και από πειράματα μεταλλαξογένεσης που αυξάνουν την υδροφοβικότητα των υπεύθυνων τμημάτων, αυξάνοντας ταυτόχρονα και την τάση τους για συσσωμάτωση. Τέλος, μια υπόθεση που έχει πολλούς υποστηρικτές σήμερα, υποδηλώνει την

ύπαρξη μικρών τμημάτων της πεπτιδικής αλυσίδας που ονομάζονται αμυλοειδογενείς καθοριστές, τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για τον σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων, αφού αλληλεπιδρούν μεταξύ τους οδηγώντας στον σχηματισμό τους, χωρίς απαραίτητα την συμμετοχή του υπόλοιπου τμήματος της πρωτεΐνης. Τα τμήματα αυτά, όσο η πρωτεΐνη διατηρεί την φυσική της στερεοδιάταξη, δεν φαίνεται να εμφανίζονται κρυμμένα ή αλλιώς θαμμένα στο εσωτερικό της πρωτεΐνης όπως θα αναμενόταν, αλλά βρίσκονται προς την επιφάνεια του μορίου (54). Μελέτες υποδεικνύουν πως σημαντικό ρόλο παίζει πιθανότατα και το ποσοστό της τοπικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης όπως επίσης και η υψηλή πίεση ή θερμοκρασία διότι μειώνουν το ενεργειακό κατώφλι της συσσωμάτωσης (55). Άλλοι παράγοντες που ίσως να συμμετέχουν ενεργά στο σχηματισμό τέτοιων συσσωματωμάτων είναι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες (pH, αλατότητα, κ.τ.λ.), ενζυμική δράση ή ακόμα και γενετικοί παράγοντες όπως μεταλλάξεις.



Εικόνα 20. Απεικόνιση της διαδρομής που ακολουθεί μια νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη στο κύτταρο και πως αυτή μπορεί να οδηγηθεί τελικά στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων (50).

1.2.4 ΣΥΚΡΟΤΗΣΗ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΙΝΙΔΩΝ

Δεν φαίνεται να υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός με βάση τον οποίο πραγματοποιείται η συγκρότηση των μονομερών της εκάστοτε πρωτεΐνης, ωστόσο έχουν προταθεί ορισμένοι πιθανοί μηχανισμοί, που φαίνεται να επικρατούν βάση των πειραματικών παρατηρήσεων σε διάφορες περιπτώσεις αμυλοειδογένεσης. Πρόκειται για τα μοντέλα Refolding (επαναδιπλώματος), Gain of interaction και Natively unfolded (φυσικά αποδιαταγμένων πρωτεϊνών) (56).

1.2.4.1 ΜΟΝΤΕΛΟ REFOLDING

Σύμφωνα με το refolding μοντέλο, προτείνεται πως όλες οι πρωτεΐνες που έχουν δυνατότητα σχηματισμού ινιδίων, διατηρούν δύο χωριστές καταστάσεις, την φυσική τους διαμόρφωση και μία επιπλέον ινιδιακή. Για την μετατροπή της πρωτεΐνης από την μια κατάσταση στην άλλη, είναι αναγκαίο ένα στάδιο κατά το οποίο αποδιατάσσεται και εν συνεχεία διπλώνει ξανά, αποκτώντας με τον τρόπο αυτό μια νέα στερεοδιάταξη που της επιτρέπει να πολυμεριστεί σε ινίδια. Η νέα δομή που αποκτά η πρωτεΐνη πιστεύεται πως είναι πλούσια σε β-κλώνους, ενώ στηρίζεται σε αλληλεπιδράσεις της κύριας αλυσίδας (backbone) και δεν οφείλεται τόσο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων. Αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός πως η κοινή δομή που εμφανίζουν τα αμυλοειδή ινίδια δείχνει να είναι ως ένα βαθμό ανεξάρτητη σε σχέση με την αμινοξική ακολουθία. Πρωτεΐνες που έχει προταθεί πως συγκροτούνται με βάση το μοντέλο αυτό είναι η

ινσουλίνη, που σχηματίζει αριστερόστροφες παράλληλες β-έλικες (57), το SH3 domain αλλά και rignon πρωτείνες (58).

1.2.4.2 NATIVELY UNFOLDED

Το μοντέλο αυτό, όπως υποδεικνύει και η ονομασία του, υποστηρίζει την θεωρία της ύπαρξης ορισμένων πρωτεϊνών ή έστω τμημάτων τους (domain, ακόμα και μικρά πεπτίδια), που στην φυσική τους κατάσταση, χωρίς απαραίτητα να έχει προκληθεί κάποια στερεοδιαταξική αλλαγή, εμφανίζουν ένα δίπλωμα σχετικής αταξίας. Εξαιτίας αυτού του σχετικά άτακτου διπλώματος, τμήματα ή και ολόκληρη η πρωτεΐνη, έχουν την δυνατότητα και μάλιστα πιθανότατα ωθούνται στον σχηματισμό μιας “cross-β” στήλης, μέσω της οποίας και σταθεροποιείται η στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης. Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα πρωτεϊνών ή τμημάτων τους τα οποία υπακούουν στο παραπάνω μοντέλο, όπως είναι το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών rignon Sup35p (59) και Ure2p (60), το πεπτίδιο πολυγλουταμίνης της χαντιγκτίνης (61) και το Αβ πεπτίδιο που συμμετέχει στη νόσο Alzheimer (62).

1.2.4.3 GAIN OF INTERACTION

Η τρίτη περίπτωση περιλαμβάνει τα gain of interaction μοντέλα. Στα μοντέλα αυτά είναι απαραίτητη μια στερεομορφική αλλαγή σε μια περιορισμένη περιοχή της πρωτεΐνης που έχει ως αποτέλεσμα την αποκάλυψη στην επιφάνεια ενός τμήματος που δεν ήταν προσβάσιμο. Απελευθερωμένα τέτοια τμήματα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας

τον κύριο άξονα του ινιδίου. Τα τμήματα αυτά βρίσκονται συνήθως στο άκρο μιας δομικής αυτοτελούς περιοχής (domain) ή συνδέουν δύο domain μεταξύ τους. Στα μοντέλα αυτά, το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης διατηρεί ανέπαφη την φυσική της στερεοδιάταξη και φαίνεται πως μόνο τα τμήματα που απελευθερώνονται υπόκεινται σε στερεοδιαταξική αλλαγή. Υπάρχουν τέσσερις διακριτές περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται ως μοντέλα gain of interaction.

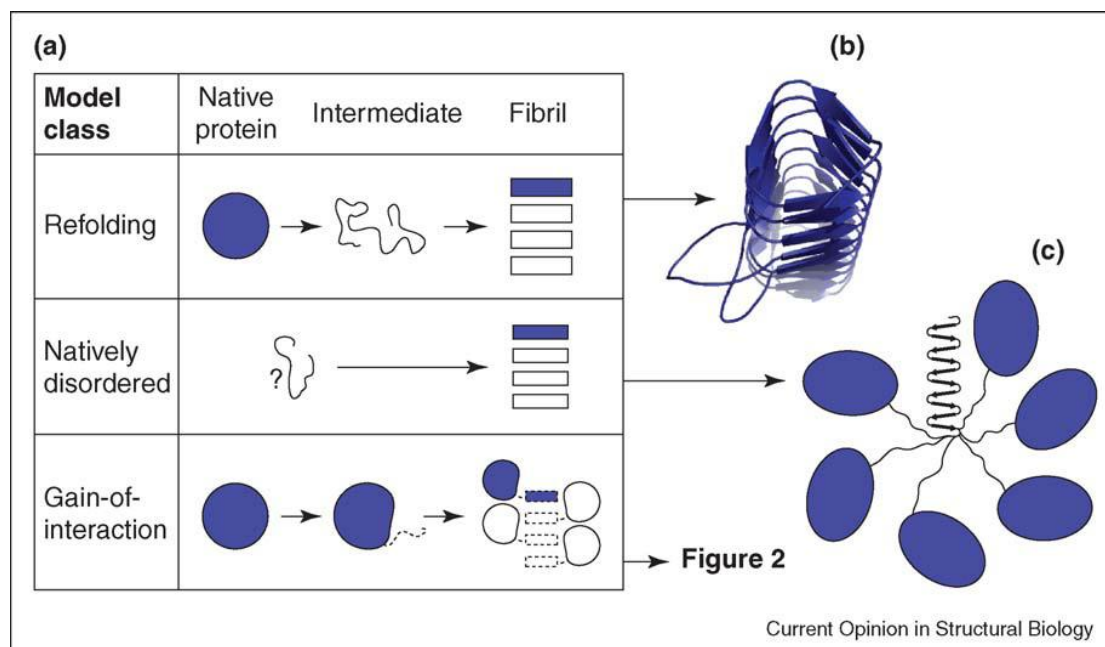
Η πρώτη περίπτωση υποστηρίζει πως η στερεοδιαταξική αλλαγή οδηγεί στην αποκάλυψη ενός τμήματος στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Τα απελευθερωμένα αυτά τμήματα των μονομερών αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα τα ελεύθερα μόρια της πρωτεΐνης να πολυμερίζονται σχηματίζοντας το ινίδιο (direct stacking). Το μοντέλο αυτό φαίνεται συμπερασματικά να στηρίζεται στη συγγένεια που εμφανίζουν δομές που αλληλοσυμπληρώνονται οπότε πιθανότατα να εξαρτάται σε ένα βαθμό και από τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων και κατ'επέκταση από την αμινοξική ακολουθία των τμημάτων αυτών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεΐνης που υπακούει στο παραπάνω μοντέλο φαίνεται πως είναι η τρανσθυρετίνη (TTR).

Η δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνει τα “cross-β spine” μοντέλα. Στην περίπτωση αυτή το μικρό τμήμα της πρωτεΐνης που αποκαλύπτεται έχει δομή β-κλώνου, βρίσκεται στο άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και έχει την τάση να αυτοπολυμερίζεται συγκροτώντας β-πτυχωτές επιφάνειες (cross-β spine) ενώ το υπόλοιπο της πρωτεΐνης διατάσσεται πλευρικά της (Εικόνα 22b). Μια τέτοια δομή αποτελείται, συνεπώς, από δύο ή περισσότερα β-πτυχωτά φύλλα

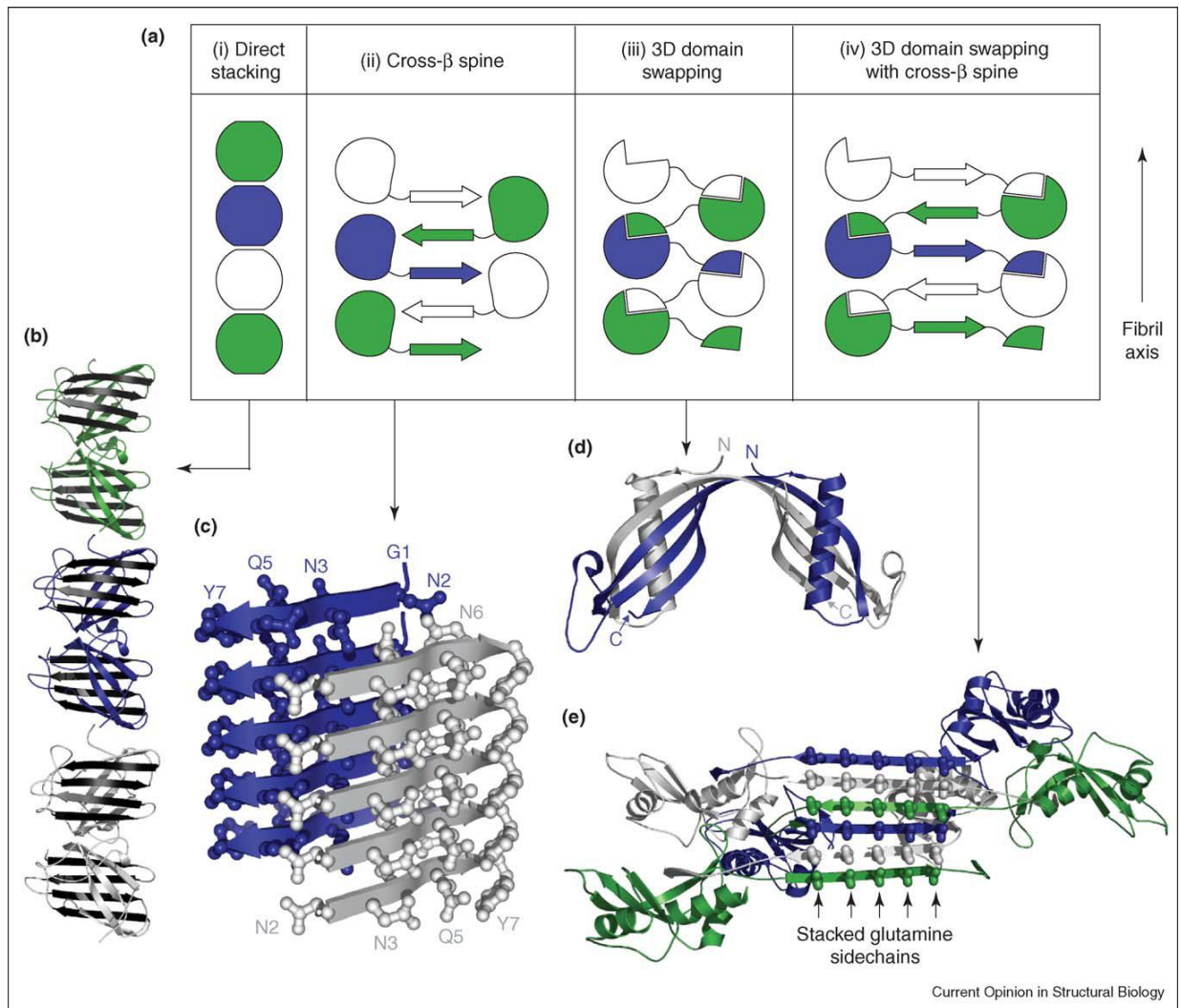
τα οποία μπορεί να είναι επίπεδα ή στραμμένα, παράλληλα ή αντιπαράλληλα και τα οποία πακετάρονται το ένα με το άλλο σε μια διαμόρφωση cross-β (63).

Η περίπτωση κατά την οποία το τμήμα αυτό δεν βρίσκεται προς τα άκρα της πολυπτιδικής ακολουθίας αλλά πιο κεντρικά, τότε συνήθως γίνεται ανταλλαγή μιας δομικής αυτοτελούς περιοχής μεταξύ των μονομερών (Εικ. 22d) ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός της β-πτυχωτής επιφάνειας (domain swapping cross-β spine μοντέλο).

Ωστόσο, η ανταλλαγή δομικών αυτοτελών περιοχών (Domain Swapping) μεταξύ των πρωτεϊνών εντοπίζεται και γενικότερα ως ένας συνήθης μηχανισμός ομο-ολιγομερισμού, όπου δύο όμοιες πρωτεΐνες ανταλλάσσουν όμοια δομικά αυτοτελή στοιχεία ή domains, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τον διμερισμό και την δημιουργία μιας επιφάνειας αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών.



Εικόνα 21. Τα πιθανά μοντέλα αυτοσυγκρότησης αμυλοειδών ινιδίων. (a) Οι τρεις γενικοί τύποι αλλαγής της στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης που οδηγεί στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων. (b) Η δομή της αριστερόστροφης παράλληλης β έλικας που φαίνεται να επικρατεί σε αρκετά αμυλοειδή ινίδια. (c) Ενδεικτικό σχήμα που αναπαριστά τον σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων μέσω του Gain-of-interaction μοντέλου (56).



Εικόνα 22. Gain-of-interaction μοντέλα. (a) Διαγραμματικές απεικονίσεις των τεσσάρων πιθανών μηχανισμών σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων. (b) Μοντέλο που υποδεικνύει πως πραγματοποιείται ο πολυμερισμός μέσω άμεσης εναπόθεσης (direct stacking). (c) Διαγραμματική απεικόνιση της εναπόθεσης των β -κλώνων που σχηματίζουν τον κύριο άξονα του ινιδίου. (d) Ο πολυμερισμός της κυσταίνης C όπως πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού του 3D domain swapping. (e) Σχηματισμός του άξονα του ινιδίου μέσω των διαδοχικών β -κλώνων (β -strand stacking) μέσω 3D domain swapping (56).

1.2.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ

Η ύπαρξη αμυλοειδών ινιδίων, αρχικά και μέχρι σήμερα, συσχετίζεται κατά κύριο λόγο με ένα πλήθος ασθενειών, γνωστές ως αμυλοειδώσεις, όπως είναι οι νόσοι Alzheimer (64), Huntington και Parkinson, ο διαβήτης τύπου II ή οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (65) (Πίνακες 1-2). Οι ασθένειες αυτές ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες, τις συστηματικές ή αλλιώς εντοπισμένες, ανάλογα με το αν προσβάλλουν ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό (εντοπισμένες) ή προσβάλλουν συστήματα οργάνων και ιστών (συστηματικές), αλλά και σε πρωτογενείς ή δευτερογενείς, ανάλογα με το αν τα ίδια τα ινίδια είναι που προκαλούν την διαταραχή και κατ'επέκταση την ασθένεια ή αν είναι αποτέλεσμα άλλων φλεγμονών ή ασθενειών (66,67).

Δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα αν υπεύθυνες για την εμφάνιση της ασθένειας είναι οι ίδιες οι εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων ή αν οφείλεται στην παρουσία των αρχικών ολιγομερών πυρηνών. Ο συνεχής σχηματισμός ινιδίων από μονομερή της πρωτεΐνης έχει δείχτει πως οδηγεί στον σχηματισμό πλακών, δηλαδή εναποθέσεων εντός (αλλά και εκτός) του κυττάρου, που με την σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν στην λύση του κυττάρου και την τοπική καταστροφή του ιστού. Ωστόσο, γίνεται ολοένα και περισσότερο αποδεκτό πως τα μικρού μοριακού βάρους και λιγότερο ενεργειακά σταθερά ολιγομερή, που αποτελούν ενδιάμεσες δομές κατά τον σχηματισμό ινιδίων, είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της ασθένειας εξαιτίας της έντονης τοξικότητας που εμφανίζουν (68-70). Λίγα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με το μηχανισμό με τον οποίο συμμετέχουν στην εμφάνιση της ασθένειας. Το ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στους πιθανούς τρόπους

αλληλεπίδρασης των ολιγομερών αυτών με τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα έχει προταθεί πως τα ολιγομερή σχηματίζουν πόρους (ιοντικά κανάλια), όπως έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις της αμυλίνης (71), του αμυλοειδούς Αβ πεπτιδίου (72,73) ή της β₂-μικροσφαιρίνης επιτρέποντας την ανταλλαγή ιόντων, όπως είναι η έντονη εισροή κατιόντων Ca²⁺ που προκαλεί αποπόλωση της μεμβράνης και οδηγεί στον εκφυλισμό του κυττάρου (36,74). Μια εναλλακτική πρόταση, δεν περιλαμβάνει τον σχηματισμό καναλιών, αλλά υποστηρίζει πως η παρουσία τέτοιων ολιγομερών καταρρίπτει το διηλεκτρικό φράγμα της λιπιδικής διπλοστιβάδας για ανταλλαγή ιόντων αλλάζοντας έτσι την πολικότητα της (75).

Πίνακας 1. Πρωτεΐνες που σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια και συσχετίζονται με ποικίλες μορφές αμυλοειδώσεων (55).

Amyloid type	Sequence or mutated wild-type sequences	Disease or involved tissues
As described and approved by the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis		
β 2-Microglobulin ($A\beta$ 2M)	Res 20–41 (SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK) (Hasegawa et al. 2003) Res 21–31 (NFLNCYVSGFH) (Hasegawa et al. 2003) Res 72–99 (PTEKDEYACRVNHNVTLSQPKIVKWRDM) (Ivanova et al. 2003) [for review, see also Jones et al. (2003)]	Peri-articular and occasionally associated with long term dialysis, Haemodialysis-related amyloidosis
(Pro)calcitonin (ACal)	Res 14–18 (DFNKF) (Reches et al. 2002)	Medullary carcinoma of the thyroid
α -S2C casein (ACas)	Res 81–112 (ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQV) (Niewold et al. 1999) Res 81–113 (ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK) (Niewold et al. 1999) Res 81–125 (ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNR) (Niewold et al. 1999)	Mammary gland corpora amylacea (from <i>B. taurus</i>)
$A\beta$ -Protein precursor ($A\beta$)	Res 11–25 (EVHHQKLVFFAEDVG) (Tjernberg et al. 1999) Res 14–23 (HQKLVFFAED) (Tjernberg et al. 1999) Res 16–23 (AcKLVFFAG-NH ₂) (Balbach et al. 2000) Res 34–42 (LMVGGVVIA) (Lansbury et al. 1995) Res 25–35 (GSNKGAIIGLM) (Pike et al. 1995) Res 19–20 (FF) (Reches and Gazit 2003)	Alzheimer's disease
ABri	RTVKKNHIEEN (mutation in the terminal codon leading to an 11-residue terminal extension) (Gibson et al. 2005)	Familial British dementia
ADan	LFLNSQEKHY (mutation in the terminal codon leading to a 10-residue extension) (Gibson et al. 2005)	Familial Danish dementia
APin	Res 1–46 of hypothesised FLJ3 gene (MPYVFSFKMPQEQGMFYYPVYMLPWEQPQQTVRRSPQQTRQQQ) (Solomon et al. 2003)	Calcifying epithelial odontogenic tumours (Pindborg tumours)
Apolipoprotein AI (AapoAI)	Residues 1–93 of ApoAI (Andreola et al. 2003)	Familial amyloid polyneuropathy III
Apolipoprotein AII (AapoAII)	(GSVQTIVFPQLASRTPTGQS) Stop78G or Stop78S mutations resulting in a 21-residue extension shown at the C-terminal of the protein (Benson et al. 2001)	Hereditary renal amyloidosis
Apolipoprotein AIV (AapoAIV)	<i>wt</i> protein (Bergstrom et al. 2001, 2004)	Systemic amyloidosis
Atrial natriuretic factor (AANF)	<i>wt</i> protein (Johansson et al. 1987)	Atrial amyloidosis

Table 1 (continued)		
Amyloid type	Sequence or mutated wild-type sequences	Disease or involved tissues
Cystatin C (ACys)	L68Q mutation (Ghiso et al. 1986)	Hereditary renal amyloidosis, hereditary cerebral amyloid angiopathy
Fibrinogen α -chain (AFib)	R554L (Benson et al. 1993), E526V (Uemichi et al. 1994), 4904delG (Uemichi et al. 1996)	Hereditary renal amyloidosis
Gelsolin (AGel)	Res 183–210 (FNNGDCFILDLGNNIHQWCGSNSNRYER) (Fadika and Baumann 2002; Maury et al. 1994); D187 mutant often involved (D187 N, D187Y) (Benson et al. 2001) Res 182–192 (SFNNGDCFILD) (Maury et al. 2003) Res 183–191 (FNNGNCFIL) (Maury et al. 2003) Res 184–190 (NNGNCFI) (Maury et al. 2003)	Hereditary renal amyloidosis
Genetically variant transthyretin (ATTR)	Over 100 point mutations; for a recent review, see Ando et al. (2005)	Familial amyloid polyneuropathy
Insulin (AIns)	<i>wt</i> protein (Storkel et al. 1983)	Iatrogenic amyloidosis
Islet amyloid polypeptide, (Amylin) (AIAPP)	Res 20–29 SNNFGAILSS (Tenidis et al. 2000) Res 30–37 TNVGSNTY (Nilsson and Raleigh 1999) Res 22–29 NFGAILSS (Azriel and Gazit 2001) Res 24–29 GAILSS (Nilsson and Raleigh 1999) Res 22–27 NFGAIL (Tenidis et al. 2000) Res 23–27 FGAIL (Tenidis et al. 2000)	Type II diabetes
Kerato-epithelin (AKer)	R124C (Schmitt-Bernard et al. 2000), P501T (Kawasaki et al. 1999), V505D (Tian et al. 2005), L518P (Hirano et al. 2000), L527R (Funayama et al. 2006), N544S (Nakagawa Asahina et al. 2004) mutations of the betaig-h3 (TGFB1) gene, A546D and P551Q missense changes (Aldave et al. 2004)	Lattice corneal amyloid dystrophy
Lactoferrin (ALac)	Res 539–546 (NAGDVAFV) (Nilsson and Dobson 2003)	Amyloidosis in seminal vesicles, cornea and brain
Lysozyme (ALys)	Compound heterozygosity in exon 2 (Thr70Asn) and exon 4 (Trp112Arg) (Rocken et al. 2006)	Hereditary renal amyloidosis, hereditary non-neuropathic systemic amyloidosis
Medin (AMed)	Res 147–154 (NFGSVQFV) (Haggqvist et al. 1999)	Aortic medial amyloidosis
Monoclonal immunoglobulin heavy chain (AH)	Deletion of domains (first CH1, hinge and second CH2 heavy-chain constant regions) compare to <i>wt</i> protein (Eulitz et al. 1990)	Immunoglobulin heavy chain amyloidosis

Πίνακας 2. Πρωτεΐνες που σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια και συσχετίζονται με ποικίλες μορφές αμυλοειδώσεων (55).

1.2.6 ΦΥΣΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ

Αν και κατά κύριο λόγο τα αμυλοειδή θεωρούνται ως περιπτώσεις δομικά ανώμαλων πρωτεϊνών και η παρουσία τους είναι συνδεδεμένη με την έννοια των αμυλοειδώσεων, τελευταία γίνονται γνωστές όλο και περισσότερες περιπτώσεις όπου οργανισμοί εκμεταλλεύονται τον σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων και επωφελούνται από τις μοναδικές ιδιότητες που αυτά διαθέτουν. Έχουν εντοπιστεί περιπτώσεις όπου αμυλοειδή διατηρούν λειτουργικό ρόλο σε κάποια κυτταρική διεργασία ή αντίστοιχα περιπτώσεις που τα ίδια τα αμυλοειδή σχηματίζουν προστατευτικές δομές που εξυπηρετούν στην επιβίωση του κυττάρου (76). Η αποκάλυψη πως το χόριο που περικλείει τα ωοθυλάκια των μεταξοσκωλήκων αποτελείται από αμυλοειδή ινίδια, αποτέλεσε το έναυσμα για την μελέτη και αποκάλυψη μιας σειράς αντίστοιχων δομών (34). Σε στελέχη εντεροβακτηρίων όπως είναι η *Escherichia coli* ή η *Salmonella*, έχει εντοπιστεί πως χρησιμοποιούνται αντίστοιχα αμυλοειδή ινίδια, που εξυπηρετούν σε ποικίλες λειτουργίες, ως δεισδυτικοί σχηματισμοί ή για την επόικηση αδρανών επιφανειών, που ονομάζονται *curli* (77,78). Ακόμα και στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί αντίστοιχες δομές, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη Pmel17, που τοποθετείται στα μελανοσώματα του δέρματος και συμμετέχει στον πολυμερισμό της μελανίνης α, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζει και την διάχυση μελανίνης από την μεμβράνη των μελανοσωμάτων, που είναι κυτταροτοξική (79). Τα αμυλοειδή αυτά, ο αριθμός των οποίων συνεχώς αυξάνεται, χαρακτηρίζονται σήμερα ως φυσικά προστατευτικά εξαιτίας του πλεονεκτικού χαρακτήρα που διατηρούν σχετικά με την επιβίωση του οργανισμού (Πίνακας 3).

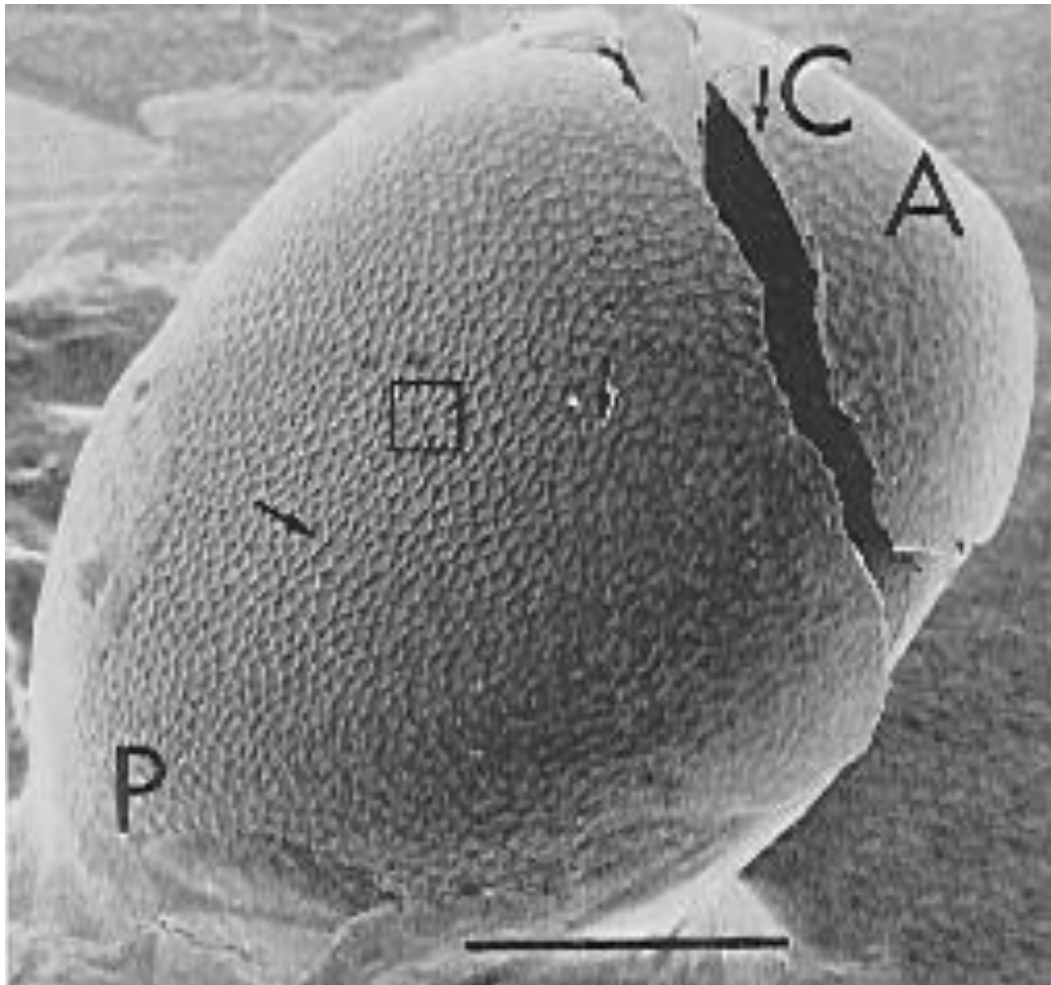
Protein	Species	Function	Tissue	Reference(s)
CPEB	<i>Aplysia spp.</i>	Memory storage	Neuronal	Darnell 2003; Si et al. 2003
CgsA subunit	<i>E. coli</i>	Surface adhesion and biofilm formation	Curli	Chapman et al. 2002; Gebbinck et al. 2005
AgfA	<i>Salmonella spp.</i>	Surface adhesion and cell-cell interactions	Tafi	Collinson et al. 1991
Pmel17 (Μα)	<i>H. sapiens</i>	UV protection	Melanosome	Berson et al. 2003
Sup 35p	<i>S. cerevisiae</i>	Hereditable transmission	Prion	Diaz-Avalos et al. 2003; Kishimoto et al. 2004
Ure2	<i>S. cerevisiae</i>	Hereditable transmission	Prion	Bousset et al. 2003
Rnq1	<i>S. cerevisiae</i>	Hereditable transmission chemical protection	Prion	Derkatch et al. 2004
Chorion	Silkmoth species	Physical and	Oocyte	Hamodrakas et al. 2004; Iconomidou et al. 2000
Het-S	<i>S. cerevisiae</i>	Hereditable transmission	Prion	Coustou-Linares et al. 2001; Dos Reis et al. 2002
Hydrophobins	Most fungi	Adhesion to hydrophobic surfaces	Hyphae	Gebbinck et al. 2005; Mackay et al. 2001
Chaplin	<i>S. coelicolor</i>	Adhesion to hydrophobic surfaces	Hyphae	Elliot et al. 2003

Πίνακας 3. Πρωτεΐνες που σχηματίζουν φυσικά αμυλοειδή με ποικίλες λειτουργίες και σε ένα εύρος οργανισμών (55).

1.3 ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας μας, είναι να ελέγξουμε αν η zona pellucida, μια δομή εξαιρετικά διατηρημένη εξελικτικά ανάμεσα στα είδη των θηλαστικών, αποτελεί ακόμα μια χαρακτηριστική περίπτωση φυσικού προστατευτικού αμυλοειδούς. Η ενδελεχής έρευνα και μελέτη του χορίου των μεταξοσκωλήκων (Εικ. 23), όπως επίσης και του χορίου (βιτελλινικός φάκελος) που περιβάλλει τα ωκύτταρα των ψαριών, δομές που αμφότερες είναι αντίστοιχες με την zona pellucida των ωκυττάρων των θηλαστικών και εξυπηρετούν παρόμοιες λειτουργίες, υπέδειξε πως και στις δύο περιπτώσεις οι δομές αυτές σχηματίζονται από αμυλοειδή ινίδια και επομένως αποτελούν φυσικά προστατευτικά αμυλοειδή. Αυτό αποτέλεσε το κίνητρο μας να κινηθούμε αναλόγως και στην περίπτωση της zona pellucida.

Ωστόσο, ένας επιπρόσθετος στόχος αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί διεξοδικά η δομή των μονομερών των ΖΡ πρωτεϊνών και με βάση τα πειραματικά μας αποτελέσματα να προταθεί ένας πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των αμυλοειδών ινιδίων της zona pellucida των θηλαστικών και να κατασκευαστεί το αντίστοιχο δομικό μοντέλο που να προσομοιώνει τον τρόπο με τον οποίο οι πρωτεΐνες αυτές πολυμερίζονται στο χώρο οδηγώντας στο σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων.



Εικόνα 23. Το χόριο των ωοθυλακίων των μεταξοσκωλήκων, δομή με αντίστοιχη λειτουργία με την zona pellucida στα θηλαστικά, αποτελεί το πρώτο φυσικό προστατευτικό αμυλοειδές που εντοπίστηκε (80).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ

2.3 ΧΡΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟ ΤΟΥ CONGO (CONGO RED)

2.4 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-X

2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΕΡΥΘΡΟΥ (ATR FT-IR)

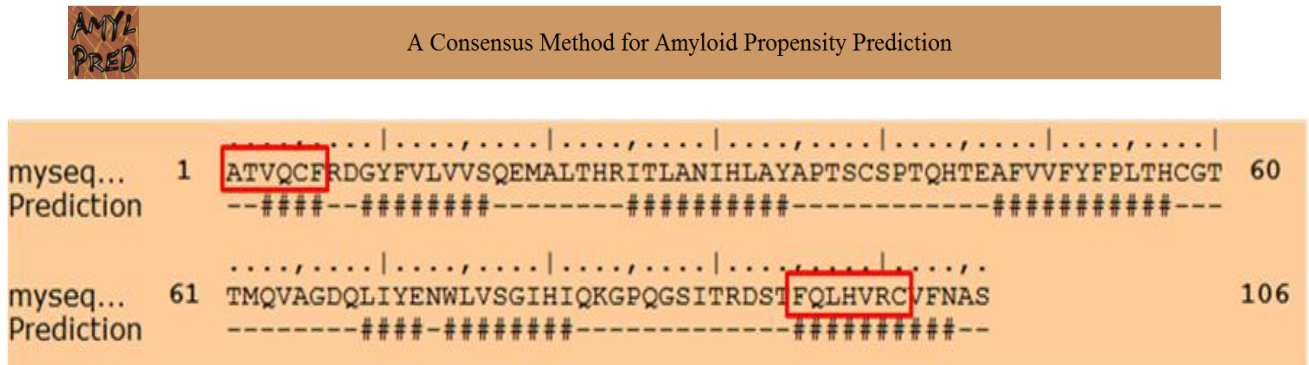
2.6 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (MODELING)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Οι ακολουθίες που αντιστοιχούν στην ανθρώπινη ZP1 (hZP1) πρωτεΐνη, με κωδικό AC (accession number) P60852, αλλά και την ZP3 του ποντικού (mZP3), με κωδικό AC P10761, απομονώθηκαν από την βάση δεδομένων Uniprot (Uniprot). Το τμήμα της ακολουθίας της mZP3 που αντιστοιχεί στην ZPN υπομονάδα (Monne & Jovine, 2008) διαχωρίστηκε και πραγματοποιήθηκε στοίχιση με την ακολουθία της hZP1, μέσω της εφαρμογής ClustalW (81), με στόχο να απομονωθεί και το τμήμα της ακολουθίας που αναλογεί στην αντίστοιχη ZPN υπομονάδα της hZP1. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των ακολουθιών αυτών με τον αλγόριθμο AMYLPRED (54), έναν συνεναιτικό αλγόριθμο πρόβλεψης αμυλοειδογενών καθοριστών. Τα αποτελέσματα και στις δύο περιπτώσεις υπέδειξαν ορισμένα τμήματα ως πιθανούς καθοριστές (Εικ. 24). Έτσι, με βάση τα αποτελέσματα του αλγορίθμου και μελετώντας την θέση των προβλεφθέντων περιοχών στην δομή, πραγματοποιήθηκε τελικά η σύνθεση δύο πεπτιδίων που αντιστοιχούν στον A κλώνο (ATVQCF) και G κλώνο (FQLHVRC) της ZPN υπομονάδας της hZP1 πρωτεΐνης, τα οποία ονομάστηκαν ZPH_A και ZPH_G αντίστοιχα, με μία απλή αντικατάσταση των καταλοίπων κυστεΐνης (Cys) από αλανίνη (Ala) για να αποφευχθεί η δημιουργία ανεπιθύμητων δισουλφιδικών δεσμών. Επιπρόσθετα, συντέθηκαν δύο ακόμα πεπτίδια τα οποία αντιστοιχούν στους E' κλώνους των ZPN υπομονάδων της hZP1 (TTMQV) και mZP3 (SRVQM), που ονομάστηκαν ZPH_ET και ZPN_ET αντίστοιχα και τα οποία δεν προβλέφθηκαν ως πιθανοί

αμυλοειδογενείς καθοριστές από το AMYLPRED, ωστόσο θέση τους στην δομή αλλά και πειραματικά δεδομένα (27) υποδεικνύουν ότι πιθανώς συμμετέχουν στον πολυμερισμό.



Εικόνα 24. Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου AMYLPRED, όπως προέκυψαν μετά από επεξεργασία της ακολουθίας που αντιστοιχεί στην ZP-N υπομονάδα της ανθρώπινης ZP1 πρωτεΐνης (hZP1). Με δίσωση απεικονίζονται οι προβλεφθέντες αμυλοειδογενείς καθοριστές και σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται τα δύο πεπτιδία που συντέθηκαν (54).

2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ (ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ)

Τα πεπτιδία που συντέθηκαν, διαλυτοποιήθηκαν σε επόμενο στάδιο με απεσταγμένο νερό (pH 5.5) σε τελική συγκέντρωση 5 mg ml^{-1} . Για να πραγματοποιηθεί αρνητική χρώση, διαλύματα (5 mg ml^{-1}) όλων των πεπτιδίων, μετά από επώαση 1-2 εβδομάδων, τοποθετήθηκαν σε ειδικά χάλκινα πλέγματα καλυμμένα με ένα λεπτό στρώμα άνθρακα (glow-discharged 400-mesh carbon-coated copper grids) για 60s. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε χρώση των πλεγμάτων με σταγόνα οξικού ουρανίου 1,5% (w/v) για 45s. Απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής έγινε με χρήση διηθητικού χαρτιού. Τα πλέγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και κατόπιν μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Philips CM120 Biotwin στα 100kV (FEI, Eidhoven, The Netherlands). Οι φωτογραφίες αποκτήθηκαν με την χρήση της ειδικής φωτογραφικής μηχανής Keen View 1K CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.3 ΧΡΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟ ΤΟΥ ΚΟΝΓΚΟ (CONGO RED)

Για να πραγματοποιηθεί χρώση, μικροποσότητα (~5μl) διαλύματος του κάθε πεπτιδίου τοποθετήθηκε σε χωριστή γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και εν συνεχεία αφέθηκε να στεγνώσει. Ακολούθησε χρώση με διάλυμα Ερυθρού του Congo (Congo red 10mM) διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7.4 (phosphate-buffered saline) για διάστημα 1h. Με το πέρας του χρόνου αυτού έγινε απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής με διαδοχικές εκπλύσεις με 90% αιθανόλη και τέλος τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε πολωτικό μικροσκόπιο, παρουσία κατάλληλου πολωτή αναλύτη (πολωτικό μικροσκόπιο Leica MZ75 με JVC GC-X3E κάμερα).

2.4 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ

Τα πεπτίδια διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό (pH 5.5) σε τελική συγκέντρωση 15 mg/ml για τον σχηματισμό ινιδίων για το διάστημα τουλάχιστον 1-2 εβδομάδων. Για την απόκτηση κατάλληλα προσανατολισμένης ίνας (απαραίτητη για την διεξαγωγή περίθλασης ακτίνων Χ), μικροποσότητα διαλύματος τοποθετήθηκε στο μεσοδιάστημα (~2mm) μεταξύ δύο γυάλινων ραβδών, στερεοποιημένων κατάλληλα σε γυάλινη αντικειμενοφόρο (βάση) ώστε να είναι απόλυτα ευθυγραμμισμένες και αφέθηκε σε συνθήκες μειωμένης υγρασίας και θερμοκρασίας δωματίου για περίπου 1h ώστε να σχηματιστεί προσανατολισμένη ίνα, κατάλληλη για περίθλαση ακτίνων-Χ. Ο προσανατολισμός της ίνας δεν διατηρείται με το πέρασ των 2 ωρών στις παραπάνω συνθήκες και επομένως τα περιθλασιγράμματα αποκτήθηκαν μέσα σε αυτό το χρονικό πλαίσιο.

Τα περιθλασιγράμματα καταγράφηκαν σε Mar Research 345 mm image plate, με την χρήση ακτινοβολίας CuK_α ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) που προήλθε από γεννήτρια περιστρεφόμενης ανόδου (Rigaku MicroMax-007 HF- Osmic Rigak VariMAXTM HF optics). Η γεννήτρια λειτουργούσε με ανοδικό ρεύμα 20 mA και ανοδική τάση 40 kV. Η απόσταση μεταξύ δείγματος και φιλμ ορίστηκε στα 150mm ενώ ο χρόνος έκθεσης ήταν 30 λεπτά. Σε αποστάσεις μεταξύ δείγματος-φιλμ, στο διάστημα 150 με 300mm δεν παρατηρήθηκαν περαιτέρω ανακλάσεις. Η απεικόνιση των περιθλασιγραμμάτων πραγματοποιήθηκε αρχικά με το πρόγραμμα MarView (MAR Research, Hamburg, Germany) και ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση, μελέτη και μέτρηση των ανακλάσεων με την

χρήση του προγράμματος IPDISP από το CCP4 πακέτο (Collaborative Computational Project, 1994).

2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΕΡΥΘΡΟΥ (ATR FT-IR)

Σταγόνες (~5 μl) από διαλύματα των δύο πεπτιδίων (5 mg/ml) τοποθετήθηκαν σε ειδικές μεταλλικές πλάκες καλυμένες με ένα λεπτό υδρόφοβο υπόστρωμα (SpectRIM, Tienta Sciences, Inc. Indianapolis, USA), αφέθηκαν να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου ώστε να σχηματίσουν λεπτές μεμβράνες (film) κατάλληλες για μέτρηση. Φάσματα IR αποκτήθηκαν, με διακριτικότητα 4 cm^{-1} , με την χρήση μικροσκοπίου υπερέρυθρου (IRScope II, BrukerOPTICS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) που διέθετε Ge ATR αντικειμενικό φακό (20x) και συνδεδεμένο σε FT spectrometer (Equinox 55, BrukerOPTICS). Συνολικά δέκα φάσματα, 32 σαρώσεων το καθένα (32-scan), συλλέχθηκαν από κάθε δείγμα και υπολογίστηκε το μέσο φάσμα με στόχο την βελτίωση S/N αναλογίας (σήμα/θόρυβος). Όλα τα φάσματα απεικονίζονται με τη μορφή απορρόφησης (absorption mode) μετά τη διόρθωση του βάθους διείσδυσης συναρτήσει του μήκος κύματος (d_p/λ). Ακολούθησε υπολογισμός των παραγώγων τους μέσω ρουτίνας του προγράμματος OPUS/OS2 μετά την εξομάλυνση των φασμάτων από τον αλγόριθμο Savitsky-Golay κατά $\pm 4\text{ cm}^{-1}$ (υπερέρυθρο), γύρω από κάθε σημείο. Εξομάλυνση σε στενότερα εύρη τιμών είχαν ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της S/N αναλογίας και ταυτόχρονα δεν αυξήθηκε ο αριθμός των ελαχίστων που μπορούσαν να προσδιοριστούν με βεβαιότητα. Τα ελάχιστα στη δεύτερη παράγωγο χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των αντίστοιχων μεγίστων των ταινιών απορρόφησης.

2.6 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (MODELING)

Η κατασκευή ενός γραφικού μοριακού μοντέλου της ZP-N υπομονάδας της hZP1 πρωτεΐνης, επιτεύχθηκε με την χρήση συγκριτικών μεθόδων μοντελοποίησης του προγράμματος MODELLER 9v2. Η λυμένη κρυσταλλογραφικά δομή της αντίστοιχης ZP-N υπομονάδας της ZP3 πρωτεΐνης του ποντικού (PDB ID: 3D4C) χρησιμοποιήθηκε σαν δομική βάση, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αντίστοιχων ακολουθιών με την χρήση του προγράμματος στοίχισης ClustalW και το αρχείο .PIR που αποκτήθηκε χρησιμοποιήθηκε σαν αρχείο εισόδου (input file) για το πρόγραμμα Modeller 9v2. Η εφαρμογή ομόλογης προτυποποίησης (homology modeling) κατέστη δυνατή καθώς οι δύο ακολουθίες εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας (Εικ. 25). Διαδικασίες docking ακολούθησαν με στόχο την κατασκευή ενός τελικού μοντέλου που επιδεικνύει τον πιθανό τρόπο με τον οποίο η ZP-N υπομονάδες πολυμερίζονται σχηματίζοντας ινίδια. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μελέτες τυχαίου docking (blind docking) με τη χρήση του GRAMM-X server. Σε επόμενο στάδιο ακολούθησε κατευθυνόμενο docking με τη χρήση του προγράμματος HADDOCK (high-performing docking μέθοδος) όπου δίνεται η δυνατότητα εισαγωγής πειραματικών περιορισμών. Στους πιθανούς περιορισμούς λήφθηκαν υπόψη αλληλεπιδράσεις που είχαν προσδιοριστεί πειραματικά και πιθανότατα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία πολυμερισμού των ZP-N υπομονάδων (27). Ειδικότερα, τα αμινοξικά κατάλοιπα 61 - 64 που ανήκουν στον Ε' κλώνο θεωρήθηκαν ως ενεργά κατάλοιπα. Από τις δομές που προέκυψαν επιλέχθηκαν αυτές που επιδείκνυαν τα χαμηλότερα ενδομοριακά ενεργειακά μέγιστα και που ικανοποιούσαν ταυτόχρονα τα πειραματικά κριτήρια που είχαμε θέσει ως

απαραίτητα. Σε τελικό στάδιο, οι διαμορφώσεις που επιλέχθηκαν επιμηκύνθηκαν με την χρήση της ρουτίνας “align” του προγράμματος παρουσίασης μοριακών γραφικών PyMOL. Ακολούθησε ενεργειακή ελαχιστοποίηση (Energy minimization) με τη βοήθεια του προγράμματος TINKER και εφαρμογή δυναμικού πλαισίου (force field implementation) μέσω του CHARMM 27 ενώ ταυτόχρονα το WHATCHECK πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθούν οι στερεοχημικοί παράγοντες του τελικού μοντέλου (82).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

mZP3_ZPN      VKVECL-EAELVVTVSRDLFGTGKLVQP-GDLILGSEGCQPRVSVDTIDVVRFNAQLHECS 58
hZP1_ZPN      ATVQCFRDGYFVLVVSQEMALTHRITLANIHILAYAPTSCSPTQHTTEAFVW-FYFPLTHCG 59
               ..*::: .. :*:**::: * :.. . .*: .. .* * ..: ** * * ..*

mZP3_ZPN      SRVQMTKDALVYSTFLLHDPFVSG--LSILRTNRVEVPIECRYPR 102
hZP1_ZPN      TTMQVAGDQLIYENWLVSGIHIQKGPQGSITRDSTFQLHVRCVFNA 105
               : :*: * *:*..* : . : .* ** * . : : : * :

```

Εικόνα 25. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρήση του αλγορίθμου στοίχισης αλληλουχιών ClustalW για τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις ZPN υπομονάδες της mZP3 και hZP1. Από το αποτέλεσμα είναι εμφανής η υψηλή ομολογία που εμφανίζουν οι δύο ακολουθίες (81).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ

3.1.2 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ

3.1.3 ΧΡΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟ ΤΟΥ ΚΟΝΓΚΟ (CONGO RED)

3.1.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΕΡΥΘΡΟΥ (ATR FT-IR)

3.2 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (MODELING)

3.2.1 ΟΜΟΛΟΓΗ ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (HOMOLOGY MODELING)

3.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΚΥΡΟΒΟΛΗΣΗΣ (DOCKING)

3.2.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΕΛΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

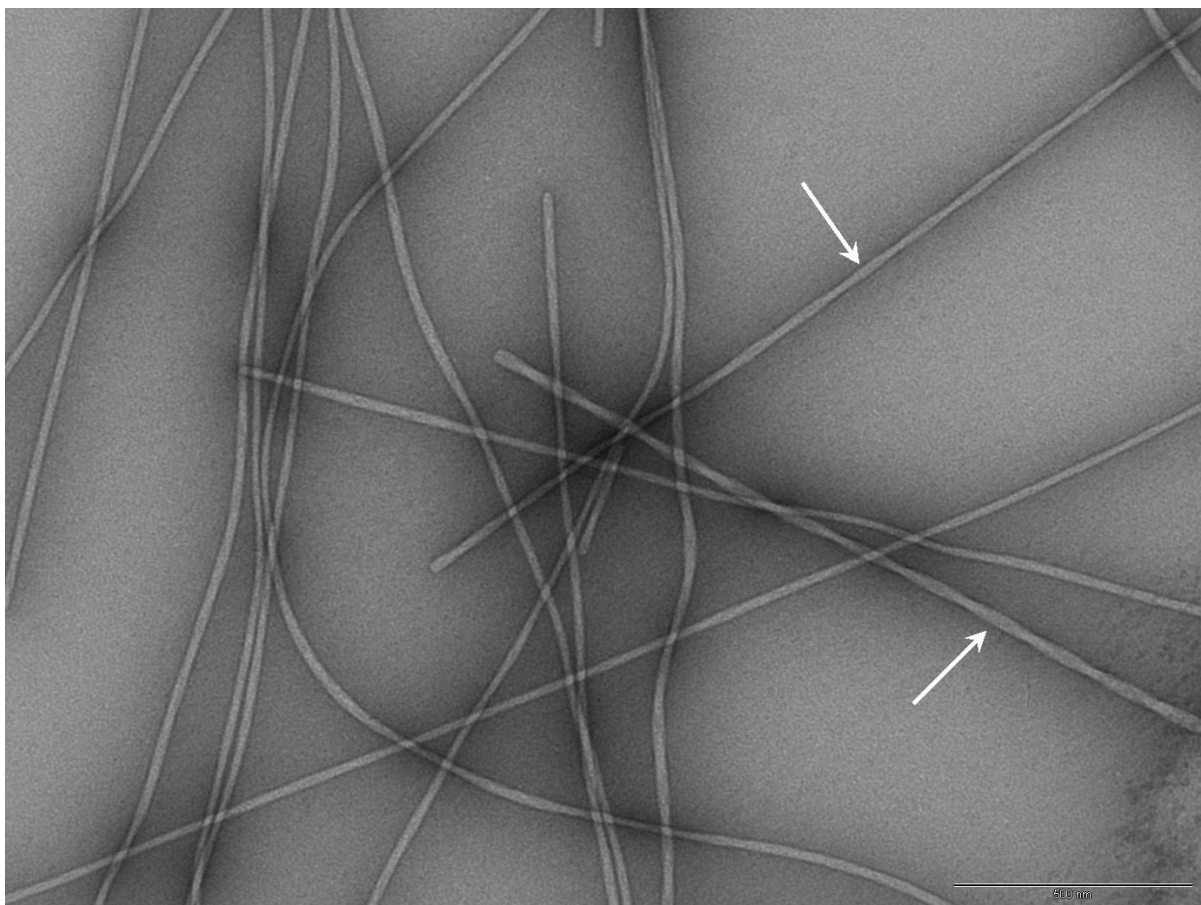
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα τέσσερα συνθετικά πεπτίδια διαλυτοποιήθηκαν αρχικά σε απεσταγμένο νερό (βλ. Κεφ. 2.1-2.2), όπου αφέθηκαν για το διάστημα 1-2 εβδομάδων με στόχο να ελεγχεί αν σχηματίζουν ινίδια. Με το πέρας αυτού του διαστήματος, τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στους κλώνους A (ZPH_A) και G (ZPH_G) της ZP-N υπομονάδας της ανθρώπινης ZP1, όπως είχε προβλεφθεί με την χρήση του συναινετικού αλγορίθμου πρόβλεψης AMYLPRED, βρέθηκε πως αυτοσυγκροτούνται σε ινίδια με αμυλοειδογενή χαρακτηριστικά. Σε πλήρη αντίθεση, τα διαλύματα των πεπτιδίων που αντιστοιχούν στους Ε' κλώνους του ανθρώπου και του ποντικού, ZPH_ET και ZPN_ET, δεν σχηματίζουν αμυλοειδογενή ινίδια στις αντίστοιχες συνθήκες, κάτι που είχε επίσης προβλεφθεί από τον αλγόριθμο και έτσι αποκλείστηκε το ενδεχόμενο να λειτουργούν ως πιθανοί αμυλοειδογενείς καθοριστές. Ο χαρακτηρισμός των παραπάνω ινιδίων στηρίχθηκε στον έλεγχο των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους σύμφωνα με τα βασικά κριτήρια καθορισμού των αμυλοειδών ινιδίων (βλ Κεφ. 1.2.2). Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε μελέτη των ινιδίων αυτών με τις μεθόδους της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης, της περίθλασης ακτίνων-Χ, της φασματοσκοπίας υπερερυθρού και τέλος έγινε και χρώση με Congo red που βάφει ειδικά αμυλοειδή.

3.1.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ

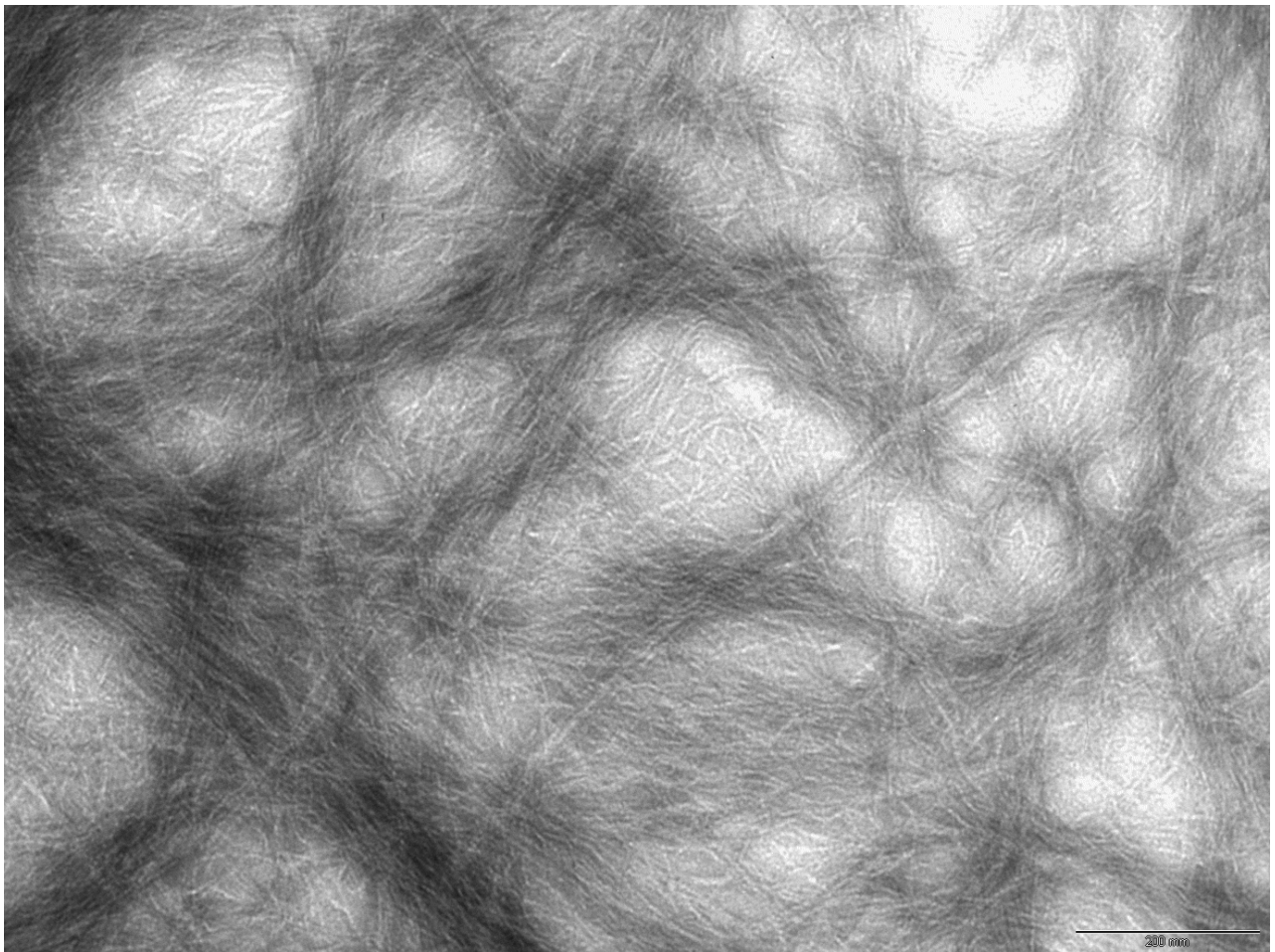
Τα πεπτίδια ZPH_A και ZPH_G αντίστοιχα, μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου βρέθηκε πως σχηματίζουν πηκτώματα (gel) που οφείλονται στον σχηματισμό ώριμων ινιδίων εξαιτίας της αυτοσυγκρότησης του πεπτιδίου και τα οποία εμφανίζουν δομικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά στα περισσότερα αμυλοειδή ινίδια.

Στην περίπτωση των ινιδίων που σχηματίζονται από αυτοσυγκρότηση του ZPH_A πεπτιδίου, τα ινίδια εμφανίζονται δομικά ομοιόμορφα μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, έχουν διάμετρο της τάξης των $\sim 100 - 120 \text{ \AA}$, είναι ευθεία και φαίνεται να είναι σχετικά ακαθόριστου μήκους, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως δεν φέρουν διακλαδώσεις. Λεπτομερέστερη ανάλυση τους υποδεικνύει πως τα ινίδια αυτά αποτελούν ουσιαστικά υπερδευτεροταγείς δομές αφού σχηματίζονται από την περιέλιξη δύο μικρότερων πρωτοινιδίων που είναι επίσης ομοιόμορφα σε διάμετρο, με πάχος της τάξης των $\sim 40 - 50 \text{ \AA}$ (Εικ. 26).



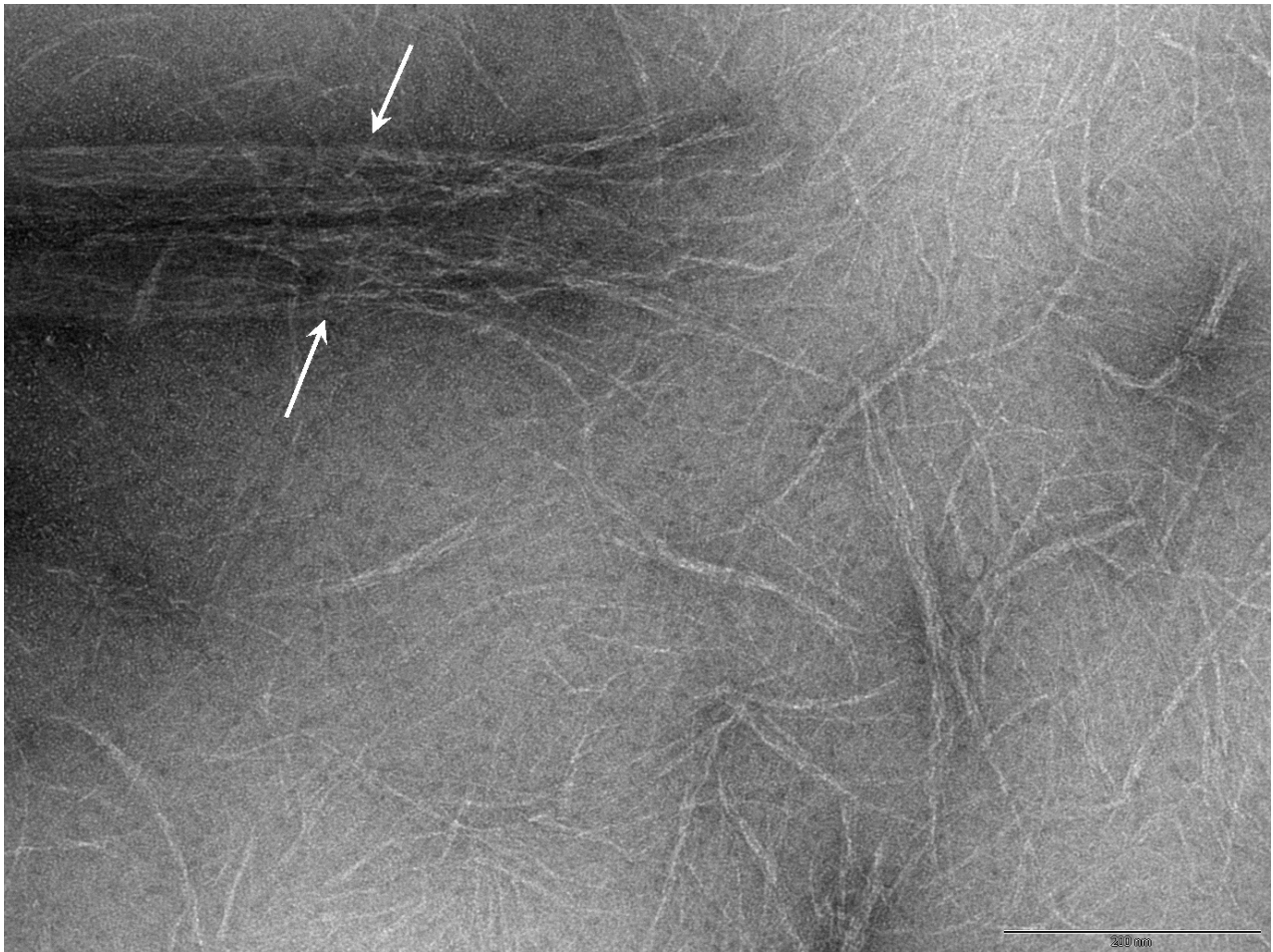
Εικόνα 26. Τα ινίδια που σχηματίζονται από αυτοσυγκρότηση του ZPH_A πεπτιδίου, εμφανίζονται ευθύγραμμα, αδιακλάδιστα και με ακαθόριστο μήκος (βέλη), όπως όλα τα αμυλοειδή ινίδια, όταν παρατηρηθούν με ΗΜΔ.

Η εικόνα στην περίπτωση των ινιδίων από αυτοσυγκρότηση του ZPH_G πεπτιδίου εμφανίζεται αρκετά διαφορετική από ότι στην περίπτωση του ZPH_A (δείγμα της ποικιλίας στην μορφολογία που εμφανίζουν τα αμυλοειδή ινίδια) καθώς ο πολυμερισμός φαίνεται να είναι ιδιαίτερα έντονος σε αυτή την περίπτωση (Εικ. 27).



Εικόνα 27. Ο πολυμερισμός του ZPH_G πεπτιδίου είναι ιδιαίτερα έντονος με αποτέλεσμα να σχηματίζεται πήκτωμα (gel).

Τα ινίδια εμφανίζονται ξανά ως ευθεία, αδιακλάδιστα και ακαθορίστου μήκους. Τα πρωτοινίδια είναι ομοιόμορφα με διάμετρο της τάξης των ~40 - 50 Å, ωστόσο δεν έχουμε την ίδια πλευρική αλληλεπίδραση δύο περιελιγμένων πρωτοινιδίων όπως στην περίπτωση του ZPH_A. Υπάρχει, ωστόσο και σε αυτή τη περίπτωση σχηματισμός υπερδευτεροταγών δομών και συγκεκριμένα σχηματισμός ταινιών (bundles), με πλάτος που ποικίλει, μέσω των πλευρικών αλληλεπιδράσεων των πρωτοινιδίων (Εικ. 27-28).

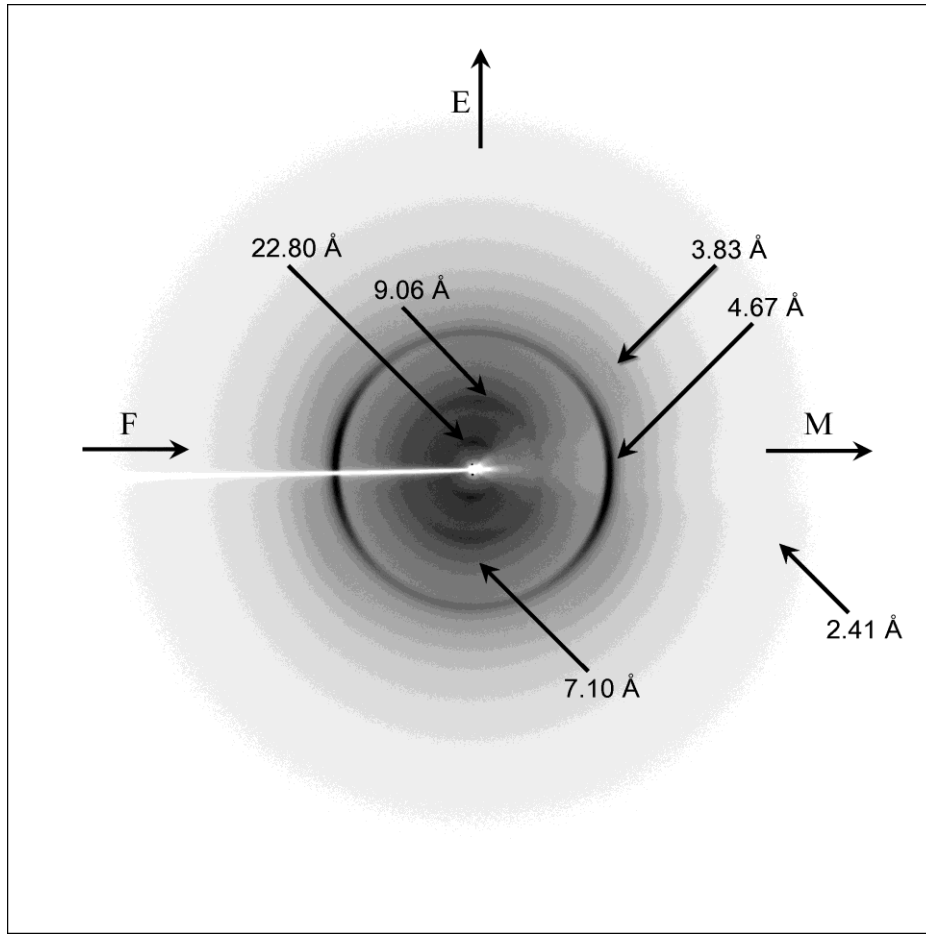


Εικόνα 28. Τα ινίδια που προέρχονται από αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ZPH_G. Ο πολυμερισμός του πεπτιδίου είναι ιδιαίτερα έντονος κάτι που έχει ως αποτέλεσμα και τον σχηματισμό δεματίων (βέλη).

3.1.2 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ

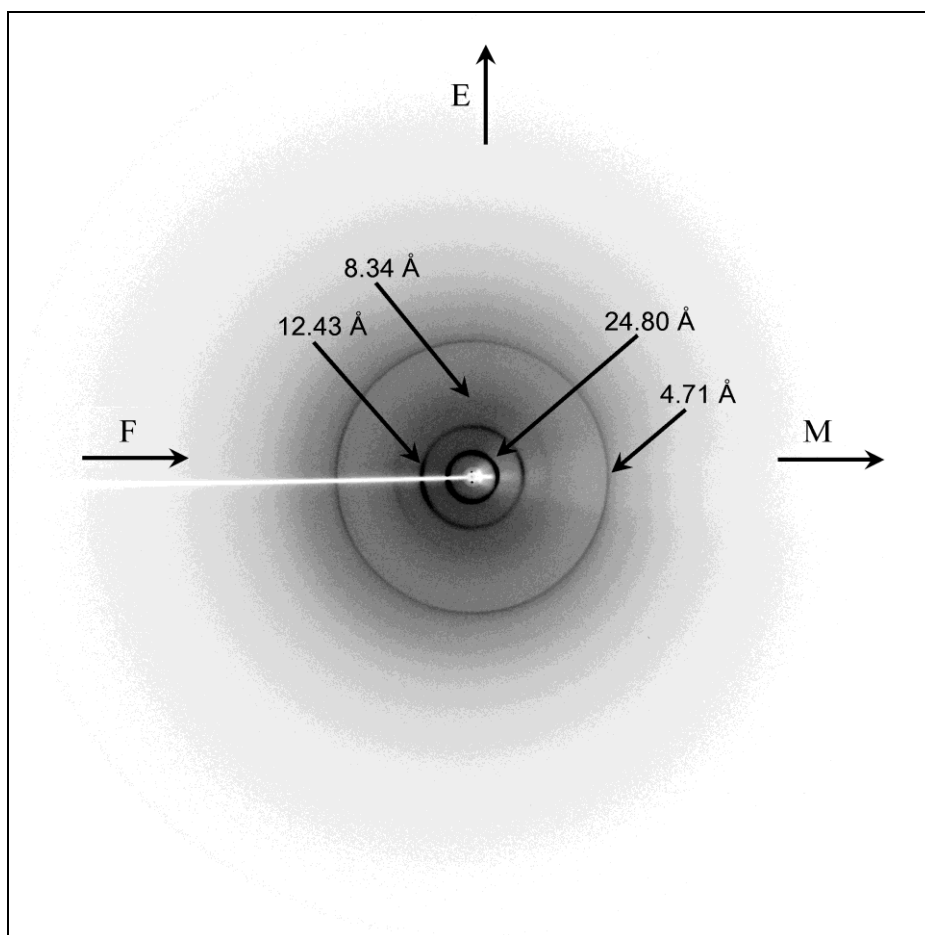
Διαλύματα ινιδίων από αυτοσυγκρότηση των πεπτιδίων σχηματίζουν, κάτω από ειδική επεξεργασία, ίνες με προσανατολισμό κατάλληλο για περίθλαση ακτίνων-Χ. Στις ίνες αυτές, ο άξονας των αμυλοειδών ινιδίων είναι σχετικά παράλληλος με τον άξονα της ίνας (83). Τα περιθλασιγράμματα και στις δύο περιπτώσεις παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές ανακλάσεις των “cross-β” περιθλασιγραμμάτων που εμφανίζουν τα αμυλοειδή ινίδια. Οι ανακλάσεις ως επί το πλείστον, εμφανίζονται ως δακτύλιοι και το γεγονός αυτό σχετίζεται πιθανότατα με το τυχαίο πακετάρισμα ορισμένων εκ των ινιδίων, που αποκτούν κάθε πιθανή διεύθυνση και προσανατολισμό στο χώρο.

Το περιθλασίγραμμα που προκύπτει από προσανατολισμένη ίνα των ινιδίων από αυτοσυγκρότηση του ZPH_A πεπτιδίου είναι όπως αναφέρθηκε ένα κλασσικό “cross-β” τύπου περιθλασίγραμμα, αφού εμφανίζει μια χαρακτηριστική ανάκλαση στον μεσημβρινό άξονα (M), που είναι παράλληλος ως προς τον άξονα της ίνας (F), στα 4.67 Å που αντιστοιχεί στην απόσταση που διαχωρίζει δύο διαδοχικούς β-κλώνους, οι οποίοι εκτείνονται κατά μήκος του ινιδίου και είναι κάθετοι ως προς τον άξονα του και επιπλέον εμφανίζει μία ισημερινή (E) ανάκλαση, κάθετα ως προς τον άξονα της ίνας (F), στα 9.06 Å, η οποία αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών που εκτείνονται παράλληλες ως προς τον άξονα του ινιδίου. Οι δύο αυτές ανακλάσεις, πιθανότατα αποτελούν και τους δύο άξονες της κυβελίδας, στην οποία οργανώνονται τα μόρια του πεπτιδίου, με την ανάκλαση στα 22.80 Å να αποτελεί πιθανότατα την τρίτη διάσταση και ταυτόχρονα αντιπροσωπεύει το μήκος του συντιθέμενου πεπτιδίου (Εικ.29).



Εικόνα 29. Περιθλασίγραμμα τύπου “cross-β” δομής προσανατολισμένης ίνας ινιδίων που προέρχονται από αυτοσυγκρότηση του ZPH_A πεπτιδίου. Είναι εμφανής η χαρακτηριστική μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.67 Å που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων, όπως επίσης και η ισημερινή ανάκλαση στα 9.06 Å, που υποδηλώνει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών.

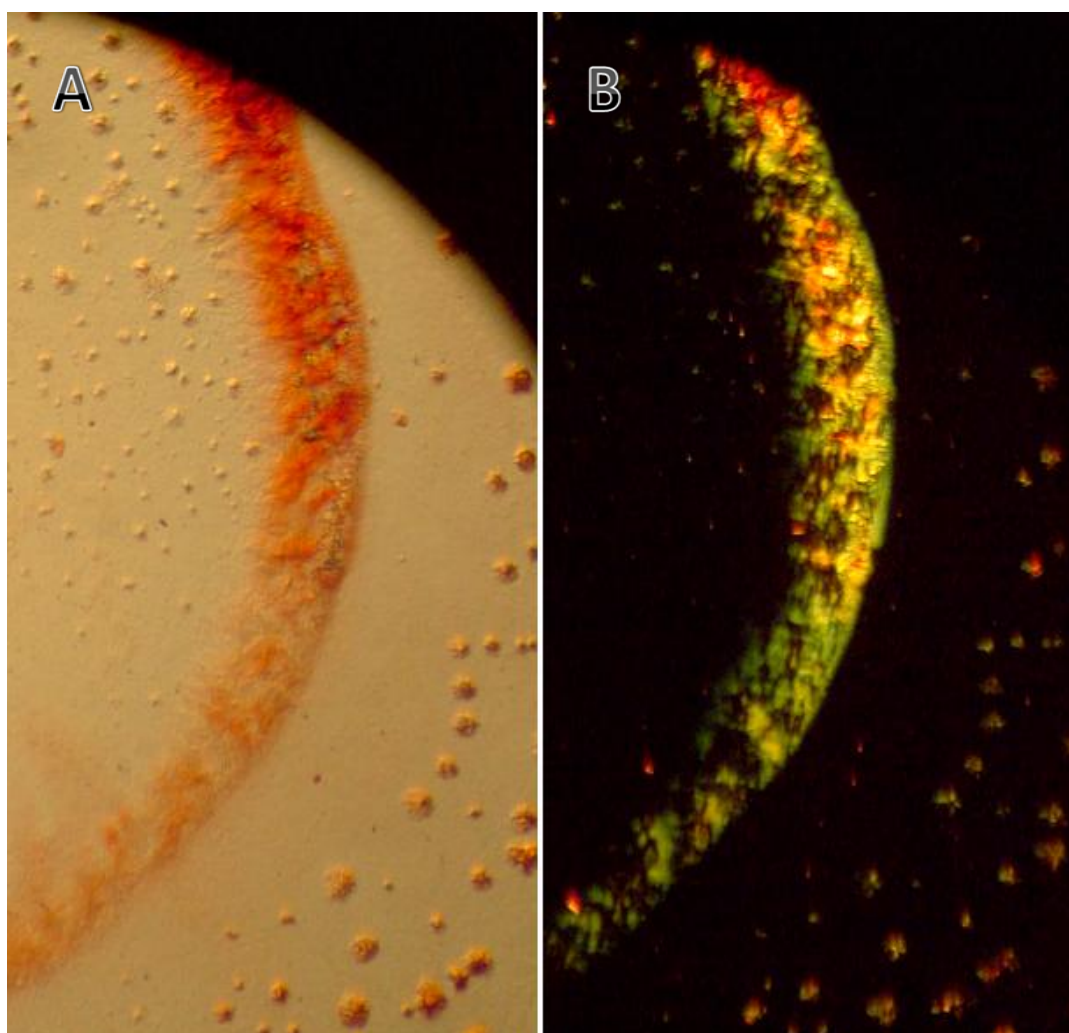
Σε αντιστοιχία, στην περίπτωση του ZPH_G πεπτιδίου προκύπτει επίσης ένα χαρακτηριστικό “cross-β” τύπου περιθλασίγραμμα, καθώς η παρουσία της μεσημβρινής ανάκλασης στα 4.71 Å είναι ενδεικτική της απόστασης μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων ενώ η ισημερινή ανάκλαση στα 8.34 Å αντιστοιχεί στην απόσταση που διαχωρίζει δύο διαδοχικές β-πτυχωτές επιφάνειες, σε αναλογία με ότι ισχύει στην περίπτωση του ZPH_A πεπτιδίου. Οι δύο παραπάνω ανακλάσεις όπως και αυτή στα 24.80 Å, που υποδεικνύει το μήκος του αντίστοιχου πεπτιδίου, φαίνεται πως αντιστοιχούν και σε αυτή την περίπτωση στις τρεις διαστάσεις της κυψελίδας εντός της οποίας οργανώνονται τα μόρια του ZPH_G πεπτιδίου (Εικ. 30).



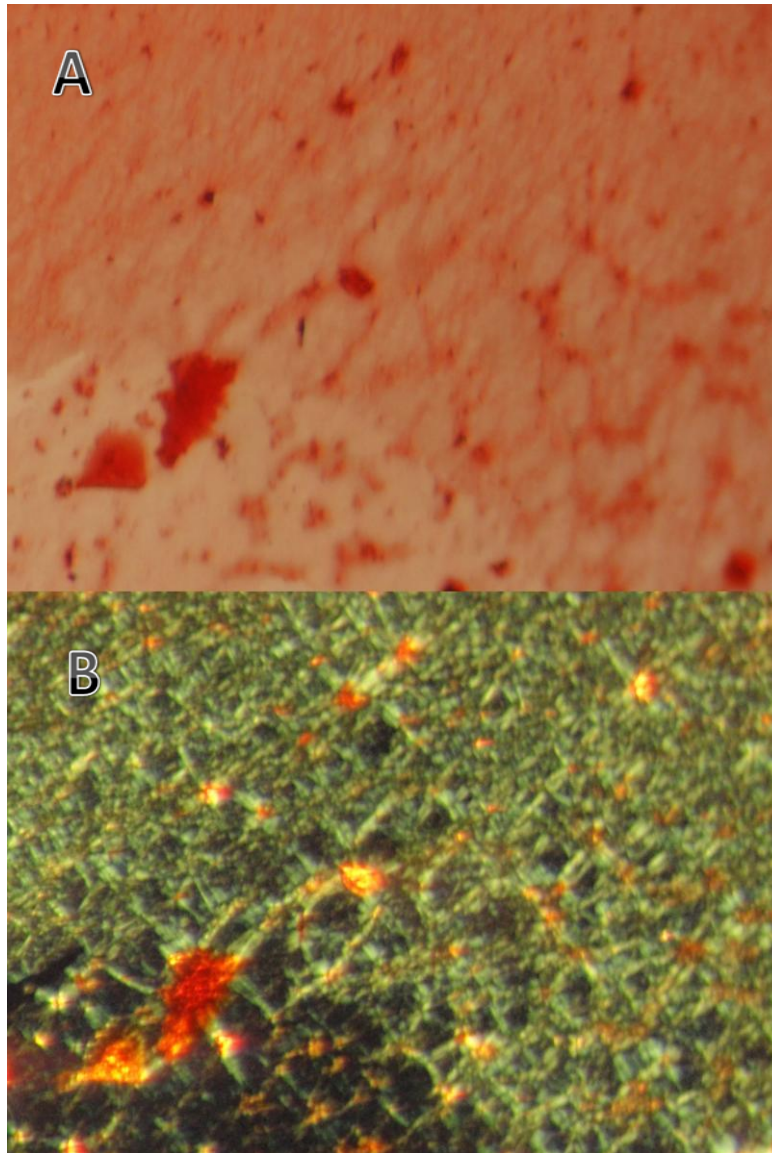
Εικόνα 30. Περιθλασίγραμμα τύπου “cross-β” δομής προσανατολισμένης ίνας ινιδίων που προέρχονται από αυτοσυγκρότηση του ZPH_G πεπτιδίου. Είναι εμφανής η χαρακτηριστική μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.71 Å που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων, όπως επίσης και η ισημερινή ανάκλαση στα 8.34 Å, που υποδηλώνει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών.

3.1.3 ΧΡΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟ ΤΟΥ ΚΟΝΓΚΟ (CONGO RED)

Είναι εμπειριστατωμένο το γεγονός πως οι εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων δεσμεύουν εκλεκτικά την χρωστική ερυθρό του Κονγκό (Congo red dye) που είναι ένα διάζω-άλας. Για τον λόγο αυτό, έγινε χρώση εναποθέσεων διαλυμάτων των πεπτιδίων με την χρωστική αυτή και εντοπίστηκε πως την δεσμεύουν και εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα που εμφανίζουν και τα αμυλοειδή ινίδια όταν παρατηρηθούν σε διασταυρωμένους πολωτή-αναλύτη.



Εικόνα 31. Χρώση Congo red σε διάλυμα του πεπτιδίου ZPH_A. (A) Μη διασταυρωμένοι πολωτής και αναλύτης. Οι περιοχές που εμφανίζουν την έντονη κόκκινη απόχρωση έχουν δεσμεύσει επιτυχώς την χρωστική. (B) Διασταυρωμένοι πολωτής και αναλύτης. Οι περιοχές που έχουν δεσμεύσει την χρωστική εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα που εμφανίζουν οι αμυλοειδείς εναποθέσεις.

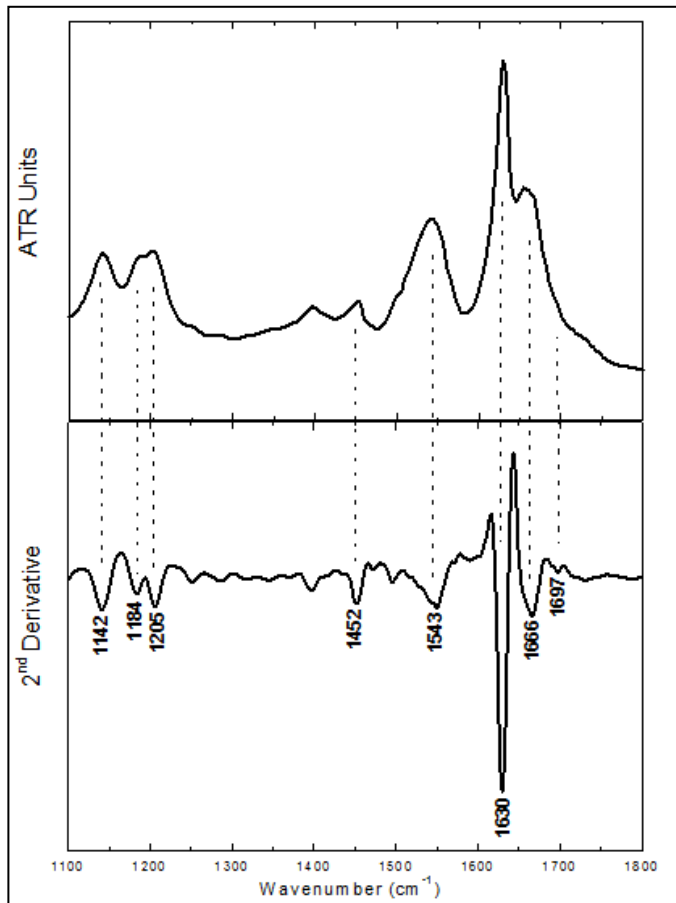


Εικόνα 32. Χρώση Congo red σε διάλυμα του πεπτιδίου ZPH_G που σχηματίζει πήκτωμα (gel). (A) Μη διασταυρωμένοι πολωτής και αναλύτης. Οι περιοχές που εμφανίζουν την έντονη κόκκινη απόχρωση έχουν δεσμεύσει επιτυχώς την χρωστική. (B) Διασταυρωμένοι πολωτής και αναλύτης. Οι περιοχές που έχουν δεσμεύσει την χρωστική εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα που εμφανίζουν οι αμυλοειδείς εναποθέσεις.

3.1.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΕΡΥΘΡΟΥ (ATR FT-IR)

Τα φάσματα απορρόφησης ATR FT-IR που προέκυψαν απο διαλύματα των ινιδίων των δύο πεπτιδίων έδωσαν μια σαφή εικόνα σχετικά με τη δευτεροταγή δομή που επικρατεί.

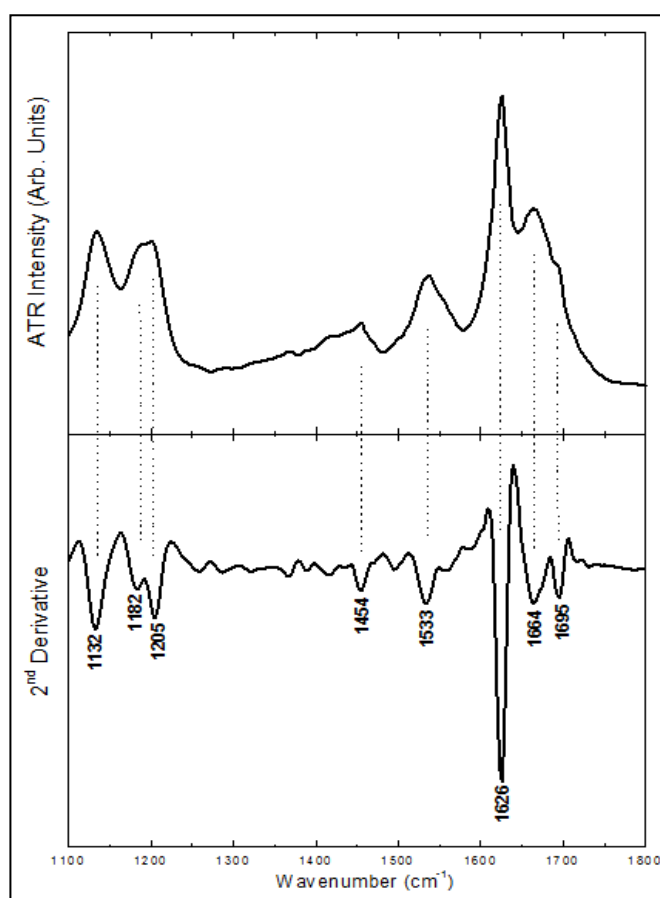
Στην περίπτωση του ZPH_A πεπτιδίου, η έντονη εμφάνιση μιας ταινίας στα 1630 cm^{-1} στην αμιδική I περιοχή υποδεικνύει την παρουσία β-πτυχωτών επιφανειών (Synkewisz). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμφάνιση ταινίας στα 1666 cm^{-1} , ενδεικτική της παρουσίας β-στροφών, που πιθανότατα συνδέουν τους διαδοχικούς β-κλώνους αλλά και αυτή στα 1697 cm^{-1} , που οφείλεται στην παρουσία αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνεπώς υποστηρίζουν απόλυτα την “cross-β” διευθέτηση που συνήθως φέρουν τα αμυλοειδή ινίδια. Τέλος, η εμφάνιση ταινίας στην περιοχή της αμιδικής II στα 1543 cm^{-1} , οφείλεται επίσης στην διευθέτηση β-πτυχωτών φύλλων και επομένως συμφωνεί επίσης με τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικ. 33).



Κυματάριθμος	Απόδοση
1142 cm^{-1}	TFA
1184 cm^{-1}	TFA
1205 cm^{-1}	TFA
1452 cm^{-1}	CH ₂ παραμόρφωση
1453 cm^{-1}	Β-πτυχωτές επιφάνειες (Αμιδική II)
1630 cm^{-1}	β-πτυχωτές επιφάνειες (Αμιδική I)
1666 cm^{-1}	β-στροφές
1697 cm^{-1}	Αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες

Εικόνα 33. Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερερυθρού (ATR FT-IR) που πραγματοποιήθηκε σε φιλμ που προέκυψε από εναπόθεση διαλύματος ινιδίων του πεπτιδίου ZPH_A σε ειδικό υδρόφοβο υπόστρωμα.

Αντίστοιχα δεδομένα προκύπτουν και από την μελέτη του φάσματος στην περίπτωση του ZPH_G πεπτιδίου. Συγκεκριμένα υποστηρίζεται η έντονη παρουσία β-πτυχωτών φύλλων με την εμφάνιση ταινίας στην περιοχή της αμιδικής I και II, στα 1626 cm^{-1} και στα 1533 cm^{-1} αντίστοιχα και συγκεκριμένα αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας όπως υποδεικνύει η παρουσία επιπλέον ταινίας στα 1695 cm^{-1} . Τέλος, υποστηρίζεται και η παρουσία β-στροφών από τις ταινίες στα 1664 cm^{-1} αλλά και αυτής στα 1259 cm^{-1} στην περιοχή της αμιδικής III (Εικ. 34). Συμπερασματικά, η δομή που φαίνεται να επικρατεί στα ινίδια που σχηματίζονται από την αυτοσυγκρότηση και των δύο αυτών πεπτιδίων είναι αυτή της αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας, δομή που επικρατεί γενικότερα στα αμυλοειδή ινίδια.



Κυματάριθος	Απόδοση
1132 cm^{-1}	TFA
1182 cm^{-1}	TFA
1205 cm^{-1}	TFA
1259 cm^{-1}	Β-στροφές (Αμιδική III)
1454 cm^{-1}	CH ₂ παραμόρφωση
1533 cm^{-1}	Β-πτυχωτές επιφάνειες (Αμιδική II)
1626 cm^{-1}	β-πτυχωτές επιφάνειες (Αμιδική I)
1664 cm^{-1}	β-στροφές
1695 cm^{-1}	Αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες

Εικόνα 34. Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερερυθρού (ATR FT-IR) που πραγματοποιήθηκε σε φιλμ που προέκυψε από εναπόθεση διαλύματος ινιδίων του πεπτιδίου ZPH_G σε ειδικό υδρόφοβο υπόστρωμα.

3.2 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (MODELING)

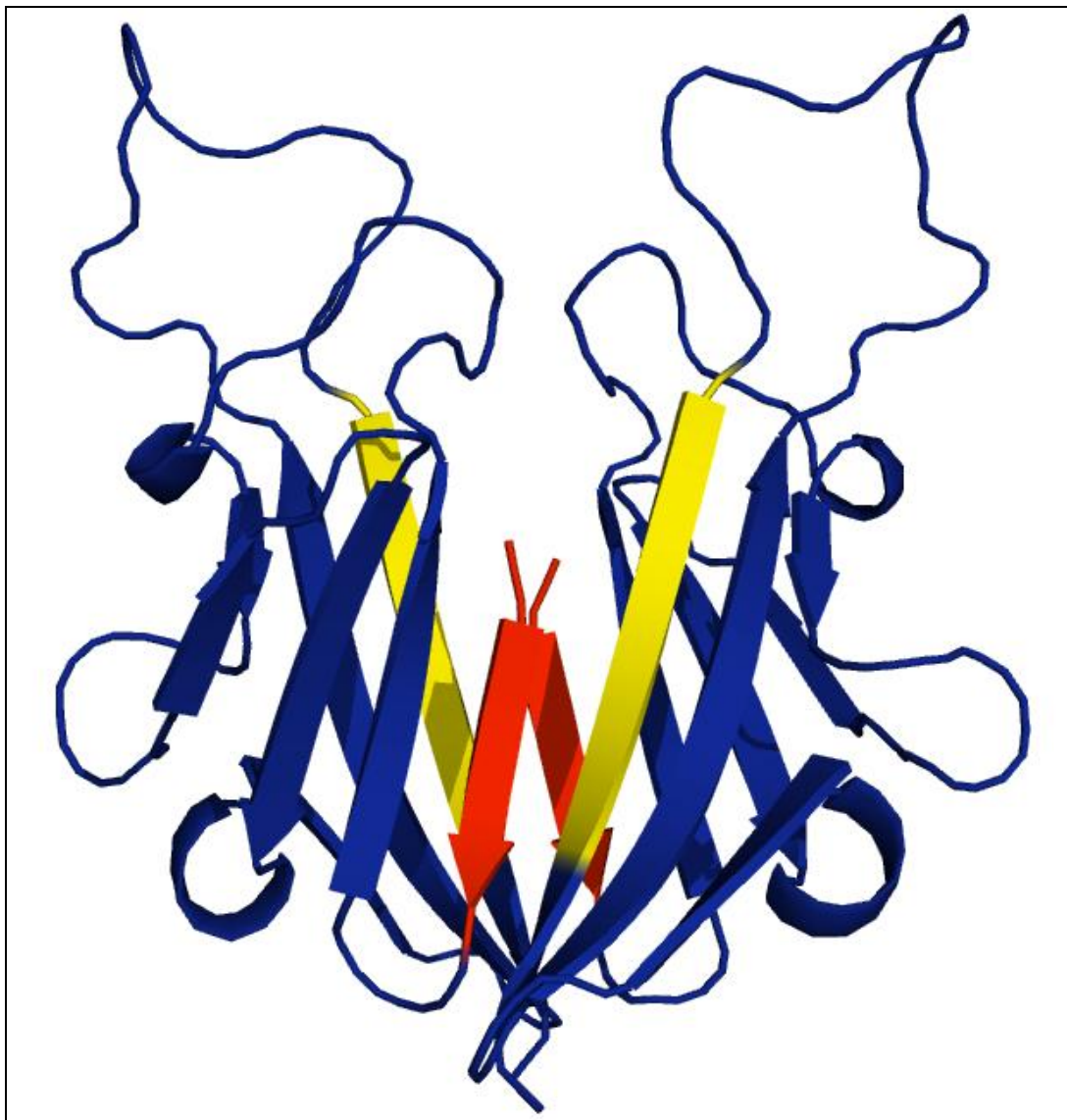
3.2.1 ΟΜΟΛΟΓΗ ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Με την χρήση κατάλληλου προγράμματος ομόλογης προτυποποίησης (Κεφ. 2.6) και με βάση την κρυσταλλογραφικά λυμένη δομή της ZP-N υπομονάδας της ZP3 πρωτεΐνης του ποντικού δημιουργήθηκε ένα μοντέλο που απεικονίζει την στερεοδομή της αντίστοιχης ZP-N υπομονάδας της ZP1 πρωτεΐνης του ανθρώπου. Η δομή μελετήθηκε περαιτέρω με την βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMOL όπου εντοπίστηκε η θέση των μελετούμενων πεπτιδίων και ακολούθησε μελέτη των πιθανών αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν.

3.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΚΥΡΟΒΟΛΗΣΗΣ (DOCKING)

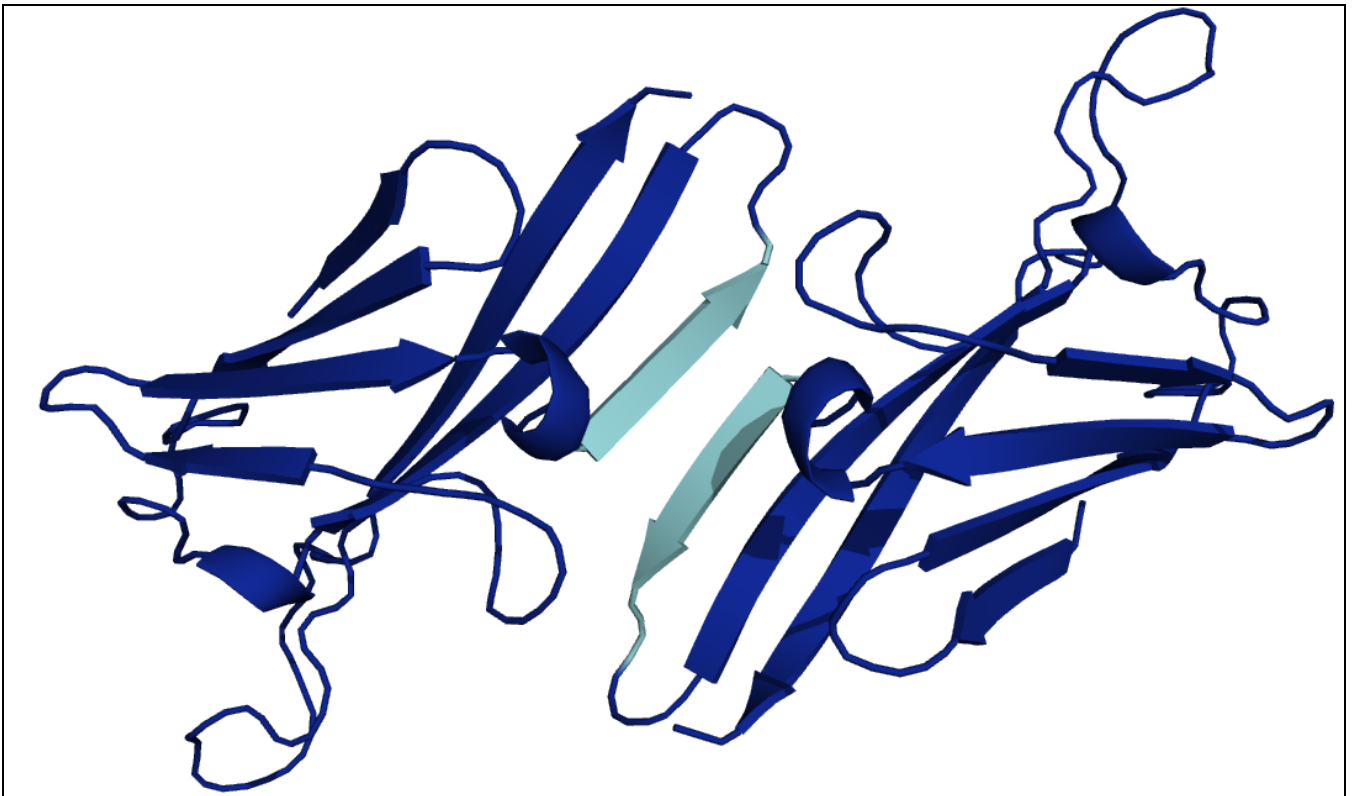
Αφού εντοπίστηκε η θέση των μελετούμενων πεπτιδίων στην δομή της ZP-N υπομονάδας και με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που υποδεικνύουν την πιθανότητα να λειτουργούν ως αμυλοειδογενείς καθοριστές, το επόμενο βήμα είναι να μελετήσουμε την πιθανότητα συμμετοχής τους στον πολυμερισμό των ZP-N υπομονάδων που οδηγεί στον σχηματισμό ινιδίων της *zona pellucida*. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν αρχικά δοκιμές τυχαίας αγκυροβόλησης με την χρήση του διαδικτυακού προγράμματος GRAMM-X (84). Από τις λύσεις που προέκυψαν εντοπίστηκε και επιλέχθηκε μια που συμπεριλάμβανε την συμμετοχή των κλώνων A και G στο σχηματισμό διμερών ZP-N υπομονάδων μέσω αλληλεπιδράσεων της κύριας αλυσίδας τους (backbone interactions) και που ταυτόχρονα παρουσίαζε τις

ελάχιστες δυνατές στεροχημικές παρεμποδίσεις (Εικ. 35) Το ενδιαφέρον σχετικά με την λύση αυτή είναι πως διατηρούνται σχετικά ελεύθερες για αλληλεπίδραση οι περιοχές όπου εντοπίζονται οι Ε' β-κλώνοι κάθε μονομερούς, που έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στον σχηματισμό διμερών επίσης μέσω αλληλεπιδράσεων της κύριας αλυσίδας. Ωστόσο καμία από τις λύσεις που προέκυψαν μέσω του GRAMM-X δεν υποστήριζε την συμμετοχή του Ε' β-κλώνου στον σχηματισμό διμερών ZP-N υπομονάδων.



Εικόνα 35. Μοντέλο αλληλεπίδρασης διαδοχικών ZP-N υπομονάδων μέσω των A και G β-κλώνων (με κόκκινο και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα), όπως προέκυψε από το πρόγραμμα αγκυροβόλησης GrammX. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως μια τέτοια αλληλεπίδραση αφήνει σχετικά ελεύθερους τους Ε' β-κλώνους (βέλη) στις άκρες επιτρέποντας έτσι περαιτέρω αλληλεπιδράσεις για πολυμερισμό υπομονάδων.

Ως λογικό επακόλουθο, ακολούθησε δοκιμή κατευθυνόμενης αγκυροβόλησης με την χρήση του προγράμματος HADDOCK (85) αφού ορίστηκαν ως ενεργά τα κατάλοιπα 61-64 που αποτελούν τον E' β-κλώνο της δομής. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν εντοπίστηκε κατάλληλη λύση που υποδεικνύει την συμμετοχή των E' β-κλώνων στη συμμετοχή διμερών σε κοντινή αναλογία με τα δεδομένα από την κρυσταλογραφικά εντοπισμένη συμμετοχή τους (Εικ. 36).

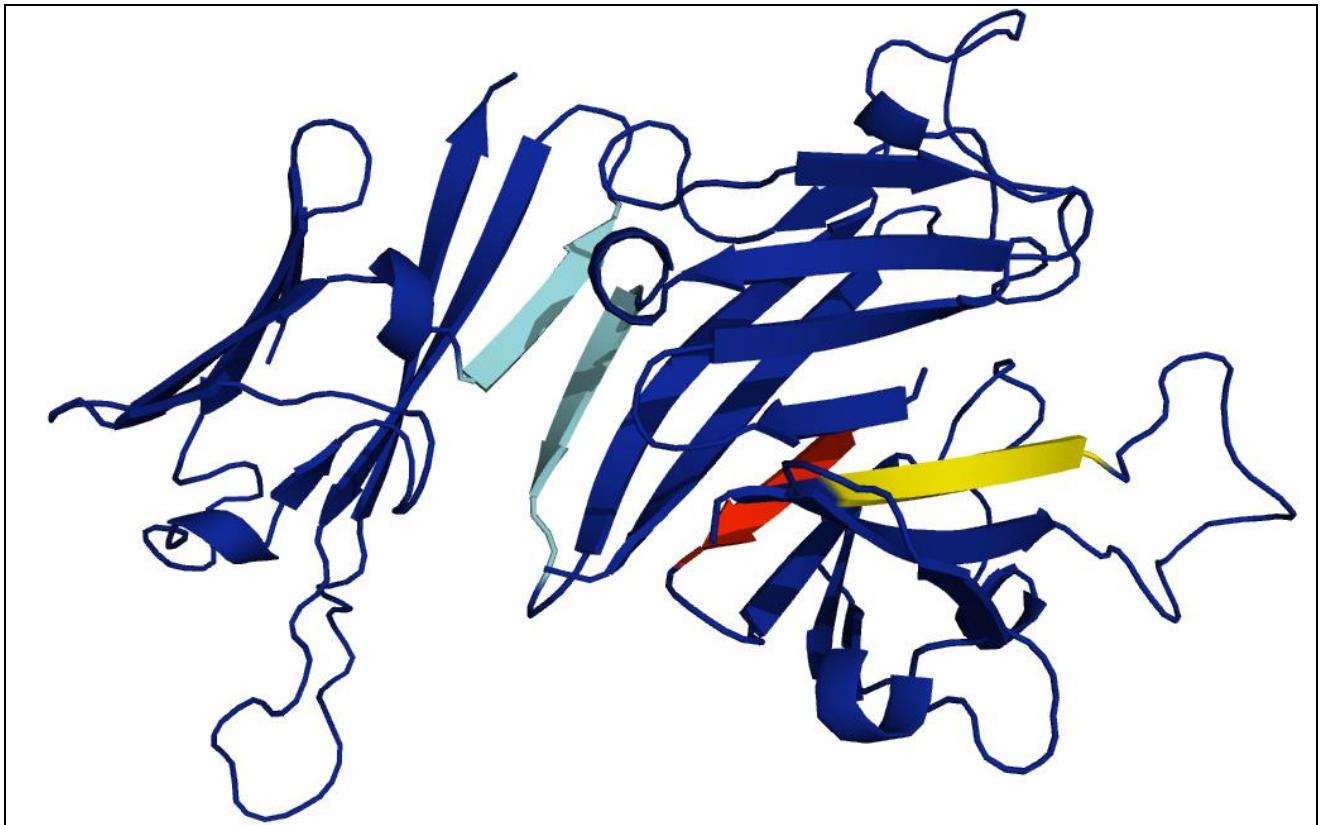


Εικόνα 36. Ο πολυμερισμός διαδοχικών ZP-N υπομονάδων μέσω αλληλεπίδρασης των E' β-κλώνων (απεικονίζονται με γαλάζιο χρώμα) όπως προέκυψε μετά από χρήση του προγράμματος κατευθυνόμενης αγκυροβόλησης HADDOCK.

3.2.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΕΛΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

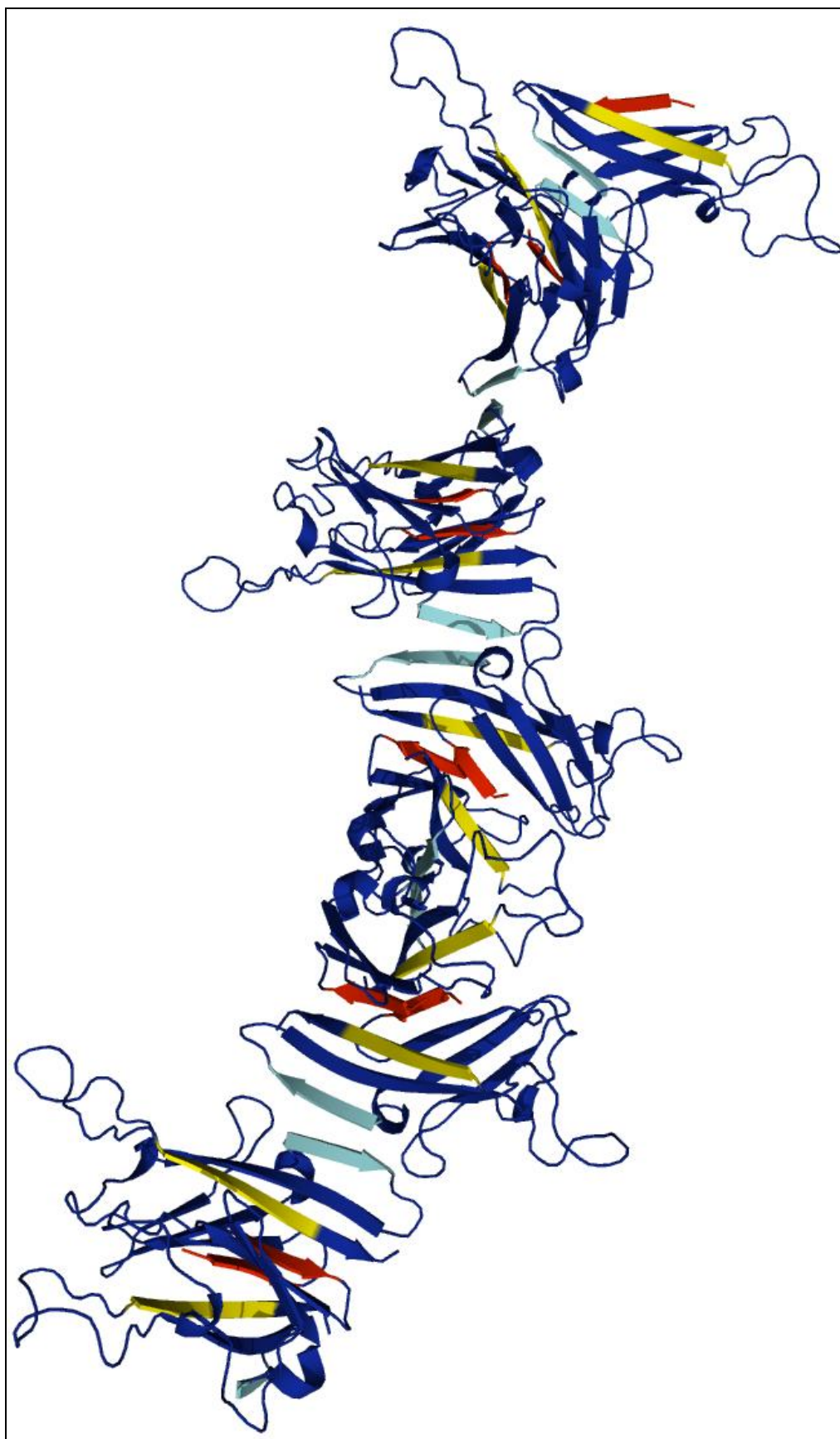
Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα, τα δεδομένα από τις δοκιμές μοντελοποίησης όπως επίσης και το γεγονός πως η πιθανότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ A και G β-κλώνων δεν φαίνεται να εμποδίζει την ταυτόχρονη αλληλεπίδραση μεταξύ Ε' β-κλώνων, έγινε μια προσπάθεια να συνδυαστούν τα αποτελέσματα από τα πειράματα αγκυροβόλησης ώστε να προκύψει ένα τελικό μοντέλο που προτείνει ένα πιθανό μηχανισμό πολυμερισμού διαδοχικών ZP-N υπομονάδων βασισμένο στην αμυλοειδογενή φύση που εμφανίζουν τα πεπτίδια που μελετήσαμε. Αυτός ο συνδυασμός πραγματοποιήθηκε με την χρήση της ρουτίνας “align”, του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMOL, μιας ρουτίνας δομικής στοίχισης. Σαν αποτέλεσμα, προέκυψε ένα τριμερές συνδεδεμένων ZP-N υπομονάδων το οποίο στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των A και G αλλά και των Ε' β-κλώνων, αντίστοιχα (Εικ. 37).

Με συνεχείς διαδοχικές χρήσεις της ίδιας ρουτίνας πραγματοποιήθηκε η επιμήκυνση του μοντέλου έως το επίπεδο των 11 συνδεδεμένων μονομερών ZP-N υπομονάδων μέσω διαδοχικών A-G και Ε'-Ε' αλληλεπιδράσεων (Εικ. 38).



Εικόνα 37. Απεικόνιση του τριμερούς διαδοχικών ZP- N υπομονάδων όπως προέκυψε από την χρήση της ρουτίνας “align” του προγράμματος αναπαράστασης μοριακών γραφικών PyMOL (με κόκκινο, κίτρινο και γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται οι A, G και E β-κλώνοι).

Η τελική μορφή του μοντέλου, υποδεικνύει τον σχηματισμό δύο περιστραμμένων και αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών που σχηματίζουν τον κύριο άξονα του πρωτοϊνιδίου και τους β-κλώνους αντίστοιχα κάθετους ως προς τον ίδιο άξονα, σε συμφωνία με την “cross- β” δομή που φαίνεται πως επικρατεί γενικότερα στα αμυλοειδή ινίδια.



Εικόνα 38. Το τελικό προτεινόμενο μοντέλο πολυμερισμού των ZP-N υπομονάδων μέσω διαδοχικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των A και G αλλά και των E' και E' β-κλώνων. Είναι ξεκάθαρος ο σχηματισμός μιας περιστραμμένης β έλικας.

3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρουσία τμημάτων της αμινοξικής ακολουθίας, τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων κερδίζει συνεχώς όλο και περισσότερους υποστηρικτές στην επιστημονική κοινότητα. Οι περιοχές αυτές, που όπως προαναφέρθηκε χαρακτηρίζονται ως αμυλοειδογενείς καθοριστές (amyloidogenic determinants – aggregation prone segments), είναι μικρά τμήματα της πεπτιδικής αλυσίδας και λειτουργούν ως οδηγοί στην δημιουργία των ινιδίων. Μια τέτοια περίπτωση, συνεπώς μπορεί να αποτελεί και ο σχηματισμός των ινιδίων της zona pellucida, αφού σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας τα δύο πεπτίδια που προβλέφθηκαν ως πιθανοί καθοριστές, σχηματίζουν ινίδια που φέρουν αμυλοειδογενή χαρακτηριστικά και επομένως μπορούν να λειτουργούν ως οδηγοί στον σχηματισμό της zona pellucida.

Με βάση τα δεδομένα που είναι έως και σήμερα γνωστά, σχετικά με τις πρωτείνες που έχουν συσχετισθεί με την δημιουργία αμυλοειδών, φαίνεται πως το μόνο κοινό στοιχείο τους είναι πως είναι απαραίτητο ένα στάδιο κατά το οποίο η πρωτεΐνη αποκτά ένα “ανώμαλο” δίπλωμα ή έστω να υποκύπτει σε κάποια στερεοδιαταξική αλλαγή. Αυτό πιθανότατα ισχύει και στην περίπτωση των ZP πρωτεϊνών, αφού η στερεοδιάταξη τους όταν παράγονται από το κύτταρο διαφέρουν από την δομή που αποκτούν όταν σχηματίζουν τα ινίδια της zona pellucida. Η στερεοδιαταξική αλλαγή, όπως προαναφέρθηκε, οφείλεται στην δράση ενός ενζύμου όταν αυτές βρεθούν στην επιφάνεια του ωκυττάρου, που προκαλεί τομή στο CFCS τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και απελευθερώνει την πρωτεΐνη από το TMD και το EHP. Η απώλεια του EHP που αλληλεπιδρά με το IHP, “επιτρέπει” στην πρωτεΐνη να

αποκτήσει την κατάλληλη στερεοδιάταξη που είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό της σε ινίδια, σε αντιστοιχία με ότι συμβαίνει συνήθως με τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων.

Η εμφάνιση αμυλοειδών που διατηρούν προστατευτικό ρόλο, που εξυπηρετούν δηλαδή την ομαλή διαβίωση του οργανισμού (Κεφ. 1.2.6), έχει προσδώσει νέο ενδιαφέρον στο θέμα των αμυλοειδών, καθώς η παρουσία τους δεν δεσμεύεται πια απαραίτητα με την εμφάνιση ασθενειών (αμυλοειδώσεων). Το χόριο των ωοθυλακίων των μεταξοσκωλήκων, μια δομή που προστατεύει τα αυγά του οργανισμού και που διαθέτει τρομερές μηχανικές ιδιότητες (αντοχή σε μηχανικές πιέσεις) ήταν μια από τις πρώτες δομές που συσχετίστηκαν με την έννοια των φυσικών προστατευτικών αμυλοειδών. Στην περίπτωση των θηλαστικών, η *zona pellucida* είναι η αντίστοιχη δομή που προστατεύει το ωοκύτταρο από μηχανικές πιέσεις, ενώ συμμετέχει επιπλέον στην πρόσδεση του σπερματοζωαρίου και κατ' επέκταση με βάση και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορεί πιθανότατα να είναι μία ακόμη περίπτωση ενός φυσικού προστατευτικού αμυλοειδούς.

Εκτενέστερη μελέτη της δομής και της φύσης των ινιδίων της *zona pellucida* και των αλληλεπιδράσεων που τα διασυνδέουν είναι απαραίτητη και πιθανότατα να αποκαλύψει πληροφορίες σχετικά με την γενικότερη φύση των αμυλοειδών ινιδίων. Τέλος, η γνώση της δομής των ινιδίων της *zona pellucida* έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε επίπεδο μελετών γονιμότητας, καθώς μπορούν πιθανότατα να προκύψουν νέες μέθοδοι βελτιστοποίησης της ή και αντίθετα, νέες μέθοδοι αντισύλληψης.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dumont, J. N., and Brummett, A. R. (1985) *Dev Biol (N Y 1985)* **1**, 235-288
2. Dietl, J. (1989) *Berlin: Springer-Verlag KG* **4**, 49-60
3. Gwatkin, R. B. L. (1976) *Elsevier* **1**, 1-54
4. Gwatkin, R. B. L. (1977) *Fertilization mechanisms in man and mammals*, Plenum Press, New York
5. Yanagimachi, R. (1994) *Zygote* **2**, 371-372
6. Wassarman, P. M., Bleil, J. D., Florman, H. M., Greve, J. M., Roller, R. J., Salzman, G. S., and Samuels, F. G. (1985) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**, 11-19
7. Wassarman, P. M., Jovine, L., and Litscher, E. S. (2004) *Cytogenet Genome Res* **105**, 228-234
8. Wassarman, P. M., Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Darie, C., and Litscher, E. S. (2005) *Mol Cell Endocrinol* **234**, 95-103
9. Florman, H. M., and Wassarman, P. M. (1985) *Cell* **41**, 313-324
10. Czuppon, A. B. (1984) *Biochem Int* **8**, 9-18
11. Greve, J. M., and Wassarman, P. M. (1985) *J Mol Biol* **181**, 253-264
12. Litscher, E. S., Janssen, W. G., Darie, C. C., and Wassarman, P. M. (2008) *J Cell Physiol* **214**, 153-157
13. Wassarman, P. M. (1988) *Annu Rev Biochem* **57**, 415-442
14. Rankin, T. L., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J., and Dean, J. (2001) *Development* **128**, 1119-1126
15. Bleil, J. D., and Wassarman, P. M. (1980) *Dev Biol* **76**, 185-202
16. Green, D. P. (1997) *Rev Reprod* **2**, 147-156
17. Monne, M., and Jovine, L. *Biol Reprod* **85**, 661-669
18. Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. S., and Wassarman, P. M. (2007) *Soc Reprod Fertil Suppl* **63**, 187-201
19. Wassarman, P. M. (2005) *J Cell Physiol* **204**, 388-391
20. Litscher, E. S., and Wassarman, P. M. (2007) *Histol Histopathol* **22**, 337-347
21. Jovine, L., Darie, C. C., Litscher, E. S., and Wassarman, P. M. (2005) *Annu Rev Biochem* **74**, 83-114
22. Bork, P. S., C. (1992) *FEBS Lett.* , 237-240
23. Monne, M., Han, L., and Jovine, L. (2006) *Semin Reprod Med* **24**, 204-216
24. Jovine, L., Janssen, W. G., Litscher, E. S., and Wassarman, P. M. (2006) *BMC Biochem* **7**, 11
25. Wassarman, P. M., and Litscher, E. S. (2008) *Methods Mol Biol* **475**, 99-113
26. Callebaut, I., Mornon, J. P., and Monget, P. (2007) *Bioinformatics* **23**, 1871-1874
27. Monne, M., Han, L., Schwend, T., Burendahl, S., and Jovine, L. (2008) *Nature* **456**, 653-657
28. Wassarman, P. M. (2008) *Nature* **456**, 586-587
29. Han, L., Monne, M., Okumura, H., Schwend, T., Cherry, A. L., Flot, D., Matsuda, T., and Jovine, L. *Cell* **143**, 404-415
30. Benhold, H. (1922) *Munchen Med Wschr* **69**, 1537-1538
31. Astbury, W. T., and Dickinson, S. (1935) *Biochem J* **29**, 2351-2360 2351
32. Cohen, A. S., and Calkins, E. (1959) *Nature* **183**, 1202-1203
33. Geddes, A. J., Parker, K. D., Atkins, E. D., and Beighton, E. (1968) *J Mol Biol* **32**, 343-358

34. Iconomidou, V. A., Vriend, G., and Hamodrakas, S. J. (2000) *FEBS Lett* **479**, 141-145
35. Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., and Riek, R. (2009) *Science* **325**, 328-332
36. Kreplak, L., and Aebi, U. (2006) *Adv Protein Chem* **73**, 217-233
37. Goldsbury, C., Baxa, U., Simon, M. N., Steven, A. C., Engel, A., Wall, J. S., Aebi, U., and Muller, S. A. *J Struct Biol* **173**, 1-13
38. Dobson, C. M. (2003) *Nature* **426**, 884-890
39. Sunde, M., and Blake, C. C. (1998) *Q Rev Biophys* **31**, 1-39
40. Kodali, R., and Wetzel, R. (2007) *Curr Opin Struct Biol* **17**, 48-57
41. Missmahl, H. P., and Hartwig, M. (1953) *Virchows Arch* **324**, 489-508
42. Divry, P., Florkin, M. (1927) *CR Societe de Biologie (Paris)* **97**, 1808-1810
43. Krebs, M. R., Bromley, E. H., and Donald, A. M. (2005) *J Struct Biol* **149**, 30-37
44. Iconomidou, V. A., Chryssikos, G. D., Gionis, V., Vriend, G., Hoenger, A., and Hamodrakas, S. J. (2001) *FEBS Lett* **499**, 268-273
45. Westermark, P. (2005) *FEBS J* **272**, 5942-5949
46. Nelson, R., and Eisenberg, D. (2006) *Adv Protein Chem* **73**, 235-282
47. Anfinsen, C. B. (1973) *Science* **181**, 223-230
48. Fandrich, M. (2003) *Acta Histochem* **105**, 379
49. Stefani, M. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1739**, 5-25
50. Dobson, C. M. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 329-332
51. Ohnishi, S., Koide, A., and Koide, S. (2000) *J Mol Biol* **301**, 477-489
52. Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4224-4228
53. Kallberg, Y., Gustafsson, M., Persson, B., Thyberg, J., and Johansson, J. (2001) *J Biol Chem* **276**, 12945-12950
54. Frousios, K. K., Iconomidou, V. A., Karletidi, C. M., and Hamodrakas, S. J. (2009) *BMC Struct Biol* **9**, 44
55. Harrison, R. S., Sharpe, P. C., Singh, Y., and Fairlie, D. P. (2007) *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **159**, 1-77
56. Nelson, R., and Eisenberg, D. (2006) *Curr Opin Struct Biol* **16**, 260-265
57. Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., and Saibil, H. R. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9196-9201
58. Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8342-8347
59. Hess, S., Lindquist, S. L., and Scheibel, T. (2007) *EMBO Rep* **8**, 1196-1201
60. Kajava, A. V., Baxa, U., Wickner, R. B., and Steven, A. C. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7885-7890
61. Sikorski, P., and Atkins, E. (2005) *Biomacromolecules* **6**, 425-432
62. Wetzel, R. (2006) *Acc Chem Res* **39**, 567
63. Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. O., Riek, C., Grothe, R., and Eisenberg, D. (2005) *Nature* **435**, 773-778
64. Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T., and Zagorski, M. G. (1992) *J Mol Biol* **225**, 1075-1093
65. Wickner, R. B., Dyda, F., and Tycko, R. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2403-2408
66. Merlini, G., and Westermark, P. (2004) *J Intern Med* **255**, 159-178

67. Pepys, M. B. (2006) *Annu Rev Med* **57**, 223-241
68. Glabe, C. G. (2008) *J Biol Chem* **283**, 29639-29643
69. Walsh, D. T., Montero, R. M., Bresciani, L. G., Jen, A. Y., Leclercq, P. D., Saunders, D., AN, E. L.-A., Gbadamoshi, L., Gentleman, S. M., and Jen, L. S. (2002) *Neurobiol Dis* **10**, 20-27
70. Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., and Glabe, C. G. (2004) *J Biol Chem* **279**, 46363-46366
71. Mirzabekov, T. A., Lin, M. C., and Kagan, B. L. (1996) *J Biol Chem* **271**, 1988-1992
72. Arispe, N., Pollard, H. B., and Rojas, E. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10573-10577
73. Rauk, A. (2009) *Chem Soc Rev* **38**, 2698-2715
74. Kagan, B. L., Hirakura, Y., Azimov, R., Azimova, R., and Lin, M. C. (2002) *Peptides* **23**, 1311-1315
75. Hall, E. J., Worgul, B. V., Smilenov, L., Elliston, C. D., and Brenner, D. J. (2006) *Radiat Environ Biophys* **45**, 99-104
76. Iconomidou, V. A., and Hamodrakas, S. J. (2008) *Curr Protein Pept Sci* **9**, 291-309
77. Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., and Hultgren, S. J. (2002) *Science* **295**, 851-855
78. Wang, X., and Chapman, M. R. (2008) *Prion* **2**, 57-60
79. Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S. (2003) *J Cell Biol* **161**, 521-533
80. Papanikolaou A.M., M. L. H., Hamodrakas S.J. (1985) *Can. J. Zool.* **64**, 1158-1173
81. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680
82. Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) *Nature* **381**, 272
83. Fraser RDB, M. T. (1973) *Conformation in Fibrous Proteins*, Academic Press, New York
84. Tovchigrechko, A., and Vakser, I. A. (2006) *Nucleic Acids Res* **34**, W310-314
85. Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. (2003) *J Am Chem Soc* **125**, 1731-1737

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. *Hellenic Society for Biological Sciences, 32nd Panhellenic Meeting, Karpenisi, Greece*

ΕΝΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟ-ΑΝΑΛΟΓΟ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΖΟΝΑ PELLUCIDA ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ, ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΓΕΝΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Λούρος, Ν.Ν., Οικονομίδου, Β.Α και Χαμόδρακας Σ.Ι
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
157 01

Τα ωοκύτταρα όλων σχεδόν των οργανισμών (σπονδυλοζώων και ασπόνδυλων) περιβάλλονται από μία εξωκυτταρική δομή πρωτεϊνικής κυρίως φύσεως, η οποία παίζει πρωταρχικό ρόλο στις διαδικασίες της ωογένεσης και γονιμοποίησης. Η δομή αυτή στα θηλαστικά ονομάζεται *zona pellucida* (ZP) και αποτελείται από 3 πρωτεΐνες (ZP1-ZP3). Σε ορισμένα θηλαστικά, έχει βρεθεί μία επιπλέον, η ZP4, παρόμοια με την ZP1. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν μια χαρακτηριστική αυτοτελή δομική περιοχή, γνωστή ως ZP-domain, κοντά στο C-τελικό άκρο και ανήκουν σε μια οικογένεια εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, τις λεγόμενες ZP-domain πρωτεΐνες, με ποικίλες λειτουργίες, οι οποίες εμφανίζονται σε μια ποικιλία οργανισμών, από τους νηματώδεις μέχρι τα θηλαστικά. Η δομική αυτή περιοχή αποτελείται από ~260 αμινοξικά κατάλοιπα με 8 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys), που σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (στα θηλαστικά, οι πρωτεΐνες ZP1-2 έχουν 10 κατάλοιπα Cys). Χωρίζεται σε ZP-N και ZP-C υπο-δομικές αυτοτελείς περιοχές, από μια περιοχή ευαίσθητη σε πρωτεάσες, όπου η πρώτη, ZP-N, είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό, ενώ η δεύτερη, ZP-C, σχετίζεται με την λειτουργία της πρωτεΐνης. Με τη μελέτη της λυμένης κρυσταλλογραφικά δομής της ZP-N και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον δικό μας αλγόριθμο πρόγνωσης “αμυλοειδογενών καθοριστών” “AMYLPRD”, βρέθηκαν ορισμένες πιθανές αμυλοειδογενείς περιοχές, που αντιστοιχούν στην ZP-N της ZP1 του ανθρώπου, και, συντέθηκε, ένα από τα προγνωσθέντα ως ‘πιθανώς αμυλοειδογενή’ πεπτίδια. Το πεπτίδιο μελετήθηκε πειραματικά και διαπιστώθηκε ότι “διπλώνει” και αυτοσυγκροτείται σε ινίδια με αμυλοειδογενή χαρακτηριστικά, γεγονός που, πιθανώτατα, υποδεικνύει ότι, εκτός από το χόριο των ωοθυλακίων των μεταξοσκωλήκων και των ιχθύων, και η *zona pellucida* των ωοκυττάρων των θηλαστικών είναι ένα φυσικό προστατευτικό αμυλοειδές.

A PEPTIDE-ANALOGUE OF MAMMALIAN *ZONA PELLUCIDA* PROTEINS WITH AMYLOIDOGENIC PROPERTIES

Louros, N.N., Iconomidou, V.A. and Hamodrakas, S.J.

*Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens
157 01*

Oocytes from almost all organisms (both vertebrates and invertebrates) are surrounded by an extracellular proteinaceous coat, which plays an important role during oogenesis and fertilization. This extracellular matrix is called *zona pellucida* (ZP) in mammals and it consists of 3 proteins (ZP1-ZP3). A fourth protein, called ZP4, similar to ZP1, has also been found in some mammalian species. These proteins share a conserved sequence at their C-terminal ends. This structural element (domain), designated as the ZP domain, is present in many extracellular proteins with various functions and from a wide variety of organisms, from nematodes to mammals. It consists of ~260 amino acids with 8 conserved cysteine (Cys) residues that form intramolecular disulfide bonds (mammalian proteins ZP1-2 have 10 conserved cysteine residues). The ZP domain is a bipartite structure divided by a protease-sensitive region into the ZP-N and ZP-C subdomains, respectively. The ZP-N subdomain is responsible for protein polymerization, whereas the ZP-C domain contributes to the protein's function. Analysis of the recently solved crystal structure of the ZP-N subdomain, and detailed study of the results of application of the "amyloidogenic determinant" prediction algorithm, "AMYL PRED", developed in our lab, on the ZP-N subdomain sequence of human ZP1 protein, led us to the synthesis of one peptide, predicted as a potential amyloidogenic determinant. Experimental studies show that this peptide folds and self-assembles into amyloid-like fibrils, which most probably indicates that, mammalian *zona pellucida* is also a natural protective amyloid, in close analogy to its counterparts, silkworm and fish chorions.

2. *Hellenic Society for Biological Sciences, 33rd Panhellenic Meeting, Edessa, Greece*

ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ-ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΖΟΝΑ
PELLUCIDA ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ, ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΓΕΝΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Λούρος, Ν.Ν., Οικονομίδου, Β.Α και Χαμόδρακας Σ.Ι

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
157 01*

Η *zona pellucida* (ZP), γνωστή επίσης και ως διαφανής ζώνη (στα λατινικά *pellucida* σημαίνει διαφανής), είναι μια γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως δομή, που περιβάλλει τα ωοκύτταρα όλων των θηλαστικών και 'παίζει' σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της ωογένεσης και γονιμοποίησης. Η πορώδης αυτή δομή στα θηλαστικά αποτελείται από 3 πρωτεΐνες (ZP1-ZP3). Σε ορισμένα θηλαστικά, έχει βρεθεί μία επιπλέον πρωτεΐνη, η ZP4, παρόμοια με την ZP1. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μια χαρακτηριστική αυτοτελή δομική περιοχή κοντά στο C-τελικό τους άκρο. Το δομικό αυτό στοιχείο είναι γνωστό ως ZP domain και εμφανίζεται σε μια οικογένεια εξωκυτταρικών πρωτεϊνών (τις λεγόμενες ZP domain πρωτεΐνες), με ποικίλες λειτουργίες. Αποτελείται από ~260 αμινοξικά κατάλοιπα με 8 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys), που σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (στα θηλαστικά, οι πρωτεΐνες ZP1-2 έχουν 10 κατάλοιπα Cys). Χωρίζεται σε ZP-N και ZP-C 'υπο'-δομικές αυτοτελείς περιοχές, από μια περιοχή ευαίσθητη σε πρωτεάσες. Η ZP-N, είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό, ενώ η δεύτερη, ZP-C, σχετίζεται με την λειτουργία της πρωτεΐνης. Με τη μελέτη της 'λυμένης' κρυσταλλογραφικά δομής της ZP-N και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αλγόριθμο πρόγνωσης "αμυλοειδογενών καθοριστών" "AMYLPRED", που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας, βρέθηκαν ορισμένες πιθανές αμυλοειδογενείς περιοχές, που αντιστοιχούν στην ZP-N της ZP1 του ανθρώπου. Δύο από τα προγνωσθέντα ως 'πιθανώς αμυλοειδογενή' πεπτίδια συντέθηκαν. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα, που υποστηρίζουν πως και τα δύο πεπτίδια "διπλώνουν" και αυτοσυγκροτούνται σε ινίδια με αμυλοειδογενή χαρακτηριστικά, προτείνεται ένα μοντέλο που υποδεικνύει πως πραγματοποιείται ο πολυμερισμός των ZP πρωτεϊνών για τη δημιουργία της *zona pellucida*. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανότατα, υποδεικνύουν πως εκτός από το χόριο των ωοθυλακίων των μεταξοσκωλήκων και των ιχθύων, και η *zona pellucida* των ωοκυττάρων των θηλαστικών είναι ένα φυσικό προστατευτικό αμυλοειδές.

PEPTIDE-ANALOGUES OF MAMMALIAN *ZONA PELLUCIDA* PROTEINS WITH AMYLOIDOGENIC PROPERTIES

Louros, N.N., Iconomidou, V.A. and Hamodrakas, S.J.

*Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens
157 01*

All mammalian oocytes are enclosed by a proteinaceous coat, called *zona pellucida* (ZP) that protects the egg until it is fully developed and implanted in the uterus and is also bound to play a crucial role during fertilization. This extracellular porous matrix is a filamentous structure, composed of 3 glycoproteins (ZP1-3). A fourth protein, called ZP4, similar to ZP1, has also been found in some mammalian species (such as human, porcine etc.). These proteins share a conserved domain at their C-terminal end. This common structural element (domain), present in a family of extracellular proteins with various functions and from a wide variety of organisms (ZP domain proteins), is known as the ZP domain. It consists of ~260 amino acids with 8 conserved cysteine (Cys) residues that form intramolecular disulfide bonds (mammalian proteins ZP1-2 have 10 conserved cysteine residues) and is divided into two subdomains: the N-terminal region named ZP-N and the C-terminal region known as the ZP-C subdomain. The ZP-N subdomain is responsible for protein polymerization, whereas the ZP-C most probably contributes to the protein's function. Analysis of the solved crystal structure of the ZP-N subdomain and detailed study of the results produced by the "AMYL PRED" algorithm application, an amyloidogenic determinant prediction algorithm developed in our lab, led us to synthesize two peptide-analogues of parts of the human ZP-1 protein sequence, predicted as potential amyloidogenic determinants. Experimental data clearly indicate that these peptides do actually fold and self-assemble into amyloid-like fibrils. Based on these results, a possible model is proposed suggesting how ZP protein polymerization might occur for the formation of *zona pellucida*. This data most probably indicate that *zona pellucida* is a natural protective amyloid, in close analogy to its well-documented counterparts, silkworm and fish chorions.