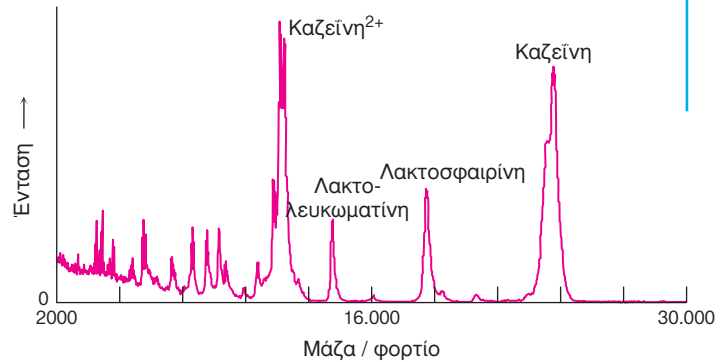


Εξερευνώντας τις πρωτεΐνες



Το γάλα, η πηγή τροφής όλων των θηλαστικών αποτελείται εν μέρει από μια ποικιλία πρωτεϊνών. Η μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος που βλέπουμε στο σχήμα έγινε με την τεχνική φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF, που διαχωρίζει τα μόρια βάσει του λόγου της μάζας προς το φορτίο τους. [(Αριστερά) Jean Paul Iris/FPG· (δεξιά) ευγενική προσφορά Brian Chait.]

Στο προηγούμενο κεφάλαιο είδαμε ότι οι πρωτεΐνες παίζουν καθοριστικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες — στην κατάλυση, τη μεταγωγή σημάτων και τη δομική στήριξη. Αυτή η εκπληκτική ποικιλία λειτουργιών προκύπτει από το γεγονός ότι υπάρχουν χιλιάδες πρωτεΐνες, κάθε μία με τη δική της ιδιαίτερη διαμόρφωση στον χώρο, η οποία καθορίζει και την εξειδικευμένη αλληλεπίδρασή της με ένα ή περισσότερα μόρια, επιλεκτικά, μέσα από ένα ιδιαίτερα ανομοιογενές σύνολο. Η βιοχημεία επιδιώκει κυρίως να προσδιορίσει πώς οι αλληλουχίες των αμινοξέων καθορίζουν τη στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών· επιδιώκει επίσης να γνωρίσει πώς οι πρωτεΐνες συνδέονται με ειδικά υποστρώματα και άλλα μόρια, μεσολαβούν στην κατάλυση και μεταγούν ενέργεια και πληροφορίες

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει είναι απαραίτητος το πρώτο στάδιο στη σειρά των μελετών που έχουν ως στόχο την εξερεύνηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει ιδιοτήτων όπως η διαλυτότητα, το μέγεθος, το φορτίο και η δεσμευτική ικανότητα για διάφορα μόρια. Όταν η πρωτεΐνη έχει καθαριστεί, μπορούμε να βρούμε την αλληλουχία των αμινοξέων της. Η στρατηγική είναι το «διαίρει και βασίλευε», δηλαδή να διασπάσουμε την πρωτεΐνη σε μικρά θραύσματα που μπορούμε να τα προσδιορίσουμε εύκολα. Η αυτοματοποίηση της τεχνικής για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων και η χρήση μεθόδων ανασυνδυασμένου DNA προσφέρουν πληθώρα στοιχείων αλληλουχίας που ανοίγουν νέους ορίζοντες. Για να κατανοήσουμε τη φυσιολογική λειτουργία μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιούμε αντισώματα ως ανιχνευτές για τον εντοπισμό της *in vivo* και τη μέτρηση των ποσοτήτων της. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παρουσιάζουν ιδιαίτερη συγγένεια για τις πρωτεΐνες τους και μπορούμε να παράγουμε σε μεγάλες ποσότητες. Σήμερα έχουμε

ΠΕΡΙΓΡΑΦΑ

- 4.1 Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών είναι ένα ουσιαστικό πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας τους
- 4.2 Η αλληλουχία αμινοξέων μπορεί να προσδιοριστεί με αυτοματοποιημένη αντίδραση αποικοδόμησης Edman
- 4.3 Η ανοσολογία προσφέρει σημαντικές τεχνικές για τη διερεύνηση των πρωτεϊνών
- 4.4 Μπορούμε να συνθέτουμε πεπτίδια με αυτοματοποιημένες μεθόδους στερεάς φάσης
- 4.5 Η τριδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης μπορεί να καθοριστεί με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και κρυσταλλογραφία με ακτίνες X

την ικανότητα να παράγουμε συνθετικά πεπτίδια, γεγονός που μας δίνει τη δυνατότητα να συνθέτουμε νέα φάρμακα, λειτουργικά πρωτεϊνικά θραύσματα και αντιγόνα για την επαγωγή ειδικών αντισωμάτων. Οι τεχνικές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X είναι οι βασικές μεθοδολογίες για την κατανόηση της τριδιάστατης δομής των πρωτεϊνών που αποτελεί το κλειδί της λειτουργίας τους.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών με αυτές τις φυσικές και χημικές τεχνικές έχει διευρύνει τις γνώσεις μας σχετικά με τη μοριακή βάση της ζωής και μας επιτρέπει να αντιμετωπίσουμε σήμερα μερικές από τις πιο προκλητικές ερωτήσεις της βιολογίας σε μοριακό επίπεδο.

4.0.1 Το πρωτέωμα είναι η λειτουργική απεικόνιση του γονιδιώματος

Οι αυτόματοι αναλυτές αλληλουχιών DNA έχουν προσδιορίσει τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων σε πολλούς οργανισμούς, ακόμη και σε αρκετά μετάζωα. Ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans* (ασκαρίδιο) έχει γονιδίωμα 97×10^6 βάσεων και περίπου 19.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster* έχει γονιδίωμα που περιέχει 180×10^6 βάσεις και 14.000 περίπου γονίδια. Η απίστευτη ανάπτυξη της τεχνολογίας προσδιορισμού αλληλουχιών γονιδίων έφθασε ήδη στο θεαματικότατο αποτέλεσμα της, την αποκάλυψη της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, το οποίο αποτελείται από 3×10^9 βάσεις και περίπου 40.000 γονίδια. Η γνώση, όμως, του γονιδιώματος είναι ανάλογη με έναν κατάλογο ανταλλακτικών αυτοκινήτου, δηλαδή δεν εξηγεί πώς λειτουργεί το σύστημα συλλογικά. Μια νέα λέξη, το *πρωτέωμα*, επινοήθηκε προκειμένου να περιγράψει ένα πιο περίπλοκο επίπεδο πληροφοριών, το επίπεδο των *λειτουργικών πληροφοριών*, που περιλαμβάνει το είδος, τις λειτουργίες και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που δημιουργούν συλλογικά μια λειτουργική μονάδα.

Ο όρος πρωτέωμα προέρχεται από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται στο γονιδίωμα (proteome = *protein/genome*). Στην περίπτωση του γονιδιώματος αναφερόμαστε στο πλήθος των πληροφοριών που μπορούν να εκφραστούν, ενώ στην περίπτωση του πρωτεώματος αναφερόμαστε στο πλήθος των πληροφοριών που είναι λειτουργικά παρούσες. Παραδείγματος χάριν, ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν για να δημιουργήσουν μια πορεία μεταγωγής σήματος ή έναν δίαυλο ιόντων στη μεμβράνη; Το πρωτέωμα δεν είναι ένα σταθερό χαρακτηριστικό των κυττάρων. Αντιθέτως, επειδή αντιπροσωπεύει τη λειτουργική έκφραση των πληροφοριών, τροποποιείται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό στάδιο και τις συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως π.χ. η παρουσία ορμονών. Το πρωτέωμα είναι πολύ μεγαλύτερο από το γονιδίωμα λόγω της ύπαρξης παραγόντων όπως το εναλλακτικό μάτισμα RNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, η χρονική ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και οι πολλές τροποποιούμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με το γονιδίωμα, το πρωτέωμα δεν είναι στατικό.

Η κατανόηση του πρωτεώματος απαιτεί την εξέταση, τον χαρακτηρισμό και την καταλογογράφηση των πρωτεϊνών. Ένας ερευνητής συχνά ξεκινά τη διαδικασία απομονώνοντας μια πρωτεΐνη καθαρή από όλα τα άλλα βιομόρια του κυττάρου.

4.1 Ο ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΙΝΑΙ ΕΝΑ ΟΥΣΙΑΣΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟ ΒΗΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥΣ

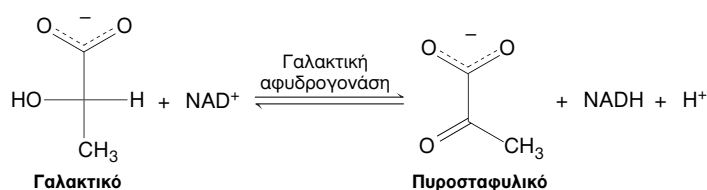
Υπάρχει μια βιοχημική παροιμία που λέει «Μη σπαταλάς καθαρή σκέψη σε μη καθαρή πρωτεΐνη». Ξεκινώντας με καθαρές πρωτεΐνες μπορούμε να καθορίσουμε την αλληλουχία αμινοξέων και τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ πρω-

τεϊνών απομακρυσμένων εξελικτικά οργανισμών και να ερευνήσουμε τη βιοχημική λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Ακόμη, μπορούμε να την κρυσταλλώσουμε και έτσι να αποκτήσουμε στοιχεία από μελέτες με ακτίνες Χ που μας δίνουν την εικόνα της τριτοταγούς δομής, η οποία αποτελεί και το πραγματικό λειτουργικό πρόσωπο της πρωτεΐνης.

4.1.1 Η δοκιμασία: πώς αναγνωρίζουμε την πρωτεΐνη που ψάχνουμε;

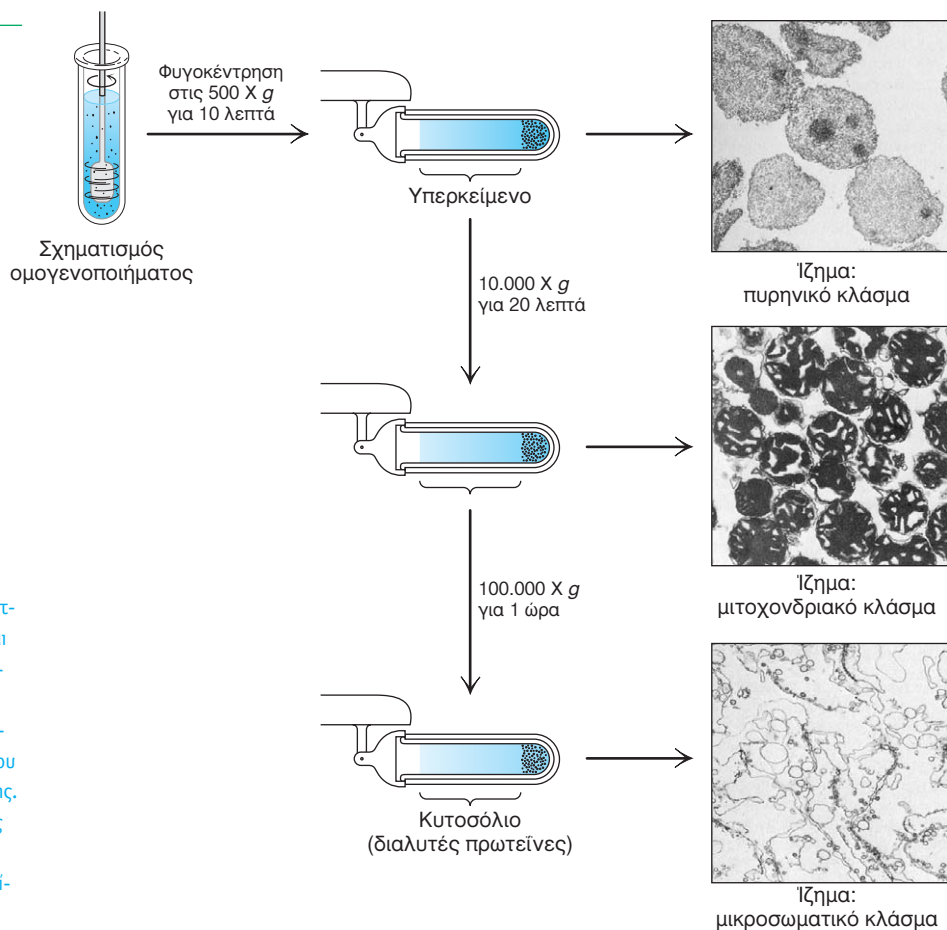
Ο καθαρισμός θα δώσει ένα δείγμα πρωτεΐνης που θα περιέχει μόνο την πρωτεΐνη για την οποία ενδιαφέρεται ο βιοχημικός. Το δείγμα μπορεί να είναι μόνο το 1% του αρχικού υλικού, είτε το υλικό είναι κύτταρα σε καλλιέργεια είτε ένα συγκεκριμένο όργανο φυτού ή ζώου. Πώς μπορεί ο βιοχημικός να απομονώσει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη από ένα μείγμα πρωτεϊνών;

Ο βιοχημικός χρειάζεται έναν τρόπο να αναγνωρίζει την πρωτεΐνη και ο τρόπος αυτός ονομάζεται *δοκιμασία* (assay). Ο προσδιορισμός της κατάλληλης δοκιμασίας είναι συχνά δύσκολος, όσο πιο εξειδικευμένη όμως είναι η δοκιμασία τόσο πιο αποτελεσματικός γίνεται ο καθαρισμός. Για τα ένζυμα, που είναι πρωτεϊνικοί καταλύτες (Κεφάλαιο 8), η δοκιμασία στηρίζεται συνήθως στην αντίδραση την οποία καταλύει το προς απομόνωση ένζυμο στο κύτταρο. Ας πάρουμε το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση, η οποία είναι σημαντικότερος παράγοντας στην αναερόβια παραγωγή ενέργειας από τη γλυκόζη καθώς και στη σύνθεση γλυκόζης από γαλακτικό. Η γαλακτική αφυδρογονάση συμμετέχει στην ακόλουθη αντίδραση:



Το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο [ανηγμένο (NADH – *Nicotinamide adenine dinucleotide*)], ξεχωρίζει εύκολα από τα άλλα στοιχεία της αντίδρασης λόγω της ικανότητάς του να απορροφά φως στα 340 nm. Επομένως, μπορούμε να παρακολουθήσουμε την πρόοδο της αντίδρασης, εξετάζοντας πόσο φως απορροφά το μείγμα αντίδρασης στα 340 nm και στη μονάδα του χρόνου, παραδείγματος χάριν 1 λεπτό μετά την προσθήκη του ενζύμου. Επομένως, η δοκιμασία που χρησιμοποιούμε κατά την απομόνωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης αφορά την αύξηση της απορρόφησης του φωτός στα 340 nm σε ένα λεπτό.

Προκειμένου να είμαστε σίγουροι για τον σχεδιασμό του καθαρισμού χρειάζομαστε μια ακόμη πληροφορία: την ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει στο μείγμα που επεξεργαζόμαστε. Υπάρχουν πολλοί γρήγοροι και ακριβείς τρόποι για να καθορίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Έχοντας αυτές τις δύο τιμές που προσδιορίσαμε πειραματικά, δηλαδή την ενζυμική δραστηριότητα και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, μπορούμε να υπολογίσουμε την *ειδική δραστηριότητα*, που είναι ο λόγος της ενζυμικής δραστηριότητας προς την ποσότητα της πρωτεΐνης στην ενζυμική δοκιμασία. Η ειδική δραστηριότητα θα αυξάνεται καθώς ο καθαρισμός συνεχίζεται και επομένως το μείγμα των πρωτεϊνών που δοκιμάζουμε θα αποτελείται όλο και περισσότερο από γαλακτική αφυδρογονάση. Στην ουσία, όλη η διαδικασία καθαρισμού αφορά την αύξηση της ειδικής δραστηριότητας.



ΕΙΚΟΝΑ 4.1 Διαφορική φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα ομογενοποιούνται στον ομογενοποιητή και το ομογενοποίημα υπόκειται σταδιακά σε συνεχώς αυξανόμενη φυγόκεντρο δύναμη. Όσο πυκνότερο είναι το υλικό τόσο μικρότερη φυγόκεντρος δύναμη απαιτείται για την καταβύθισή του ως ίζημα στο βάθος του σωλήνα φυγοκέντρησης. Διαχωρίζοντας τα κλάσματα της φυγοκέντρησης μπορούμε να συνεχίσουμε τον καθαρισμό των μορίων με άλλες μεθόδους. [Οι φωτογραφίες είναι ευγενική προσφορά S. και B. Fleischer.]

4.1.2 Για να καθαρίσουμε μια πρωτεΐνη πρέπει να την απομονώσουμε από το κύτταρο

Έχοντας αποφασίσει το είδος της δοκιμασίας και την πηγή απομόνωσης της πρωτεΐνης, πρέπει να διαχωρίσουμε τα κυτταρικά συστατικά και να αποφασίσουμε ποιο από αυτά είναι εμπλουτισμένο με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Τα πρωτόκολλα καθαρισμού αποφασίζονται με δοκιμές και μέσα από λάθη, με βάση προηγούμενες εμπειρίες. Στο πρώτο στάδιο ξεκινάμε με *ομογενοποίηση* καταστρέφοντας την κυτταρική μεμβράνη και στη συνέχεια το μείγμα κλασματώνεται με φυγοκέντρηση, δίδοντας ένα ίζημα στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα και ένα ελαφρύτερο διαλυτό υπερκείμενο επάνω από το ίζημα (Εικόνα 4.1). Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται και πάλι σε μεγαλύτερη ταχύτητα και διαχωρίζεται σε νέο ίζημα και νέο υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή, που ονομάζεται *διαφορική φυγοκέντρηση*, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κλασμάτων ελαττούμενης πυκνότητας τα οποία περιέχουν χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες και τα οποία δοκιμάζονται για τη δραστηριότητα που προσπαθούμε να απομονώσουμε. Συνήθως ένα κλάσμα θα έχει αυξημένη δραστηριότητα και αυτό θα χρησιμοποιηθεί για τον περαιτέρω καθαρισμό με άλλες πιο ευαίσθητες τεχνικές.

4.1.3 Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν βάσει της διαλυτότητας, του μεγέθους, του φορτίου και της δεσμευτικής συγγένειας για άλλα μόρια

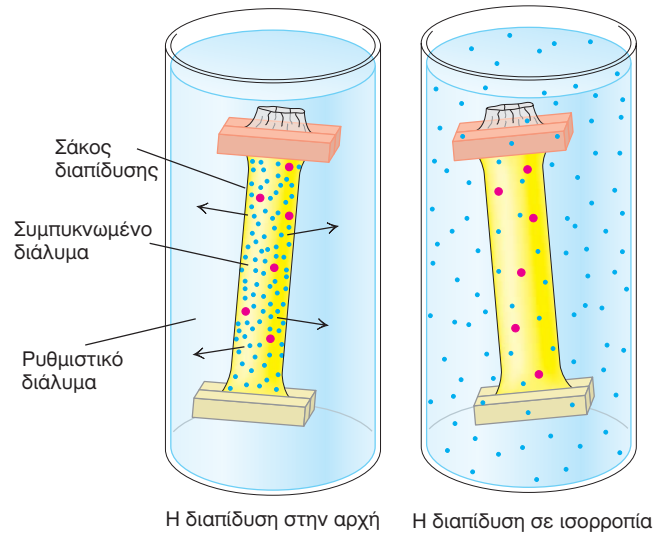
Αρκετές χιλιάδες πρωτεΐνες έχουν απομονωθεί σε ενεργό μορφή βάσει χαρακτηριστικών όπως η *διαλυτότητα*, το *μέγεθος*, το *φορτίο* και η *ειδική δεσμευτική συγγένεια*. Συνήθως, τα πρωτεϊνικά μείγματα υπόκεινται σε μια σειρά διαχωρισμών, οι οποίοι βασίζονται στα ειδικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης που απο-

μονώνουμε έτσι ώστε τελικά να έχουμε μια καθαρή πρωτεΐνη. Σε κάθε στάδιο καθαρισμού το παρασκεύασμα δοκιμάζεται και καθορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Για να καθορίσουμε την τριτοταγή δομή και τον μηχανισμό δράσης απαιτείται αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης σε επίπεδο χιλιοστών του γραμμαρίου (mg). Επομένως, η συνολική ποσότητα που καθαρίζεται είναι σημαντικός παράγοντας σε ένα πρωτόκολλο καθαρισμού. Υπάρχει μεγάλη ποιικιλία τεχνικών καθαρισμού.

Εξαλάτωση. Οι περισσότερες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μικρότερη διαλυτότητα σε υψηλή συγκέντρωση άλατος, φαινόμενο που ονομάζεται *εξαλάτωση* (salting out). Η συγκέντρωση του άλατος που απαιτείται για να εξαλατωθεί μια πρωτεΐνη διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη. Επομένως, η εξαλάτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος κλασμάτωσης των πρωτεϊνών. Παραδείγματος χάριν, το ινωδογόνο, η πρωτεΐνη που προκαλεί την πήξη του αίματος, καθιζάνει με 0,8 M θειικού αμμωνίου, ενώ η λευκοματίνη του ορού χρειάζεται 2,4 M θειικού αμμωνίου. Η εξαλάτωση είναι επίσης χρήσιμη ως μέθοδος αύξησης της συγκέντρωσης πρωτεϊνών που προέρχονται από άλλα στάδια καθαρισμού και βρίσκονται σε αραιά διαλύματα. Μπορούμε επίσης να χρησιμοποιήσουμε και τη μέθοδο της διαπίδωσης προκειμένου να απομακρύνουμε το άλας από ένα διάλυμα αν αυτό είναι αναγκαίο.

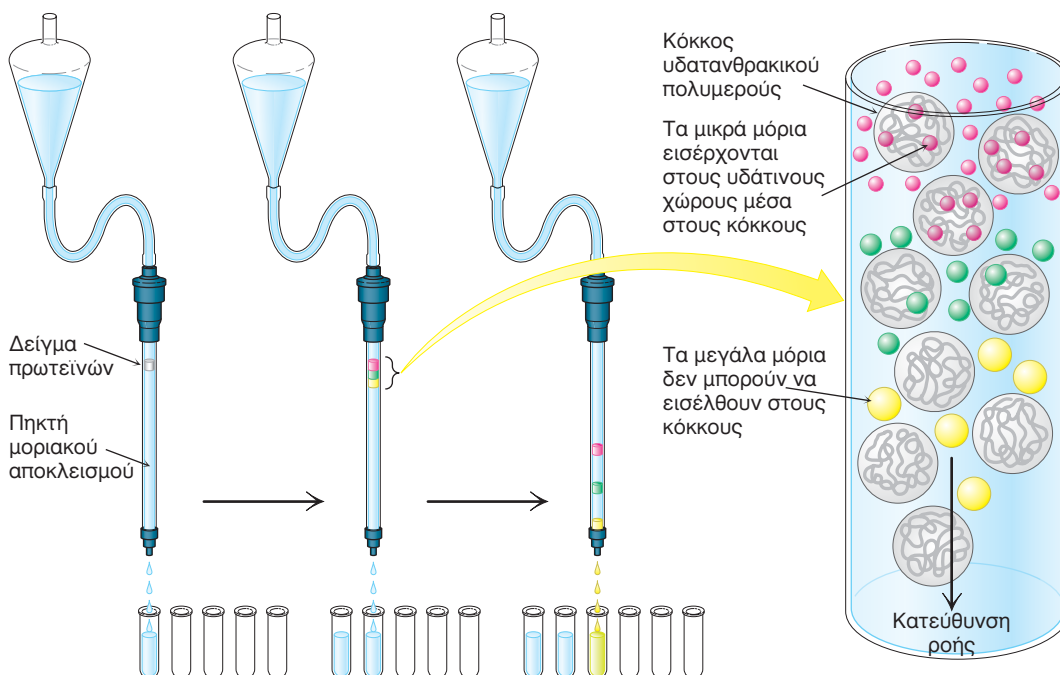
Διαπίδωση. Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν από μικρότερα μόρια με τη μέθοδο της *διαπίδωσης* (dialysis) μέσα από μια ημιδιαπερατή μεμβράνη, όπως μια μεμβράνη κυτταρίνης με πόρους (Εικόνα 4.2). Τα μόρια που έχουν διαστάσεις σημαντικά μεγαλύτερες από τη διάμετρο των πόρων διατηρούνται μέσα στον σάκο διαπίδωσης, ενώ τα μικρότερα μόρια και τα ιόντα περνούν από τους πόρους της μεμβράνης και εμφανίζονται στο διάλυμα εκτός σάκου. Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση του άλατος ή άλλων μικρών μορίων, δεν είναι αποδοτική, όμως, για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών.

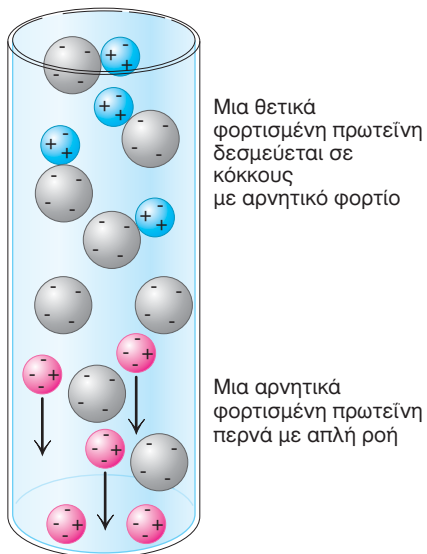
Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή. Ο καλύτερος διαχωρισμός βάσει του με-



ΕΙΚΟΝΑ 4.2 Διαπίδωση. Τα μόρια της πρωτεΐνης (κόκκινα) παραμένουν μέσα στον σάκο διαπίδωσης, ενώ τα μικρά μόρια (μπλε) διαχέονται στον διαλύτη που περιβάλλει τη μεμβράνη.

ΕΙΚΟΝΑ 4.3 Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή. Ένα μείγμα πρωτεϊνών τοποθετείται σε στήλη πορώδους υλικού. Ο όγκος του δείγματος των πρωτεϊνών διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερος. Οι μεγάλες πρωτεΐνες εμφανίζονται στην έξοδο της στήλης πριν από τις μικρές πρωτεΐνες διότι δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των κόκκων του υλικού.

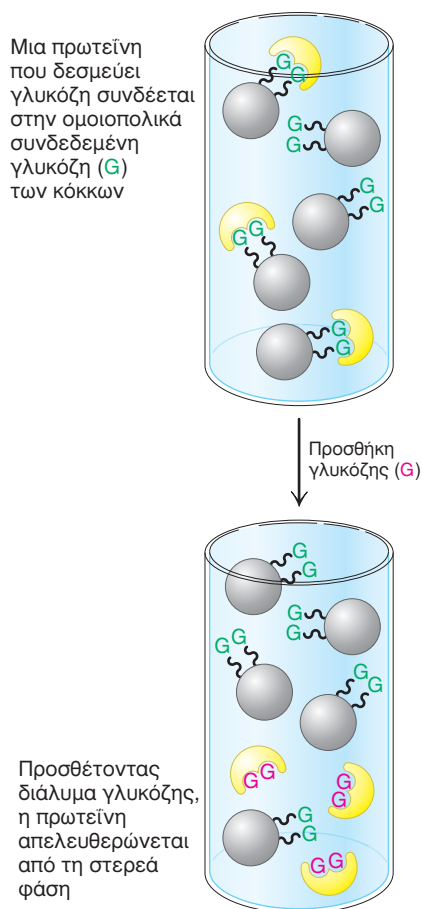




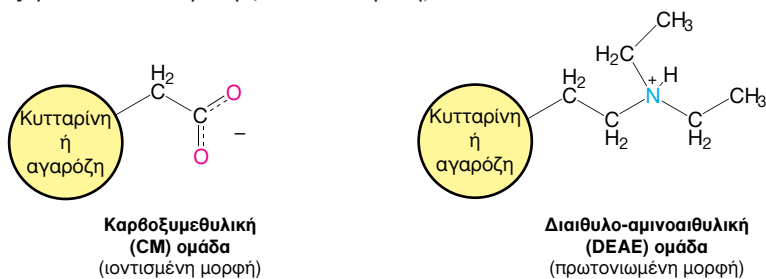
ΕΙΚΟΝΑ 4.4 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του καθαρού φορτίου τους.

γέθους επιτυγχάνεται με την τεχνική της *χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή* (gel-filtration chromatography) (Εικόνα 4.3). Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή μιας στήλης που αποτελείται από πορώδεις κόκκους από αδιάλυτο πολυμερές, που μπορεί όμως να συγκρατήσει πολύ νερό, όπως π.χ. η δεξτράνη ή η αγαρόζη (υδατάνθρακες) ή το πολυακρυλαμίδιο. Τα ονόματα Sephadex, Sepharose και Biogel είναι κλασικές εμπορικές ονομασίες αυτών των υλικών, που έχουν τυπική διάμετρο 100 μm (0,1 mm). Μικρά μόρια περνούν μέσα από αυτούς τους κόκκους, αλλά τα μεγάλα δεν μπορούν να περάσουν. Αποτέλεσμα είναι ότι τα μικρά μόρια κατανέμονται στο υδατικό περιβάλλον μέσα στους κόκκους και μεταξύ τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Τα μεγάλα μόρια περνούν πιο εύκολα μέσα από τη στήλη και εμφανίζονται πρώτα διότι βρίσκονται σε μικρότερο όγκο υγρού. Τα μόρια με μέγεθος που τα επιτρέπει να περνούν περιστασιακά στους κόκκους θα εκλουστούν σε ενδιάμεσο χρόνο, ενώ τα μικρά θα εκλουστούν τελευταία διότι ακολουθούν μια δαιδαλώδη διαδρομή μέσα από τους κόκκους.

Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν και βάσει των φορτίων τους με τη *χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής* (ion-exchange chromatography) Αν το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε pH 7 είναι θετικό, αυτή συνήθως θα δεσμευθεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν καρβοξυλικά ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δεν θα δεσμευθεί στη στήλη αυτή (Εικόνα 4.4). Μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη μπορεί στη συνέχεια να εκλουστεί (απελευθερωθεί) με αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου ή άλλου άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Τα ιόντα νατρίου συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. Οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή συγκέντρωση θετικών φορτίων θα εμφανιστούν πρώτες, ακολουθούμενες από εκείνες με υψηλότερη συγκέντρωση θετικών φορτίων. Αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (ανιοντικές πρωτεΐνες) είναι δυνατόν να διαχωριστούν με χρωματογραφία σε θετικά φορτισμένη διαιθυλο-αμινοαιθυλο-κυτταρίνη (DEAE-κυτταρίνη). Αντίθετα, θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες (κατιοντικές πρωτεΐνες) είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε αρνητικά φορτισμένη καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη (CM-κυτταρίνη).



ΕΙΚΟΝΑ 4.5 Χρωματογραφία συγγένειας. Στο παράδειγμα η κονκαναβαλίνη Α (που φαίνεται κίτρινη) διαχωρίζεται λόγω συγγένειας με τη γλυκόζη (G) που βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη στη στερεά φάση της στήλης.



Χρωματογραφία συγγένειας. Η *χρωματογραφία συγγένειας* (affinity chromatography) είναι μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται γενικά για τον καθαρισμό πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια πολλών πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Παραδείγματος χάριν, η φυτική πρωτεΐνη κονκαναβαλίνη Α μπορεί να καθαριστεί με το πέρασμα ενός μείγματος μέσω μιας στήλης από κόκκους που περιέχουν ομοιοπολικά δεσμευμένη γλυκόζη. Η κονκαναβαλίνη Α δεσμεύεται στη στήλη αυτή διότι έχει συγγένεια με τη γλυκόζη, ενώ οι περισσότερες άλλες πρωτεΐνες δεν έχουν. Η δεσμευμένη κονκαναβαλίνη Α μπορεί να απελευθερωθεί από τη στήλη με προσθήκη γλυκόζης σε υψηλή συγκέντρωση. Η γλυκόζη στο διάλυμα αντικαθιστά τη γλυκόζη της στήλης στις θέσεις όπου αυτή δεσμεύεται στην κονκαναβαλίνη Α (Εικόνα 4.5). Η χρωματογραφία συγγένειας είναι η μέθοδος επιλογής για την απομόνωση παραγόντων μεταγραφής, πρωτεϊνών δηλαδή που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση δεσμευόμενες σε ειδικές θέσεις στο DNA. Ένα πρωτεϊνικό

μείγμα διηθείται μέσω μιας στήλης που περιέχει ειδικές αλληλουχίες DNA δεσμευμένες σε αδρανές υλικό. Οι πρωτεΐνες που έχουν υψηλή συγγένεια με την αλληλουχία δεσμεύονται και παραμένουν στη στήλη. Στην περίπτωση αυτή, ο μεταγραφικός παράγοντας θα απελευθερωθεί με έκπλυση διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Γενικά, η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην απομόνωση πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν μια ομάδα X, ως εξής: (1) ομοιοπολική δέσμευση του X ή παραγώγου του σε στήλη, (2) προσθήκη του μείγματος των πρωτεϊνών στη στήλη, που στη συνέχεια ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν δεσμεύθηκαν, και (3) έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλυτής μορφής του X. Η χρωματογραφία συγγένειας είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης και του μορίου που χρησιμοποιείται ως δόλωμα είναι πολύ εξειδικευμένες.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Όλες οι μέθοδοι χρωματογραφίας αποκτούν καλύτερη διαχωριστική ικανότητα όταν χρησιμοποιούμε την τεχνική της *υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης* (high-pressure liquid chromatography, HPLC). Με την τεχνική HPLC επιτυγχάνουμε την ενίσχυση των μεθόδων που ήδη περιγράφηκαν και στηρίζονται σε διαχωρισμό στήλης. Το υλικό της στήλης αυτής είναι πολύ λεπτό και επομένως προσφέρει περισσότερες θέσεις αλληλεπίδρασης άρα και μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα. Επειδή το υλικό είναι τόσο λεπτόκοκκο πρέπει να εφαρμοστεί πίεση προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ροή. Το τελικό αποτέλεσμα είναι υψηλή διαχωριστική ικανότητα αλλά και γρήγορος διαχωρισμός (Εικόνα 4.6).

4.1.4 Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν και να εμφανιστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

Πως αποφασίζουμε αν ένα πρωτόκολλο καθαρισμού είναι αποτελεσματικό; Ένας τρόπος έγκειται στην εξέταση της ειδικής δραστηριότητας, η οποία πρέπει να αυξάνεται καθώς προχωρεί ο καθαρισμός. Ένας άλλος τρόπος έγκειται στην παρακολούθηση των αποτελεσμάτων, δηλαδή στην εξέταση των πρωτεϊνών που εμφανίζονται σε κάθε στάδιο καθαρισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης.

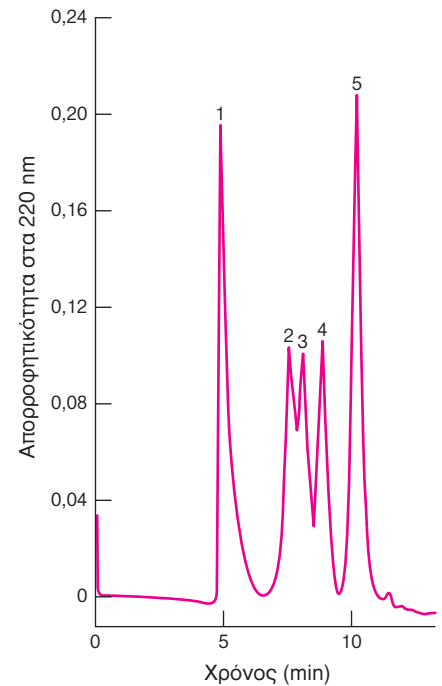
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Το φαινόμενο αυτό λέγεται *ηλεκτροφόρηση* και προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια, όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης (v) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f).

$$v = \frac{Ez}{f} \quad (1)$$

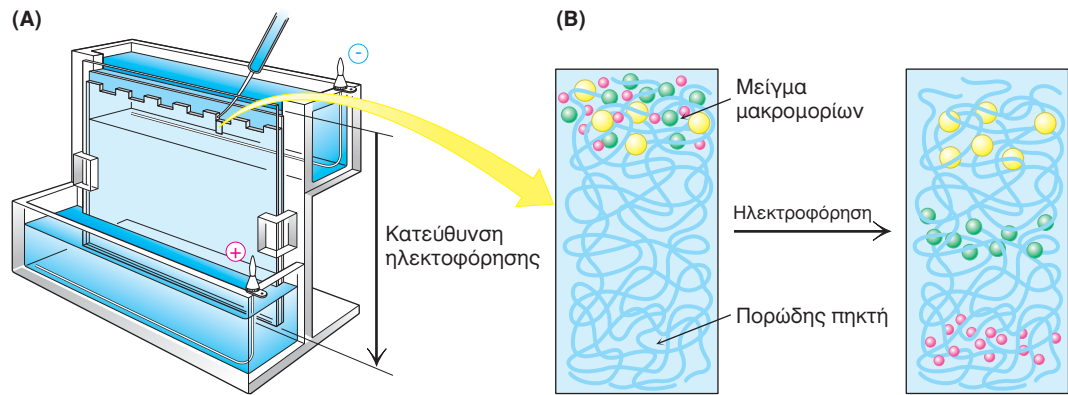
Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής fv που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Ο συντελεστής τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από το ιξώδες (η) του μέσου. Για μια σφαίρα με ακτίνα r

$$f = 6\pi\eta r \quad (2)$$

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντοτε σε πηκτή (ή άλλο σταθερό υπόβαθρο, όπως χαρτί) διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει τον διαχωρισμό (Εικόνα 4.7). Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διά μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια



ΕΙΚΟΝΑ 4.6 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Η διήθηση με την τεχνική HPLC έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τις πρωτεΐνες (1) θυρεοσφαιρίνη (669 kd), (2) καταλάση (232 kd), (3) βόεια λευκωματίνη ορού (67 kd), (4) ωλοευκωματίνη (43 kd) και ριβονουκλεάση (13.4 kd). [Κατά K.J. Wilson και T.D. Schlabach. In *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2, suppl. 41, F. M. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, Eds. (Wiley, 1998), p.10.14.1.]

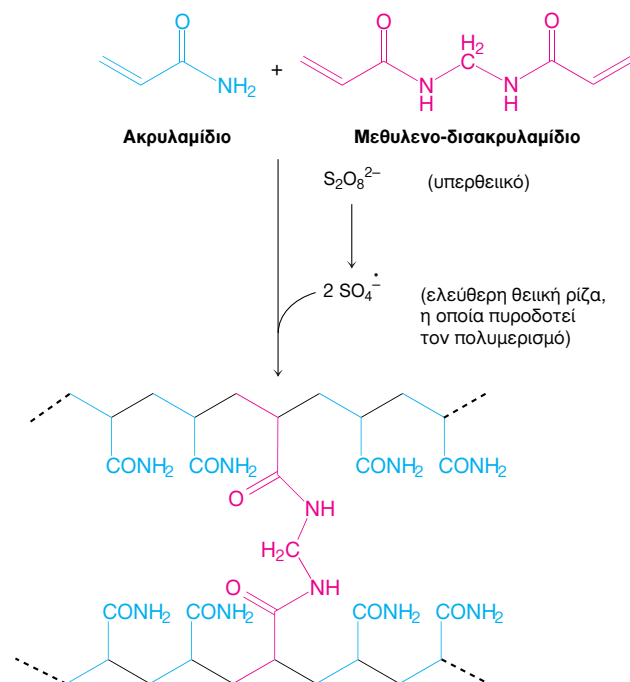


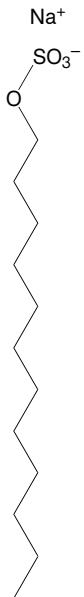
ΕΙΚΟΝΑ 4.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. (Α) Μια συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε αρκετά δείγματα συγχρόνως με αυτήν την επίπεδη συσκευή, ενώ τα μείγματα των πρωτεϊνών τοποθετούνται στις εσοχές που δημιουργήθηκαν στην άνω πηκτή με τη χρήση ενός σιφωνίου ακρίβειας μικρολίτρων. Μετά την τοποθέτηση του άνω μέρους της συσκευής μπορούμε να συνδέσουμε το σύστημα στο ηλεκτρικό ρεύμα. Το ρεύμα περνώντας μέσα από την πηκτή αναγκάζει το σύμπλοκο πρωτεΐνης-SDS (sodium dodecyl sulfate = δωδεκακυλο-θειικό νάτριο) που έχει αρνητικό φορτίο να μετακινηθεί προς την άνοδο που βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής. (Β) Καθώς οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσω της πηκτής η απόσταση που διανύουν ανά μονάδα χρόνου είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους, επομένως οι μικρότερες μετακινούνται ταχύτερα προς την άνοδο.

μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η κατεύθυνση ροής είναι από επάνω προς τα κάτω. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι το υλικό είναι χημικά ουδέτερο και η παρασκευή της πηκτής εύκολη. Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με διασύνδεση μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε το αντίθετο από ό,τι στη χρωματογραφία πηκτής διότι όλα τα μόρια, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους, αναγκάζονται να μετακινηθούν μέσω της πηκτής. Η πηκτή συμπεριφέρεται σαν ένας κόκκος της στήλης χρωματογραφίας.

Σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν κυρίως βάσει της μάζας τους. Το μείγμα των πρωτεϊνών διαλύεται πρώτα σε διάλυμα δωδεκακυλο-θειικού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες

ΕΙΚΟΝΑ 4.8 Σχηματισμός πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Όταν πολυμερίζουμε ενεργοποιημένο μονομερές (μπλε) και διασυνδέτη (κόκκινο) σχηματίζεται ένα τριδιάστατο πλέγμα.





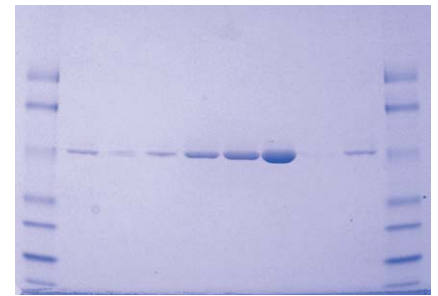
Δωδεκακυλο-θειικό νάτριο (SDS)

τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη (2-θειοαιθανόλη) ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα. Αυτό δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από ό,τι το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε πολυακρυλαμίδιο. Στο τέλος, οι πρωτεΐνες στην πηκτή εμφανίζονται με χρώση με άργυρο ή με κυανούν του Coomassie, που αποκαλύπτει μια σειρά από ζώνες (Εικόνα 4.9). Οι ραδιενεργές σημάσεις μπορούν να φανούν με την τοποθέτηση ενός φιλμ ακτινογραφίας επάνω από την πηκτή. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *αυτοραδιογραφία*.

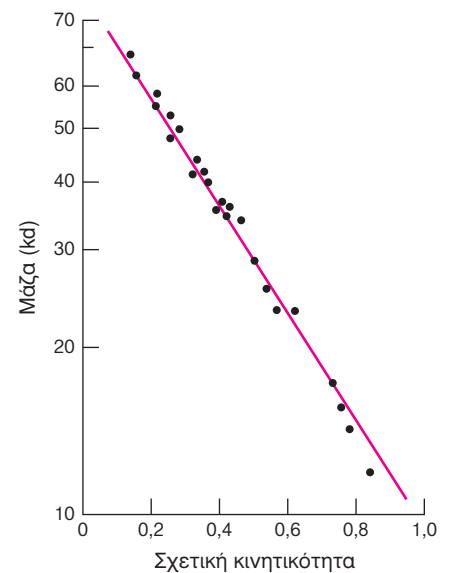
Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διά μέσου της πηκτής, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο τοποθέτησης του μείγματος. Η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από τις συνθήκες αυτές είναι ευθέως ανάλογη με τον λογάριθμο της μάζας τους (Εικόνα 4.10). Αυτή η εμπειρική σχέση δεν ακολουθείται από μερικές πρωτεΐνες, π.χ. μερικές πρωτεΐνες πλούσιες σε υδατάνθρακες και μεμβρανικές πρωτεΐνες που μετακινούνται ανώμαλα. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών που απαιτούνται για ανίχνευση είναι εξαιρετικά μικρές: περίπου 0,1 μg (~2 pmol) για χρώση με κυανούν του Coomassie και ακόμη λιγότερο (0,02 μg) όταν χρησιμοποιούμε χρώση αργύρου. Είναι δυνατόν να διαχωριστούν εύκολα πρωτεΐνες που διαφέρουν στη μάζα τους κατά 2% (π.χ. 40 και 41 kd, διαφορά 10 αμινοξέων).

Μπορούμε λοιπόν να εξετάσουμε την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού, αναλύοντας ένα μικρό δείγμα κάθε σταδίου με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου. Τα αρχικά στάδια θα εμφανίσουν δωδεκάδες έως εκατοντάδες πρωτεϊνών. Καθώς η διαδικασία καθαρισμού συνεχίζεται, ο αριθμός των ζωνών θα ελαττώνεται, ενώ η ζώνη που αντιπροσωπεύει την προς καθαρισμό πρωτεΐνη θα αυξάνεται σε ένταση.

Ισοηλεκτρικός εστιασμός. Οι πρωτεΐνες μπορούν επίσης να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά βάσει του σχετικού περιεχομένου τους σε όξινα και βασικά αμινοξέα. Το *ισοηλεκτρικό σημείο* (pI) μιας πρωτεΐνης είναι το pH όπου το ολικό φορτίο της είναι μηδέν. Στο pH αυτό, η δυνατότητα μετατόπισής της σε ηλεκτρικό πεδίο είναι μηδέν, διότι το z στην εξίσωση (1) είναι ίσο με μηδέν. Παραδείγματος χάριν, το pI του κυτοχρώματος c μιας πολύ βασικής πρωτεΐνης μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι 10,6, ενώ της λευκοματίνης ορού, μιας όξινης πρωτεΐνης στο αίμα, είναι 4,8. Ας υποθέσουμε ότι ένα μείγμα πρωτεϊνών ηλεκτροφορείται σε μια βαθμίδωση pH σε πηκτή χωρίς SDS. Κάθε πρωτεΐνη θα μετακινηθεί μέχρι να συναντήσει μια θέση στην πηκτή όπου το pH ισούται με το pI της πρωτεΐνης. Αυτή η μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών ανάλογα με το ισοηλεκτρικό σημείο τους λέγεται *ισοηλεκτρικός εστιασμός*. Η βαθμίδωση pH στην πηκτή σχηματίζεται με ηλεκτροφόρηση πρώτα των *πολυαμφολυτών* (μικρών πολυ φορτισμένων πολυμερών) που έχουν πολλές τιμές pI. Ο ισοηλεκτρικός εστιασμός μπορεί εύκολα να διαχωρίσει πρωτεΐνες που διαφέρουν σε pI, ακόμη και κατά 0,01, που σημαίνει ότι μπορούν να διαχωριστούν πρωτεΐνες που διαφέρουν και κατά ένα μόνον αρνητικό φορτίο (Εικόνα 4.11).

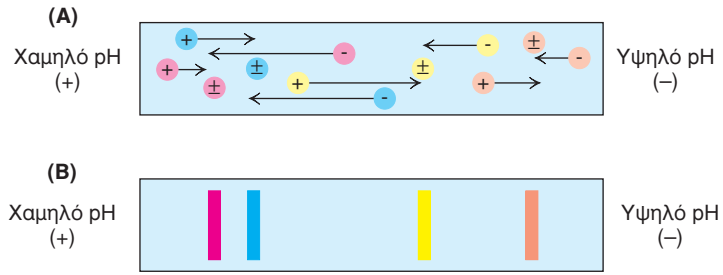


ΕΙΚΟΝΑ 4.9 Χρώση των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου μπορούν να εμφανιστούν με χρώση με κυανούν του Coomassie. [Ευγενική προσφορά Kodak Scientific Imaging Systems.]



ΕΙΚΟΝΑ 4.10 Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να προσδιορίσει την μάζα των πρωτεϊνών. Η κινητικότητα πολλών πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τον λογάριθμο της μάζας τους. [Κατά K. Weber και M. Osborn, *The Proteins*, vol. 1, 3^d ed. (Academic Press, 1975), p. 179.]

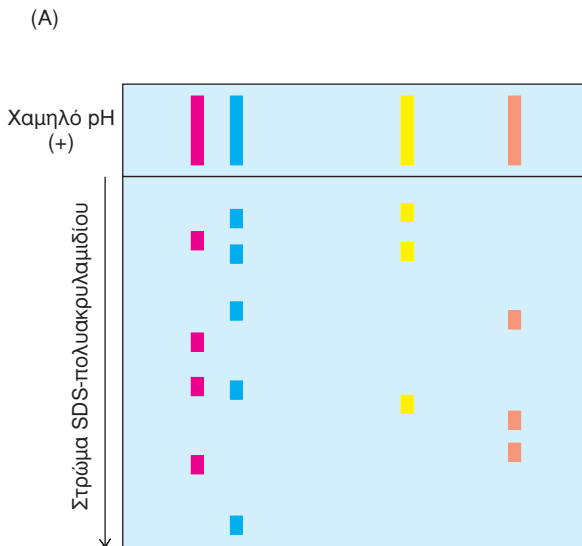
ΕΙΚΟΝΑ 4.11 Η αρχή του ισοηλεκτρικού εστιασμού. Στην πηκτή διαμορφώνεται πρώτα μια βαθμίδωση pH και μετά τοποθετείται το δείγμα. (A) Μετά την τοποθέτηση του δείγματος το ηλεκτρικό ρεύμα θα οδηγήσει τις πρωτεΐνες στο ισοηλεκτρικό σημείο τους όπου και θα εστιαστούν διότι εκεί δεν έχουν φορτίο. (B) Οι πρωτεΐνες από τις αντίστοιχες ζώνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άλλα πειράματα αν κόψουμε την κάθε ζώνη και εκλούσουμε την πρωτεΐνη.



Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Ο ισοηλεκτρικός εστιασμός μπορεί να συνδυαστεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου για να επιτύχουμε διαχωρισμούς υψηλής διακριτικής ικανότητας. Το δείγμα διαχωρίζεται πρώτα με ισοηλεκτρικό εστιασμό. Κατόπιν αυτή η λωρίδα πηκτής τοποθετείται οριζόντια επάνω από μια πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου. Επομένως, οι πρωτεΐνες αρχίζουν τη μετακίνησή τους στη δεύτερη πηκτή από το σημείο που αντιστοιχεί στη μετακίνησή τους μέσω της λωρίδας πηκτής του ισοηλεκτρικού εστιασμού. Εφαρμόζοντας ρεύμα στη δεύτερη πηκτή οι πρωτεΐνες μετακινούνται κατακόρυφα, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους σε έναν διδιάστατο σχηματισμό από κηλίδες. Σε μια τέτοια πηκτή, πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί στην οριζόντια κατεύθυνση, βάσει του ισοηλεκτρικού σημείου τους, διαχωρίζονται κατακόρυφα βάσει της μάζας τους. Είναι εντυπωσιακό ότι με ένα τέτοιο πείραμα μπορούμε να διαχωρίσουμε περισσότερες από χίλιες πρωτεΐνες του βακτηρίου *Echerichia coli* (Εικόνα 4.12).

ΕΙΚΟΝΑ 4.12 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πηκτή. (A) Ένα πρωτεϊνικό δείγμα διαχωρίζεται αρχικά στην οριζόντια κατεύθυνση, ανάλογα με το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών που περιέχει, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.11. Η πηκτή τοποθετείται στη συνέχεια επάνω σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου και ηλεκτροφορεύεται κατακόρυφα, οπότε πρωτεΐνες με το ίδιο ισοηλεκτρικό σημείο αλλά διαφορετική μάζα θα διαχωριστούν τώρα βάσει της μάζας τους. (B) Οι πρωτεΐνες της *E. coli*, όταν διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, δίνουν αποτύπωμα από χίλιες τουλάχιστον διαφορετικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν όπως περιγράψαμε, δηλαδή πρώτα στην οριζόντια κατεύθυνση σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο και στη συνέχεια στην κατακόρυφη κατεύθυνση ανάλογα με τη μάζα τους. [Ευγενική προσφορά Dr. Patrick H. O'Farrell.]

Οι πρωτεΐνες που απομονώνονται από τα κύτταρα κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και εξέταση της έντασης των σημάτων. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση ή ελάττωση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ως απόκριση στη φυσιολογική κατάσταση. Πώς μπορούμε να αποφανθούμε ποια πρωτεΐνη ρυθμίζεται; Ένα μειονέκτημα της ισχύος της πηκτής δύο διαστάσεων ήταν ότι, μολονότι εμφανίζονταν πολλές πρωτεΐνες, δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθούν. Σήμερα, αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθεί με συνδυασμό της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων και των τεχνικών φασματομετρίας μάζας. Θα αναλύσουμε τις τεχνικές αυτές όταν θα εξετάσουμε πώς προσδιορίζεται η μάζα μιας πρωτεΐνης (Εδάφιο 4.1.7).



ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1 Ποσοτικοποίηση του πρωτοκόλλου καθαρισμού μιας υποθετικής πρωτεΐνης.

| Στάδιο | Ολική πρωτεΐνη (mg) | Ολική δραστικότητα (μονάδες) | Ειδική δραστικότητα (μονάδες mg ⁻¹) | Απόδοση (%) | Επίπεδο καθαρότητας |
|------------------------------------|---------------------|------------------------------|---|-------------|---------------------|
| Ομογενοποίηση | 15.000 | 150.000 | 10 | 100 | 1 |
| Κλασμάτωση άλατος | 4.600 | 138.000 | 30 | 92 | 3 |
| Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής | 1.278 | 115.500 | 90 | 77 | 9 |
| Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού | 68,8 | 75.000 | 1.100 | 50 | 110 |
| Χρωματογραφία συγγένειας | 1,75 | 52.500 | 30.000 | 35 | 3.000 |



ΕΙΚΟΝΑ 4.13 Ηλεκτροφορητική ανάλυση του καθαρισμού μιας πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού της υποθετικής πρωτεΐνης που αναλύθηκε στον Πίνακα 4.1 ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου. Κάθε διαδρομή περιέχει 50 μg δείγματος. Η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η ζώνη της πρωτεΐνης που καθαρίστηκε είναι πιο εμφανής σε σχέση με τις άλλες ζώνες.

4.1.5 Ένα πρωτόκολλο καθαρισμού μπορεί να εκτιμηθεί και ποσοτικά

Για να προσδιοριστεί η επιτυχία του σχήματος καθαρισμού μιας πρωτεΐνης, παρακολουθείται η διαδικασία σε κάθε στάδιο ως προς την ειδική δραστικότητα και καθαρότητα με ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου. Ας δούμε τα αποτελέσματα για τον καθαρισμό της υποθετικής πρωτεΐνης X που συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1 και στην Εικόνα 4.13. Σε κάθε στάδιο μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι:

Ολική πρωτεΐνη. Η ποσότητα της πρωτεΐνης σε ένα κλάσμα ισούται με την ποσότητα της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε σε έναν μικρό όγκο του κλάσματος επί τον συνολικό όγκο.

Ολική δραστικότητα. Η ενζυμική δραστικότητα για το κλάσμα καθορίζεται με τη μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου σε μικρό όγκο του κλάσματος, με μια κατάλληλη δοκιμασία για την πρωτεΐνη X, και την αναγωγή της στον συνολικό όγκο του κλάσματος.

Ειδική δραστικότητα. Η παράμετρος αυτή είναι το κλάσμα της ολικής δραστικότητας διά της μάζας ολικής πρωτεΐνης.

Απόδοση. Η παράμετρος αυτή δείχνει τη δραστικότητα που διατηρήθηκε μετά από κάθε στάδιο καθαρισμού σαν ποσοστό της αρχικής δραστικότητας. Η ποσότητα της αρχικής δραστικότητας θεωρείται ως 100%.

Επίπεδο καθαρότητας. Η παράμετρος αυτή καθορίζει την αύξηση της καθαρό-

τητας του δείγματος, ως προς την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, σε κάθε στάδιο της διαδικασίας. Ισούται με το ηπλίκο της ειδικής δραστικότητας του συγκεκριμένου σταδίου διά της ειδικής δραστικότητας του αρχικού σταδίου.

Όπως βλέπουμε στον Πίνακα 4.1, το πρώτο στάδιο καθαρισμού, η κλασμάτωση άλατος, οδηγεί σε αύξηση της καθαρότητας μόνο κατά τρεις φορές, αλλά ανακτούμε όλη σχεδόν την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, αφού η απόδοση είναι 92%. Αφού ακολουθήσει διαπίδυση για να απομακρυνθεί το άλας, το κλάσμα αυτό περνά από μια στήλη ιοντοανταλλαγής. Η καθαρότητα τώρα αυξάνεται 9 φορές σε σχέση με την αρχική και η απόδοση ελαττώνεται στο 77% του αρχικού υλικού. Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού δίνει καθαρότητα 100 φορές της αρχικής, αλλά η απόδοση είναι ήδη στο 50%. Στο τελικό στάδιο της χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιούμε προσδότη ειδικό για το ένζυμο-στόχο που καθαρίζουμε. Το στάδιο αυτό είναι το πιο εξειδικευμένο από όλα και αποδίδει καθαρότητα 3.000 φορές, ενώ ελαττώνει την απόδοση σε 35%. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου στην Εικόνα 4.13 δείχνει ότι, προσθέτοντας σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης μετά από κάθε στάδιο καθαρισμού, ο αριθμός των πρωτεϊνών που εμφανίζονται στην ηλεκτροφόρηση ελαττώνεται όσο η καθαρότητα του δείγματος αυξάνεται, αλλά η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει αυξάνεται ως ποσοστό της συνολικής πρωτεΐνης που υπάρχει στο δείγμα.

Ένα επιτυχημένο πρωτόκολλο καθαρισμού πρέπει να παίρνει υπ' όψιν και το επίπεδο καθαρότητας και την απόδοση. Μεγάλη καθαρότητα, αλλά μικρή απόδοση, παρέχει μικρή ποσότητα πρωτεΐνης για τα υπόλοιπα πειράματα. Μεγάλη ποσότητα μικρής καθαρότητας αφήνει πολλές ξένες πρωτεΐνες στο κλάσμα και περιπλέκει την ερμηνεία των πειραμάτων.

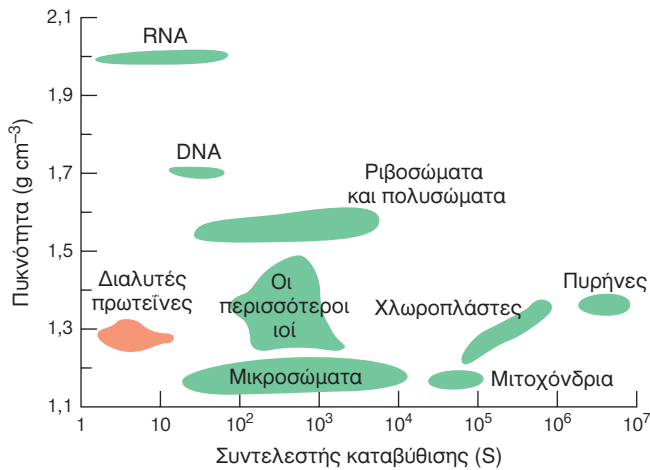
4.1.6 Η υπερφυγοκέντρηση είναι πολύτιμη μέθοδος διαχωρισμού βιομορίων και προσδιορισμού της μάζας τους

Έχουμε ήδη συζητήσει τη χρήση της φυγοκέντρησης στον διαχωρισμό των κυτταρικών συστατικών, η μέθοδος όμως χρησιμοποιείται και για την ανάλυση των ίδιων των μακρομορίων. Με την τεχνική αυτή μπορούμε να καθορίσουμε παραμέτρους, όπως η μάζα και η πυκνότητα, να πάρουμε πληροφορίες για το σχήμα του μορίου και να μελετήσουμε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων. Για να μπορέσουμε να βγάλουμε τα συμπεράσματα αυτά από τα δεδομένα της φυγοκέντρησης χρειαζόμαστε μια μαθηματική εξίσωση σχετικά με τη συμπεριφορά των μορίων όταν αυτά βρεθούν σε πεδίο άσκησης φυγόκεντρης δύναμης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2 Οι τιμές *S* και τα μοριακά Βάρη πρότυπων πρωτεϊνών.

| Πρωτεΐνη | Τιμή <i>S</i> (μονάδες <i>Svedberg</i>) | Μοριακό Βάρος |
|----------------------------------|---|------------------|
| Παγκρεατικός αναστολέας θρυψίνης | 1 | 6.520 |
| Κυτόχρωμα <i>c</i> | 1,83 | 12.310 |
| Ριβονουκλεάση A | 1,78 | 13.690 |
| Μυοσφαιρίνη | 1,97 | 17.800 |
| Θρυψίνη | 2,5 | 23.200 |
| Ανθρακική ανυδράση | 3,23 | 28.800 |
| Κονκαναβαλίνη A | 3,8 | 51.260 |
| Μηλική αφυδρογονάση | 5,76 | 74.900 |
| Γαλακτική αφυδρογονάση | 7,54 | 146.200 |

[Από T. Creighton, *Proteins*, 2nd ed. (W. H. Freeman and Company, 1993) Table 7.1]



ΕΙΚΟΝΑ 4.14 Πυκνότητα και συντελεστές καταβύθισης κυτταρικών συστατικών. [Κατά L.J. Kleinsmith και V.M. Kish, *Principles of Cell and Molecular Biology*, 2nd ed. (Harper Collins, 1995), p. 138.]

Ένα σωματίδιο θα μετακινηθεί μέσα σε ένα υγρό αν βρεθεί σε πεδίο φυγόκεντρης δύναμης. Ένας καλός τρόπος ποσοτικοποίησης της ταχύτητας μετακίνησης είναι ο υπολογισμός του συντελεστή καταβύθισης s ενός σωματιδίου χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση

$$s = m(1 - \bar{v}\rho)/f$$

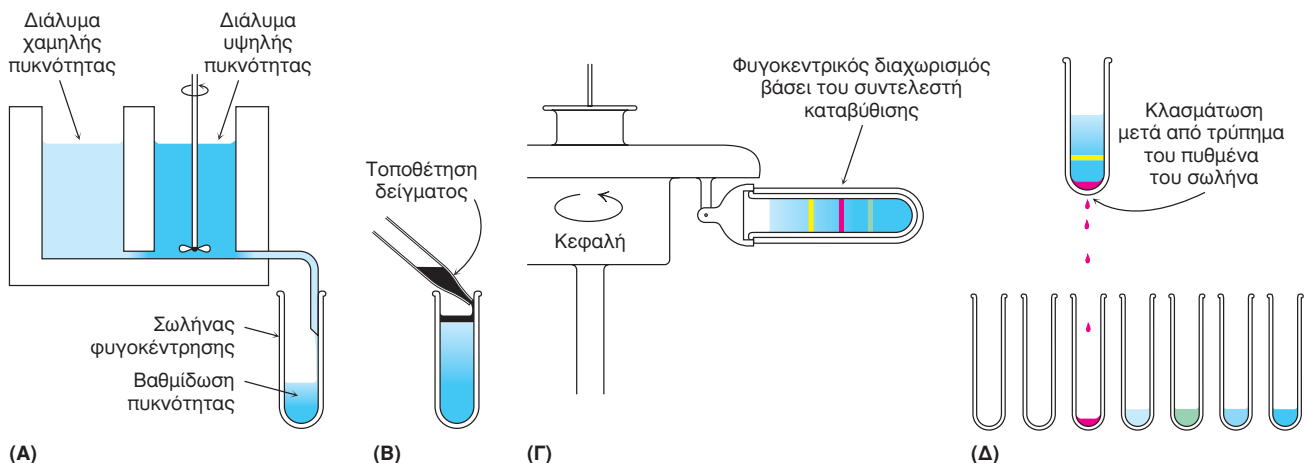
όπου m είναι η μάζα του σωματιδίου, \bar{v} ο μερικός ειδικός όγκος του σωματιδίου (το αντίστροφο της πυκνότητας του σωματιδίου), ρ η πυκνότητα του διαλύματος και f ο συντελεστής τριβής (παράγοντας που εξαρτάται από το σχήμα του σωματιδίου). Ο όρος $(1 - \bar{v}\rho)$ είναι η δύναμη άνωσης που ασκείται από το διάλυμα.

Οι συντελεστές καταβύθισης συνήθως εκφράζονται σε μονάδες *Svedberg* (S) που είναι ίσες με 10^{-13} s. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή S, τόσο πιο αργά μετακινείται ένα σωματίδιο μέσα σε ένα φυγοκεντρικό πεδίο. Οι τιμές S για μερικά βιομόρια και κυτταρικά συστατικά φαίνονται στον Πίνακα 4.2 και στην Εικόνα 4.14.

Η προηγούμενη εξίσωση μας οδηγεί σε αρκετά σημαντικά συμπεράσματα:

1. Η ταχύτητα καταβύθισης ενός σωματιδίου είναι ανάλογη της μάζας του. Ένα σωματίδιο με μεγαλύτερη μάζα καταβυθίζεται ταχύτερα από ένα σωματίδιο ίδιου σχήματος και πυκνότητας αλλά μικρότερης μάζας.
2. Το σχήμα επηρεάζει επίσης την ταχύτητα καταβύθισης, διότι επηρεάζει το ιξώδες. Ο συντελεστής τριβής f ενός συμπαγούς σωματιδίου είναι μικρότερος από εκείνον ενός λιγότερου συμπαγούς σωματιδίου της ίδιας μάζας. Επομένως, τα επιμήκη σωματίδια καθιζάνουν πιο αργά από ό,τι τα σφαιρικά σωματίδια της ίδιας μάζας.
3. Ένα πυκνό σωματίδιο μετακινείται πιο γρήγορα από ό,τι ένα λιγότερα πυκνό διότι η αντίθετη δύναμη της άνωσης $(1 - \bar{v}\rho)$ είναι μικρότερη για το πυκνό σωματίδιο.

ΕΙΚΟΝΑ 4.15 Φυγοκέντρηση σε ζώνες. Τα στάδια στη φυγοκέντρηση αυτή είναι τα εξής: (Α) δημιουργία μιας βαθμίδωσης πυκνότητας, (Β) τοποθέτηση του δείγματος επάνω στη βαθμίδωση, (Γ) τοποθέτηση του σωλήνα σε κεφαλή φυγοκέντρου με εκτυπώσιμους σωλήνες και φυγοκέντρηση, (Δ) συλλογή των κλασμάτων [Κατά D. Freifelder, *Physical Biochemistry*, 2nd ed. (W.H. Freeman and Company, 1982), p. 397]



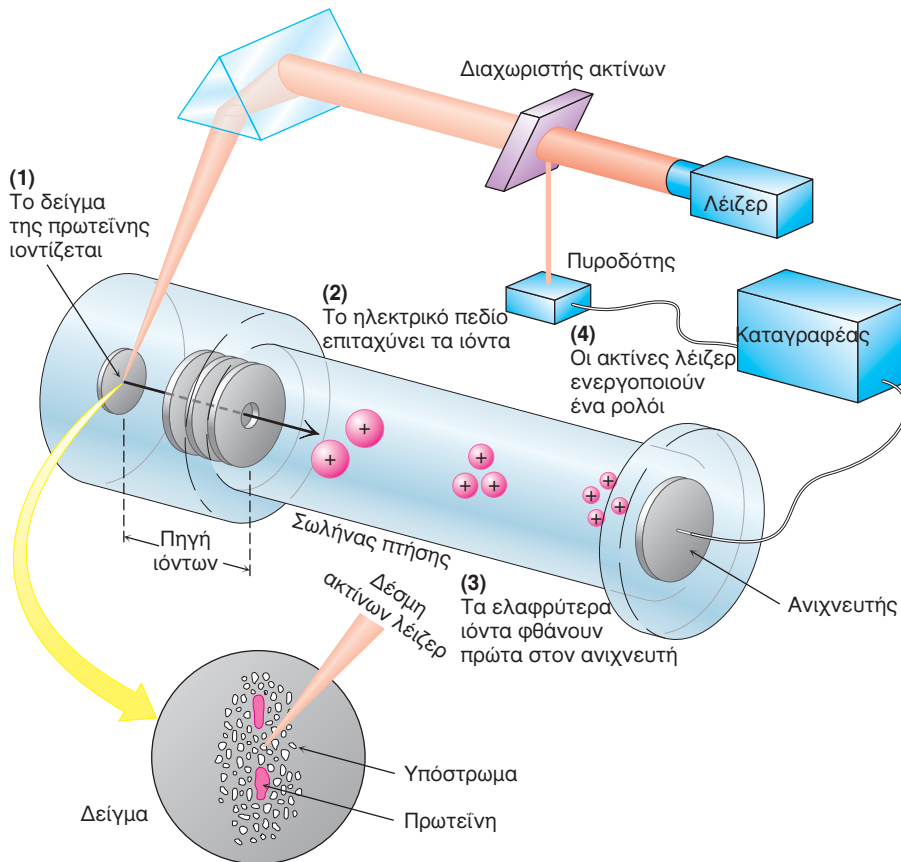
4. Η ταχύτητα καταβύθισης εξαρτάται επίσης από την πυκνότητα του διαλύματος (ρ). Τα σωματίδια καταβυθίζονται όταν $\bar{\nu}\rho < 1$, επιπλέον όταν $\bar{\nu}\rho > 1$ και δεν μετακινούνται όταν $\bar{\nu}\rho = 1$.

Υπάρχει μια τεχνική που ονομάζεται *φυγοκέντρωση σε ζώνες* ή πιο απλά *φυγοκέντρωση βαθμίδωσης* που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με διαφορετικούς συντελεστές καταβύθισης. Το πρώτο στάδιο είναι η δημιουργία μιας βαθμίδωσης πυκνότητας σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα. Αναμειγνύοντας ίσες ποσότητες ενός διαλύματος χαμηλής πυκνότητας (όπως 5% σακχαρόζη) και ενός διαλύματος υψηλής πυκνότητας (όπως 20% σακχαρόζη) επιτυγχάνουμε τη δημιουργία μιας γραμμικής βαθμίδωσης σακχαρόζης από 20% στον πυθμένα έως 5% στην κορυφή του σωλήνα (Εικόνα 4.15). Ο ρόλος της βαθμίδωσης πυκνότητας ανάγεται στην παρεμπόδιση της μεταφοράς θερμότητας λόγω ροής. Ένας μικρός όγκος του μείγματος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε τοποθετείται επάνω στη βαθμίδωση πυκνότητας. Καθώς η κεφαλή της φυγοκέντρου περιστρέφεται, οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσω της βαθμίδωσης και διαχωρίζονται σύμφωνα με τους συντελεστές καταβύθισης τους. Ο χρόνος και η ταχύτητα της φυγοκέντρωσης καθορίζονται εμπειρικά. Οι ζώνες των πρωτεϊνών που διαχωρίστηκαν μπορούν να συλλεχθούν από τον σωλήνα, μετά από τρύπημα του πυθμένα του και συλλογή των σταγόνων σε κλάσματα. Τα κλάσματα μετρώνται και καθορίζεται το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνη και καταλυτική δραστηριότητα ή κάποια άλλη λειτουργική ιδιότητα. Αυτή η τεχνική ταχύτητας καταβύθισης διαχωρίζει εύκολα πρωτεΐνες που διαφέρουν σε σταθερά καταβύθισης κατά έναν παράγοντα του δύο ή περισσότερο.

Η μάζα μιας πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί απόλυτα με *καταβύθιση ισορροπίας*, όπου ένα μείγμα φυγοκεντρείται σε σχετικά χαμηλή ταχύτητα, έτσι ώστε η καταβύθιση να εξισορροπείται από τη διάχυση. Η τεχνική της καταβύθισης ισορροπίας είναι ιδιαίτερα ακριβής για τον καθορισμό της μάζας και μπορεί να εφαρμοστεί κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες στις οποίες η φυσική τεταρτοταγής δομή ολιγομερών πρωτεϊνών διατηρείται. Αντίθετα, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (Εδάφιο 4.1.4) προσφέρει μια *εκτίμηση* της μάζας των διαχωρισμένων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από συνθήκες αποδιάταξης. Σημειώνεται ότι αν ξέρουμε τη μάζα των αποδιατεταγμένων συστατικών μιας ολιγομερούς πρωτεΐνης, διότι την καθορίσαμε με ανάλυση σε SDS-πολυακρυλαμίδιο, και τη μάζα της ανέπαφης ολιγομερούς πρωτεΐνης, όπως καθορίστηκε από ανάλυση με καταβύθιση ισορροπίας, μπορούμε να προσδιορίσουμε πόσα αντίγραφα κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας υπάρχουν στην ολιγομερή πρωτεΐνη.

4.1.7 Η μάζα μιας πρωτεΐνης μπορεί να καθοριστεί απόλυτα με φασματομετρία μάζας

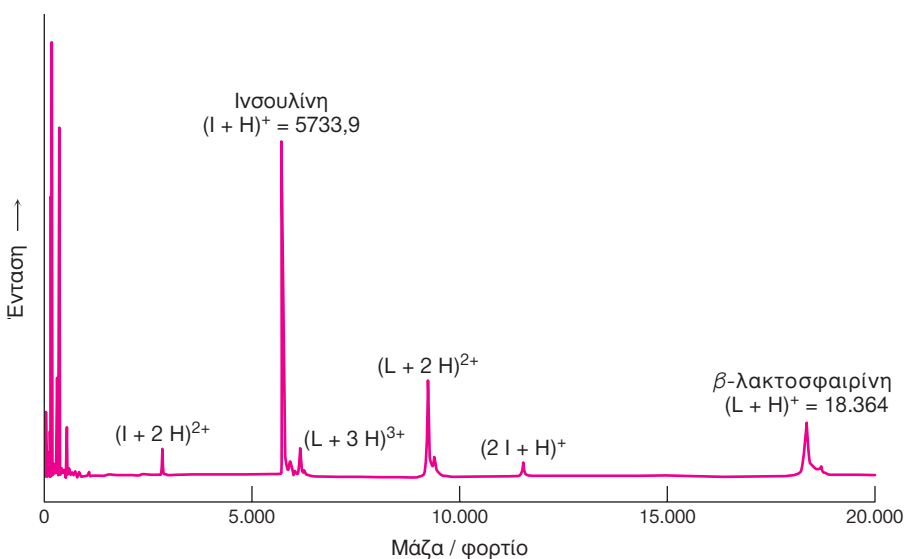
Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική μέθοδος καθιερωμένη στην οργανική χημεία από χρόνια. Μέχρι πρόσφατα, όμως, η τεχνική αυτή δεν είχε καμιά χρησιμότητα στη μελέτη των πρωτεϊνών, διότι οι πρωτεΐνες δεν είναι πτητικές. Η δυσκολία αυτή παρακάμφθηκε με τη διασπορά πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων στην αέρια φάση. Οι μεθοδολογίες αυτές ονομάζονται *εκρόφηση-ιοντισμός από μήτρα μέσω λέιζερ* (matrix-assisted laser desorption-ionization, MALDI) και *φασματομετρία ηλεκτροψεκασμού* (electrospray spectrometry). Θα εστιάσουμε την προσοχή μας στη φασματομετρία MALDI. Στην τεχνική αυτή δημιουργούνται ιόντα πρωτεΐνης που επιταχύνονται μέσω ενός ηλεκτρικού πεδίου (Εικόνα 4.16). Τα ιόντα αυτά ταξιδεύουν μέσα από έναν σωλήνα επιτάχυνσης, όπου τα μικρά ιόντα ταξιδεύουν γρηγορότερα και φθάνουν πρώτα στον ανιχνευτή. Επομένως, ο *χρόνος πτήσης* (time of flight, TOF) στο ηλεκτρικό πεδίο είναι παράμετρος εξαρτώμενη από τη μάζα (ή, για να είμα-



ΕΙΚΟΝΑ 4.16 Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF. (1) Το πρωτεϊνικό δείγμα μονιμοποιημένο σε κατάλληλο υλικό ιοντίζεται με ακτίνες λέιζερ. (2) Ένα ηλεκτρικό πεδίο επιταχύνει προς τον ανιχνευτή τα ιόντα που δημιουργούνται στον σωλήνα πτήσης. (3) Τα ελαφρύτερα ιόντα φθάνουν πρώτα. (4) Ο παλμός του ιοντισμού λέιζερ ενεργοποιεί συγχρόνως ένα ρολόι που μετρά τον χρόνο πτήσης (TOF) των ιόντων. [Κατά J.T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3d ed. (Lippincott – Raven, 1997), p. 279.]

στε ακριβέστεροι, τον λόγο μάζα/φορτίο). Ελάχιστες ποσότητες βιομορίων, τόσο μικρές όσο λίγα picomol (pmol) έως femtomol (fmol) χρειάζονται για μια τέτοια ανάλυση. Ένα φάσμα μάζας MALDI-TOF για το μείγμα των πρωτεϊνών ινσουλίνης και β-λακτοσφαιρίνης υπάρχει στην Εικόνα 4.17. Οι μάζες που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF είναι 5733,9 και 18,364 αντίστοιχα σε σχέση με τις τιμές 5733,5 και 18,388 που είχαν υπολογιστεί από τον μοριακό τύπο της κάθε πρωτεΐνης. Η μέθοδος MALDI-TOF είναι πράγματι ένας ακριβής τρόπος προσδιορισμού της μάζας μιας πρωτεΐνης.

Η φασματομετρία μάζας επέτρεψε την ανάπτυξη της μεθόδου αποτύπωσης πεπτιδικής μάζας (peptide mass fingerprinting). Αυτή η τεχνική ταυτοποίησης πεπτιδίων έχει αυξήσει εντυπωσιακά τη χρήση της μεθόδου ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων γίνεται όπως περιγράφηκε ήδη στο Εδάφιο 4.1.4. Το δείγμα απομονώνεται και διασπάται σε εξειδικευ-



ΕΙΚΟΝΑ 4.17 Φάσμα μάζας MALDI-TOF για την ινσουλίνη και τη β-λακτοσφαιρίνη. Μείγμα ινσουλίνης (I) και β-λακτοσφαιρίνης (L), 5 pmol από την κάθε μία, ιοντίζεται με MALDI, που παράγει κυρίως μονήρη φορτισμένα μοριακά ιόντα από πεπτιδία και πρωτεΐνες (I + H⁺ για την ινσουλίνη και L + H⁺ για τη λακτοσφαιρίνη). Παρ' όλα αυτά, παράγονται και μόρια με πολλαπλά φορτία καθώς και μικρές ποσότητες διμερούς ινσουλίνης με ένα φορτίο (2 I + H⁺). [Κατά J.T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3d ed. (Lippincott – Raven, 1997), p. 282.]

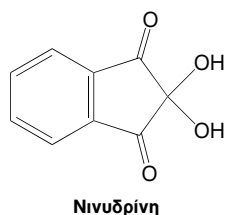
μένες θέσεις με χημικό ή ενζυμικό τρόπο. Οι μάζες των πρωτεϊνικών θραυσμάτων καθορίζονται στη συνέχεια με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. Τελικά οι μάζες των πρωτεϊνικών θραυσμάτων, ή το δακτυλικό αποτύπωμα της υδρόλυσης, συγκρίνονται με αποτυπώματα που υπάρχουν καταχωρισμένα σε βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών, οι οποίες «διασπάστηκαν ηλεκτρονικά» από ένα πρόγραμμα υπολογιστή που μιμείται την τεχνική διάσπασης που χρησιμοποιήθηκε για το δείγμα του πειράματος. Η τεχνική αυτή έχει προσφέρει εντυπωσιακά αποτελέσματα. Παραδείγματος χάριν, με τη μέθοδο αποτύπωσης πεπτιδικής μάζας προσδιορίστηκε απόλυτα το 80% των 150 πρωτεϊνών της ζύμης που έχουν αναλυθεί συνολικά με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Η φασματομετρία μάζας έδωσε τις ετικέτες με τα ονόματα σε πολλές πρωτεΐνες της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων.

4.2 Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΕΙ ΜΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ EDMAN

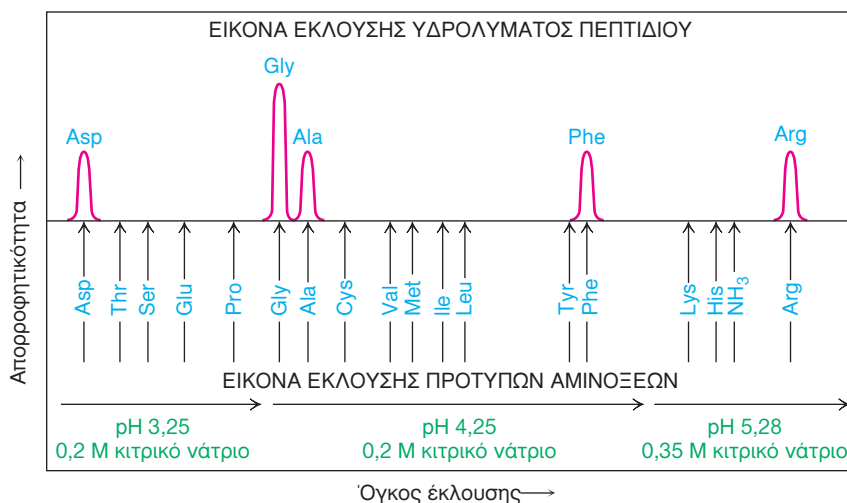
Έχοντας καθαρίσει την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει και έχοντας προσδιορίσει τη μάζα της, το επόμενο στάδιο που συνήθως ακολουθεί είναι ο καθορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων ή της πρωτοταγούς δομής. Όπως αναφέρθηκε ήδη (Εδάφιο 3.2.1) υπάρχει ένας πλούτος πληροφοριών και για τη λειτουργία αλλά και για την ιστορία της εξέλιξης της πρωτεΐνης που αποκαλύπτεται με τη γνώση της πρωτοταγούς δομής της. Ας δούμε πώς μπορούμε να προσδιορίσουμε την αλληλουχία ενός μικρού πεπτιδίου, όπως το

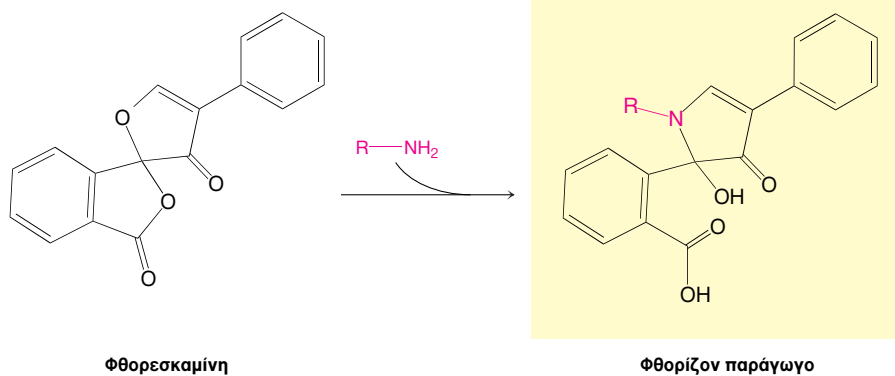


Πρώτα προσδιορίζουμε τη σύσταση αμινοξέων του πεπτιδίου. Το πεπτίδιο υδrolύεται στα αμινοξέα που το αποτελούν, με θέρμανση σε 6 N HCl στους 110°C για 24 ώρες. Τα αμινοξέα που είναι υδrolυμένα μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε στήλες από σουλφονιωμένο πολυστυρόλιο. Η ταυτότητα του αμινοξέος προσδιορίζεται από τον όγκο της έκλυσης, που είναι ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος που απαιτείται για την απομάκρυνση του αμινοξέος από τη στήλη (Εικόνα 4.18) και ποσοτικοποιείται με αντίδραση νινυδρίνης. Τα αμινοξέα που υφίστανται την επεξεργασία αυτή δίνουν ένα έντονο μπλε χρώμα, εκτός από την προλίνη η οποία δίνει κίτρινο χρώμα διότι περιέχει μια δευτεροταγή αμινική ομάδα. Η συγκέντρωση ενός αμινοξέος σε διάλυμα μετά τη θέρμανσή του μαζί με νινυδρίνη είναι ανάλογη με την απορροφητικότητα του διαλύματος. Αυτή η τεχνική μπορεί να προσδιορίσει ένα μικρογραμμάριο (10 nmol) ενός αμινοξέος, που είναι η πο-



ΕΙΚΟΝΑ 4.18 Καθορισμός της σύστασης αμινοξέων. Τα αμινοξέα που περιέχονται σε υδρόλυμα πεπτιδίου μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε ρητίνη σουλφονιωμένου πολυστυρολίου, όπως Dower-50. Για την έκλυση των αμινοξέων χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα με βαθμίδωση pH (στην περίπτωση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε κίτρικό νάτριο). Η ποσότητα του κάθε αμινοξέος καθορίζεται από την απορροφητικότητα του. Το ασπαραγινικό, που έχει οξίνη πλευρική αλυσίδα, εμφανίζεται πρώτο, ενώ η αργινίνη, που έχει βασική πλευρική αλυσίδα, εμφανίζεται τελευταία. Το αρχικό πεπτίδιο λοιπόν αποτελείται από τα εξής κατάλοιπα αμινοξέων: ένα ασπαραγινικό, δύο γλυκίνες, μία αλανίνη, μία φαινυλαλανίνη και μία αργινίνη.





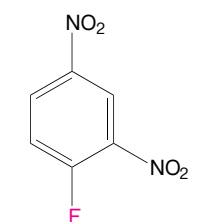
ΕΙΚΟΝΑ 4.19 Φθορίζοντα παράγωγα αμινοξέων. Η φθορεσκαμίνη αντιδρά με τις α -αμινοικές ομάδες των αμινοξέων δημιουργώντας φθορίζοντα παράγωγα.

σότητά του σε ένα δακτυλικό αποτύπωμα. Η *φθορεσκαμίνη*, που αντιδρά με α -αμινοικές ομάδες για να δώσει ένα προϊόν υψηλού φθορισμού, μπορεί να προσδιορίσει έως και ένα νανογραμμάριο (10 pmol) αμινοξέος (Εικόνα 4.19). Σύγκριση του σχήματος του χρωματογραφήματος της υδρόλυσης των αμινοξέων στο μείγμα που αναλύεται με εκείνο του γνωστού μείγματος των αμινοξέων, θα δείξει ότι τα αμινοξέα του πεπτιδίου είναι

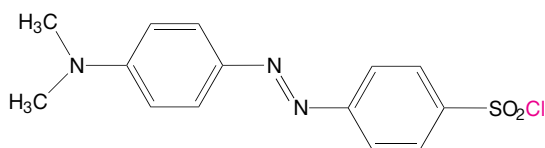
(Ala, Arg, Asp, Gly₂, Phe).

Η παρένθεση σημαίνει ότι αυτά είναι τα αμινοξέα του πεπτιδίου και όχι η αλληλουχία τους.

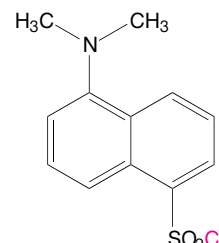
Το επόμενο βήμα είναι συχνά η ταυτοποίηση του αμινο-τελικού άκρου του πεπτιδίου, με την προσθήκη ενός συμπλόκου που σχηματίζει σταθερό ομοιοπολικό δεσμό. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε *φθορο-δινιτρο-βενζόλιο* (FDNB) για πρώτη φορά από τον Frederick Sanger. Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως το *διμεθυλαμινο-αζοβενζυλο-σουλφονυλο-χλωρίδιο* (dabsyl-χλωρίδιο) διότι σχηματίζει έντονα χρωματισμένα παράγωγα που μπορούν να ανιχνευθούν με υψηλή ευαισθησία. Η ουσία αυτή αντιδρά με μια μη φορτισμένη ομάδα α -NH₂ και δημιουργεί ένα παράγωγο σουλφοναμιδίου που είναι σταθερό κάτω από συνθήκες που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς (Εικόνα 4.20). Η υδρόλυση του δείγματος του dabsyl-πεπτιδίου σε 6 N HCl δίνει dabsyl-αμινοξύ, που μπορεί να προσδιοριστεί ως dabsyl-αλανίνη από τις χρωματογραφικές του ιδιότητες. Το *διμεθυλαμινο-ναφθολο-σουλφονυλο-χλωρίδιο* (dansyl-χλωρίδιο), ένα άλλο χρωμοφόρο που χρησιμοποιείται αρκετά συχνά, σχηματίζει φθορίζοντα παράγωγα σουλφοναμιδίων.



Φθορο-δινιτρο-βενζόλιο

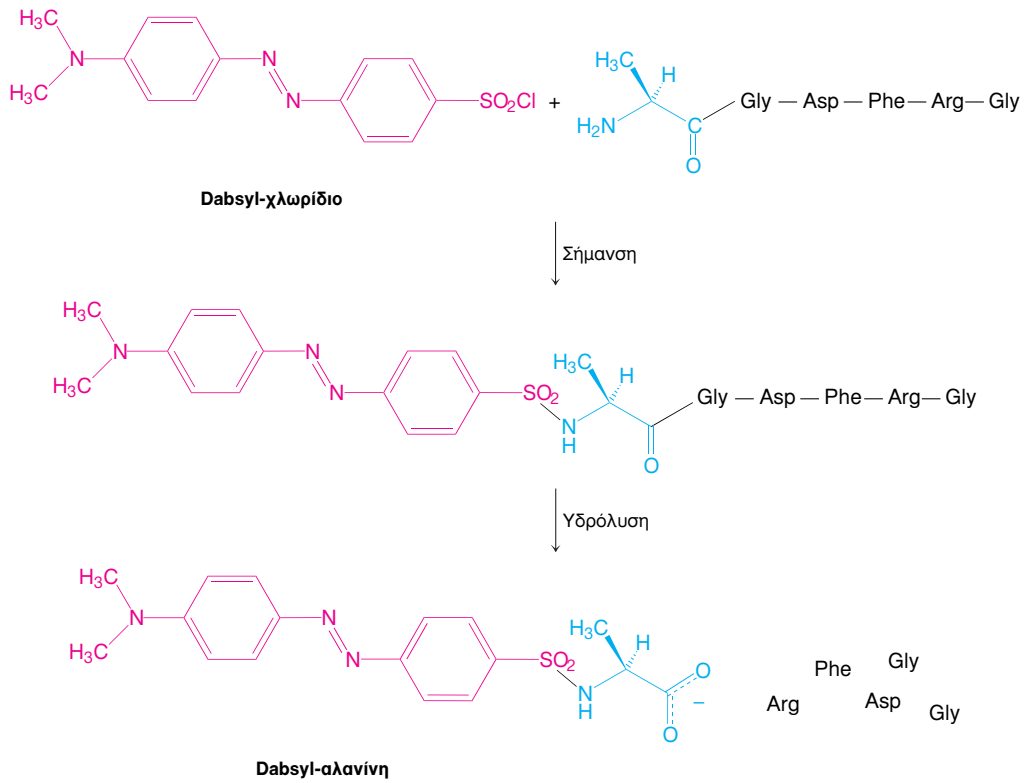


Dabsyl-χλωρίδιο



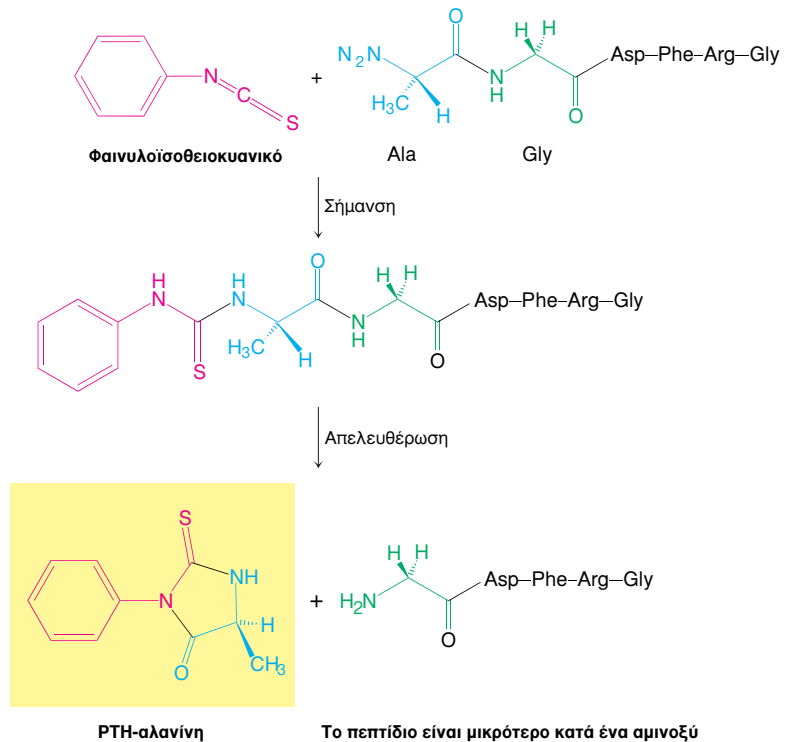
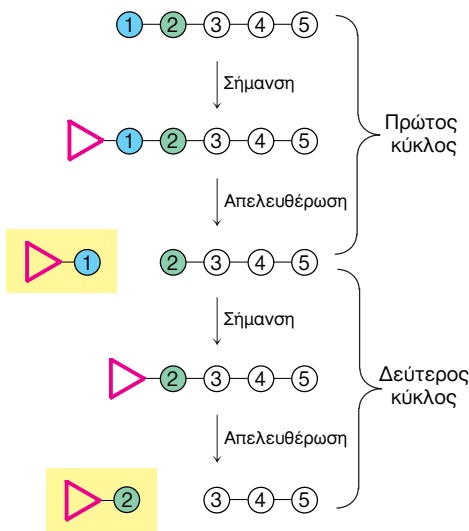
Dansyl-χλωρίδιο

Παρ' όλο που η μέθοδος προσδιορισμού του αμινο-τελικού αμινοξέος με dabsyl είναι ευαίσθητη και αποτελεσματική, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλούς κύκλους, διότι το πεπτίδιο καταστρέφεται τελείως στο στάδιο της όξινης υδρόλυσης και επομένως χάνεται όλη η πληροφορία της αλληλουχίας. Ο Pehr Edman καθόρισε έναν τρόπο για τη σήμανση του αμινο-τελικού άκρου και τη διάσπασή του από το πεπτίδιο χωρίς να καταστρέφει τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των άλλων αμινοξέων. Η *αποικοδόμηση Edman* απομακρύνει ένα κατάλοιπο αμινοξέος κάθε φορά από το αμινο-τελικό άκρο του πεπτιδίου (Εικόνα 4.21). Το *φαινυλοϊσοθειοκυανικό* αντιδρά με τη μη φορτισμένη τελική αμινοική ομάδα του πεπτιδίου και σχηματίζει ένα παράγωγο φαινυλο-θειοκαρ-



ΕΙΚΟΝΑ 4.20 Καθορισμός του αμινο-τελικού καταλοίπου ενός πεπτιδίου. Το dabsyl-χλωρίδιο χρησιμοποιείται για τη σήμανση του πεπτιδίου, που στη συνέχεια υδρολύεται με υδροχλωρικό οξύ. Το dabsyl-αμινοξύ (dabsyl-αλανίνη στο παράδειγμά μας) ταυτοποιείται από τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά του.

ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ EDMAN



ΕΙΚΟΝΑ 4.21 Αποικοδόμηση Edman. Το σημασμένο αμινο-τελικό κατάλοιπο (PTH-αλανίνη στον πρώτο κύκλο) μπορεί να απελευθερωθεί χωρίς να υδρολυθεί το υπόλοιπο του πεπτιδίου. Επομένως, το νέο αμινο-τελικό κατάλοιπο του πεπτιδίου Gly-Asp-Phe-Arg-Gly μπορεί να προσδιοριστεί σε έναν δεύτερο ανάλογο κύκλο. Με άλλους τρεις κύκλους αποικοδόμησης Edman καθορίζεται η πλήρης αλληλουχία του αρχικού πεπτιδίου.

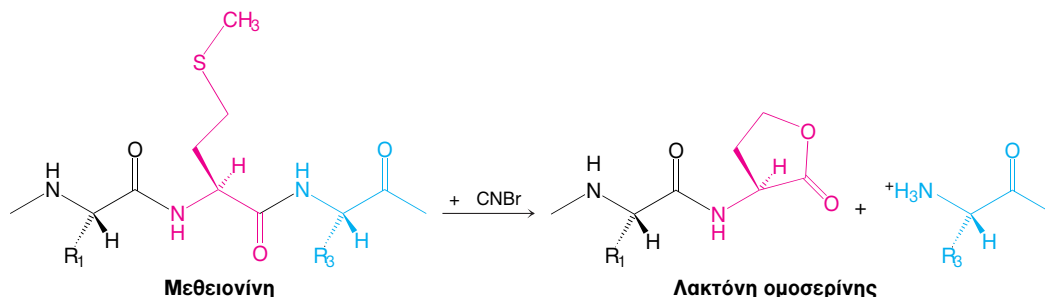
βαμοϋλίου. Στη συνέχεια, κάτω από ήπιες όξινες συνθήκες, απελευθερώνεται ένα κυκλικό παράγωγο του τελικού αμινοξέος, ενώ το υπόλοιπο πεπτίδιο παραμένει ανέπαφο και μικρότερο κατά ένα αμινοξύ. Το κυκλικό παράγωγο είναι η ένωση φαινυλοθειο-υδαντοϊνο(PTH)-αμινοξύ, που μπορεί να προσδιοριστεί με χρωματογραφικές μεθόδους. Η διαδικασία Edman μπορεί να επαναληφθεί μετά στο μικρότερο πεπτίδιο δίνοντας ένα άλλο PTH-αμινοξύ που μπορεί και πάλι να προσδιοριστεί με χρωματογραφία. Τρεις ακόμη κύκλοι επανάληψης της διαδικασίας θα αποκαλύψουν ολόκληρη την αλληλουχία του αρχικού πενταπεπτιδίου

Ο χρόνος καθορισμού της πλήρους αλληλουχίας μιας πρωτεΐνης ελαχιστοποιήθηκε με την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων μηχανημάτων προσδιορισμού αλληλουχίας αμινοξέων. Απαιτείται τώρα λιγότερο από μία ώρα για ένα πλήρη κύκλο αποικοδόμησης Edman — τη σχάση ενός αμινοξέος από ένα πεπτίδιο και τον χαρακτηρισμό του. Επαναλαμβάνοντας τους κύκλους αποικοδόμησης μπορούμε να χαρακτηρίσουμε έως και 50 αμινοξέα μιας πρωτεΐνης. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης διαχωρίζει τα αμινοξέα με μεγάλη ευαισθησία (Εικόνα 4.22). Τα μηχανήματα προσδιορισμού αλληλουχιών αμινοξέων σε αέρια φάση αναλύουν ποσότητες picomole πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η ευαισθησία αυτή επιτρέπει την ανάλυση πρωτεϊνικού δείγματος που εκλύεται από μία και μόνο ζώνη μιας πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδιου.

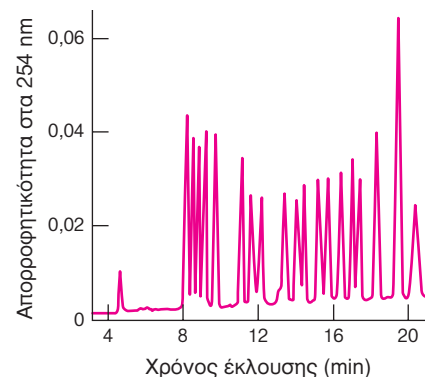
4.2.1 Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να υποστούν εξειδικευμένη διάσπαση σε μικρά πεπτίδια για να διευκολυνθεί η ανάλυση

Θεωρητικά, μια ολόκληρη πρωτεΐνη μπορεί να αναλυθεί με τη μέθοδο Edman. Πρακτικά, όμως, τα πεπτίδια με περισσότερα από πενήντα κατάλοιπα δεν μπορούν να αναλυθούν με τη μέθοδο Edman, διότι στην αντίδραση δεν απομακρύνεται όλο το αμινοξύ που διασπάται σε κάθε κύκλο. Αν η αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης κάθε κύκλου είναι 98%, το κλάσμα του σωστού αμινοξέος που θα απελευθερωθεί μετά από 60 κύκλους θα είναι μόνο 0,3 ($0,98^{60}$), δηλαδή ένα μείγμα που είναι αδύνατον να καθαριστεί. Η δυσκολία αυτή μπορεί να ξεπεραστεί με την ειδική διάσπαση μιας πρωτεΐνης σε πεπτίδια όχι πολύ μεγαλύτερα από πενήντα αμινοξέα το κάθε ένα. Δηλαδή η στρατηγική είναι *διαίρει και βασίλευε*.

Ειδική διάσπαση μπορεί να επιτευχθεί με χημικές και ενζυμικές μεθόδους. Παραδείγματος χάριν, οι Bernhard Witkop και Erhard Gross ανακάλυψαν ότι το βρωμιούχο κυάνιο (CNBr) διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες μόνο στο καρβοξυ-τελικό άκρο της μεθειονίνης (Εικόνα 4.23).



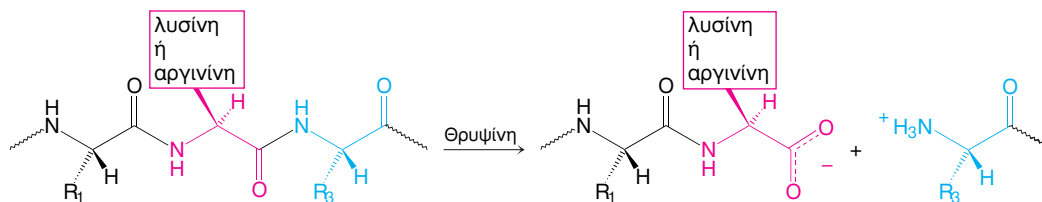
Μια πρωτεΐνη με 10 μεθειονίνες θα δώσει συνήθως έντεκα πεπτίδια όταν διασπαστεί με CNBr. Η θρυψίνη, ένα πρωτεολυτικό ένζυμο από το παγκρεατικό υγρό, επίσης προκαλεί πολύ ειδική διάσπαση. Η θρυψίνη διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυ-τελικό άκρο της αργινίνης και της λυσίνης (Εικόνα 4.24 και Εδάφιο 9.1.4). Μια πρωτεΐνη που περιέχει 9 λυσίνες και 7 αργινίνες δίνει συνήθως 17 πεπτίδια όταν διασπάται με θρυψίνη. Κάθε ένα από αυτά τα πεπτίδια θρυψίνης, εκτός από το καρβοξυ-τελικό πεπτίδιο της πρω-



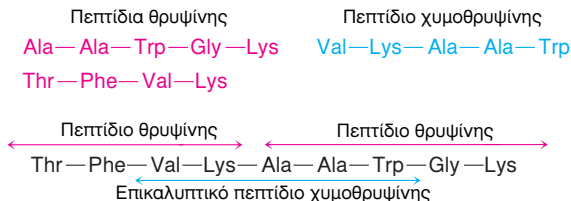
ΕΙΚΟΝΑ 4.22 Διαχωρισμός των PTH-αμινοξέων.

Τα PTH-αμινοξέα μπορούν εύκολα να διαχωριστούν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Σε αυτήν την εικόνα έκλουσης των PTH-πεπτιδίων με HPLC φαίνεται πόσο καλά διαχωρίζεται το μείγμα των πεπτιδίων στα επιμέρους πεπτίδια. Ένα άγνωστο πεπτίδιο μπορεί να καθοριστεί, με τη μέθοδο αυτή, αν συγκρίνουμε τον χρόνο έκλουσής του με τους χρόνους γνωστών πρότυπων αμινοξέων.

ΕΙΚΟΝΑ 4.23 Διάσπαση με Βρωμιούχο κυάνιο. Το βρωμιούχο κυάνιο διασπά πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυ-τελικό άκρο της μεθειονίνης.



ΕΙΚΟΝΑ 4.24 Διάσπαση με Θρυψίνη. Η θρυψίνη υδρολύει τα πολυπεπτιδικά στο καρβοξυ-τελικό άκρο της αργινίνης και της λυσίνης.

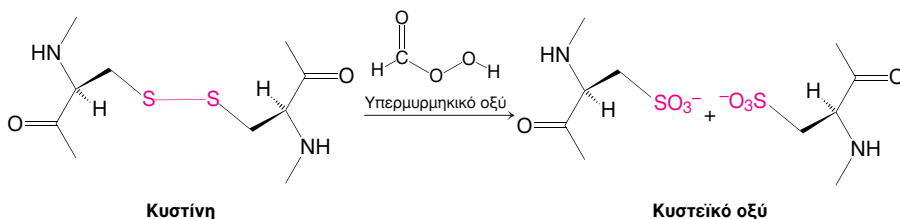
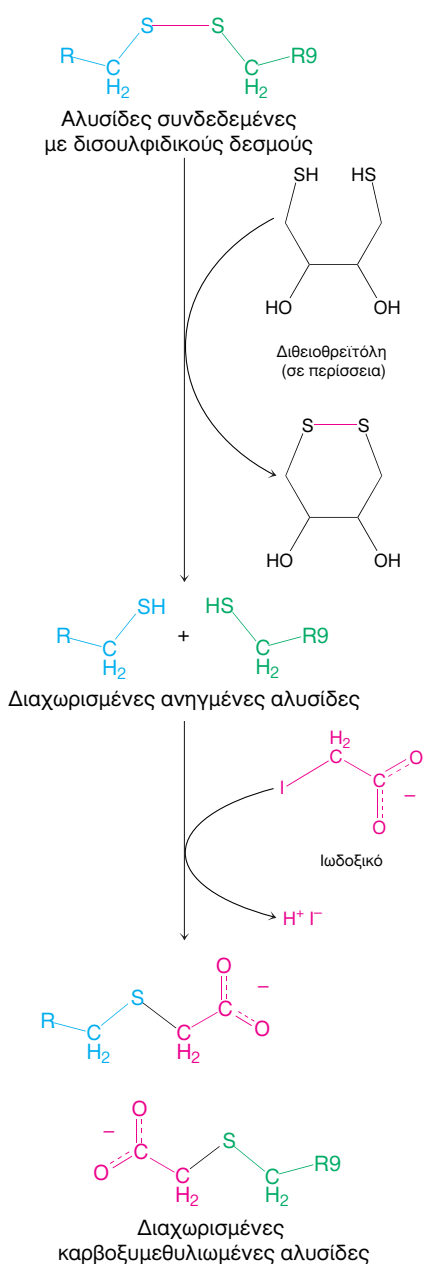


ΕΙΚΟΝΑ 4.25 Επικαλυπτικά πεπτιδία. Η διάσπαση με χυμοθρυψίνη δίνει ένα πεπτιδίο που επικαλύπτει δύο πεπτιδία θρυψίνης και έτσι μπορούμε να αποφασίσουμε για τη σειρά τους.

τεΐνης, θα έχει στο άκρο του αργινίνη ή λυσίνη. Στον Πίνακα 4.3 δίνονται αρκετοί άλλοι εξειδικευμένοι τρόποι διάσπασης πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

Τα πεπτιδία που προκύπτουν με ειδικές χημικές ή ενζυμικές διασπάσεις διαχωρίζονται με χρωματογραφία. Η αλληλουχία κάθε ενός από τα καθαρά πεπτιδία προσδιορίζεται με τη μέθοδο Edman. Στο σημείο αυτό, η αλληλουχία των αμινοξέων των τμημάτων της πρωτεΐνης είναι γνωστή, αλλά η σειρά των τμημάτων αυτών δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Πώς μπορούμε να βάλουμε τα πεπτιδία σε μια σειρά για να επιτύχουμε την πρωτοταγή δομή της αρχικής πρωτεΐνης; Οι απαραίτητες συμπληρωματικές πληροφορίες δίνονται από τα επικαλυπτικά πεπτιδία (Εικόνα 4.25). Για να διασπαστεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα σε άλλες θέσεις, χρησιμοποιείται ένα ένζυμο διαφορετικό από τη θρυψίνη. Παραδείγματος χάριν, η χυμοθρυψίνη διασπά πεπτιδικούς δεσμούς ειδικά στο καρβοξυ-τελικό άκρο αρωματικών και μερικών άλλων μεγάλων μη πολικών καταλοίπων (Εδάφιο 9.1.3). Επειδή τα πεπτιδία αυτά της χυμοθρυψίνης επικαλύπτουν δύο ή περισσότερα πεπτιδία θρυψίνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν τη σειρά των πεπτιδίων θρυψίνης. Επομένως τώρα ολόκληρη η αλληλουχία αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι γνωστή.

Αν στο αρχικό δείγμα μιας πρωτεΐνης υπάρχουν περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τότε χρειάζονται συμπληρωματικά βήματα. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS κάτω από αναγωγικές συνθήκες θα εμφανίσει τον αριθμό των αλυσίδων. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο αριθ-



μός των διάκριτων αμινο-τελικών αμινοξέων. Για πρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συγκρατούνται από μη ομοιοπολικούς δεσμούς, απαιτούνται ουσίες αποδιάταξης, όπως η ουρία ή η υδροχλωρική γουανιδίνη, για να διαχωριστούν οι αλυσίδες. Οι αλυσίδες πρέπει να διαχωριστούν πριν αρχίσει η εύρεση της αλληλουχίας. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς διαχωρίζονται πρώτα με αναγωγή με β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη. Για να παρεμποδιστούν οι κυστεΐνες από πιθανή επανασύνδεση, αλκυλιώνονται με ιωδοξικό σχηματίζοντας σταθερά S-καρβοξυμεθυλο-παράγωγα (Εικόνα 4.26). Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει προσδιορισμός της αλληλουχίας όπως ήδη περιγράφηκε.

ΕΙΚΟΝΑ 4.26 Αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών. Τα πολυπεπτιδία που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς μπορούν να διαχωριστούν με αναγωγή των δεσμών αυτών με το αντιδραστήριο διθειοθρεϊτόλη. Η αναγωγή πρέπει να ακολουθηθεί από αλκυλίωση για να αποφευχθεί η επανένωση των σουλφυδρικών ομάδων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3 Εξειδικευμένες διασπάσεις πολυπεπτιδίων.

| Αντιδραστήριο | Θέση διάσπασης |
|-----------------------------|---|
| Χημική διάσπαση | |
| Βρωμιούχο κυάνιο | Καρβοξυ-τελικό άκρο μεθειονίνης |
| Ο-Ιωδοσοβενζοϊκό | Καρβοξυ-τελικό άκρο θρυπτοφάνης |
| Υδροξυλαμίνη | Δεσμοί ασπαραγίνης-γλυκίνης |
| 2-Νιτρο-5-θειοκυανοβενζοϊκό | Αμινο-τελικό άκρο κυστεΐνης |
| Ενζυμική διάσπαση | |
| Θρυψίνη | Καρβοξυ-τελικό άκρο λυσίνης και αργινίνης |
| Κλωστριπαΐνη | Καρβοξυ-τελικό άκρο αργινίνης |
| Σταφυλοκοκκική πρωτεάση | Καρβοξυ-τελικό άκρο ασπαραγινικού και γλουταμινικού (του τελευταίου μόνον υπό ορισμένες συνθήκες) |
| Θρομβίνη | Καρβοξυ-τελικό άκρο αργινίνης |
| Χυμοθρυψίνη | Καρβοξυ-τελικό άκρο τυροσίνης, θρυπτοφάνης, φαινυλαλανίνης, λευκίνης και μεθειονίνης |
| Καρβοξυπεπτιδάση Α | Αμινο-τελικό άκρο του C-τελικού αμινοξέος (εκτός από αργινίνη, λυσίνη ή προλίνη) |

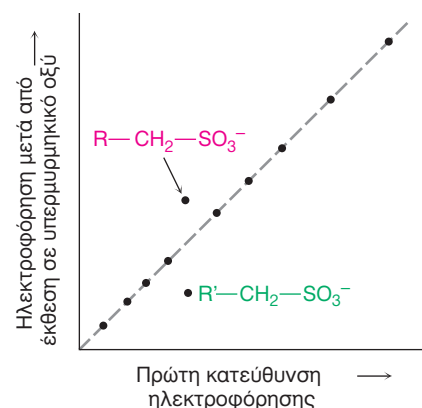
Για να συμπληρώσουμε τις γνώσεις μας για τη δομή των πρωτεϊνών πρέπει να προσδιορίσουμε τις θέσεις των αρχικών δισουλφιδικών δεσμών. Οι θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών μπορούν να προσδιοριστούν με την τεχνική της *διαγώνιας ηλεκτροφόρησης* (Εικόνα 4.27). Η πρωτεΐνη πρώτα διασπάται ειδικά σε πεπτίδια κάτω από συνθήκες που διατηρούν ανέπαφους τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Το μείγμα των πεπτιδίων ηλεκτροφορείται σε χαρτί, το οποίο στη συνέχεια εκτίθεται σε ατμούς υπερμυρμηκικού οξέος που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και μετατρέπει την κυστίνη σε κυστεϊκό οξύ. Τα πεπτίδια που ήταν δεσμευμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς τώρα είναι ανεξάρτητα και πιο όξινα, λόγω της δημιουργίας μιας ομάδας SO_3^- .

Το μείγμα ηλεκτροφορείται στην κατακόρυφη κατεύθυνση κάτω από τις ίδιες συνθήκες όπως η πρώτη ηλεκτροφόρηση. Τα πεπτίδια που δεν έχουν δισουλφιδικούς δεσμούς θα έχουν την ίδια μετακίνηση όπως πριν και επομένως θα βρίσκονται σε μια διαγώνια γραμμή. Αντίθετα, τα νεοσχηματισμένα πεπτίδια που περιέχουν κυστεϊκό οξύ θα μετακινηθούν διαφορετικά από ό,τι το αρχικό πεπτίδιο που ήταν συνδεδεμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς και επομένως θα είναι εκτός της διαγωνίου. Τα πεπτίδια αυτά μπορούν στη συνέχεια να απομονωθούν, να προσδιοριστεί η αλληλουχία τους και να καθοριστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί.

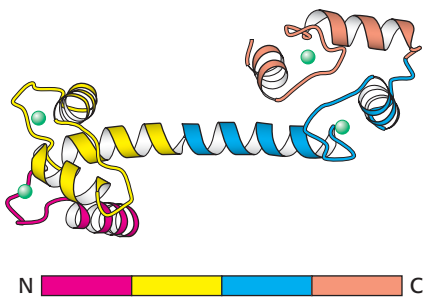
4.2.2 Οι αλληλουχίες αμινοξέων αποτελούν πηγές πολλών πληροφοριών

Ο καθορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης είναι πολύτιμη πηγή πληροφοριών για τη λειτουργία, τη δομή και την ιστορία μιας πρωτεΐνης.

1. Η αλληλουχία μιας πρωτεΐνης συγκρινόμενη με τις αλληλουχίες όλων των γνωστών πρωτεϊνών αποκαλύπτει την οικογένεια στην οποία ανήκει η πρωτεΐνη αυτή. Ο καθορισμός της σχέσης αυτής είναι απλώς θέμα λίγων λεπτών σε έναν προσωπικό υπολογιστή (Υποκεφάλαιο 7.2). Αν η πρωτεΐνη ανήκει σε γνωστή οικογένεια πρωτεϊνών μπορούμε να συμπεράνουμε πολλά σχετικά με τη λειτουργία της. Η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη, παραδείγματος χάριν, ανήκουν



ΕΙΚΟΝΑ 4.27 Διαγώνια ηλεκτροφόρηση. Πεπτίδια ενωμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς μπορούν να διαχωριστούν με διαγώνια ηλεκτροφόρηση. Το μείγμα των πεπτιδίων ηλεκτροφορείται στην οριζόντια κατεύθυνση και μετά εκτίθεται σε υπερμυρμηκικό οξύ. Το οξύ διασπά και οξειδώνει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του δείγματος στην κατακόρυφη κατεύθυνση.



ΕΙΚΟΝΑ 4.28 Επαναλαμβανόμενα μοτίβα σε μια πρωτεϊνική αλυσίδα. Η ασβεστοτροποποιητίνη είναι αισθητήρας του ασβεστίου και περιέχει τέσσερις παρόμοιες μονάδες σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι μονάδες φαίνονται στο σχήμα με τα χρώματα κόκκινο, κίτρινο, μπλε και πορτοκαλί. Η κάθε μονάδα δεσμεύει ένα ιόν ασβεστίου, που φαίνεται με πράσινο χρώμα.

στην ομάδα των πρωτεολυτικών ενζύμων με κοινό καταλυτικό μηχανισμό που στηρίζεται στην ύπαρξη μιας αντιδραστικής σερίνης στο καταλυτικό κέντρο τους (Εδάφιο 9.1.4). Αν, επομένως, η αλληλουχία της νέας πρωτεΐνης μοιάζει με τις αλληλουχίες της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης, το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι μπορεί να ανήκει στις σερινοπρωτεάσες.

2. *Η σύγκριση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης διαφόρων βιολογικών ειδών παρέχει πλήθος πληροφοριών σχετικά με τις εξελικτικές πορείες.* Γενεαλογικές συγγένειες μεταξύ των οργανισμών εμφανίζονται στις αλληλουχίες των πρωτεϊνών τους. Μπορούμε να καθορίσουμε ακόμη και την εποχή που διαχωρίστηκαν δύο εξελικτικές γραμμές διότι οι τυχαίες μεταλλάξεις λειτουργούν ως ρολόι. Παραδείγματος χάριν, η συγκριτική μελέτη της πρωτεϊνικής οικογένειας για τις λευκωματίνες ορού που βρέθηκαν στα πρωτεύοντα θηλαστικά δηλώνει ότι οι άνθρωποι και οι πίθηκοι της Αφρικής διαχωρίστηκαν πριν από 5 εκατομμύρια και όχι πριν από 30 εκατομμύρια χρόνια, όπως πιστεύαμε προηγουμένως. Η ανάλυση των αλληλουχιών μας έδωσε μια νέα αντιμετώπιση των στοιχείων των απολιθωμάτων και της διαδρομής που ακολούθησε η ανθρώπινη εξέλιξη.

3. *Η αλληλουχία των αμινοξέων μπορεί να παρουσιάσει εσωτερικές επαναλήψεις.* Οι επαναλήψεις αυτές μας αποκαλύπτουν την ιστορία της ίδιας της πρωτεΐνης. Πολλές πρωτεΐνες εμφανίστηκαν λόγω του διπλασιασμού ενός αρχέγονου γονιδίου που τροποποίησε, στη συνέχεια, τη λειτουργία του. Παραδείγματος χάριν, η ασβεστοτροποποιητίνη, που είναι ο καθολικός ανιχνευτής του ασβεστίου στα ευκαρυωτικά, περιέχει τέσσερα ίδια μοτίβα δέσμευσης ασβεστίου που προήλθαν από επαναλήψεις γονιδίων (Εικόνα 4.28).

4. *Πολλές πρωτεΐνες περιέχουν αλληλουχίες αμινοξέων που λειτουργούν ως σήματα τα οποία δηλώνουν την τύχη τους ή ρυθμίζουν την επεξεργασία τους.* Μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη ή μια μεμβρανική πρωτεΐνη, παραδείγματος χάριν, περιέχει ένα σήμα στην αλληλουχία αποτελούμενο από 20 υδρόφοβα αμινοξέα κοντά στο αμινο-τελικό άκρο τα οποία κατευθύνουν την πρωτεΐνη στην κατάλληλη μεμβράνη. Μια άλλη πρωτεΐνη μπορεί να περιέχει μια αλληλουχία αμινοξέων που λειτουργεί ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού το οποίο κατευθύνει την πρωτεΐνη στον πυρήνα.

5. *Η γνώση της αλληλουχίας παρέχει τη βάση για την παρασκευή αντισωμάτων ειδικών για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.* Παρατηρώντας την αλληλουχία μιας πρωτεΐνης μπορούμε να αποφασίσουμε ποιο μέρος της πρωτεΐνης μπορεί να δώσει αντισώματα πιο εύκολα αν ενεθεί σε έναν ποντικό ή ένα κουνέλι. Πεπτίδια για τις αλληλουχίες αυτές μπορούν να συντεθούν και να χρησιμοποιηθούν για να παραχθούν αντισώματα στην πρωτεΐνη. Αυτά τα ειδικά αντισώματα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στον προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που υπάρχει σε ένα διάλυμα ή στο αίμα, στον καθορισμό της κατανομής της σε ένα κύτταρο, ή στην κλωνοποίηση του γονιδίου της (Εδάφιο 4.3.3).

6. *Η αλληλουχία αμινοξέων είναι χρήσιμη για τη δημιουργία ανιχνευτών DNA εξειδικευμένων για τα γονίδια που κωδικεύουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες* (Εδάφιο 6.1.4). Γνωρίζοντας την αλληλουχία μιας πρωτεΐνης μπορούμε να λειτουργήσουμε με τη συλλογιστική της αντίστροφης γενετικής, δημιουργώντας ανιχνευτές DNA οι οποίοι αντιστοιχούν σε τμήματα γνωστής αλληλουχίας. Οι ανιχνευτές αυτοί, που καθορίζονται με βάση τον γενετικό κώδικα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του γονιδίου της πρωτεΐνης και τον προσδιορισμό ολόκληρης της αλληλουχίας της. Γνωρίζοντας τώρα το γονίδιο, μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για τη φυσιολογική ρύθμιση της πρωτεΐνης. Έτσι, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας είναι αναπόσπαστο μέρος της μοριακής γενετικής, όπως ακριβώς και η κλωνοποίηση είναι κομβικό σημείο στην ανάλυση της πρωτεϊνικής δομής και λειτουργίας.

4.2.3 Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έχει φέρει επανάσταση στον προσδιορισμό της αλληλουχίας αμινοξέων

Εκατοντάδες πρωτεΐνες έχουν αναλυθεί με αποικοδόμηση Edman των πεπτιδίων που παράγονται από την ειδική διάσπαση των πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μεγάλων πρωτεϊνών, που έχουν περισσότερα από 1000 αμινοξέα, χρειάζεται ηρωικές προσπάθειες. Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τέτοιων πρωτεϊνών, συχνά είναι πιο αποτελεσματική μια συμπληρωματική πειραματική προσέγγιση που βασίζεται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Όπως θα αναλυθεί στο Κεφάλαιο 6, μεγάλες περιοχές του DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν και να βρεθεί η αλληλουχία τους. Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων αποκαλύπτει αμέσως την αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το γονίδιο (Εικόνα 4.29). Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA παράγει πλήθος αλληλουχιών σε ελάχιστο χρόνο.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|
| Αλληλουχία DNA | GGG | | TTC | | TGG | | GGA | | GCA | | GCA | | GGA | | AGC | | ACT | | ATG | | GGC | | GCA |
| Αλληλουχία αμινοξέων | Gly | | Phe | | Leu | | Gly | | Ala | | Ala | | Gly | | Ser | | Thr | | Met | | Gly | | Ala |

ΕΙΚΟΝΑ 4.29 Η αλληλουχία αμινοξέων είναι προϊόν της αλληλουχίας του DNA. Η πλήρης αλληλουχία νουκλεοτιδίων του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1) που είναι το αίτιο του συνδρόμου της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) έγινε γνωστή μέσα σε έναν χρόνο μετά την απομόνωση του ιού. Εδώ φαίνεται ένα τμήμα της αλληλουχίας DNA που καθορίστηκε από το γονιδίωμα RNA του ιού. Μαζί φαίνεται η αντίστοιχη αλληλουχία αμινοξέων που είναι προϊόν της γνώσης μας για τον γενετικό κώδικα.

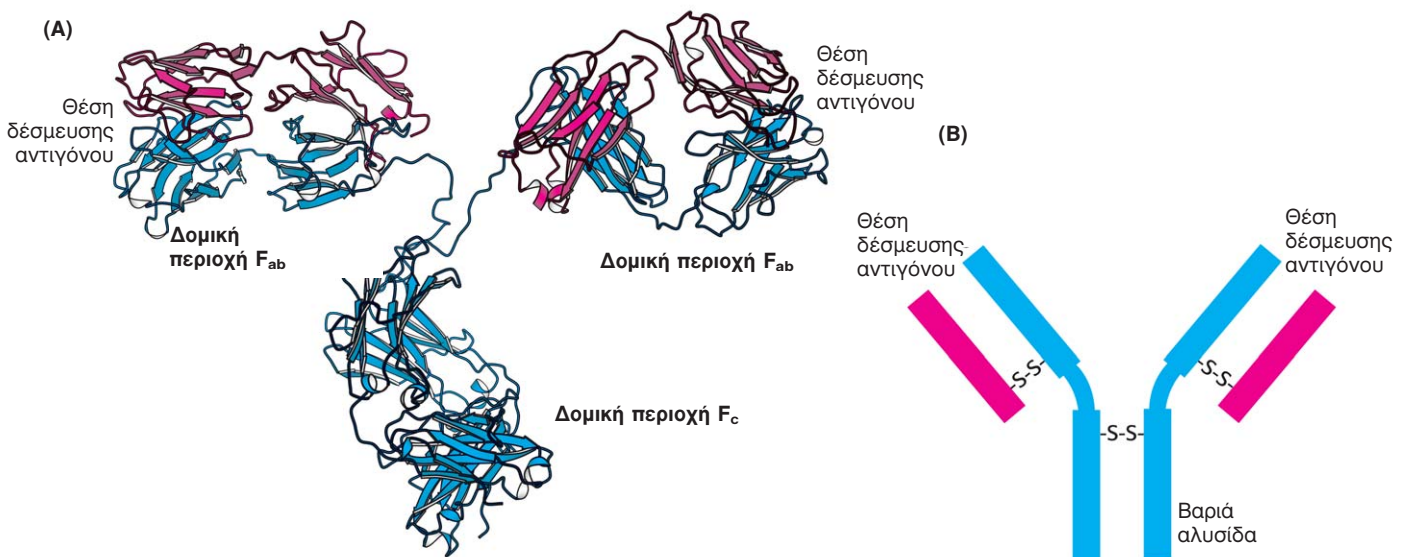
Παρ' όλο που η τεχνολογία του DNA δίνει την πρωτοταγή δομή, η απομόνωση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη. Η πρωτοταγής δομή που διαβάζουμε από το DNA είναι εκείνη της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης, που μόλις έγινε από τη μηχανή μετάφρασης. Πολλές πρωτεΐνες τροποποιούνται μετά τη σύνθεσή τους. Μερικές έχουν τροποποιημένα άκρα και άλλες πρωτεΐνες προκύπτουν από τη διάσπαση μεγαλύτερων αρχικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Οι κυστεΐνες σε μερικές πρωτεΐνες οξειδώνονται και δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς, που μπορεί να είναι είτε μεταξύ μιας αλυσίδας είτε μεταξύ διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Συγκεκριμένες πλευρικές αλυσίδες μερικών πρωτεϊνών επιδέχονται τροποποίηση. Αλληλουχίες αμινοξέων που προέρχονται από αλληλουχίες DNA περιέχουν πολλές πληροφορίες αλλά δεν περιλαμβάνουν τέτοιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Για να προσδιοριστούν οι αλλαγές αυτές, που είναι ουσιαστικές για τη βιολογική δραστηριότητα πολλών πρωτεϊνών, απαιτούνται χημικές αναλύσεις των ίδιων των πρωτεϊνών. *Επομένως, η αλληλουχία του DNA και η πρωτεϊνική χημική ανάλυση είναι συμπληρωματικές αντιμετώπισεις για τον καθορισμό της δομικής βάσης της λειτουργίας της πρωτεΐνης.*

4.3 Η ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΦΕΡΕΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι ανοσολογικές μέθοδοι έχουν προσφέρει εξαιρετικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται στον καθαρισμό, τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Οι μεθοδολογίες στηρίζονται στην εκπληκτική εξειδίκευση των αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες-στόχους. Σημασμένα αντισώματα παρέχουν τον τρόπο παρακολούθησης μιας πρωτεΐνης κατά την απομόνωση, την ποσοτικοποίηση ή την κυτταρική της εμφάνιση.

4.3.1 Μπορούν να παραχθούν αντισώματα για ειδικές πρωτεΐνες

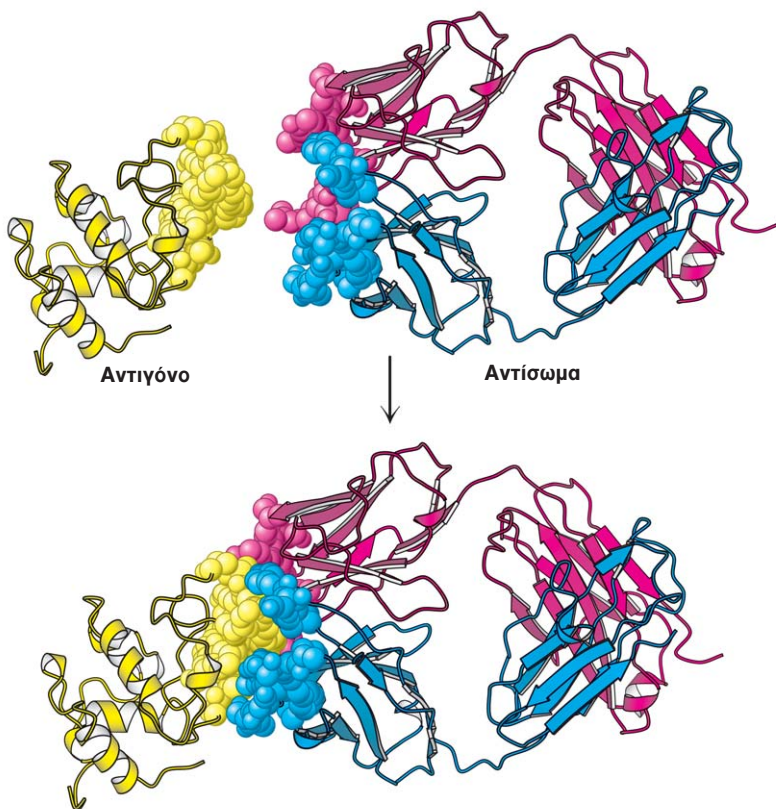
Οι ανοσολογικές τεχνικές αρχίζουν με τη δημιουργία αντισωμάτων για την πρωτεΐνη. Ένα *αντίσωμα* (που λέγεται και *ανοσοσφαιρίνη*, *immunoglobulin = Ig*) είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται σε ένα ζώο ως αντίδραση στην ύπαρξη μιας ξένης ουσίας που λέγεται *αντιγόνο*. Η φυσιολογική λειτουργία των αντισωμάτων αφορά την προστασία του ζώου από λοιμώξεις (Κεφάλαιο 33). Τα αντισώματα έχουν ειδική συγγένεια για τα αντιγόνα που προκάλεσαν τη σύνθεσή τους. Οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι πολύ αποτελεσματικά αντιγόνα. Η ομάδα που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα λέγεται *αντιγονικός προσδιοριστής* (antigenic determinant) ή *επίτοπος* (epitope) (Εικόνες 4.30 και 4.31). Μικρά ξένα μόρια, όπως π.χ. συνθετικά πεπτίδια, είναι επίσης ικανά να προκαλέσουν την ενεργοποίηση αντισωμάτων με την προϋπόθεση να περιέχουν έναν επίτοπο και να είναι δεσμευμένα σε έναν μακρομοριακό φορέα. Το μικρό ξένο μόριο ονομάζεται *απτένιο*. Τα ζώα έχουν μεγάλη ποικιλία κυττάρων που παράγουν αντισώματα και το κάθε κύτταρο παράγει αντισώματα μιας εξειδίκευσης. Ένα αντιγόνο λειτουργεί με το να ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό μικρού αριθμού κυττάρων που ήδη συνθέτουν αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντιγόνο (Κεφάλαιο 33).



ΕΙΚΟΝΑ 4.30 Δομή αντισώματος.

(Α) Τα αντισώματα IgG (ανοσοσφαιρίνης Γ) αποτελούνται από τέσσερις αλυσίδες, δύο βαριές αλυσίδες (μπλε) και δύο ελαφριές αλυσίδες (κόκκινες), που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα ενώνονται και δίνουν τη δομική περιοχή F_{ab} που έχει τις θέσεις δέσμευσης αντιγόνου στα άκρα της. Οι δύο βαριές αλυσίδες σχηματίζουν τη δομική περιοχή F_c . Οι δομικές περιοχές F_{ab} ενώνονται με τη δομική περιοχή F_c με εύκαμπτες αρθρώσεις. (Β) Το μόριο IgG σε πιο σχηματική μορφή.

Οι ανοσολογικές τεχνικές στηρίζονται στην ικανότητά μας να παράγουμε αντισώματα εναντίον ενός ειδικού αντιγόνου. Για την παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν μια ειδική πρωτεΐνη κάνουμε ένεση της πρωτεΐνης σε κουνέλι δύο φορές μέσα σε 3 εβδομάδες. Η ένεση της πρωτεΐνης ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που παράγουν αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν την ξένη ουσία. Αρκετές εβδομάδες αργότερα παίρνουμε αίμα από το ανοσοποιημένο κουνέλι, το φυγοκεντρούμε και διαχωρίζουμε τα κύτταρα από το υπερκείμενο ή ορό. Ο ορός, που λέγεται *αντιορός*, περιέχει αντισώματα για όλα τα αντιγόνα που έχουν ενεθεί στο κουνέλι. Μόνο ένα μέρος από αυτά θα αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη που ενέθηκε. Πρέπει επίσης να κατανοήσουμε ότι όλα τα αντισώματα που αναγνωρίζουν μια πρωτεΐνη δεν είναι ίδια. Παραδείγματος χάριν, η 2,4-δινιτροφαινόλη (DNP) χρησιμοποιήθηκε ως απτένιο για τη δημιουργία αντισωμάτων. Αναλύσεις των αντισωμάτων DNP έδειξαν ότι η ικανότητά τους να δεσμεύουν το απτένιο καλύπτει ένα ευρύ φάσμα τιμών με σταθερές διάστασης από 0,1 nM έως 1 μM. Αντίστοιχα, πολλές ζώνες εμφανίστηκαν όταν τα αντισώματα DNP υπέστησαν ισοηλεκτρικό εστιασμό. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά του γεγονότος ότι τα κύτταρα παράγουν πολ-



λά διαφορετικά αντισώματα, το κάθε ένα από τα οποία αναγνωρίζει ένα διαφορετικό στοιχείο στην επιφάνεια του ίδιου αντιγόνου. Τα αντισώματα είναι ετερογενή ή *πολυκλωνικά* (Εικόνα 4.32). Αυτή η πολυκλωνικότητα είναι ένας φραγμός που μπορεί να περιπλέξει τη χρήση των αντισωμάτων.

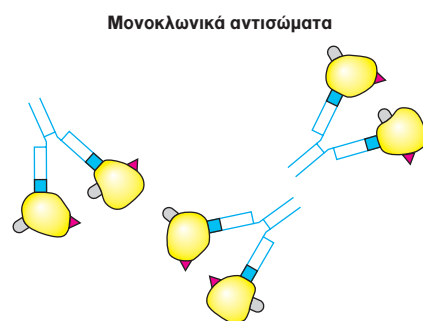
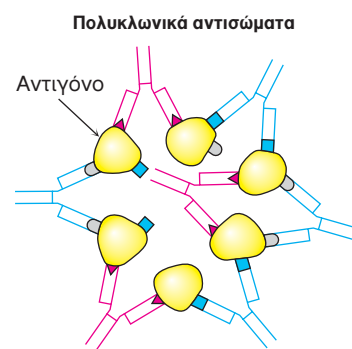
4.3.2 Μπορούμε να παράγουμε μονοκλωνικά αντισώματα με όποια εξειδίκευση θέλουμε

Η ανακάλυψη ενός τρόπου παραγωγής *μονοκλωνικών αντισωμάτων*, με όποια εξειδίκευση επιθυμούμε, έφερε επανάσταση στη χρήση των ανοσολογικών τεχνικών. Όπως η χρήση μη καθαρής πρωτεΐνης έτσι και η χρήση μείγματος αντισωμάτων δυσκολεύει την ερμηνεία δεδομένων και την κατανόηση της λειτουργίας. Θα ήταν ιδανικό να μπορούσαμε να έχουμε έναν κλώνο κυττάρων που παράγουν μόνο έναν τύπο αντισώματος. Το πρόβλημα είναι ότι κύτταρα που παράγουν αντισώματα δεν διατηρούνται έξω από τον οργανισμό, διότι πεθαίνουν σε μικρό χρονικό διάστημα.

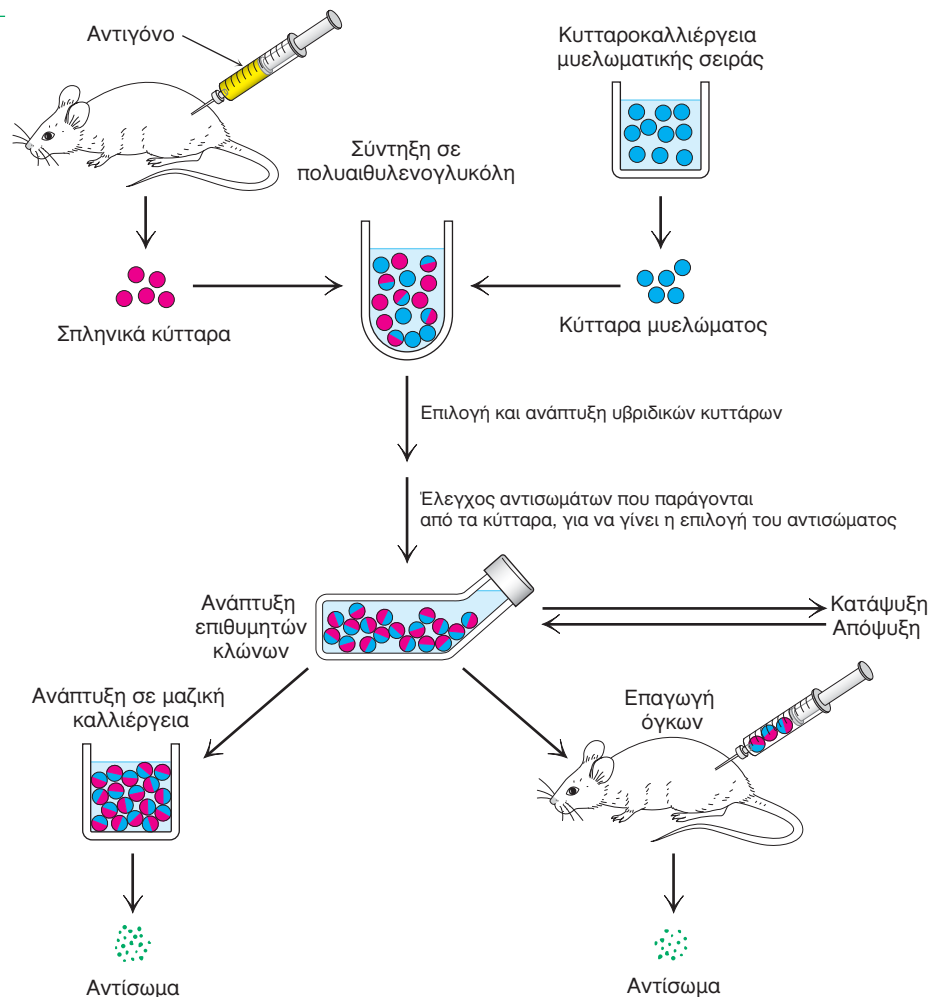
Ωστόσο, υπάρχουν αθάνατες κυτταρικές σειρές που παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα. Οι σειρές αυτές προέρχονται από μια μορφή καρκίνου, το *πολλαπλό μυέλωμα*, μια κακοήγη διαταραχή των κυττάρων που παράγουν αντισώματα. Στον καρκίνο αυτόν, ένα μετασχηματισμένο πλασματοκύτταρο πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα, με αποτέλεσμα την τεράστια παραγωγή ενός μόνου τύπου κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν κλώνο διότι προέρχονται από το ίδιο κύτταρο και έχουν τις ίδιες ιδιότητες. Αυτά τα απολύτως ίδια κύτταρα του μυελώματος εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες φυσιολογικής *ανοσοσφαιρίνης* ενός και μόνου τύπου από γενεά σε γενεά. Ένα μυέλωμα μπορεί να μεταμοσχευθεί από τον έναν ποντικό στον άλλο, όπου εξακολουθεί να πολλαπλασιάζεται. Τα αντισώματα αυτά αποδείχθηκαν ιδιαίτερα χρήσιμα για την ανάλυση της δομής τους, αλλά επειδή δεν ξέραμε τίποτε για την εξειδίκευσή τους, δεν είχαν καμία χρησιμότητα για τις μεθόδους που περιγράφονται στις επόμενες σελίδες.



ΕΙΚΟΝΑ 4.31 Αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος. Μια πρωτεΐνη-αντιγόνο, στην περίπτωση αυτή η λυσοζύμη, δεσμεύεται στο ένα άκρο της δομικής περιοχής F_{ab} ενός αντισώματος. Το άκρο του αντισώματος και του αντιγόνου έχουν συμπληρωματικό σχήμα, επιτρέποντας την κάλυψη ενός μεγάλου τμήματος της επιφάνειας και των δύο μορίων μετά τη δέσμευση.



ΕΙΚΟΝΑ 4.32 Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα περισσότερα αντιγόνα έχουν αρκετούς επιτόπους. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι ετερογενή μείγματα αντισωμάτων, το κάθε ένα ειδικό για έναν από τους επιτόπους ενός αντιγόνου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι όλα ίδια και παράγονται από κλώνους ενός μοναδικού αρχικού κυττάρου-παραγωγού. Αναγνωρίζουν έναν και μόνο επίτοπο. [Κατά R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W.H. Freeman and Company, 2000) p. 154.]



ΕΙΚΟΝΑ 4.33 Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα υβριδωματικά κύτταρα δημιουργούνται από τη σύντηξη κυττάρων που παράγουν αντισώματα και κυττάρων μυελώματος. Τα υβριδικά κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε υλικό επιλογής. Τελικά ελέγχονται για να επιλεγούν εκείνα που παράγουν αντισώματα της ειδικότητας που επιθυμούμε. [Κατά C. Milstein. *Monoclonal antibodies*. © 1980 by Scientific American, Inc. All rights reserved.]

Οι Cesar Milstein και Georges Köhler ανακάλυψαν ότι *αν δημιουργηθεί μια σύντηξη ενός βραχύβιου κυττάρου που παράγει ένα αντίσωμα και ενός αθάνατου κυττάρου μυελώματος, τότε μπορούμε να έχουμε μεγάλες ποσότητες ομοιογενούς αντισώματος οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης*. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη: Εισάγουμε με ένεση το αντιγόνο σε έναν ποντικό και αρκετές εβδομάδες αργότερα παίρνουμε τον σπλήνα του (Εικόνα 4.33). Ένα μείγμα πλασματοκυττάρων αυτού του σπλήνα και κυττάρων μυελώματος συντηκονται *in vitro*. Το κάθε ένα από τα υβριδικά κύτταρα που προκύπτουν και ονομάζονται *υβριδωματικά κύτταρα* παράγει το αντίσωμα που καθορίζεται από το σπληνικό κύτταρο με το οποίο ενώθηκε και μάλιστα η παραγωγή συνεχίζεται επ' άπειρον και σε μεγάλες ποσότητες. Τα υβριδωματικά κύτταρα ελέγχονται στη συνέχεια με κάποια δοκιμασία αντιγόνου-αντισώματος για να προσδιοριστούν εκείνα που έχουν την επιθυμητή εξειδίκευση. Οι ομάδες των κυττάρων που φαίνονται να παράγουν τα επιθυμητά αντισώματα υποκλωνοποιούνται και ελέγχεται και πάλι η παραγωγή ειδικού αντισώματος. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου επιτύχουμε μια καθαρή καλλιέργεια, δηλαδή έναν κλώνο που παράγει ένα μόνο αντίσωμα. Τα θετικά κύτταρα που επιλέχθηκαν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό, ή να ενεθούν σε ποντικούς και να επάγουν τη δημιουργία μυελώματος. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να καταψυχθούν και έτσι να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Η μέθοδος των υβριδωμάτων η οποία επιτρέπει την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων άνοιξε καινούργιους ορίζοντες στη βιολογία και την ιατρική. *Μεγάλες ποσότητες ομοιογενούς αντισώματος οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης μπορούν να παραχθούν με τη μέθοδο αυτή. Είναι οι πηγές οξυδερκούς κατανόησης της σχέσης μεταξύ δομής αντισώματος και εξειδίκευσης. Τα μονοκλω-*

νικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη ως αναλυτικά και παρασκευαστικά αντιδραστήρια απόλυτης εξειδίκευσης. Παραδείγματος χάριν, μπορεί να παρασκευαστεί αντίσωμα για αντιγόνο που δεν έχει απομονωθεί ακόμη (Υποκεφάλαιο 4.4). Πολλές πρωτεΐνες που καθορίζουν την αναπτυξιακή διεργασία απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα σαν ετικέτες (Εικόνα 4.34). Μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα σε στερεά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στήλες συγγένειας για να καθαριστούν σπάνιες πρωτεΐνες. Με τη μεθοδολογία αυτή απομονώθηκε η ιντερφερόνη (μια αντι-ική πρωτεΐνη) με απόδοση καθαρότητας 5000 φορές σε σχέση με το αρχικό εκχύλισμα. Τα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν τα μονοκλωνικά αντισώματα σε πολλές δοκιμασίες. Παραδείγματος χάριν, όταν ισοένζυμα της καρδιάς ανιχνεύονται στο αίμα τότε έχουμε ενδείξεις καρδιακής προσβολής. Οι μεταγγίσεις αίματος έγιναν ασφαλέστερες με τον έλεγχο του αίματος του δότη για τους ιούς της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS), της ηπατίτιδας και άλλων λοιμωδών νοσημάτων. Μονοκλωνικά αντισώματα δοκιμάζονται επίσης ως πιθανά θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Ακόμη, η τεράστια ποικιλία εξειδίκευσης που προσφέρουν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν καταλυτικά αντισώματα με νέες ιδιότητες που δεν βρίσκονται στα ένζυμα που υπάρχουν στη φύση.



ΕΙΚΟΝΑ 4.34 Φωτομικρογραφία φθορισμού ενός αναπτυσσόμενου εμβρύου *Drosophila*. Το έμβryo έχει χρωματιστεί με φθορίζον μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη του γονιδίου *engrailed* που είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA. Το γονίδιο είναι απαραίτητο για τον καθορισμό του σχεδιασμού του σώματος. [Ευγενική προσφορά Dr. Nipam Patel και Dr. Corey Goodman.]

4.3.3 Οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνεύονται και να ποσοτικοποιούνται με τη χρήση ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης

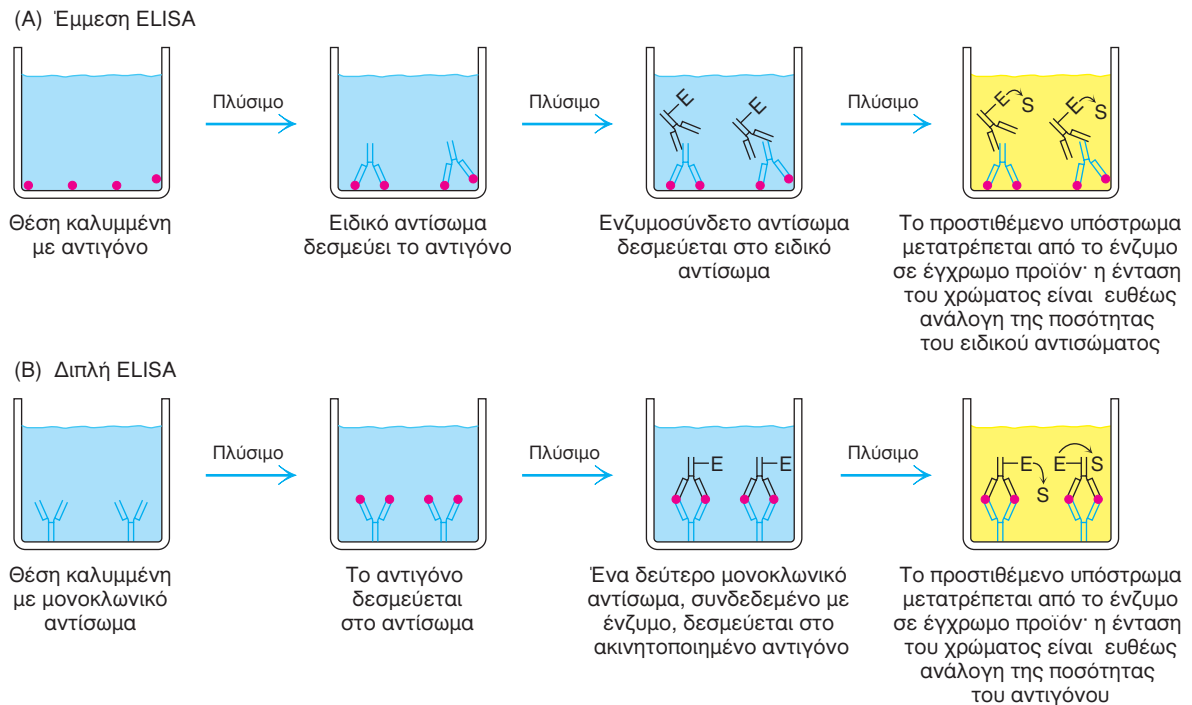
Τα αντισώματα παρέχουν εξαιρετική εξειδίκευση ως αντιδραστήρια καθορισμού της ποσότητας μιας πρωτεΐνης ή κάποιου άλλου αντιγόνου. Η τεχνική λέγεται *ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση* (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Με την τεχνική αυτή, ένα ένζυμο που αντιδρά με ένα άχρωμο υπόστρωμα και παράγει ένα έγχρωμο προϊόν συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα αντιγόνο-στόχο. Αν υπάρχει αντιγόνο τότε το σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου θα δεσμευθεί σε αυτό και το ένζυμο θα καταλύσει την αντίδραση παράγοντας το χρωμοφόρο προϊόν. Επομένως, η παρουσία του χρωμοφόρου προϊόντος καθορίζει την ύπαρξη του αντιγόνου. Μια τέτοια μέτρηση, γρήγορη και ευαίσθητη μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες πρωτεΐνης μικρότερες από ένα νανογραμμάριο (10^{-9} g). Η ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα, η χρήση όμως μονοκλωνικών αντισωμάτων παρέχει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.



Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι ELISA. Θα εξετάσουμε δύο από αυτούς. Ο έμμεσος τύπος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ύπαρξης αντισώματος και αποτελεί τη βάση της δοκιμασίας ανίχνευσης του ιού HIV. Στην περίπτωση αυτή, πρωτεΐνες από τον πυρήνα του ιού (τα αντιγόνα) προσκολλώνται στον πυθμένα του πλακιδίου. Αντισώματα από τον ασθενή προστίθενται στο επιστρωμένο πλακίδιο και επωάζονται με το αντιγόνο. Τελικά, ενζυμοσύνδετα αντισώματα που αναγνωρίζουν ανθρώπινα αντισώματα (π.χ. αντισώματα αίγας που δημιουργήθηκαν με αντιγόνο ανθρώπινα αντισώματα) επωάζονται στο πλακίδιο και όσα μένουν ασύνδετα ξεπλένονται. Στο τέλος τοποθετείται το υπόστρωμα. Η ενζυμική αντίδραση που τελικά παρατηρείται υποδηλώνει ότι τα ενζυμοσύνδετα αντισώματα δεσμεύθηκαν στα ανθρώπινα αντισώματα και συνεπώς ο ασθενής είχε αντισώματα προς τα ιικά αντιγόνα (Εικόνα 4.35).

Ο δεύτερος τύπος ονομάζεται διπλή (sandwich) ELISA και επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του αντιγόνου. Αντισώματα για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο προσκολλώνται στον πυθμένα του πλακιδίου. Στη συνέχεια το αντιγόνο (ή αίμα ή ούρα που περιέχουν το αντιγόνο) προστίθεται στο πλακίδιο και το τυχόν αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα. Τελικά, ένα δεύτερο, δια-

φορετικό αντίσωμα για το ίδιο αντιγόνο προστίθεται στο πλακίδιο. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένζυμο και επομένως ακολουθείται η μεθοδολογία που μόλις περιγράψαμε για τον έμμεσο τύπο ELISA. Στην περίπτωση αυτή η αντίδραση δίνει αποτελέσματα ανάλογα της ποσότητας του αντιγόνου. Κατά συνέπεια επιτρέπει τη μέτρηση μικρών ποσοτήτων αντιγόνου (Εικόνα 4.35).



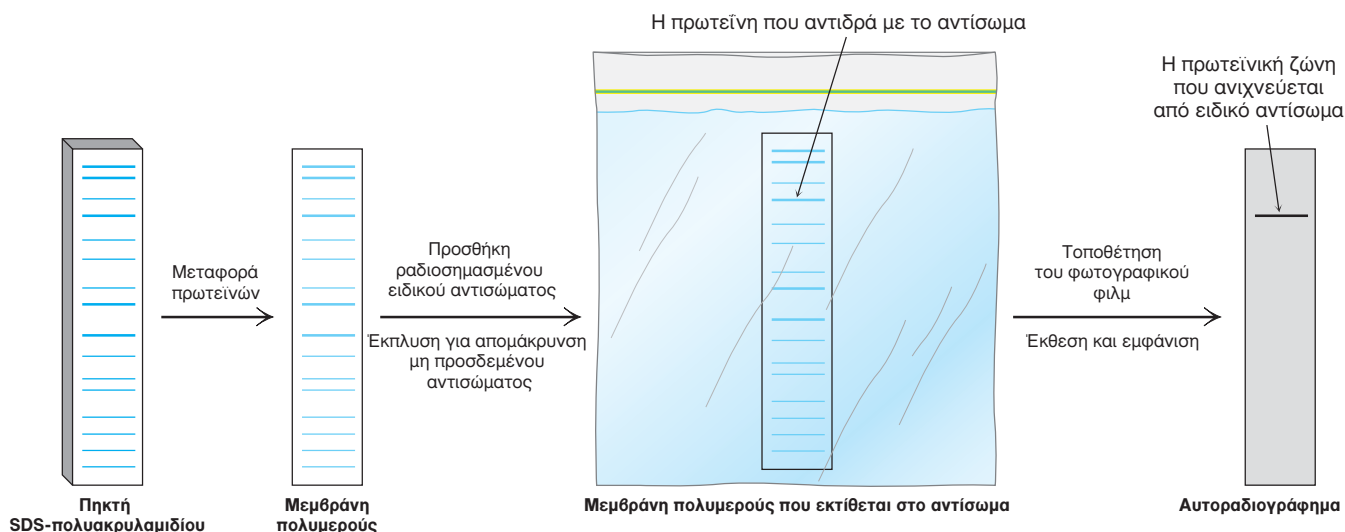
ΕΙΚΟΝΑ 4.35 Ανίχνευση με την τεχνική ELISA. (A) Έμμεση ELISA. (B) Διπλή (sandwich) ELISA.

(A) Στην έμμεση ELISA, το χρώμα οφείλεται στην ύπαρξη του αντισώματος που αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο. Η ένταση του χρώματος εξαρτάται από την ποσότητα του αντισώματος. (B) Στη διπλή ELISA, το χρώμα οφείλεται στην ύπαρξη αντιγόνου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου. [Κατά R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W.H. Freeman and Company, 2000), p. 162.]

4.3.4 Η ανοσοαποτύπωση επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική

Συχνά απαιτείται η ανίχνευση μικρής ποσότητας πρωτεΐνης μέσα από ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών, όπως στην περίπτωση ύπαρξης κάποιας ικτής πρωτεΐνης στο αίμα. Πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε ένα κύτταρο ή κυτταρικό υγρό μπορούν να ανιχνευθούν με μια τεχνική ανοσομέτρησης που λέγεται *ανοσοαποτύπωση* ή *αποτύπωση Western* (Western blotting) (Εικόνα 4.36). Ένα δείγμα ηλεκτροφορείται σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμίδου (Εικόνα 4.36). Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται στην πηκτική μεταφέρονται (με αποτύπωση, συνήθως ηλεκτροαποτύπωση) σε μια επιφάνεια που τις κάνει να αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο (π.χ. αντίσωμα αίγας που αναγνωρίζει αντίσωμα ποντικού). Μια ραδιενεργός σήμανση του δεύτερου αντισώματος δημιουργεί μια σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιογράφημα). Εναλλακτικά, ένα ένζυμο επάνω στο δεύτερο αντίσωμα δημιουργεί ένα έγχρωμο (και αδιάλυτο στο νερό, στην περίπτωση αυτή) προϊόν, όπως στην ELISA. Η απο-

τύπωση Western καθιστά δυνατή την ανεύρεση μιας πρωτεΐνης σε ένα πολύπλοκο μείγμα, όπως η βελόνα στα άχυρα της γνωστής παροιμίας. Αυτή είναι η βάση της τεχνικής ανίχνευσης του ιού ηπατίτιδας C όπου η πρωτεΐνη-στόχος βρίσκεται στον πυρήνα του ιού. Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την κλωνοποίηση των γονιδίων.

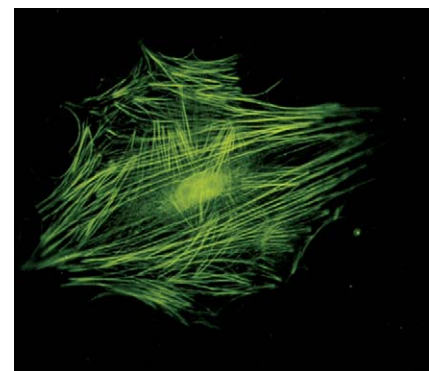


4.3.5 Φθορίζοντες δείκτες επιτρέπουν την παρατήρηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα

Η βιοχημεία συνήθως περιλαμβάνει παρατηρήσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή πηκτές πολυακρυλαμιδίου. Δεν πρέπει όμως να μας διαφεύγει το γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες λειτουργούν σε κύτταρα. Η ύπαρξη ανιχνευτών που φθορίζουν μας δίνει την ευκαιρία να τις μελετήσουμε στο φυσικό περιβάλλον τους. Παραδείγματος χάριν, τα κύτταρα μπορούν να χρωματιστούν με αντισώματα που φθορίζουν και να αναλυθούν με *μικροσκόπιο φθορισμού* για να αποκαλύψουν τη θέση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν. Σειρές από παράλληλες δέσμες εμφανίζονται σε κύτταρα που χρωματίζονται με αντίσωμα ειδικό για ακτίνη, μια πρωτεΐνη που πολυμερίζεται σε νημάτια (Εικόνα 4.37). Τα νημάτια της ακτίνης είναι συστατικά του κυτταρικού σκελετού που ρυθμίζει το σχήμα και τη μετακίνηση των κυττάρων. Παρατηρώντας τη θέση της πρωτεΐνης, οι φθορίζοντες δείκτες μας δίνουν και ενδείξεις για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Παραδείγματος χάριν, ο πρωτεϊνικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι παράγοντας μεταγραφής και ρυθμίζει τη γονδιακή έκφραση ανταποκρινόμενος στη στεροειδή ορμόνη κορτιζόνη. Ο υποδοχέας συνδέθηκε με την *πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη* (green fluorescent protein, GFP) που είναι φυσική πρωτεΐνη της μέδουσας *Aequorea victoria* (Εδάφιο 3.6.5). Το μικροσκόπιο φθορισμού έδειξε ότι, όταν δεν υπάρχει ορμόνη, ο υποδοχέας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 4.38A), ενώ με την προσθήκη του στεροειδούς ο υποδοχέας μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και δεσμεύεται στο DNA (Εικόνα 4.38B).

Η καλύτερη διαχωριστική ικανότητα του μικροσκοπίου φθορισμού είναι περίπου 0,2 μm (200 nm ή 2.000 Å) λόγω του μήκους κύματος του ορατού φωτός. Ακόμη καλύτερη τοπική ανάλυση μπορεί να επιτευχθεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας αντισώματα σημασμένα με δείκτες μεγάλης ηλεκτρονικής πυκνότητας. Παραδείγματος χάριν, ο συνδυασμός φερριτίνης με αντίσωμα μπορεί να εμφανιστεί εύκολα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διότι περιέχει έναν πυρήνα υδροξειδίου του σιδήρου που έχει μεγάλη πυκνότητα ηλεκτρονίων. Συσσωματώματα χρυσού μπορούν επίσης να συζευ-

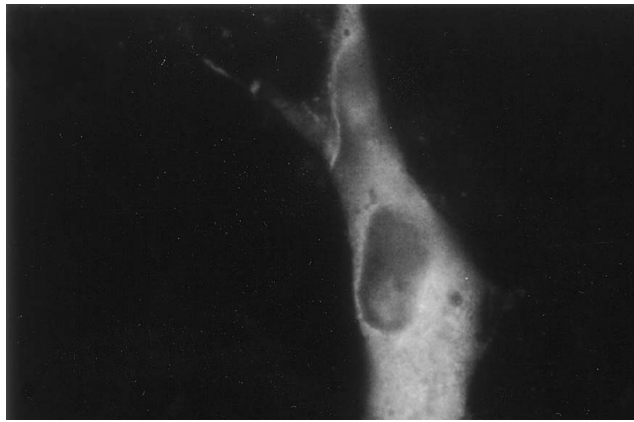
ΕΙΚΟΝΑ 4.36 Αποτύπωση Western. Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν σε μια πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται σε μεμβράνη πολυμερούς και σημαίνονται με ραδιοενεργό αντίσωμα. Η πρωτεΐνη επάνω στην οποία δεσμεύεται το αντίσωμα εμφανίζεται σαν μια ζώνη στο αυτοραδιογράφημα.



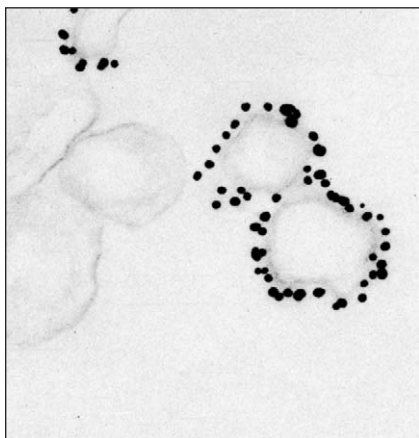
ΕΙΚΟΝΑ 4.37 Τα νημάτια της ακτίνης. Τα νημάτια της ακτίνης, στη φωτομικρογραφία φθορισμού του κυττάρου, έχουν εμφανιστεί λόγω χρώσης με ένα αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη. [Ευγενική προσφορά Dr. Ηλία Λαζαρίδη.]

ΕΙΚΟΝΑ 4.38 Πυρηνικός εντοπισμός ενός υποδοχέα στεροειδών. (Α) Ο υποδοχέας γίνεται ορατός διότι έχει προστεθεί σε αυτόν πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Στις συνθήκες αυτές βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των καλλιεργούμενων κυττάρων. (Β) Όταν προσθέσουμε στο καλλιεργητικό υλικό των κυττάρων κορτικοστερόνη (γλυκοκορτικοειδές στεροειδές) ο υποδοχέας μετακινείται στον πυρήνα. [Ευγενική προσφορά Prof. William B.Pratt/ Department of Pharmacology, University of Michigan.]

(A)



(B)



ΕΙΚΟΝΑ 4.39 Ανοσοκυτταροχημεία με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα αδιαφανή σωματίδια (διαμέτρου 150 Å, ή 15 nm) στην ηλεκτρονιομικρογραφία αυτή είναι συσσωματώματα ατόμων χρυσού συνδεδεμένων σε μόρια αντισώματος. Αυτά τα μεμβρανικά κυστίδια στις συνάψεις των νευρώνων περιέχουν μια πρωτεΐνη-διάλυτο που αναγνωρίζεται από το συγκεκριμένο αντίσωμα. [Ευγενική προσφορά Dr. Peter Sargent.]

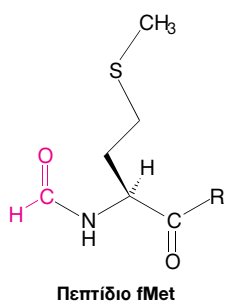
χθούν με αντισώματα και να γίνουν ορατά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η ανοσοκυτταροχημεία με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να προσδιορίσει τη θέση αντιγόνων με ακρίβεια 10 nm (100 Å) ή και μεγαλύτερη (Εικόνα 4.39).

4.4 ΜΠΟΡΟΥΜΕ ΝΑ ΣΥΝΘΕΤΟΥΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Η δυνατότητα να συνθέτουμε πεπτίδια με καθορισμένη αλληλουχία αποτελεί μια αποτελεσματική τεχνική διεύρυνσης της βιοχημικής ανάλυσης για πολλούς λόγους.

1. Τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα και να ενεργοποιήσουν τη σύνθεση ειδικών αντισωμάτων. Παραδείγματος χάριν, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τις περισσότερες φορές είναι πιο απλό να έχουμε μια πεπτιδική αλληλουχία απευθείας από την αλληλουχία του DNA παρά από τον προσδιορισμό της ίδιας της αλληλουχίας στην πρωτεΐνη (βλ. και το Κεφάλαιο 6). Τα πεπτίδια μπορούν να συντεθούν με βάση την αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων και στη συνέχεια μπορούμε να δημιουργήσουμε αντισώματα που έχουν στόχο τα πεπτίδια αυτά. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την απομόνωση της ανέπαφης πρωτεΐνης από το κύτταρο.

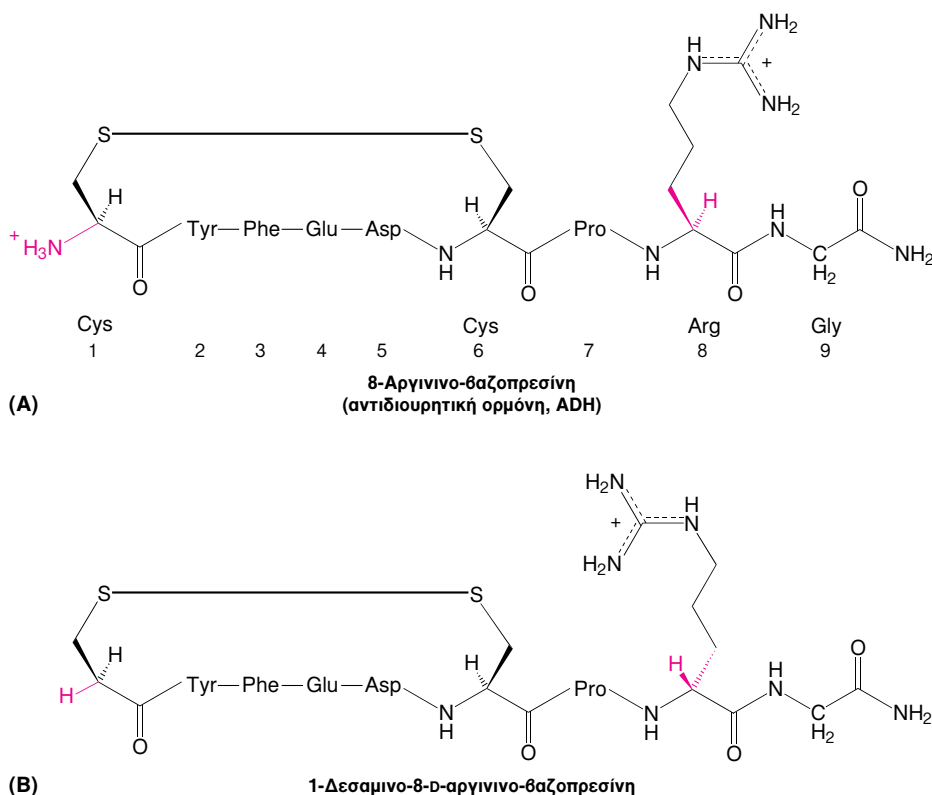
2. Τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να απομονωθούν υποδοχείς πολλών ορμονών και άλλων σηματοδοτικών μορίων. Παραδείγματος χάριν, τα λευκά αιμοσφαίρια έλκονται από τα βακτήρια λόγω των φορμυλομεθειονυλοπεπτιδίων (πεπτιδίων fMet) που απελευθερώνονται από τη διάσπαση των βακτηριακών πρωτεϊνών. Τα συνθετικά φορμυλομεθειονυλοπεπτίδια χρησιμο-



ποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των κυτταρικών υποδοχέων για την τάξη αυτή των πεπτιδίων. Επιπλέον, συνθετικά πεπτίδια μπορούν να προσδεθούν σε κόκκους αгарόζης και έτσι να δημιουργηθούν στήλες χρωματογραφίας για τον καθαρισμό των πρωτεϊνικών υποδοχέων που αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα πεπτίδια.



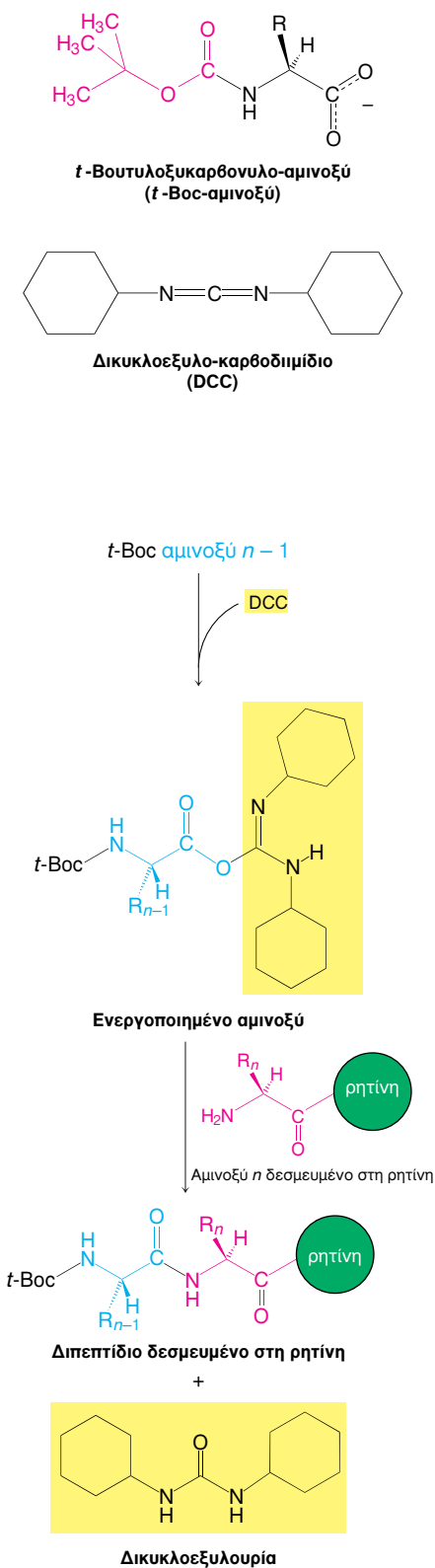
3. Τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα. Η βαζοπρεσίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που ενεργοποιεί την επαναρρόφηση του νερού στα αθροιστικά σωληνάκια των νεφρών, οδηγώντας στον σχηματισμό πιο πυκνών ούρων. Οι ασθενείς που υποφέρουν από άποιο διαβήτη έχουν ανεπάρκεια βαζοπρεσίνης (που ονομάζεται και αντιδιουρητική ορμόνη): έτσι, εκκρίνουν μεγάλους όγκους ούρων (περισσότερα από 5 λίτρα την ημέρα) και διψούν συνεχώς, λόγω της υπερβολικής απώλειας υγρών. Αυτή η ανεπάρκεια μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χορήγηση 1-δεσαμινο-8-D-αργινοβαζοπρεσίνης, ενός συνθετικού αναλόγου της ορμόνης που λείπει (Εικόνα 4.40). Αυτό το συνθετικό πεπτίδιο διασπάται *in vivo* πολύ πιο αργά από τη βαζοπρεσίνη και, επιπλέον, δεν αυξάνει την πίεση του αίματος.



ΕΙΚΟΝΑ 4.40 Βαζοπρεσίνη, φυσική και συνθετική. (A) Η Βαζοπρεσίνη, ή αντιδιουρητική ορμόνη, είναι μια πεπτιδική ορμόνη που ενεργοποιεί την επαναρρόφηση του νερού και (B) Το συνθετικό ανάλογο της ορμόνης είναι πιο σταθερό από τη φυσική ορμόνη. Το ανάλογο εδώ είναι: 1-δεσαμινο-8-D-αργινοβαζοπρεσίνη.

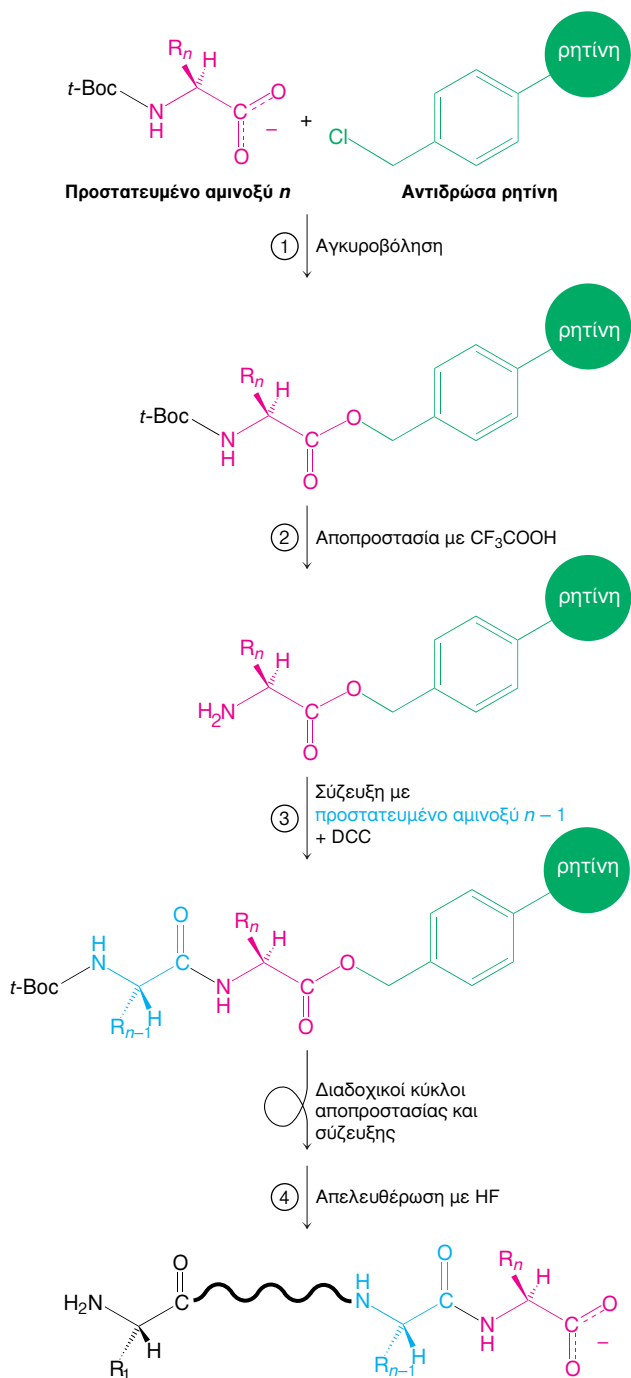
4. Τέλος, η μελέτη των συνθετικών πεπτιδίων μπορεί να βοηθήσει στον καθορισμό των κανόνων που διέπουν την τριδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Μπορούμε να ερευνήσουμε αν μια συγκεκριμένη αλληλουχία διαμορφώνεται σε α -έλικα, β -πτύχωση, ή στροφή φουρκέτας ή αν συμπεριφέρεται ως τυχαίο σπείραμα.

Πώς σχηματίζονται όμως τα πεπτίδια αυτά; Η αμινική ομάδα του ενός αμινοξέος πρέπει να αντιδράσει με την καρβοξυλική ομάδα του άλλου. Για να δημιουργηθεί όμως ένα και μόνο προϊόν πρέπει να υπάρχει μια μοναδική ελεύθερη αμινική ομάδα από το πρώτο αμινοξύ και μια μοναδική ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα από το δεύτερο αμινοξύ. Επομένως, μερικές ομάδες πρέπει να προστατευθούν ενώ άλλες να ενεργοποιηθούν, ώστε να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Η α -αμινική ομάδα του πρώτου αμινοξέος του πεπτιδίου προστατεύεται με *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλική (*t*-Boc) ομάδα, δίνοντας



ΕΙΚΟΝΑ 4.41 Ενεργοποίηση αμινοξέων. Το δικυκλοεξυλο-καρβοδιιμίδιο χρησιμοποιείται για να ενεργοποιήσει την καρβοξυλική ομάδα στον σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών.

t-Boc-αμινοξύ. Η καρβοξυλική ομάδα ενεργοποιείται με το αντιδραστήριο δικυκλοεξυλο-καρβοδιιμίδιο (DCC) όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.41. Η αντίδραση της ελεύθερης αμινικής ομάδας του επόμενου αμινοξέος με το ενεργό καρβοξύλιο οδηγεί στη δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού και την απελευθέρωση δικυκλοεξυλουρίας. Η καρβοξυλική ομάδα του διπεπτιδίου ενεργοποιείται με DCC και αντιδρά με την ελεύθερη αμινική ομάδα του τρίτου αμινοξέος του πεπτιδίου. Αυτό επαναλαμβάνεται μέχρις ότου σχηματιστεί όλο το πεπτίδιο. Στο τέλος της σύνθεσης τα πεπτίδια ξεπλένονται με αραιό οξύ και έτσι απομακρύνεται η προστατευτική *t*-Boc ομάδα του πρώτου αμινοξέος και το πεπτίδιο είναι έτοιμο.



ΕΙΚΟΝΑ 4.42 Πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης. Η σειρά των σταδίων στη σύνθεση στερεάς φάσης είναι: (1) δέσμευση του καρβοξυ-τελικού αμινοξέος, (2) αποπροστασία του αμινο-τελικού άκρου (3) σύνθεση του επόμενου αμινοξέος. Τα στάδια 2 και 3 επαναλαμβάνονται μετά από κάθε προσθήκη αμινοξέος. Τελικά στο στάδιο (4) όλο το πεπτίδιο απελευθερώνεται από τη ρητίνη.

Πεπτίδια που έχουν περισσότερα από 100 αμινοξέα είναι δυνατόν να συντεθούν με επαναλαμβανόμενους κύκλους των αντιδράσεων που περιγράψαμε. Η σύνδεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας επάνω σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα, όπως παραδείγματος χάριν κόκκοι πολυστυρολίου, δίνει ακόμη μεγαλύτερη απόδοση στη μέθοδο. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου στερεάς φάσης είναι ότι το προϊόν σε κάθε στάδιο είναι δεσμευμένο στους κόκκους και μπορεί να ξεπλυθεί· έτσι δεν υπάρχει ανάγκη να καθαριστούν τα ενδιάμεσα προϊόντα. Οι αντιδράσεις γίνονται σε ένα και μόνο δοχείο, επομένως δεν απαιτείται ενδιάμεση μεταφορά προϊόντων. Η πρώτη ομάδα που δεσμεύεται στο πολυστυρόλιο είναι το καρβοξυ-τελικό αμινοξύ του πεπτιδίου (Εικόνα 4.42). Η προστατευτική *t*-Boc ομάδα του αμινοξέος απομακρύνεται. Στη συνέχεια προστίθεται το επόμενο αμινοξύ (στην προστατευμένη *t*-Boc μορφή) μαζί με το δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο, που είναι το αντιδραστήριο σύνδεσης. Όταν σχηματιστεί ο πεπτιδικός δεσμός, η περίσσεια των αντιδραστηρίων και του δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου ξεπλένεται και αυτό αφήνει τους κόκκους με το επιθυμητό διπεπτιδιο-προϊόν. Τα επόμενα αμινοξέα προστίθενται με την ίδια διαδικασία. Στο τέλος της σύνθεσης, τα πεπτίδια απελευθερώνονται με την προσθήκη υδροφθορικού οξέος (HF) που διασπά τον καρβοξυλικό εστέρα, ο οποίος είναι η άγκυρα, χωρίς να διαταράσσει τους πεπτιδικούς δεσμούς. Την ίδια στιγμή απομακρύνονται επίσης προστατευτικές ομάδες σε πιθανές πλευρικές αλυσίδες, όπως εκείνες της λυσίνης. Αυτός ο κύκλος των αντιδράσεων μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί, πράγμα που καθιστά δυνατή τη σύνθεση πεπτιδίων που περιέχουν 50 κατάλοιπα με καλή απόδοση και καθαρότητα σε βάση ρουτίνας. Πράγματι, ο Merrifield συνέθεσε ιντερφερόνη (155 κατάλοιπα) με αντι-ιική δράση και ριβονουκλεάση (124 κατάλοιπα) με καταλυτική δραστηριότητα.

4.5 Η ΤΡΙΔΙΑΣΤΑΤΗ ΔΟΜΗ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΚΑΘΟΡΙΣΤΕΙ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR) ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

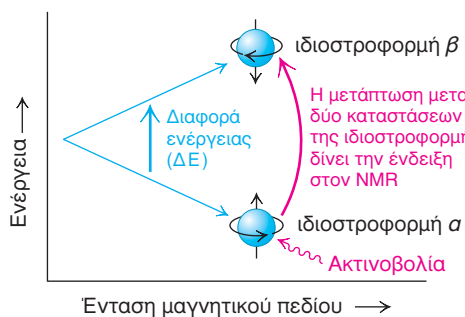
Ένα βασικό ερώτημα είναι: Πώς μοιάζει η τριδιάστατη δομή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης; Η δομή μιας πρωτεΐνης καθορίζει και τη λειτουργία της, δεδομένου ότι η εξειδίκευση των ενεργών θέσεων και των θέσεων δέσμευσης εξαρτάται από τις μεταξύ τους αποστάσεις στον χώρο. Δύο από τις πιο σημαντικές τεχνικές που έχουμε στη διάθεσή μας για την αποκάλυψη της πρωτεϊνικής δομής είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και η κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ.

4.5.1 Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μπορεί να αποκαλύψει τις δομές των πρωτεϊνών σε διάλυμα

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) είναι μοναδική στον καθορισμό της ατομικής δομής μακρομορίων σε διάλυμα, με την προϋπόθεση ότι διαθέτουμε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης (~ 1 mM, ή 15 mg ml⁻¹ για μια πρωτεΐνη 15 kd). Η τεχνική στηρίζεται στη φυσική ιδιότητα των πυρήνων συγκεκριμένων ατόμων να έχουν μαγνητικές ιδιότητες. Μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ισότοπων εμφανίζουν την ιδιότητα αυτή, η οποία ονομάζεται *ιδιοστροφορμή* (spin) και τα πιο σημαντικά από αυτά τα ισότοπα αναγράφονται στον Πίνακα 4.4. Το απλούστερο παράδειγμα είναι η περίπτωση του πυρήνα του υδρογόνου (¹H) που είναι ένα πρωτόνιο. Η περιστροφή ενός πρωτονίου δημιουργεί μαγνητική ροπή. Η ροπή αυτή μπορεί να πάρει έναν από τους δύο διαφορετικούς προσανατολισμούς ή καταστάσεις ιδιοστροφορμής, που λέγονται *α* και *β*, όταν βρεθεί υπό την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (Εικόνα 4.43). Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.4 Πυρήνες ατόμων με Βιολογική σημασία που δίνουν σήματα στον NMR.

| Πυρήνας | Αφθονία στη φύση (% του βάρους του στοιχείου) |
|------------------|---|
| ¹ H | 99,984 |
| ² H | 0,016 |
| ¹³ C | 1,108 |
| ¹⁴ N | 99,635 |
| ¹⁵ N | 0,365 |
| ¹⁷ O | 0,037 |
| ²³ Na | 100,0 |
| ²⁵ Mg | 10,05 |
| ³¹ P | 100,0 |
| ³⁵ Cl | 75,4 |
| ³⁹ K | 93,1 |



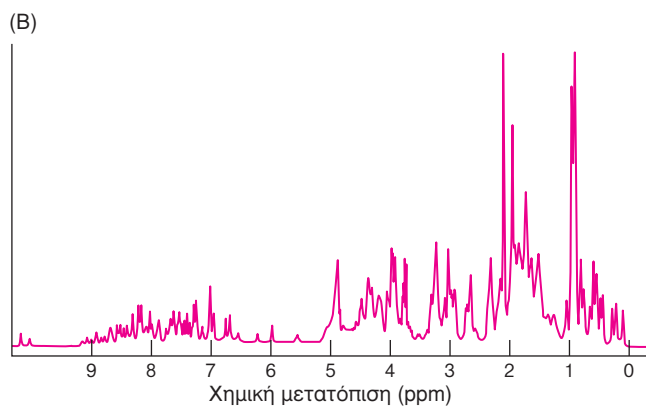
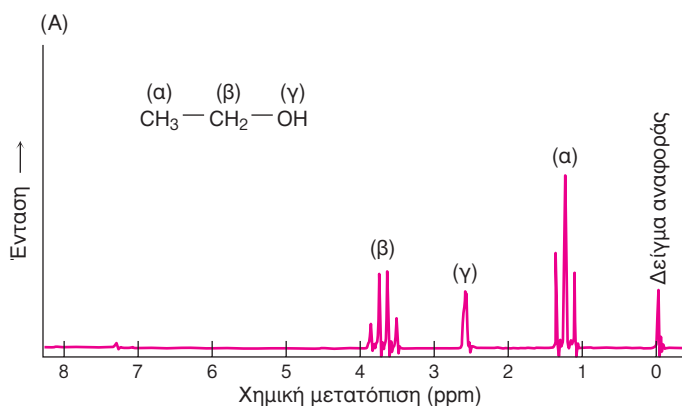
ΕΙΚΟΝΑ 4.43 Η Βασική Θεώρηση της φασματοσκοπίας NMR. Η ενέργεια των δύο προσανατολισμών του πυρήνα με τιμή ιδιοτροφορμής $1/2$ (όπως ^{31}P και ^1H) εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται. Η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκπέμπεται στην κατάλληλη συχνότητα επάγει τη μετάπτωση από το κάτω επίπεδο στο επάνω.

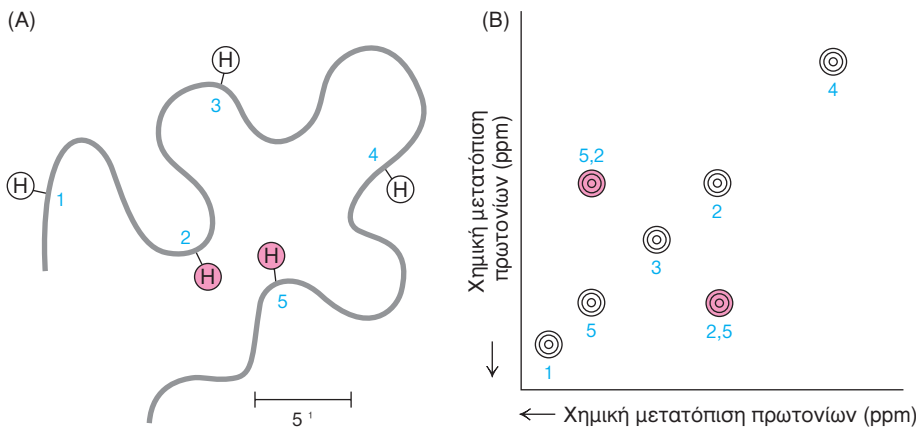
ΕΙΚΟΝΑ 4.44 Μονοδιάστατα φάσματα NMR.

(Α) Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ αιθανόλης ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) παρουσιάζει σαφή διαχωρισμό των χημικών μετατοπίσεων των υδρογόνων. (Β) Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για το θραύσμα πρωτεΐνης 55 αμινοξέων που συμμετέχει στο μάτισμα του RNA εμφανίζει μια πολύπλοκη εικόνα. Υπάρχουν πολλές κορυφές και πολλές μπορεί να συμπίπτουν. [(Α) Κατά C. Branden και J. Tooze, *Introduction to Protein Structure* (Garland, 1991), p. 280. (Β) Ευγενική προσφορά Barbara Amann και Wesley McDermott.]

δύο καταστάσεων είναι ανάλογη με την ένταση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Η κατάσταση α έχει ελαφρώς χαμηλότερη ενέργεια και επομένως είναι πιο πιθανή (κατά έναν παράγοντα 1,0001 σε ένα τυπικό πείραμα) διότι ευθυγραμμίζεται με το πεδίο. Ένα πρωτόνιο στην κατάσταση α μπορεί να βρεθεί στη διεγερμένη κατάσταση (κατάσταση β) όταν εφαρμόσουμε έναν παλμό ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (παλμό ραδιοσυχνότητας, RF) με την προϋπόθεση ότι η συχνότητα αντιστοιχεί στην ενεργειακή διαφορά των α και β . Κάτω από τις συνθήκες αυτές, η ιδιοτροφορμή θα μεταπέσει από την κατάσταση α στην κατάσταση β , δηλαδή θα έχουμε *συντονισμό* (resonance). Το φάσμα συντονισμού ενός μορίου καθορίζεται είτε με τη διατήρηση της συχνότητας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μεταβλητή ένταση μαγνητικού πεδίου είτε με τη διατήρηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου σε μεταβλητή συχνότητα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Τις ιδιότητες αυτές του πυρήνα του υδρογόνου μπορούμε να τις εκμεταλλευτούμε για να ερευνήσουμε το χημικό περιβάλλον του πυρήνα αυτού. Η ροή των ηλεκτρονίων γύρω από τον μαγνητικό πυρήνα δημιουργεί ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο που είναι αντίθετο με το εξωτερικά εφαρμοζόμενο πεδίο. Ο βαθμός της αντίστασης εξαρτάται από την περιβάλλουσα ηλεκτρονική πυκνότητα. Επομένως, οι πυρήνες θα αλλάξουν καταστάσεις ή θα συντονίζονται σε ελαφρώς διαφορετικές εντάσεις πεδίου ή συχνότητες ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Οι πυρήνες του διαταραγμένου δείγματος απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε μια συχνότητα που μπορεί να μετρηθεί. Οι διαφορετικές συχνότητες, που ονομάζονται *χημικές μετατοπίσεις* (chemical shifts), εκφράζονται σε κλασματικές μονάδες δ (μέρη ανά εκατομμύριο ppm) σε σχέση με τις μετατοπίσεις ενός στοιχείου αναφοράς όπως το υδατοδιαλυτό παράγωγο του τετραμεθυλοσιλενίου που προσθέτουμε μαζί με το δείγμα. Παραδείγματος χάριν, ένα πρωτόνιο της ομάδας $-\text{CH}_3$, έχει τυπικά χαρακτηριστική χημική μετατόπιση (δ) ίση με 1 ppm, ενώ ένα πρωτόνιο αρωματικής ομάδας έχει $\delta = 7$ ppm. Οι περισσότερες τιμές για χημική μετατόπιση πρωτονίων στις πρωτεΐνες βρίσκονται μεταξύ 0 και 9 ppm (Εικόνα 4.44). Με αυτή την τεχνική του *μονοδιάστατου NMR* μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα περισσότερα πρωτόνια στις πιο πολλές πρωτεΐνες. Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη πληροφορία μπορούμε, στη συνέχεια, να συμπεράνουμε αλλαγές για μια χημική ομάδα όταν αυτή βρεθεί κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Παραδείγματος χάριν, διαφορετικές συνθήκες θα εμφανιστούν αν αλλάξουμε το pH του διαλύματος μιας πρωτεΐνης και η συγκεκριμένη ομάδα βρεθεί από περιβάλλον ελεύθερου σπειράματος σε περιβάλλον α -έλικας.



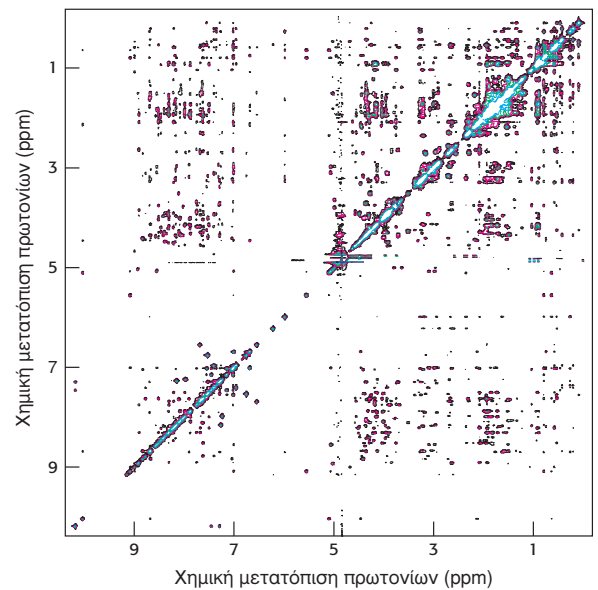


ΕΙΚΟΝΑ 4.45 Το πυρηνικό φαινόμενο

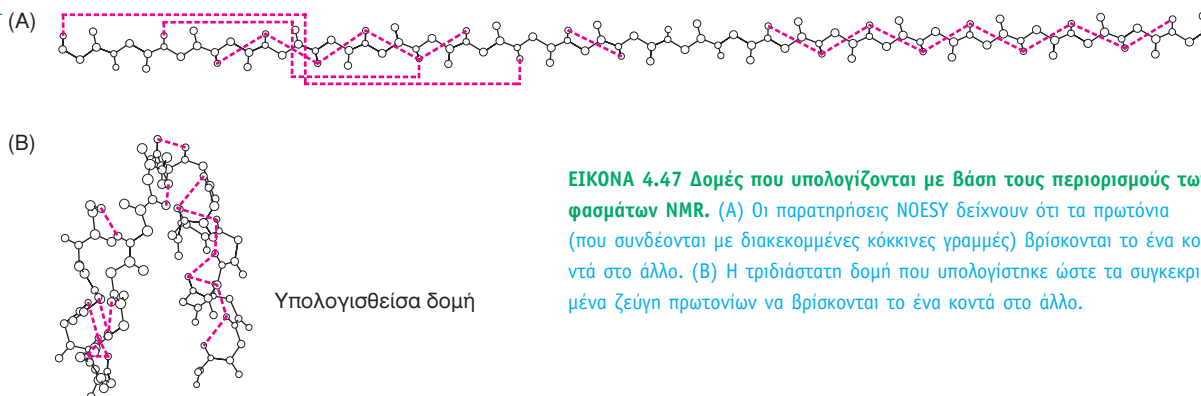
Overhauser. Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser ταυτοποιεί ζεύγη πρωτονίων που βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο. (A) Σχηματική απεικόνιση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας που χαρακτηρίζει πέντε συγκεκριμένα πρωτόνια. Τα πρωτόνια 2 και 5 βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο (~4 Å απόσταση), ενώ τα άλλα πρωτόνια είναι σε μεγαλύτερη απόσταση το ένα από το άλλο. (B) Ένα υπεραπλουστευμένο φάσμα NOESY. Τα πρωτόνια που είδαμε στο μέρος A εμφανίζονται ως οι πέντε κορυφές που σχηματίζουν μια διαγώνιο γραμμή. Οι άλλες δύο κορυφές, συμμετρικά επάνω και κάτω από τη διαγώνιο, αποκαλύπτουν ότι τα πρωτόνια 2 και 5 βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο.

Ακόμη περισσότερες πληροφορίες μπορούμε να αντλήσουμε εξετάζοντας τον τρόπο με τον οποίο οι ιδιοτροφορμές διαφόρων πρωτονίων επηρεάζουν τα γειτονικά τους πρωτόνια. Στις μελέτες αυτές επάγουμε τον μαγνητισμό ενός δείγματος εφαρμόζοντας παλμό συγκεκριμένης ραδιοσυχνότητας με αποτέλεσμα την αλλαγή της ιδιοτροφορμής ενός πυρήνα. Μπορούμε τώρα να παρατηρήσουμε την επίδραση της αλλαγής αυτής στην ιδιοτροφορμή ενός γειτονικού πυρήνα. Ιδιαίτερα αποκαλυπτικό είναι ένα διδιάστατο φάσμα, που επιτυγχάνεται με την ενισχυμένη φασματοσκοπία πυρήνων κατά Overhauser (nuclear Overhauser enhancement spectroscopy – NOESY) η οποία δίνει μια γραφική παράσταση ζευγών πρωτονίων που γειτονεύουν στον χώρο, παρά το ότι μπορεί να βρίσκονται μακριά στην πρωτοταγή δομή. Βάση της τεχνικής αυτής αποτελεί το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser, μια αλληλεπίδραση μεταξύ πυρήνων που είναι αντιστρόφως ανάλογη της έκτης δύναμης της μεταξύ τους απόστασης. Έτσι ο μαγνητισμός μεταφέρεται από τον διεγερμένο πυρήνα σε έναν άλλο μη ενεργοποιημένο, όταν η μεταξύ τους απόσταση είναι μικρότερη από 5 Å (Εικόνα 4.45A). Με άλλα λόγια, το φαινόμενο παρέχει τον τρόπο καθορισμού της σχετικής θέσης των ατόμων της τριδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης. Η διαγώνιος του φάσματος NOESY αντιστοιχεί σε ένα μονοδιάστατο φάσμα. Οι κορυφές που βρίσκονται εκτός διαγώνιου παρέχουν σημαντικές νέες πληροφορίες, διότι καθορίζουν τα ζεύγη των πρωτονίων που απέχουν λιγότερο από 5 Å (Εικόνα 4.45B).

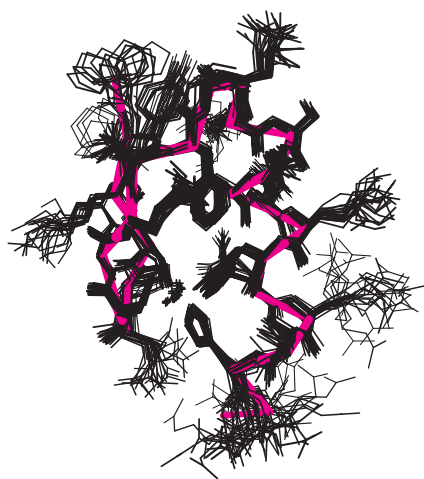
Στην Εικόνα 4.46 βλέπουμε το διδιάστατο φάσμα NOESY για μια πρωτεΐνη 55 αμινοξέων. Ο μεγάλος αριθμός των κορυφών που δεν βρίσκονται στη διαγώνιο αποκαλύπτει πρωτόνια γειτονικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης. Οι δομές στον χώρο υπολογίζονται έτσι ώστε τα πρωτόνια, που φαίνονται από το φάσμα NOESY ότι απέχουν λιγότερο από 5 Å, να βρίσκονται πολύ κοντά στην τριτοταγή δομή (Εικόνα 4.47). Αν ο αριθμός των περιοριστικών συνθηκών είναι ικανοποιητικός τότε η τριδιάστατη δομή που θα καθοριστεί θα είναι σχεδόν απόλυτη. Συνήθως δημιουργούμε μια οικογένεια δομών για τρεις λόγους (Εικόνα 4.48). Πρώτον, ο αριθμός περιοριστικών συνθηκών μπορεί να μην είναι αρκετός για να μας επιτρέψει να καθορίσουμε την τριδιάστατη δομή μόνο από τα δεδομένα αυτά. Δεύτερον, οι αποστάσεις που καθορίζονται από το φάσμα NOESY είναι συνήθως κατ' εκτίμηση. Τρίτον, οι πειραματικές παρατηρήσεις δεν γίνονται σε ένα μόριο αλλά σε μεγάλο αριθμό μορίων στο διάλυμα τα οποία είναι δυνατόν σε μια δεδομένη στιγμή να έχουν μικρές διαφορές στη δομή τους. Επομένως, οι οικογένειες δομών που δημιουργούνται από την ανάλυση της δο-



ΕΙΚΟΝΑ 4.46 Ανιχνεύοντας μικρές αποστάσεις μεταξύ πρωτονίων. Φάσμα NOESY για τη δομική περιοχή της πρωτεΐνης του ματίσματος RNA (55 αμινοξέα) που είδαμε στο Β της Εικόνας 4.44. Κάθε σημείο που βλέπουμε εκτός της διαγώνιου αντιπροσωπεύει μια κοντινή απόσταση μεταξύ δύο πρωτονίων. Το φάσμα αυτό αποκαλύπτει εκατοντάδες τέτοιες κοντινές αποστάσεις μεταξύ πρωτονίων, που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για να καθορίσουμε την τριδιάστατη δομή αυτής της περιοχής. [Ευγενική προσφορά Barbara Amann και Wesley McDermott.]



ΕΙΚΟΝΑ 4.47 Δομές που υπολογίζονται με βάση τους περιορισμούς των φασμάτων NMR. (A) Οι παρατηρήσεις NOESY δείχνουν ότι τα πρωτόνια (που συνδέονται με διακεκομμένες κόκκινες γραμμές) βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο. (B) Η τριδιάστατη δομή που υπολογίστηκε ώστε τα συγκεκριμένα ζεύγη πρωτονίων να βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο.



ΕΙΚΟΝΑ 4.48 Μια οικογένεια δομών. Σύνολο 25 δομών για μια δομική περιοχή 28 αμινοξέων που ανήκει σε πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου που δεσμεύεται στο DNA. Η κόκκινη γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο των θέσεων του κορμού της πρωτεΐνης. Κάθε δομή ταιριάζει με τις περιοριστικές συνθήκες που προέκυψαν από τα πειράματα NMR. Οι διαφορές στις δομές οφείλονται σε συνδυασμό δύο παραγόντων, όπως ατέλειες στα πειραματικά δεδομένα και η δυναμική φύση των πρωτεϊνών σε διάλυμα. [Ευγενική προσφορά Barbara Amann.]

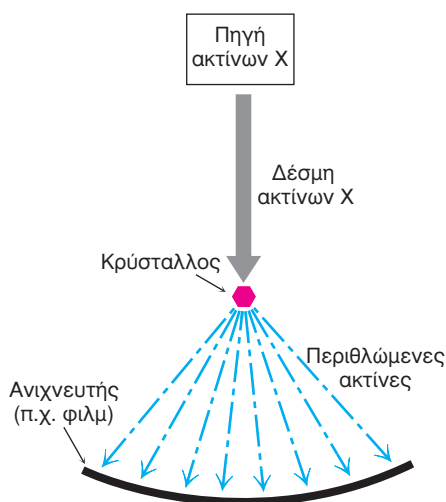
μής με NMR αντιπροσωπεύουν το φάσμα των στερεοδιατάξεων της πρωτεΐνης όταν βρίσκεται σε διάλυμα. Προς το παρόν η φασματοσκοπία NMR μπορεί να προσδιορίσει τις δομές σχετικά μικρών πρωτεϊνών (< 40 kD), όμως η ευαισθησία της μεθόδου σίγουρα θα αυξηθεί. Η ευκρίνεια των δομών που αποκάλυπτει ο NMR έχει ενισχυθεί θεαματικά λόγω της χρήσης της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA η οποία, όπως θα δούμε στο Κεφάλαιο 6, μας παρέχει την ικανότητα να παράγουμε πρωτεΐνες σημασμένες ομοιόμορφα ή σε συγκεκριμένες θέσεις με ^{13}C , ^{15}N και ^2H .

4.5.2 Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X αποκαλύπτει την τριδιάστατη δομή σε ατομικό επίπεδο

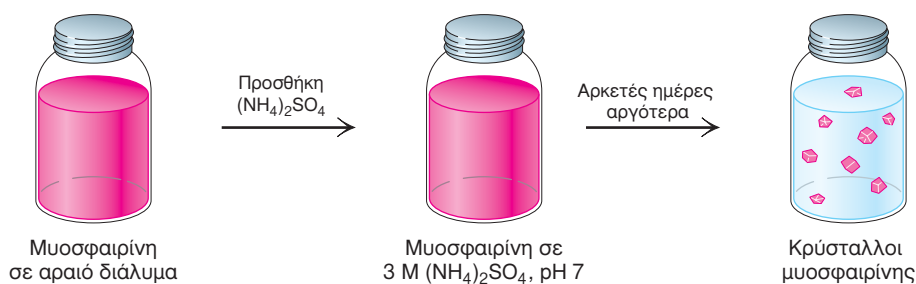
Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X παρέχει πληροφορίες για την πρωτεϊνική δομή με τη μεγαλύτερη δυνατή ευκρίνεια. Με την τεχνική αυτή αποκαλύπτεται η λεπτομερής τοποθέτηση των περισσότερων ατόμων του πρωτεϊνικού μορίου στον χώρο. Η χρήση των ακτίνων X δίνει την καλύτερη ευκρίνεια διότι το μήκος κύματος των ακτίνων βρίσκεται περίπου στο επίπεδο του μήκους του ομοιοπολικού δεσμού. Τα τρία βασικά συστατικά της ανάλυσης με ακτίνες X είναι: ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος, μια πηγή ακτίνων X και ένας ανιχνευτής (Εικόνα 4.49).

Η τεχνική απαιτεί όλα τα μόρια της πρωτεΐνης να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και γι' αυτό το πρώτο στάδιο της έγκειται στην επιτυχή κρυστάλλωση της πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σταδιακή προσθήκη θειικού αμμωνίου ή άλλων αλάτων σε πυκνό διάλυμα της πρωτεΐνης έτσι ώστε να ελαττωθεί η διαλυτότητά της. Αυτή είναι η διεργασία της εξάλωσης που περιγράφηκε στο Εδάφιο 4.1.3. Παραδείγματος χάριν, η μυοσφαιρίνη κρυσταλλώνεται σε 3 M θειικού αμμωνίου (Εικόνα 4.50). Μερικές πρωτεΐνες κρυσταλλώνονται εύκολα, ενώ για άλλες χρειάζεται μεγάλη προσπάθεια έως ότου βρεθούν οι σωστές συνθήκες κρυστάλλωσης. Η κρυστάλλωση είναι τέχνη που απαιτεί μεγάλη επιμονή και υπομονή. Σήμερα κρυσταλλώνονται ολοένα και μεγαλύτερες και πιο πολύπλοκες πρωτεΐνες. Παραδείγματος χάριν, ο ιός της πολιομυελίτιδας, ένα σύμπλοκο 8.500 kD που αποτελείται από 240 υπομονάδες πρωτεΐνης γύρω από έναν πυρήνα RNA, έχει κρυσταλλωθεί και η δομή του έχει αναλυθεί με ακτίνες X. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι κρύσταλλοι μιας πρωτεΐνης εμφανίζουν συχνά βιολογική δραστηριότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι κρυσταλλώθηκαν στη βιολογικά ενεργό μορφή τους. Παραδείγματος χάριν, οι κρύσταλλοι του ενζύμου μπορεί να είναι καταλυτικά ενεργοί αν επικαλυφθούν με υπόστρωμα.

Στη συνέχεια απαιτείται μια πηγή ακτίνων X. Η δέσμη ακτίνων X μήκους κύματος 1,54 Å παράγεται από ηλεκτρόνια που επιταχύνονται προς έναν στόχο χαλκού. Μια στενή δέσμη ακτίνων X προσκρούει στον πρωτεϊνικό κρύσταλλο. Μέρος της περνά τον κρύσταλλο, το υπόλοιπο σκεδαζείται προς διάφορες κατευθύνσεις. Τελικά, η δέσμη που σκεδαζείται, ή *περιθλάται*, μπορεί να



ΕΙΚΟΝΑ 4.49 Τα κύρια στοιχεία ενός πειράματος κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X: μια δέσμη ακτίνων X, ένας κρύσταλλος και ένας ανιχνευτής.



ΕΙΚΟΝΑ 4.50 Κρυστάλλωση μυοσφαιρίνης.

ανιχνευθεί σε φιλμ ακτίνων X, το μαύρισμα του οποίου είναι ανάλογο της έντασης των ακτίνων, ή από έναν ηλεκτρονικό ανιχνευτή στερεάς κατάστασης. Ο τρόπος σκέδασης προσφέρει πολλές πληροφορίες για τη δομή της πρωτεΐνης. Οι βασικές φυσικές αρχές στις οποίες στηρίζεται η τεχνική είναι:

1. Τα ηλεκτρόνια σκεδάζουν τις ακτίνες X. Το πλάτος αιώρησης του κύματος που σκεδάζεται από ένα άτομο είναι ανάλογο του αριθμού ηλεκτρονίων του. Έτσι, ένα άτομο άνθρακα σκεδάζει 6 φορές πιο έντονα από ένα άτομο υδρογόνου.
2. Τα σκεδαζόμενα κύματα ανασυνδυάζονται. Κάθε άτομο συνεισφέρει σε κάθε σκεδαζόμενη ακτίνα. Τα κύματα ενισχύουν το ένα το άλλο στο φιλμ ανίχνευσης εάν βρίσκονται στην ίδια φάση και αλληλοαναιρούνται εάν βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° .
3. Ο τρόπος ανασυνδυασμού των σκεδαζόμενων κυμάτων εξαρτάται μόνον από τη διάταξη των ατόμων στα μόρια του κρυστάλλου.

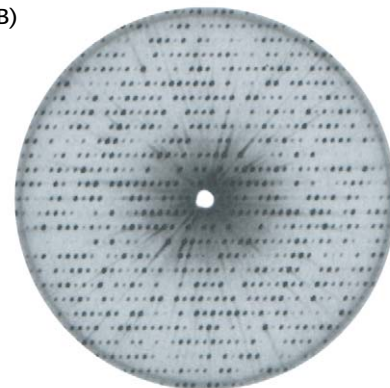
Ο κρύσταλλος της πρωτεΐνης τοποθετείται σε έναν τριχοειδή σωλήνα και παίρνει έναν συγκεκριμένο προσανατολισμό σε σχέση με τις ακτίνες X και το φιλμ. Ο κρύσταλλος περιστρέφεται έτσι ώστε η δέσμη ακτίνων X να προσκρούει σε πολλά σημεία του κρυστάλλου. Η μεταπτωτική αυτή κίνηση του κρυστάλλου έχει ως αποτέλεσμα μια φωτογραφία με ακτίνες X που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες σειρές σημείων που λέγονται *αντανakλάσεις*. Η φωτογραφία με ακτίνες X που φαίνεται στην Εικόνα 4.51 είναι μια τομή δύο διαστάσεων μέσα από ένα τριδιάστατο πλέγμα 25.000 σημείων. Η ένταση κάθε σημείου μπορεί να μετρηθεί. Αυτές οι *εντάσεις* και οι *θέσεις* τους είναι τα βασικά πειραματικά δεδομένα μιας κρυσταλλογραφικής ανάλυσης με ακτίνες X. Το επόμενο βήμα είναι η ανασύνθεση της εικόνας της πρωτεΐνης από τις παρατηρούμενες εντάσεις. Στο οπτικό ή το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οι περιθλώμενες ακτίνες εστιάζονται από φακούς που δίνουν απευθείας μια εικόνα. Ωστόσο, για τις ακτίνες X δεν υπάρχουν φακοί για τον εστιασμό τους. Η εικόνα σχηματίζεται μετά από μια μαθηματική ανάλυση που λέγεται μετασχηματισμός Fourier. Για κάθε σημείο, η διαδικασία αυτή δίνει ένα κύμα πυκνότητας ηλεκτρονίων, το πλάτος του οποίου είναι ανάλογο με το τετράγωνο της ρίζας της έντασης του παρατηρούμενου σημείου. Κάθε κύμα έχει επίσης μια *φάση* — δηλαδή το πότε εμφανίζονται οι κορυφές και οι κοιλότητες του σε σχέση με τα άλλα κύματα. Η φάση του κάθε κύματος καθορίζει το αν ενισχύει ή αναιρεί τα κύματα των άλλων σημείων. Οι φάσεις αυτές είναι δυνατόν να προσδιοριστούν από τα σχήματα περίθλασης βαρέων ατόμων, όπως το ουράνιο ή ο υδράργυρος, που χρησιμοποιούνται ως σημεία αναφοράς συγκεκριμένων θέσεων σε μια πρωτεΐνη.

Επομένως, τώρα μπορούν να γίνουν οι υπολογισμοί ενός χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων, που δίνει την πυκνότητα των ηλεκτρονίων για έναν μεγάλο αριθμό σημείων σε τακτές αποστάσεις στον κρύσταλλο. Αυτή η τριδιάστατη κατανομή της ηλεκτρονικής πυκνότητας αντιπροσωπεύεται από μια σειρά πα-

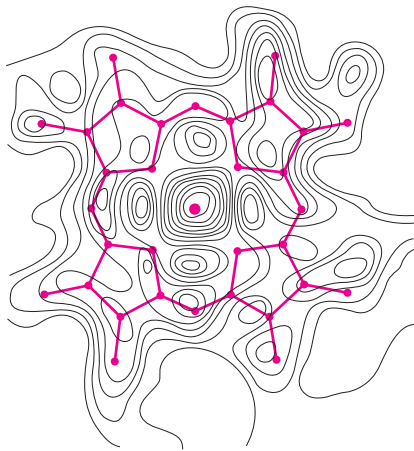
(A)



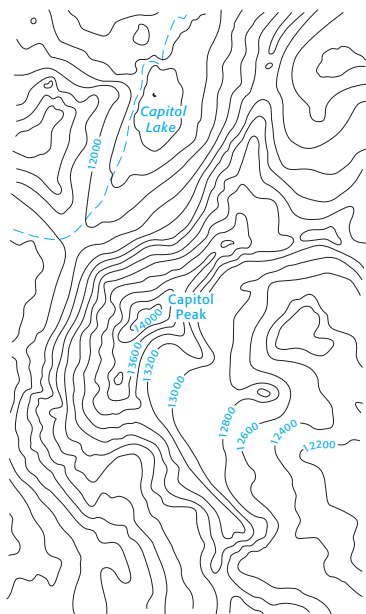
(B)



ΕΙΚΟΝΑ 4.51 Οι κρύσταλλοι μυοσφαιρίνης σε ακτίνες X. (A) Κρύσταλλοι μυοσφαιρίνης (B) Περιθλασίγραμμα ακτίνων X για κρυστάλλους μυοσφαιρίνης που υπόκεινται σε μεταπτωτική κίνηση. [(A) Mel Pollinger/Fran Heyl Associates.]



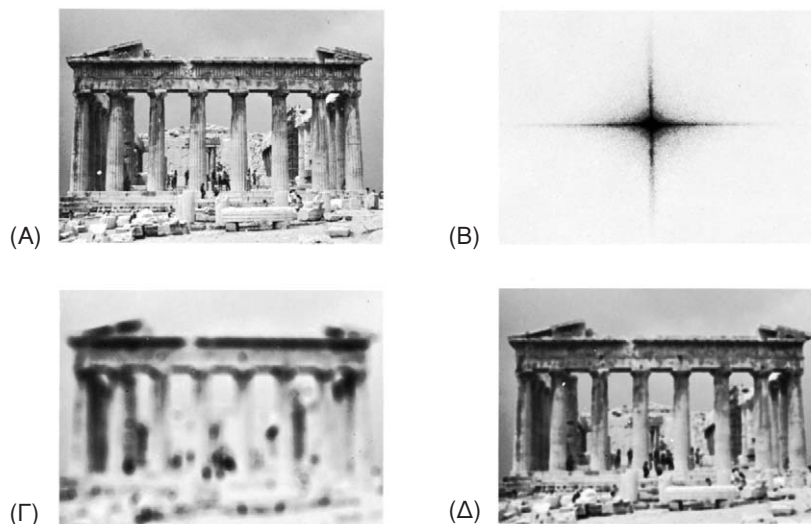
ΕΙΚΟΝΑ 4.52 Τμήμα του ηλεκτρονικού χάρτη πυκνότητας της μυοσφαιρίνης. Αυτή η περιοχή του χάρτη δείχνει την ομάδα της αίμης. Η κορυφή του κέντρου της περιοχής αυτής αντιστοιχεί στη θέση του ατόμου σιδήρου. [Από J.C. Kendrew, *The three dimensional structure of a protein molecule*. © 1961 by Scientific American, Inc. All rights reserved.]



ΕΙΚΟΝΑ 4.53 Τμήμα του γεωλογικού χάρτη των ΗΠΑ. Capitol Peak στο Κολοράντο. (Σ.τ.Μ.: το υψόμετρο εκφράζεται σε πόδια.)

ράλληλων τομών που τοποθετούνται η μία επάνω από την άλλη. Κάθε τομή είναι ένα διαφανές πλαστικό (ή ένα επίπεδο στον υπολογιστή) όπου η κατανομή ηλεκτρονικής πυκνότητας αντιπροσωπεύεται με ισούψεις γραμμές (Εικόνα 4.52), όπως οι ισούψεις γραμμές που χρησιμοποιούνται στους γεωλογικούς χάρτες για να δείξουν υψόμετρο (Εικόνα 4.53). Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση του χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων. Ένας βασικός παράγοντας είναι η διακριτική ικανότητα των ακτίνων X που καθορίζεται από τον αριθμό των περιθλώμενων εντάσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση Fourier. Η πιστότητα της εικόνας εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα της σύνθεσης Fourier, όπως φαίνεται από την οπτική αναλογία της Εικόνας 4.54. Διακριτική ικανότητα 6 Å δίνει την κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με λίγες όμως άλλες δομικές λεπτομέρειες. Ο λόγος είναι ότι οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες στις πρωτεΐνες τοποθετούνται έτσι ώστε τα κέντρα τους να είναι σε απόσταση 5 έως 10 Å μεταξύ τους. Για να καθοριστούν ομάδες ατόμων που απέχουν 2,8 έως 4,0 Å μεταξύ τους και ξεχωριστά άτομα που είναι 1,0 έως 1,5 Å μακριά το ένα από το άλλο, απαιτούνται χάρτες υψηλής ευκρίνειας. Η απόλυτη αναλυτική ικανότητα μιας ανάλυσης με ακτίνες X καθορίζεται από τον βαθμό τελειότητας ενός κρυστάλλου. Για τις πρωτεΐνες το όριο ανάλυσης συνήθως είναι περίπου 2 Å.

Μέχρι τα μέσα του 2000 αποκαλύφθηκαν οι δομές περισσότερων από 10.000 πρωτεϊνών με NMR και κρυσταλλογραφία με ακτίνες X και καθημερινά προστίθενται νέες δομές. Οι συντεταγμένες συγκεντρώθηκαν στη βάση δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org.pdb>) και οι δομές μπορούν να εκτιμηθούν οπτικά και αναλυτικά. Η γνώση της λεπτομερούς μοριακής αρχιτεκτονικής των πρωτεϊνών αποτελεί πηγή έμπνευσης για το πώς οι πρωτεΐνες αναγνωρίζουν και δεσμεύουν άλλα μόρια, πώς λειτουργούν ως ένζυμα, πώς αναδιπλώνονται και πώς εξελίσσονται. Αυτή η εξαιρετικά πλούσια συλλογή συνεχίζει να αυξάνεται με γοργούς ρυθμούς επηρεάζοντας ολόκληρο το πεδίο της βιοχημείας.



ΕΙΚΟΝΑ 4.54 Η διακριτική ικανότητα επηρεάζει την ποιότητα της εικόνας. Οι επιπτώσεις της διακριτικής ικανότητας στην ποιότητα της ανασύστασης μιας εικόνας φαίνονται εδώ σε αναλογία προς την περιθλαση των ακτίνων X. (Α) Μια φωτογραφία του Παρθενώνα, (Β) οπτική περιθλαση του Παρθενώνα, (Γ + Δ) φωτογραφίες ανασύστασης βάσει του (Β). Η καλύτερη ποιότητα του Δ οφείλεται στο ότι χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα στοιχεία στο Δ από ό,τι στο Γ [Ευγενική προσφορά (Α) Dr. Thomas Steitz και (Β) Dr. David DeRosier.]

- Η εντυπωσιακή πρόοδος στην ταχύτητα προσδιορισμού της αλληλουχίας των γονιδίων προώθησε και έναν ακόμη στόχο της βιοχημείας — την αποκάλυψη του πρωτεώματος. Το πρωτέωμα είναι το πλήρες φάσμα των πρωτεϊνών που εκφράζονται και περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με την τροποποίησή τους, τον τρόπο λειτουργίας τους και το πώς αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια.

- **Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών είναι ένα ουσιαστικό πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας τους**

Οι πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν από άλλες πρωτεΐνες και άλλα μόρια γενικότερα, βάσει χαρακτηριστικών τους όπως η διαλυτότητα, το μέγεθος, το φορτίο και η ειδική δεσμευτική συγγένεια. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου διαχωρίζει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες πρωτεϊνών που έχουν αποδιαταχθεί, κυρίως βάσει της μάζας τους. Οι πρωτεΐνες μπορούν επίσης να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά βάσει του φορτίου τους με ισοηλεκτρικό εστιασμό σε μια βαθμίδωση pH. Η υπερφυγοκέντρηση και η χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες βάσει μεγέθους, ενώ η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής τις διαχωρίζει κυρίως βάσει του φορτίου τους. Αυτό που εκμεταλλευόμαστε στη χρωματογραφία συγγένειας είναι η υψηλή συγγένεια πολλών πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Στην τεχνική αυτή, οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στη στήλη που περιέχει κόκκους συνδεδεμένους ομοιοπολικά με υπόστρωμα, αναστολέα ή άλλες ομάδες που αναγνωρίζονται ειδικά από τις πρωτεΐνες. Η μάζα της πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί απόλυτα με τη μέτρηση του συντελεστή καταβύθισης ή τη φασματομετρία μάζας.

- **Η αλληλουχία αμινοξέων μπορεί να προσδιοριστεί με αυτοματοποιημένη αντίδραση αποικοδόμησης Edman**

Η σύσταση μιας πρωτεΐνης μπορεί να καθοριστεί υδρολύοντάς την στα αμινοξέα που την αποτελούν με 6 N HCl στους 110°C. Τα αμινοξέα μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και να προσδιοριστούν ποσοτικά μετά από αντίδρασή τους με νινυδρίνη ή φθορεσκαμίνη. Οι αλληλουχίες αμινοξέων μπορούν να προσδιοριστούν με αποικοδόμηση Edman, που απομακρύνει κάθε φορά ένα αμινοξύ από το αμινο-τελικό άκρο του πεπτιδίου. Το φαινυλοϊσοθειοκυανικό αντιδρά με την τελική αμινική ομάδα σχηματίζοντας ένα φαινυλοθειο-καρβαμοϋλο-παράγωγο που κυκλοποιείται κάτω από ελαφρά όξινες συνθήκες και δίνει ένα φαινυλοθειο-υδανοϊόνο(PTH)-αμινοξύ και ένα πεπτίδιο μικρότερο κατά ένα αμινοξύ. Αυτοματοποιημένες επαναλήψεις αποικοδόμησης Edman σε ένα μηχάνημα προσδιορισμού αλληλουχίας αμινοξέων μπορούν να ταυτοποιήσουν αλληλουχίες έως και 50 καταλοίπων. Οι μεγαλύτερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες διασπώνται σε μικρότερες για ανάλυση μετά από εξειδικευμένη διάσπαση με αντιδραστήρια όπως το βρωμιούχο κυάνιο, που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυ-τελικό άκρο της μεθειονίνης. Ένζυμα όπως η θρυψίνη, που διασπά το καρβοξυ-τελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης, είναι επίσης χρήσιμα στη διάσπαση των πρωτεϊνών. Οι αλληλουχίες αμινοξέων είναι πλούσιες σε πληροφορίες που σχετίζονται με τη συγγένεια των πρωτεϊνών, την εξελικτική σχέση τους και τις ασθένειες που προκύπτουν από τις μεταλλάξεις. Η γνώση της αλληλουχίας δίνει πολύτιμες πληροφορίες για τη στερεοδιάταξη και τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

- **Η ανοσολογία προσφέρει σημαντικές τεχνικές για τη διερεύνηση των πρωτεϊνών**

Οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν με αντι-

σώματα υψηλής εξειδίκευσης. Ιδιαίτερα χρήσιμα είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα διότι είναι ομοιογενή. Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική μέτρηση (ELISA) και η αποτύπωση Western των πηκτών SDS-πολυακρυλαμιδίου είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά κόρον. Οι πρωτεΐνες μπορούν ακόμη να εντοπιστούν μέσα στο κύτταρο με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και ανοσοκυτταροχημεία με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

• **Μπορούμε να συνθέτουμε πεπτίδια με αυτοματοποιημένες μεθόδους στερεάς φάσης**

Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες μπορούν να συντεθούν με αυτοματοποιημένες μεθόδους στερεάς φάσης όπου το καρβοξυ-τελικό άκρο μιας αλυσίδας δεσμεύεται σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα. Η α-καρβοξυλική ομάδα του επόμενου αμινοξέος ενεργοποιείται με δικυκλοεξυλο-καρβοδιιμίδιο και ενώνεται στην α-αμινική ομάδα της αλυσίδας που αυξάνεται. Τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα και ως αντιγόνα για την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Επίσης μας παρέχουν τρόπους ανάλυσης της σχέσης της αλληλουχίας αμινοξέων και της στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης.

• **Η τριδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης μπορεί να καθοριστεί με φασματοσκοπία NMR και κρυσταλλογραφία με ακτίνες X**

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X πλούτισαν τους τρόπους που διαθέτουμε για να κατανοήσουμε το πώς αναδιπλώνονται οι πρωτεΐνες, πώς αναγνωρίζουν άλλα μόρια και πώς καταλύουν χημικές αντιδράσεις. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποκαλύπτει τη δομή και τη δυναμική των πρωτεϊνών σε διάλυμα. Η χημική μετατόπιση των πυρήνων εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον. Επιπροσθέτως, οι ιδιοστροφομέρες γειτονικών πυρήνων αλληλεπιδρούν έτσι ώστε να μας παρέχουν ακριβέστερες πληροφορίες για τη δομή.

Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X στηρίζεται στον σκεδασμό των ακτίνων X από τα ηλεκτρόνια. Ο τρόπος με τον οποίο ανασυνδυάζονται τα κύματα σκεδασμού εξαρτάται απόλυτα από τις αποστάσεις των ατόμων. Η τριδιάστατη δομή χιλιάδων πρωτεϊνών είναι σήμερα γνωστή σε ατομικό επίπεδο.

ΟΡΟΙ-ΚΛΕΙΔΙΑ

πρωτέωμα, 84
δοκιμασία, 85
ομογενοποίηση, 86
εξαλάτωση, 87
διαπίδυση, 87
χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή, 87
χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, 88
χρωματογραφία συγγένειας, 82
υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), 89
ηλεκτροφόρηση σε πηκτή, 89
ισοηλεκτρικό σημείο, 91
ισοηλεκτρικός εστιασμός, 91
ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, 92

συντελεστής καταβύθισης (μονάδες Svedberg, S), 95
φασματομετρία μάζας «βάσει του χρόνου πτήσης», 96
MALDI-TOF = εκρόφηση-ιοντισμός από μήτρα μέσω λέιζερ, 96
διμεθυλαμινο-αζοβενζυλο-σουλφονυλο-χλωρίδιο, 99
διμεθυλαμινο-ναφθολο-σουλφονυλο-χλωρίδιο, 99
αποικοδόμηση Edman, 99
φαινυλο-ισοθειοκυανικό, 99
βρωμιούχο κνάνιο (CNBr), 101
επικαλυπτόμενα πεπτίδια, 102
διαγώνια ηλεκτροφόρηση, 103
αντίσωμα, 106

αντιγόνο, 106
αντιγονικός προσδιοριστής (επίτοπος), 106
μονοκλωνικά αντισώματα, 107
ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική μέτρηση (ELISA), 109
ανοσοαποτύπωση (αποτύπωση Western), 110
μικροσκόπιο φθορισμού, 111
πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), 111
μέθοδος στερεάς φάσης, 115
φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), 115
κρυσταλλογραφία με ακτίνες X, 118

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Από πού να αρχίσετε

- Hunkapiller, M. W., and Hood, L. E., 1983. Protein sequence analysis: Automated microsequencing. *Science* 219:650-659.
- Merrifield, B., 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232:341-347.
- Sanger, F., 1988. Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem.* 57:1-28.
- Milstein, C., 1980. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243(4):66-74.
- Moore, S., and Stein, W. H., 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease. *Science* 180:458-464.

Βιβλία

- Creighton, T. E., 1993. *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.
- Kyte, J., 1994. *Structure in Protein Chemistry*. Garland.
- Van Holde, K. E., Johnson, W. C., and Ho, P.-S., 1998. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall.
- Methods in Enzymology*. Academic Press. [Οι 300 και πλέον τόμοι αυτής της σειράς αποτελούν έναν θησαυρό πειραματικών μεθόδων και διεργασιών.]
- Cantor, C. R., and Schimmel, P. R., 1980. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Company.
- Freifelder, D., 1982. *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*. W. H. Freeman and Company.
- Johnstone, R. A. W., 1996. *Mass Spectroscopy for Chemists and Biochemists* (2d ed.). Cambridge University Press.
- Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., and Hochstrasser, D. F., 1997. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics (Principles and Practice)*. Springer Verlag

Καθαρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών

- Deutscher, M. (Ed.), 1997. *Guide to Protein Purification*. Academic Press.
- Scopes, R. K., and Cantor, C., 1994. *Protein Purification: Principles and Practice* (3d ed.). Springer Verlag.
- Dunn, M. J., 1997. Quantitative two-dimensional gel electrophoresis: From proteins to proteomes. *Biochem. Soc. Trans.* 25:248-254.
- Aebersold, R., Pipes, G. D., Wettenhall, R. E., Nika, H., and Hood, L. E., 1990. Covalent attachment of peptides for high sensitivity solid-phase sequence analysis. *Anal. Biochem.* 187:56-65.
- Blackstock, W. P., and Weir, M. P., 1999. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17:121-127.
- Dutt, M. J., and Lee, K. H., 2000. Proteomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:176-179.
- Pandey, A., and Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846.

Υπερφυγοκέντρηση και φασματομετρία μάζας

- Schuster, T. M., and Laue, T. M., 1994. *Modern Analytical Ultracentrifugation*. Springer Verlag.
- Arnott, D., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F., 1993. Mass spectrometry of proteins and peptides: Sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis. *Clin. Chem.* 39:2005-2010.

- Chait, B. T., and Kent, S. B. H., 1992. Weighing naked proteins: Practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* 257:1885-1894.
- Jardine, I., 1990. Molecular weight analysis of proteins. *Methods Enzymol.* 193:441-455.
- Edmonds, C. G., Loo, J. A., Loo, R. R., Udseth, H. R., Barinaga, C. J., and Smith, R. D., 1991. Application of electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry in combination with capillary electrophoresis for biochemical investigations. *Biochem. Soc. Trans.* 19:943-947.
- Li, L., Garden, R. W., and Sweedler, J. V., 2000. Single-cell MALDI: A new tool for direct peptide profiling. *Trends Biotechnol.* 18:151-160.
- Pappin, D. J., 1997. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 64:165-173.
- Yates, J. R., 3rd, 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* 33:1-19.

Φασματοσκοπία και κρυσταλλογραφία με ακτίνες X

- Glusker, J. P., 1994. X-ray crystallography of proteins. *Methods Biochem. Anal.* 37:1-72.
- Wery, J. P., and Schevitz, R. W., 1997. New trends in macromolecular x-ray crystallography. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:365-369.
- Brunger, A. T., 1997. X-ray crystallography and NMR reveal complementary views of structure and dynamics. *Nat. Struct. Biol.* 4 (suppl.):862-865.
- Wüthrich, K., 1989. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 243:45-50.
- Clore, G. M., and Gronenborn, A. M., 1991. Structures of larger proteins in solution: Three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* 252:1390-1399.
- Wüthrich, K., 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley-Interscience.

Μονοκλωνικά αντισώματα και φθορίζοντα μόρια

- Köhler, G., and Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Goding, J. W., 1996. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press.
- Immunology Today*, 2000. Volume 21, issue 8.
- Tsien, R. Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-544.
- Kendall, J. M., and Badminton, M. N., 1998. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting era. *Trends Biotechnol.* 16:216-234.

Χημική σύνθεση πρωτεϊνών

- Mayo, K. H., 2000. Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: For the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol.* 18:212-217.
- Borgia, J. A., and Fields, G. B., 2000. Chemical synthesis of proteins. *Trends Biotechnol.* 18:243-251.

ΑΣΚΗΣΕΙΣ

- Πολύτιμα αντιδραστήρια.** Τα αντιδραστήρια που ακολουθούν χρησιμοποιούνται συχνά στη χημεία των πρωτεϊνών: CNBr, dabsyl-χλωρίδιο, ουρία, 6 N HCL, β-μερκαπτοαιθανόλη, νινυδρίνη, θρυψίνη, φαινυλο-ισοθειοκυανικό, υπερμυρμηκικό, χυμοθρυψίνη. Ποιο αντιδραστήριο είναι το πιο κατάλληλο για κάθε έναν από τους ακόλουθους στόχους:

 - Προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων ενός μικρού πεπτιδίου.
 - Ταυτοποίηση του αμινο-τελικού άκρου ενός πεπτιδίου από το οποίο έχετε λιγότερο από 0,1 μg.
 - Αντιστρεπτή αποδιάταξη πρωτεΐνης χωρίς δισουλφιδικούς δεσμούς. Ποια άλλα αντιδραστήρια θα χρειαζόσασταν αν υπήρχαν δισουλφιδικοί δεσμοί;
 - Υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυ-τελικό άκρο αρωματικών καταλοίπων.
 - Διάσπαση πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυ-τελικό άκρο μεθειονίνης.
 - Υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυ-τελικό άκρο λυσίνης και αργινίνης.
- Ας βρούμε την άκρη.** Η άνδρη υδραζίνη (H_2N-NH_2) έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάσπαση πεπτιδικών δεσμών σε πρωτεΐνες. Ποια είναι τα προϊόντα της αντίδρασης; Πώς μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την τεχνική αυτή για να καθορίσουμε το καρβοξυ-τελικό αμινοξύ;
- Κατασκευάζοντας νέα σημεία διάσπασης.** Η αιθυλενοϊμίνη αντιδρά με πλευρικές αλυσίδες κυστεΐνης στις πρωτεΐνες σχηματίζοντας S-αμινοαιθυλο-παράγωγα. Οι πεπτιδικοί δεσμοί στα καρβοξυ-τελικά άκρα αυτών των τροποποιημένων κυστεϊνικών παραγώγων είναι ευαίσθητοι σε υδρόλυση με θρυψίνη. Γιατί;
- Φασματομετρία.** Η απορροφητικότητα A ενός διαλύματος μέσα σε μια κυψελίδα προσδιορίζεται ως

$$A = \log_{10}(I_0/I)$$

όπου I_0 είναι η ένταση του προσπίπτοντος φωτός και I η ένταση του εξερχόμενου φωτός. Η απορροφητικότητα εξαρτάται από τον συντελεστή γραμμομοριακής απορρόφησης (ή απόσβεσης) ϵ (σε $cm^{-1}M^{-1}$), τη συγκέντρωση c (σε M) και το μήκος της κυψελίδας l (σε cm) σύμφωνα με τον τύπο

$$A = \epsilon lc.$$

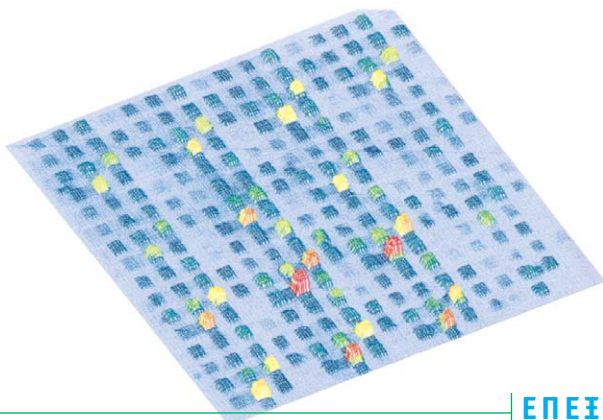
Ο συντελεστής της μυσφαιρίνης στα 580 nm είναι $15.000\ cm^{-1}M^{-1}$. Ποια είναι η απορρόφηση ενός διαλύματος 1 mg/ml σε κυψελίδα μήκους 1 cm; Τι ποσοστό φωτός εξέρχεται από το διάλυμα αυτό;
- Σε αργή κίνηση.** Η τροπομοσίνη, μια πρωτεΐνη των μυών με μοριακή μάζα 93 kd, καταβυθίζεται πιο αργά από ό,τι η αιμοσφαιρίνη (65 kd). Οι συντελεστές καταβύθισης των δύο πρωτεϊνών είναι 2,65 και 4,31 S, αντίστοιχα. Ποιο δομικό στοιχείο της τροπομοσίνης είναι υπεύθυνο για την αργή αυτή καταβύθιση;
- Καταβυθιζόμενες σφαίρες.** Ποια είναι η σχέση μεταξύ του συντελεστή καταβύθισης S μιας σφαιρικής πρωτεΐνης και της μάζας της; Πόσο πιο γρήγορα θα καταβυθιστεί μια πρωτεΐνη 80 kd από μια πρωτεΐνη 40 kd;
- Να εκτιμήσετε το μέγεθος.** Οι σχετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες μιας πρωτεΐνης 30 kd και μιας 92 kd που χρησιμοποιούνται ως σημεία αναφοράς σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιο είναι 0,80 και 0,41 αντίστοιχα. Ποια είναι η σχετική μάζα μιας πρωτεΐνης που έχει κινητικότητα 0,62 στην πηκτή αυτή;
- Νέα συνεργασία;** Το γονίδιο που κωδικοεύει μια πρωτεΐνη με έναν δισουλφιδικό δεσμό υφίσταται μετάλλαξη που αλλάζει μια σερίνη σε κυστεΐνη. Εσείς θέλετε να εξακριβώσετε αν το δισουλφιδικό ζεύγος στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη είναι το ίδιο όπως στην αρχική πρωτεΐνη. Να προτείνετε ένα πείραμα που θα δώσει άμεση απάντηση στην ερώτηση αυτή.
- Διαχωρισμός κυττάρων.** Ο φθορισμοενεργούμενος διαχωρισμός κυττάρων (fluorescence activated cell sorting = FACS) είναι μια τεχνική με πολύ μεγάλες δυνατότητες διαχωρισμού των κυττάρων σύμφωνα με το περιεχόμενό τους σε συγκεκριμένα μόρια. Παραδείγματος χάριν, ένα αντίσωμα με φθορισμό ειδικό για πρωτεΐνη της μεμβράνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαχωριστούν κύτταρα που περιέχουν αυτό το μόριο. Ας υποθέσουμε ότι θέλετε να διαχωρίσετε κύτταρα που έχουν υποδοχέα που τους επιτρέπει να αναγνωρίζουν προϊόντα βακτηριακής διάσπασης. Ωστόσο, δεν έχετε ακόμη ένα αντίσωμα που να κατευθύνεται εναντίον αυτού του υποδοχέα. Ποιο φθορίζον μόριο θα παρασκευάσετε για να ταυτοποιήσετε τέτοια κύτταρα;
- Επιλογή στήλης**

 - Το οκταπεπτίδιο AVGWVRKS επώαστηκε με το ένζυμο θρυψίνη έως ότου διασπαστεί. Να εξηγήσετε ποια είναι η προφανής επιλογή χρωματογραφικής μεθοδολογίας για τον διαχωρισμό των θραυσμάτων και γιατί θα επιλέξετε ιοντοανταλλαγή ή μοριακή διήθηση.
 - Ας υποθέσουμε ότι το πεπτίδιο επώάζεται με χυμοθρυψίνη. Ποια θα είναι η καλύτερη μέθοδος διαχωρισμού των θραυσμάτων; Να εξηγήσετε την επιλογή σας.
- Δημιουργήσαμε και άλλο ένζυμο;** Ένας ερευνητής καθώς απομονώνει ένα ένζυμο βρίσκει αύξηση της συνολικής δραστηριότητας του ενζύμου, μετά από ένα συγκεκριμένο στάδιο καθαρισμού και μάλιστα πέραν της αρχικά καθορισμένης δραστηριότητας. Πώς νομίζετε ότι μπορείτε να εξηγήσετε την αύξηση αυτή της συνολικής δραστηριότητας;
- Άσκηση για τον καθαρισμό πρωτεΐνης.** Να συμπληρώσετε τον επόμενο πίνακα.

| Στάδιο καθαρισμού | Ολική πρωτεΐνη (mg) | Ολική δραστηριότητα (μονάδες) | Ειδική δραστηριότητα (μονάδες mg ⁻¹) | Επίπεδο καθαρότητας | Απόδοση (%) |
|--|---------------------|-------------------------------|--|---------------------|-------------|
| Ακατέργαστο εκχύλισμα | 20.000 | 4.000.000 | | 1 | 100 |
| Καταβύθιση (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5.000 | 3.000.000 | | | |
| Χρωματογραφία DEAE-κυτταρίνης | 1.500 | 1.000.000 | | | |
| Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτική | 500 | 750.000 | | | |
| Χρωματογραφία συγγένειας | 45 | 675.000 | | | |

Ασκήσεις συνδυασμού ύλης από διάφορα κεφάλαια

13. *Τεταρτοταγής δομή.* Απομονώσαμε μια πρωτεΐνη. Καθορίζοντας το μοριακό βάρος της με χρωματογραφία διήθησης σε πηκτική πήραμε την τιμή 60 kd. Επαναλαμβάνοντας τη χρωματογραφία με την προσθήκη 6 M ουρίας παίρνουμε την τιμή 30 kd. Η προσθήκη 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλης στο μείγμα της χρωματογραφίας, μαζί με την ουρία, δίνει τιμή 15 kd. Να περιγράψετε τη δομή του μορίου.
14. *Μεταπτώσεις μεταξύ έλικας και σπειράματος.*
(α) Η μέθοδος NMR έδειξε ότι η πολυ-L-λυσίνη είναι τυχαίο σπείραμα σε pH 7 αλλά αν ανεβάσουμε το pH επάνω από 10 η δομή γίνεται α-έλικα. Να εξηγήσετε τί ακριβώς συμβαίνει με την εξάρτηση της δομής από το pH.
(β) Να εκτιμήσετε την αλλαγή στη δομή του πολυ-L-γλουταμινικού σε αντίστοιχες αλλαγές pH.
15. *Πεπτίδια σε μικροσυστοιχίες (τσπ).* Μεγάλος αριθμός διαφορετικών πεπτιδίων μπορούν να συντεθούν σε μικρή επιφάνεια στερεού υποστρώματος. Αυτή η μικροσυστοιχία των πυκνά τοποθετημένων αλληλουχιών επωάζεται με ανιχνευτές πρωτεΐνης σημασμένους με φθορισμό για να βρούμε ποια πεπτίδια αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη. Στην εικόνα βλέπετε τη δέσμευση αντισώματος σε μικροσυστοιχία 1024 διαφορετικών πεπτιδίων που καλύπτουν συνολική επιφάνεια μικρότερη από το νύχι μας. Πώς θα μπορούσατε να συνθέσετε αυτή τη μικροσυστοιχία των πεπτιδίων; [Υπόδειξη: Να χρησιμοποιήσετε το φως αντί του οξέος για να απελευθερώσετε τις προστατευμένες τελικές αμινικές ομάδες κάθε κύκλου σύνθεσης].




Ασκήσεις ερμηνείας δεδομένων

16. *Προσδιορισμός αλληλουχίας πρωτεϊνών I.* Να καθορίσετε την αλληλουχία ενός εξαπεπτιδίου όταν σας δίνονται τα παρακάτω στοιχεία. Σημείωση: Όταν η αλληλουχία δεν είναι γνωστή τότε τα αμινοξέα χωρίζονται με κόμματα (βλ. Πίνακα 4.3).
Αμινοξέα: (2R, A, S, V, Y)
Αμινο-τελική ανάλυση: (A)
Διάσπαση θρυψίνης: (R, A, V) και (R, S, Y)
Πέψη με καρβοξυπεπτιδάση: Δεν διασπά το πεπτίδιο
Πέψη με χυμοθρυψίνη: (A, R, V, Y) και (R, S)
17. *Προσδιορισμός αλληλουχίας πρωτεϊνών II.* Να καθορίσετε την αλληλουχία ενός πεπτιδίου 14 αμινοξέων βάσει των κατωτέρω δεδομένων:
Αμινοξέα: (4S,2L,F,G,I,K,M,T,W,Y)
Αμινο-τελική ανάλυση: (S)
Πέψη με καρβοξυπεπτιδάση: (L)
Πέψη με θρυψίνη: (3S,2L,F,I,M,T,W) (G,K,S,Y)
Πέψη με χυμοθρυψίνη: (F,I,S) (G,K,L) (L,S) (M,T) (S,W) (S,Y)
Αμινο-τελική ανάλυση του πεπτιδίου: (F,I,S): (S)
Επίδραση βρωμιούχου κυανίου: (2S,F,G,I,K,L,M*,T,Y) (2S,L,W)
*M = η μεθειονίνη ανιχνεύεται ως ομοσερίνη.
18. *Αποικοδόμηση Edman.* Το αμίδιο της αλανίνης αντιδρά με φαινυλο-ισοθειοκυανικό για να δώσει PTH-αλανίνη. Να προτείνετε έναν μηχανισμό για την αντίδραση.

Σάρωση φθορισμού 1024 πεπτιδίων σε επιφάνεια 1,6 cm². Κάθε σύνθεση καλύπτει ένα τετράγωνο πλευράς 400 μm. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα σημασμένο με φθορίζουσα ουσία προστίθεται στο πλακίδιο για να προσδιοριστούν τα πεπτίδια που αναγνωρίζονται. Το ύψος και το χρώμα είναι ενδεικτικά της έντασης φθορισμού. [Κατά S.P.A. Fodor, J.O. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu και D. Solas, *Science* 251(1991):767.]

ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

 Στην ιστοσελίδα www.whfreeman.com/biochem5 θα βρείτε τις τεχνικές: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική SDS (SDS Gel Electrophoresis), ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting), παρασκευή μονοκλωνικών αντισωμάτων και κα-

τασκευή μορίων-ανταποκριτών (Preparing Monoclonal Antibodies και Reporter Constructs, GFP) σε κινούμενα σχέδια. [Ευγενική προσφορά Lodish, H. et al., *Molecular Cell Biology*, 4th ed. (W.H. Freeman and Company, 2000).]