

# Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών

Δεύτερη Έκδοση

---

Carl Branden & John Tooze



Προλογίζει ο Καθηγητής  
Δημήτριος Τσερνόγλου

## Στοιχεία έκδοσης στην Αγγλική γλώσσα

© 1991, 1999 Carl Branden and John Tooze

All rights reserved. No part of this book covered by the copyright hereon may be reproduced or used in any form or by any means -graphic, electronic or mechanical, including photocopying, taping, or information storage and retrieval systems- without permission of the publisher.

### Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Branden, Carl-Ivar

Introduction to protein structure / Carl-Ivar Branden, John Tooze.

Second Edition

p. cm.

Includes bibliographical references and index.

ISBN 0-8153-2304-2 (hardcover). -- ISBN 0-8153-2305-0 (pbk.).

I. Proteins--Structure. I. Tooze, John. II. Title.

QP551.B7635

98-34487

572.633--dc21

CIP

Published by Garland Publishing, Inc.

19 Union Square West, New York, NY 10003-3382

 **Garland Science**  
Taylor & Francis Group  
NEW YORK AND LONDON

## Στοιχεία έκδοσης στην Ελληνική γλώσσα



© 2006 Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.

Νικητάρá 31 Αλεξανδρούπολη, E-mail: AcademicPublications@yahoo.com

ISBN 960-88412-4-0

Απαγορεύεται η μερική ή ολική αναπαραγωγή του κειμένου ή/και των εικόνων του παρόντος βιβλίου, σε οποιαδήποτε μορφή, χωρίς την έγγραφη άδεια του εκδότη.

**ΕΞΩΦΥΛΛΟ:** Δομή του καναλιού καλίου του *Streptomyces lividans*, η οποία προσδιορίστηκε από το Roderick MacKinnon στο Πανεπιστήμιο Rockefeller, στη Νέα Υόρκη (USA). Όπως αναφέρεται και στο Κεφάλαιο 12, η δομή αυτή -η πρώτη ενός καναλιού ιόντων- έδειξε τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται η διάδοση ιόντων καλίου μέσω των κυτταρικών μεμβρανών με υψηλή αποτελεσματικότητα και ειδικότητα. Στην εικόνα φαίνεται η κάτοψη της πρωτεΐνης από την εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης. Η θέση ενός ιόντος καλίου έχει επίσης σημειωθεί (σφαίρα χρυσού χρώματος). Η εικόνα αυτή σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα GRASP (A. Nicholls και B. Honig, Πανεπιστήμιο Columbia) σύμφωνα με ατομικές συντεταγμένες που ευγενικά παραχώρησε ο Roderick MacKinnon.

**ΟΠΙΣΘΟΦΥΛΛΟ:** Χειρόγραφο σχέδιο του καναλιού καλίου, στην ίδια όψη όπως και στην εικόνα του εξωφύλλου. Κάθε υπομονάδα της τετραμερούς πρωτεΐνης έχει διαφορετικό χρώμα.

Σχεδίαση εξωφύλλου της αγγλικής έκδοσης: Christopher Thorpe και Nigel Orme.

# Συντελεστές της Ελληνικής Έκδοσης

## Γενική Επιμέλεια

Γλυκός Μ. Νικόλαος – Λέκτορας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δ.Π.Θ.  
Κοκκινίδης Μιχάλης – Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.  
Χαμόδρακας Ι. Σταύρος – Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας του Κ.Π.Α.

## Βοηθόι Επιμέλειας

Δρ. Οικονομίδου Βασιλική (Κεφάλαια 1-6),  
Δρ. Φαδούλογλου Ε. Βασιλική (Κεφάλαια 7-18).

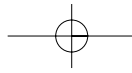
## Μεταφραστές

Αγγελακοπούλου Μαρία, Γεωργούλια Παναγιώτα, Δαρμανής Σπυρίδωνας, Παπαϊωάννου Χαρίκλεια, Σαλαγιάννη Ειρήνη, Τσαλαφούτα Αλεξάνδρα.  
Το ευρετήριο των επιστημονικών όρων επιμελήθηκε η Γεωργούλια Παναγιώτα.

**Φιλολογική - Γλωσσολογική Επιμέλεια:** Κόη Κωνσταντίνα.

**Γραφιστική - Καλλιτεχνική Επιμέλεια:** Σπυρίδωνας Ρένεσης - Αθήνα.

**Εκτύπωση - Βιβλιοδεσία:** "Γραφικές Τέχνες Μέλισσα" - Ασπροβάλτα.



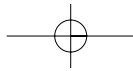
# Κεφάλαιο 8

## Αναγνώριση του DNA στους προκαρυώτες: το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα

- |   |   |
|---|---|
| 8.1 Εισαγωγή  | 8.11 Στα σύμπλοκα, οι πρωτεΐνες προκαλούν παραμορφώσεις στο B-DNA   |
| 8.2 Ένας μοριακός μηχανισμός γονιδιακού ελέγχου   | 8.12 Οι περιοχές του χειριστή αναγνωρίζονται μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-DNA   |
| 8.3 Οι πρωτεΐνες Cro και καταστολέας ελέγχουν τη λειτουργία ενός προκαρυωτικού γενετικού διακόπτη   | 8.13 Η διαμόρφωση του DNA καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις του σκελετού του με πρωτεΐνες   |
| 8.4 Η δομή της πρωτεΐνης λάμδα Cro είναι γνωστή από κρυσταλλογραφία ακτίνων X   | 8.14 Οι αλλαγές στη διαμόρφωση του DNA είναι σημαντικές για τη διαφορική σύνδεση του καταστολέα και της Cro στις διάφορες θέσεις του χειριστή |
| 8.5 Η δομή της DNA-προσδένουσας επικρατείας του λάμδα καταστολέα είναι γνωστή από κρυσταλλογραφία ακτίνων X   | 8.15 Τα βασικά χαρακτηριστικά του καταστολέα και της Cro  |
| 8.6 Οι πρωτεΐνες του φάγου λάμδα Cro και καταστολέας περιέχουν ένα ειδικό μοτίβο για πρόσδεση στο DNA   | 8.16 Η πρόσδεση στο DNA ρυθμίζεται αλλοστερικά  |
| 8.7 Το μοντέλο προβλέπει τις αλληλεπιδράσεις Cro-DNA  | 8.17 Ο trp καταστολέας περιέχει ένα μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα   |
| 8.8 Οι γενετικές μελέτες συμφωνούν με το δομικό μοντέλο   | 8.18 Μια δομική αλλαγή ρυθμίζει ένα λειτουργικό διακόπτη  |
| 8.9 Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων του DNA με καθεμία από τις πρωτεΐνες 434 Cro και 434 καταστολέα αποκάλυψαν νέα χαρακτηριστικά των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-DNA | 8.19 Ο lac καταστολέας προσδένεται τόσο στη μεγάλη όσο και στη μικρή αύλακα, επάγοντας μια μεγάλη κάμψη στο DNA                               |
| 8.10 Οι δομές της 434 Cro και της DNA-προσδένουσας επικρατείας του 434 καταστολέα είναι παρόμοιες   | 8.20 Η CAP-επαγόμενη κάμψη του DNA θα μπορούσε να ενεργοποιεί τη μεταγραφή  |
|   | 8.21 Συμπεράσματα   |

### 8.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του DNA αναγνωρίζουν και προσδένουν ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μέσω διακριτών επικρατειών της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας. Οι επικρατείες αυτές αναφέρονται ως DNA-προσδένουσες επικρατείες (DNA-binding domains) και είναι συνήθως σχετικά μικρές (μικρότερες από 100 αμινοξικά κατάλοιπα). Πολλές προκαρυωτικές DNA-προσδένουσες επικρατείες περιέχουν το μοτίβο **έλικα-στροφή-έλικα**, το οποίο αναγνωρίζει και προσδένει συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές του DNA. Οι δύο α-έλικες αυτού του μοτίβου έχουν τον ίδιο σχετικό προσανατολισμό και συνδέονται με ένα βρόχο ο οποίος έχει παρόμοια δομή σε όλα τα μοτίβα έλικα-στροφή-έλικα που εμπλέκονται στην πρόσδεση DNA. Στο Κεφάλαιο



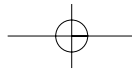
αυτό θα συζητήσουμε τις λειτουργικές ιδιότητες του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα και τον τρόπο με τον οποίο ενσωματώνεται σε δομικά διαφορετικές DNA-προσδένουσες επικράτειες προκαρυωτικών καταστολέων και ενεργοποιητών. Στα δύο επόμενα Κεφάλαια θα ασχοληθούμε με το ευρύτερο πεδίο των DNA-προσδενόμενων μοτίβων από ευκαρυωτικές πρωτεΐνες.

Ο μηχανισμός δράσης των βακτηριακών και βακτηριοφαγικών καταστολέων και ενεργοποιητών είναι κατά βάση πολύ απλός. Οι καταστολείς προσδένονται ισχυρά στο DNA στην περιοχή του εκκινητή ενός δομικού γονιδίου και με τον τρόπο αυτό εμποδίζουν την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης, αποκλείοντας έτσι την έναρξη της μεταγραφής. Οι ενεργοποιητές, από την άλλη, προσδένονται κοντά (δίπλα) στον εκκινητή και υποβοηθούν τη δέσμευση της πολυμεράσης στον παρακείμενο εκκινητή, αυξάνοντας έτσι το ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου. Παρ' όλα αυτά, όπως θα δούμε, η ρύθμιση αυτών των αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης μπορεί να είναι στις λεπτομέρειές της αρκετά πολύπλοκη.

Μερικές από τις πιο εκτεταμένα μελετημένες προκαρυωτικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες προέρχονται από το βακτηριοφάγο λάμδα και άλλους συγγενείς φάγους. Οι φάγοι αυτοί παράγουν δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες, γνωστές ως «**καταστολέας**» (repressor) και «**Cro**». Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάστηκαν έτσι σε πρώιμα στάδια της μελέτης τους, αλλά οι έρευνες που ακολούθησαν έδειξαν ότι, παραδόξως, η **λάμδα Cro** (δηλαδή η πρωτεΐνη Cro από το φάγο λάμδα) δρα μόνο ως καταστολέας, ενώ η **λάμδα καταστολέας** μπορεί να δρα τόσο ως καταστολέας όσο και ως ενεργοποιητής. Για καθαρά ιστορικούς λόγους η αντιφατική αυτή ονοματολογία έχει διατηρηθεί. Οι πρωτεΐνες καταστολέας και Cro ρυθμίζουν ένα διακόπτη ανάμεσα σε δύο φάσεις της αντιγραφής του φάγου λάμδα. Και οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα. Παρ' όλο που αυτό το μοτίβο παρατηρήθηκε αρχικά σε μία διαφορετική πρωτεΐνη, την CAP (η οποία ενεργοποιεί οπερόνια που εμπλέκονται στον καταβολισμό σακχάρων στην *Escherichia coli*), εδώ θα εστιάσουμε την προσοχή μας στις δύο βακτηριοφαγικές πρωτεΐνες, κυρίως γιατί είναι δύο από τις καλύτερα μελετημένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες.

## 8.2 Ένας μοριακός μηχανισμός γονιδιακού ελέγχου

Σε ορισμένα στελέχη της *Escherichia coli*, μια μέτρια δόση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) αρκεί για να σταματήσει η φυσιολογική τους ανάπτυξη και να ξεκινήσει η παραγωγή βακτηριοφάγων, οι οποίοι τελικά λύουν το κύτταρο. Αυτά τα βακτήρια, των αποκαλούμενων λυσιγονικών σειρών, έχουν ενσωματωμένο στο χρωμόσωμά τους φαγικό DNA, το οποίο παραμένει ανενεργό κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξής τους. Το DNA του φάγου αντιγράφεται ως μέρος του βακτηριακού χρωμοσώματος, αλλά τα γονίδια του δεν εκφράζονται. Ο φάγος στο στάδιο αυτό ονομάζεται προφάγος. Η υπεριώδης ακτινοβολία ενεργοποι-



εί τα γονίδια του φάγου, τα οποία παράγουν νέους φάγους και τελικά το κύτταρο πεθαίνει. Ο επιτυχημένος συνδυασμός γενετικών και κρυσταλλογραφικών μελετών έχει επιτρέψει τη διαλεύκανση, τουλάχιστον εν μέρει, του μοριακού μηχανισμού αυτού του γενετικού διακόπτη.

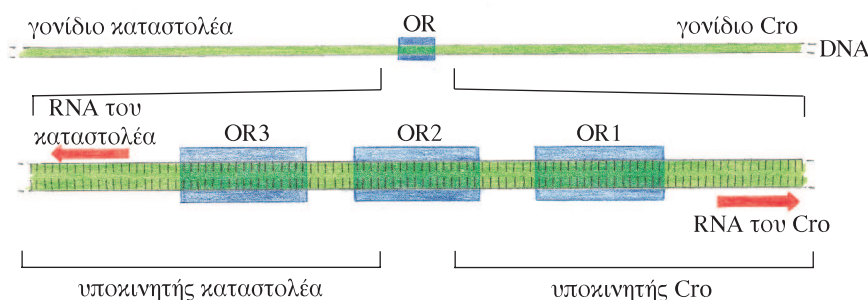
### 8.3 Οι πρωτεΐνες Cro και καταστολέας ελέγχουν τη λειτουργία ενός προκαρυωτικού γενετικού διακόπτη

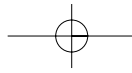
Έχουν μελετηθεί τρία συγγενικά είδη προφαγικών βακτηριοφάγων, ο λάμδα, ο 434 και ο P22. Μία σχετικά μικρή περιοχή του γονιδιώματος του φάγου περιέχει όλα τα γενετικά στοιχεία του διακόπτη (βλ. Εικόνα 8.1). Και στα τρία είδη φάγων, η περιοχή αυτή περιλαμβάνει: (α) τα δύο δομικά γονίδια που κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες (την Cro και τον καταστολέα) οι οποίες ελέγχουν τη λειτουργία του διακόπτη και (β) τη «δεξιά» περιοχή του χειριστή (OR) στην οποία αυτές οι πρωτεΐνες δρουν.

Τα δύο γονίδια μεταγράφονται με αντίθετη κατεύθυνση, ξεκινώντας από τους εκκινητές τους, οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν του χειριστή (βλ. Εικόνα 8.1). Όταν η RNA πολυμεράση προσδένεται στον αριστερό εκκινητή, ενεργοποιείται ο καταστολέας, ενώ η Cro και τα λυτικά γονίδια καταστέλλονται (βλ. Εικόνα 8.2a) και το κύτταρο επιβιώνει ως λυσιγονικό. Όταν η πολυμεράση προσδένεται στο δεξιό εκκινητή, ενεργοποιείται η Cro μαζί με τα πρώιμα λυτικά γονίδια που βρίσκονται δεξιά της, με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου (βλ. Εικόνα 8.2b).

Η επιλογή, λύση ή λυσιγονία, εξαρτάται από το ποιον από τους δύο εκκινητές μπορεί να προσδέσει η πολυμεράση, ενώ η ικανότητα πρόσδεσης της πολυμεράσης εξαρτάται με τη σειρά της από την πρόσδεση των πρωτεϊνών Cro και καταστολέας στις τρεις περιοχές πρόσδεσης –OR1, OR2 και OR3– του χειριστή (OR). Αυτές οι περιοχές πρόσδεσης βρίσκονται στο μέσο του χειριστή, έτσι ώστε η OR1 και η OR2 να επικαλύπτουν τον εκκινητή του γονιδίου της Cro και η OR2 με την OR3 να επικαλύπτουν τον εκκινητή του γονιδίου του καταστολέα (βλ. Εικόνα 8.1). Τόσο η Cro όσο και ο καταστολέας προσδένονται ως διμερή και στις τρεις θέσεις, αλλά η Cro προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην OR3, όπου εμποδίζει την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης στον εκκινητή του γονι-

**Εικόνα 8.1** Η περιοχή του DNA που ελέγχει το διακόπτη για τη σύνθεση νέων φαγικών σωματίων στους συγγενείς βακτηριοφάγους λάμδα, 434 και P22. Δύο δομικά γονίδια εμπλέκονται στον έλεγχο αυτού του διακόπτη. Το ένα κωδικοποιεί την πρωτεΐνη καταστολέα και το άλλο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cro. Ανάμεσα σ' αυτά τα γονίδια παρεμβάλλεται η περιοχή του χειριστή (OR), η οποία περιέχει τρεις θέσεις πρόσδεσης (OR1, OR2 και OR3).





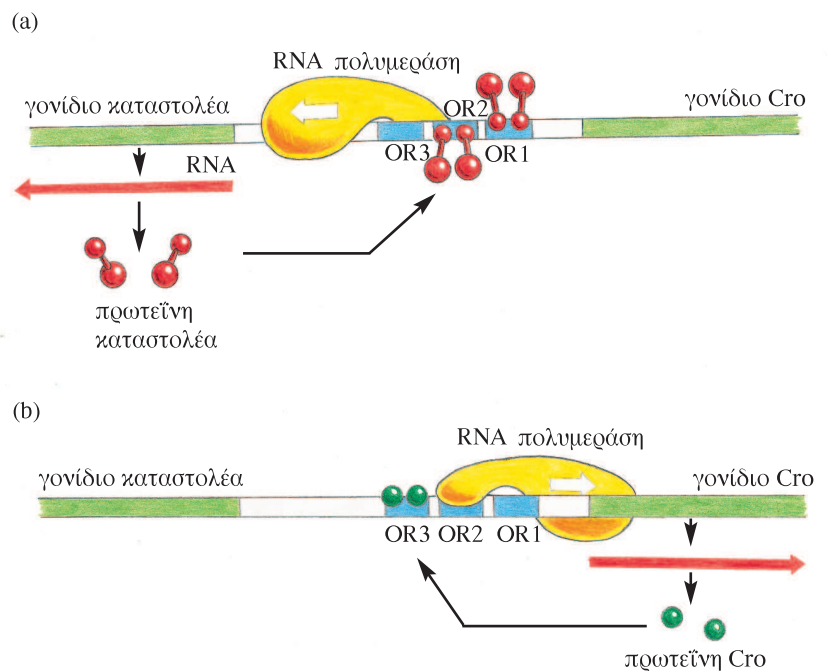
δίου του καταστολέα. Αντίστοιχα, ο καταστολέας προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην OR1, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσβαση της πολυμεράσης στον εκκινητή της Cro.

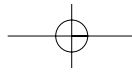
Προσδενόμενος λοιπόν ο καταστολέας στην OR1, επάγει τη λυσιγονική φάση, απενεργοποιώντας τα λυτικά γονίδια στα δεξιά της Cro. Ταυτόχρονα, και μέσω της πρόσδεσής του στην OR2, εξασφαλίζει την παραμονή στη φάση αυτή, αφού έτσι βοηθά την πολυμεράση να προσδεθεί στον εκκινητή του, παράγοντας έτσι περισσότερο καταστολέα. Στη λυσιγονία, τα διμερή του καταστολέα είναι λίγο πολύ διαρκώς συνδεδεμένα στην OR1 και στην OR2. Ο λόγος είναι ότι από τη στιγμή που ένα μόριο καταστολέα προσδένεται στη θέση υψηλής συγγένειας OR1, βοηθά ένα δεύτερο μόριο να προσδεθεί στην OR2 μέσω συνεργατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο μορίων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ο καταστολέας διαδραματίζει διπλό ρόλο, αφενός καταστέλλοντας τη σύνθεση της Cro και αφετέρου ενεργοποιώντας τη δική του σύνθεση.

Αντίθετα, η Cro λειτουργεί αποκλειστικά ως καταστολέας. Όταν προσδένεται στη θέση υψηλής συγγένειας OR3, αποτρέπει τη σύνθεση του καταστολέα, εμποδίζοντας την πρόσβαση της πολυμεράσης στον αριστερό εκκινητή. Απουσία καταστολέα, η RNA πολυμεράση μπορεί να προσδεθεί στον εκκινητή της Cro, οπότε η Cro μπορεί να συντεθεί, μαζί με τα πρώιμα λυτικά γονίδια στα δεξιά της.

Για τη μετάβαση, επομένως, από τη λυσιγονία στην παραγωγή φαγικών σωματίων, ο καταστολέας θα πρέπει να αποδεσμευτεί από την OR1 για χρονικό διάστημα τόσο μακρύ, ώστε να επιτρέπει τη σύνθεση της Cro και την πρόσδεσή της στην OR3. Αυτό ερμηνεύει και τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας: η υπεριώδης ακτινοβολία ενεργοποιεί μια βακτηριακή πρωτεάση, τη Rec A, η

**Εικόνα 8.2** (a) Η κατάσταση στο λυσιγονικό βακτήριο. Ο καταστολέας (κόκκινος) και η RNA πολυμεράση (κίτρινη) βρίσκονται προσδεδεμένα στην περιοχή του διακόπτη σε μια λυσιγονική σειρά *E. coli*. Ο καταστολέας προσδένεται στις OR1 και OR2, απενεργοποιώντας έτσι τη σύνθεση της Cro. Ο καταστολέας λειτουργεί επίσης ως ενεργοποιητής της δικής του σύνθεσης μέσω της πρόσδεσής του στην OR2. Με αυτό τον τρόπο, διευκολύνει την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στο δικό του υποκινητή. (b) Η κατάσταση στη λυτική φάση. Η σύνθεση της Cro απενεργοποιεί τη σύνθεση του καταστολέα, αφού η Cro προσδένεται στην OR3 και εμποδίζει την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή του καταστολέα. Έτσι, είναι δυνατή η μεταγραφή των φαγικών γονιδίων που βρίσκονται στα δεξιά του διακόπτη.





οποία πρωτεολύει το μόριο του καταστολέα σε δύο κομμάτια, ώστε να μην είναι πλέον δυνατός ο σχηματισμός σταθερών διμερών. Η ενεργότητα πρωτεάσης της Rec A ενεργοποιείται όταν πολυμερή της Rec A προσδένονται σε μονόκλωνο DNA που έχει προκύψει ως (βλαπτική) συνέπεια της επίδρασης της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Τα διαχωρισμένα τμήματα του καταστολέα έχουν πολύ μικρότερη συγγένεια για την OR1 και την OR2 σε σχέση με το ακέραιο μόριο του καταστολέα. Έτσι, η θέση του εκκινήτη της Cro ελευθερώνεται για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης, επιτρέποντας τη μεταγραφή του γονιδίου της Cro και των πρώιμων γονιδίων, που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του ιού. Τα νεοσυντιθέμενα πρωτεϊνικά μόρια της Cro προσδένονται στην OR3, εμποδίζοντας την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης στον εκκινήτη του καταστολέα. Με αυτόν τον τρόπο αποτρέπεται η σύνθεση περισσότερων μορίων καταστολέα (βλ. Εικόνα 8.2b). Ο διακόπτης έχει «γυρίσει» και η κυτταρική μηχανή έχει στραφεί στη σύνθεση φαγικών σωματίων.

#### 8.4 Η δομή της πρωτεΐνης λάμδα Cro είναι γνωστή από κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Πώς ο καταστολέας και η Cro αναγνωρίζουν τις ειδικές περιοχές του χειριστή και πώς επιτυγχάνεται η διαφορική τους σύνδεση στις περιοχές του διακόπτη;

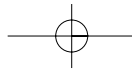
Οι αλληλουχίες των OR1, OR2 και OR3 του λάμδα είναι παρόμοιες αλλά όχι ταυτόσημες (βλ. Πίνακα 8.1). Είναι επίσης εν μέρει **παλίνδρομες**, ιδιαίτερα στα άκρα τους. Η παλινδρομική φύση αυτών των αλληλουχιών είναι σημαντική, γιατί σημαίνει ότι τα δύο μισά κάθε θέσης πρόσδεσης σχετίζονται μεταξύ τους μέσω της ύπαρξης ενός άξονα συμμετρίας τάξεως 2. Οι πρωτεΐνες Cro και καταστολέας είναι διμερή και τα παλίνδρομα τμήματα των OR1, OR2 και OR3 τους παρέχουν δύο **σχεδόν** αλλά όχι εντελώς όμοιες θέσεις αναγνώρισης, μία για κάθε υπομονάδα του διμερούς.

**Πίνακας 8.1** Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των τριών περιοχών πρόσδεσης πρωτεϊνών OR1, OR2 και OR3 του χειριστή του βακτηριοφάγου λάμδα.

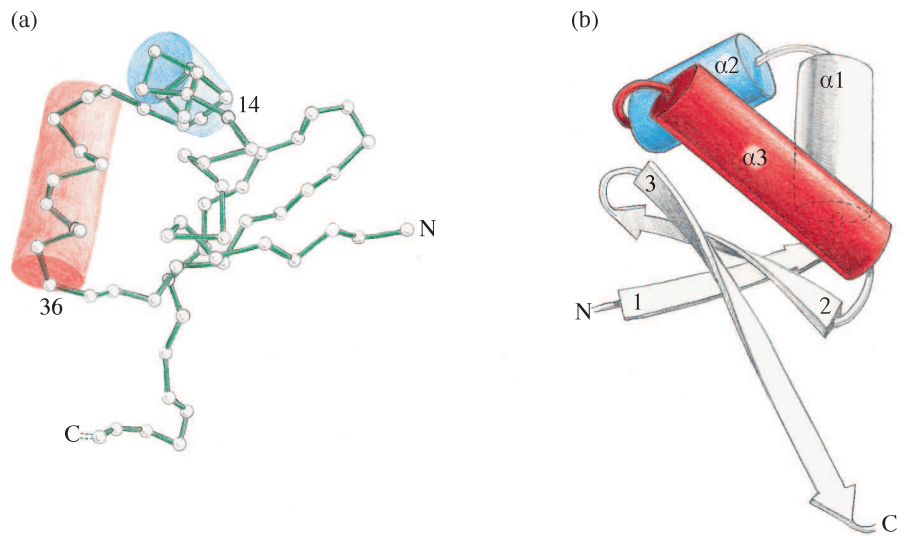
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
OR1	5'	T	A	T	C	A	C	G	C	G	A	G	T	G	G	T	A	3'	
	3'	A	T	A	G	T	G	G	C	G	T	C	A	C	C	A	T	5'	
OR2	5'	T	A	A	C	A	C	C	G	T	G	C	G	T	G	T	T	G	3'
	3'	A	T	T	G	T	G	G	C	A	C	G	C	A	C	A	A	C	5'
OR3	5'	T	A	T	C	A	C	C	G	C	A	A	G	G	G	A	T	A	3'
	3'	A	T	A	G	T	G	G	C	G	T	T	C	C	C	T	A	T	5'

Τα παλίνδρομα ζεύγη βάσεων που απαντώνται συχνότερα στα δύο άκρα είναι πράσινα, ενώ ο ψευδής άξονας της διπλής συμμετρίας παρουσιάζεται με κόκκινη κουκκίδα.





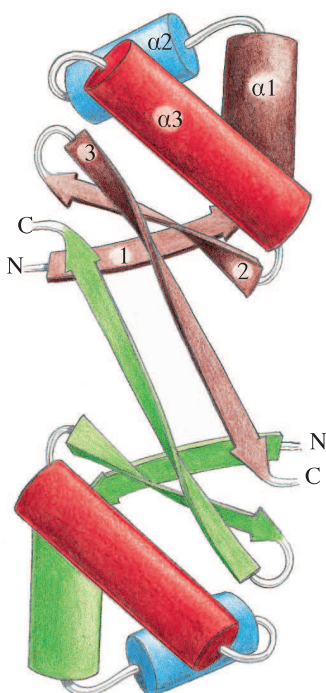
**Εικόνα 8.3** Η DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη Cro του βακτηριοφάγου λάμδα περιλαμβάνει 66 αμινοξικά κατάλοιπα που αναδιπλώνονται σε τρεις α-έλικες και τρεις β-κλώνους. (a) Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των C<sub>α</sub> ατόμων για τα πρώτα 62 κατάλοιπα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Τα τέσσερα C-τελικά κατάλοιπα δεν είναι ορατά στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. (b) Σχηματικό διάγραμμα της δομής της υπομονάδας. Οι έλικες 2 και 3 που σχηματίζουν το μοτίβο έλικα-στροφής-έλικα είναι χρωματισμένες με μπλε και κόκκινο αντίστοιχα. Η οπτική γωνία είναι διαφορετική από αυτή στο (a). [(a) Προσαρμοσμένη από τους Anderson et al., *Nature* 290: 754-758, 1981. (b) Προσαρμοσμένη από τους Ohlendorf et al., *J. Mol. Biol.* 169: 757-769, 1983.]



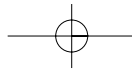
Μια πρώτη εικόνα των δομικών λεπτομερειών αυτού του συστήματος προέκυψε το 1981, όταν η ομάδα του Brian Matthews στην Eugene του Oregon προσδιόρισε την κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης Cro του φάγου λάμδα σε διακριτικότητα 2.8 Å. Η Cro είναι μια μικρή πρωτεΐνη που σχηματίζει σε διάλυμα σταθερά διμερή. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 66 αμινοξικών καταλοίπων με πολύ απλή δομή. Αναδιπλώνεται σε τρεις α-έλικες και τρεις αντιπαράλληλους β-κλώνους, που σχηματίζουν μία β-πτυχωτή επιφάνεια, και κατατάσσεται έτσι στις δομές της τάξης α+β, με τις τρεις α-έλικες να παρεμβάλλονται ανάμεσα στους κλώνους 1 και 2 (βλ. Εικόνα 8.3).

Παρ' όλα αυτά, οι έλικες δεν πακετάρονται αντιπαράλληλα η μία ως προς την άλλη με το συνηθισμένο τρόπο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3. Αντίθετα, οι έλικες 2 και 3 (κατάλοιπα 15-36) σχηματίζουν μια διάταξη έλικας-στροφής-έλικας, που μέχρι το 1981 είχε παρατηρηθεί μόνο στη βακτηριακή πρωτεΐνη CAP. Η CAP είναι μια DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη που έχει δράση ενεργοποιητή.

Ο διμερισμός των μονομερών της Cro στηρίζεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κλώνων 3 από την κάθε υπομονάδα (βλ. Εικόνα 8.4). Αυτοί οι κλώνοι, που αποτελούν το καρβοξυτελικό άκρο των αλυσίδων, διευθετούνται αντιπαράλληλα και συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου, έτσι που οι τρίκλωνες β-πτυχωτές επιφάνειες των μονομερών να ενώνονται σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια έξι αντιπαράλληλων κλώνων στο διμερές (βλ. Εικόνα 8.5).



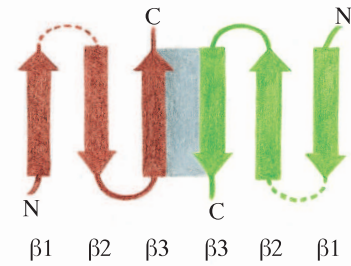
**Εικόνα 8.4** Τα μόρια της Cro από το βακτηριοφάγο λάμδα σχηματίζουν διμερή τόσο σε διάλυμα όσο και στην κρυσταλλική δομή. Οι κύριες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν το διμερές πραγματοποιούνται μεταξύ των κλώνων 3 της κάθε υπομονάδας. Στο διάγραμμα, η μία υπομονάδα είναι πράσινη και η άλλη καφέ. Οι έλικες 2 και 3, που σχηματίζουν τα μοτίβα έλικα-στροφής-έλικα στις δύο υπομονάδες, είναι χρωματισμένες με μπλε και κόκκινο. (Προσαρμοσμένη από τους Ohlendorf et al., *J. Mol. Biol.* 169: 757-769, 1983.)



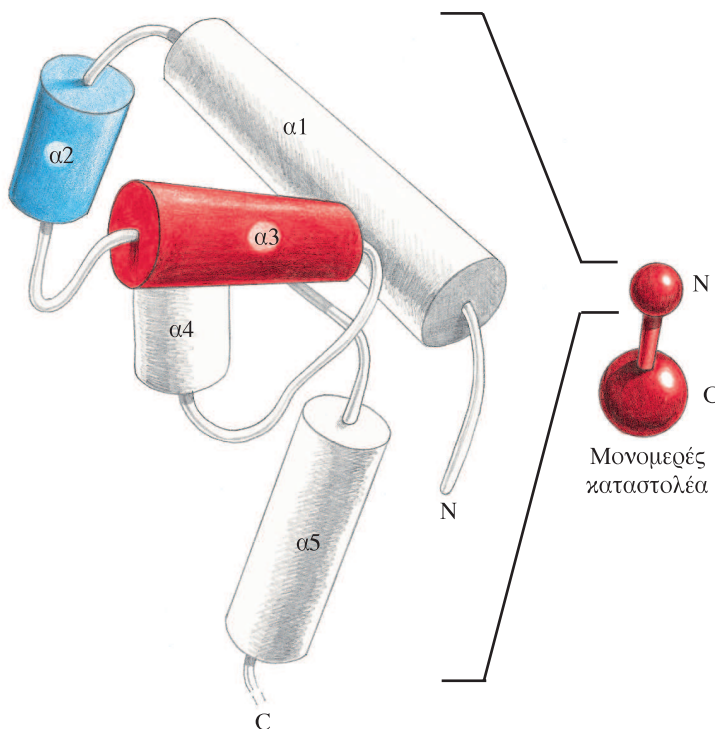
## 8.5 Η δομή της DNA-προσδένουσας επικράτειας του λάμδα καταστολέα είναι γνωστή από κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Σε μια πρόχειρη εξέταση, η πρωτεΐνη λάμδα καταστολέας φαίνεται να διαφέρει πολύ από τη λάμδα Cro: η πολυπεπτιδική της αλυσίδα είναι αρκετά μεγαλύτερη, 236 αμινοξέα, και αποτελείται από δύο επικράτειες που μπορούν να αποκοπούν ως ξεχωριστά τμήματα με ήπια πρωτεόλυση. Στον καταστολέα, η επικράτεια που είναι υπεύθυνη για το διμερισμό είναι διαφορετική από την επικράτεια που λειτουργεί ως DNA-προσδένουσα περιοχή. Συγκεκριμένα, οι καρβοξυτελικές επικράτειες συμμετέχουν στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων που συγκρατούν το διμερές ενωμένο, ενώ οι αμινοτελικές επικράτειες (με 92 κατάλοιπα) προσδένονται ειδικά στον DNA χειριστή. Οι αμινοτελικές επικράτειες μπορούν να σχηματίσουν διμερή από μόνες τους, αλλά η σταθερότητα αυτών των διμερών είναι μικρή, κι έτσι δένονται στο χειριστή λιγότερο ισχυρά απ' ό,τι το ακέραιο μόριο του καταστολέα. Η ιδιότητα αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τη μετάβαση από το λυσιγονικό στο λυτικό κύκλο: η πρωτεόλυση, που ενεργοποιείται από την υπερύθρη ακτινοβολία, διαχωρίζει την καρβοξυτελική από την αμινοτελική επικράτεια, μειώνοντας έτσι τη συγγένεια του καταστολέα για την OR1 και οδηγώντας στη μετάβαση από τη λυσιγονία στη λύση.

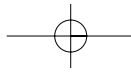
Η δομή της αμινοτελικής DNA-προσδένουσας επικράτειας του λάμδα καταστολέα προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X σε διακριτικότητα 3.8 Å από τον Carl Pabo στο Πανεπιστήμιο του Harvard και παρουσιάζει εντυπωσιακές ομοιότητες με



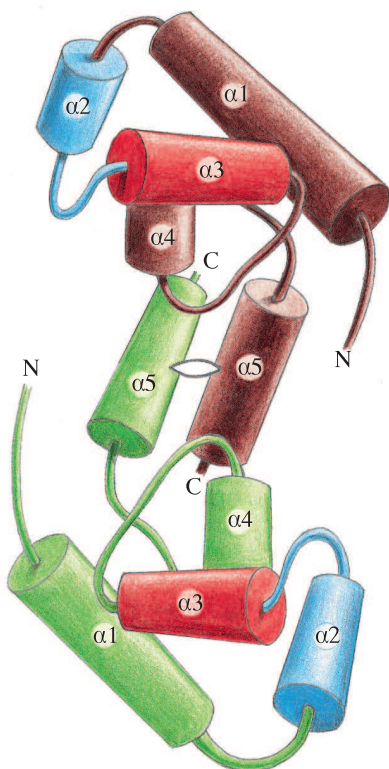
**Εικόνα 8.5** Όπως φαίνεται σ' αυτό το διάγραμμα τοπολογίας, οι τρεις β-κλώνοι της κάθε υπομονάδας της λάμδα Cro είναι έτσι διευθετημένοι στο διμερές, ώστε να σχηματίζουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια έξι αντιπαράλληλων κλώνων. Οι β-κλώνοι χρωματίζονται όπως στην Εικόνα 8.4.



**Εικόνα 8.6** Η αμινοτελική επικράτεια του λάμδα καταστολέα (η οποία προσδένει το DNA) περιέχει 92 αμινοξικά κατάλοιπα αναδιπλωμένα σε πέντε α-έλικες. Δύο από αυτές, η α2 (μπλε) και η α3 (κόκκινη), σχηματίζουν ένα μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα το οποίο έχει παρόμοια δομή με το αντίστοιχο μοτίβο της λάμδα Cro που φαίνεται στην Εικόνα 8.4. Το πλήρες μονομερές του καταστολέα περιέχει, επιπλέον, μια μεγαλύτερη C-τελική επικράτεια. (Προσαρμοσμένη από τους Pabo και Lewis, *Nature* 298: 443-447, 1982.)



**Εικόνα 8.7** Οι αμινοτελικές επικράτειες του λάμδα καταστολέα σχηματίζουν διμερή παρά την απουσία των C-τελικών επικρατειών, οι οποίες είναι οι κυρίως υπεύθυνες για το σχηματισμό διμερών στη φυσική πρωτεΐνη. Τα διμερή σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ελίκων 5 της κάθε υπομονάδας. Οι διαφορετικές υπομονάδες χρωματίζονται με πράσινο και καφέ, εκτός από το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, που είναι χρωματισμένο με μπλε και κόκκινο, όπως στην Εικόνα 8.4. (Προσαρμοσμένη από τους Pabo και Lewis, *Nature* 298: 443-447, 1982.)



τη δομή της Cro, παρ' όλο που οι β-κλώνοι της Cro αντικαθίστανται από α-έλικες στον καταστολέα.

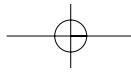
Η πολυπεπτιδική αλυσίδα των 92 αμινοτελικών καταλοίπων αναδιπλώνεται σε πέντε α-έλικες που συνδέονται με βρόχους (βλ. Εικόνα 8.6). Οι έλικες δε διευθετούνται αντιπαράλληλα η μία ως προς την άλλη, όπως είναι ο συνηθής τρόπος για τις δομές των α-ελίκων. Αντίθετα, οι α-έλικες 2 και 3 (κατάλοιπα 33-52) σχηματίζουν ένα μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, με δομή εξαιρετικά όμοια με αυτήν που απαντάται στην Cro.

Παρά την απουσία των καρβοξυτελικών επικρατειών, οι DNA-προσδένουσες επικράτειες του λάμδα καταστολέα σχηματίζουν διμερή στους κρυστάλλους. Ο σχηματισμός αυτών των διμερών είναι το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρβοξυτελικών ελίκων των δύο υπομονάδων, που είναι ανάλογες με τις αλληλεπιδράσεις των καρβοξυτελικών β-κλώνων στην πρωτεΐνη Cro (βλ. Εικόνα 8.7). Οι δύο έλικες διευθετούνται η μία απέναντι στην άλλη με κανονικό τρόπο, με την γωνία μεταξύ των αξόνων τους να έχει τιμή ίση με 20°. Η δομή της καρβοξυτελικής επικράτειας, που είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις της κύριας υπομονάδας στο ακέραιο μόριο του καταστολέα, παραμένει άγνωστη.

## 8.6 Οι πρωτεΐνες του φάγου λάμδα Cro και καταστολέας περιέχουν ένα ειδικό μοτίβο για πρόσδεση στο DNA

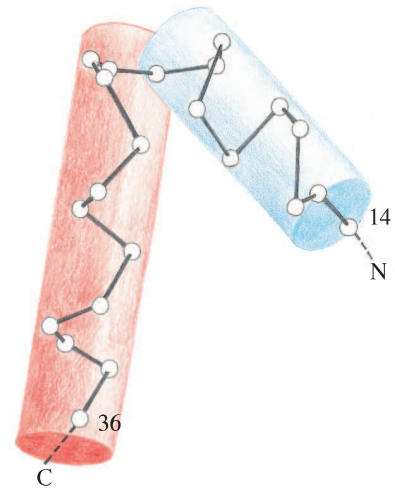
Η συγκεκριμένη διάταξη των δύο α-ελίκων που συνδέονται με ένα βρόχο, όπως συναντάται στη λάμδα Cro, στο λάμδα καταστολέα, καθώς επίσης και στην CAP, αποτελεί το μοτίβο πρόσδεσης DNA που είναι γνωστό ως **έλικα-στροφή-έλικα** (βλ. Εικόνα 8.8). Το μοτίβο αυτό παρατηρείται επίσης σε ορισμένους ευκαρυωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 9. Ο προσανατολισμός των δύο ελίκων και η διαμόρφωση των βρόχων είναι παρόμοια σ' αυτά τα τρία μόρια και η συγκεκριμένη δομή απαντάται μόνο στις DNA-προσδένουσες πρωτεΐνες.

Αφού αυτές οι πρωτεϊνικές δομές –της Cro και του καταστολέα– προσδιορίστηκαν απουσία DNA, δεν υπήρχαν πειραματικές αποδείξεις για την εμπλοκή των α-ελίκων του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα στην πρόσδεση του DNA. Παρ' όλα αυτά, το 1981 ο Brian Matthews διαπίστωσε, μελετώντας τη δομή της Cro, ότι οι αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων στο διμερές έχουν μια σημαντική συνέπεια: η δεύτερη α-έλικα (χρωματισμένη κόκκινη στην Εικόνα 8.8) των μοτίβων έλικα-στροφή-έλικα των δύο υπομονάδων βρίσκεται στα αντίθετα άκρα του επιμήκους μορίου, με απόσταση μεταξύ των ελίκων ίση με 34 Å (βλ. Εικόνα 8.4). Η απόσταση αυτή αντιστοιχεί, σχεδόν επακριβώς, σε μία στροφή της διπλής έλικας του B-DNA. Έτσι, αν η δεύτερη α-έλικα της μιας υπομονάδας προσδεθεί στη μεγάλη αύλακα του B-DNA, η αντίστοιχη α-έλικα της άλλης υπομονάδας μπορεί επίσης



**Εικόνα 8.8** Το DNA-προσδεμένο μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα της πρωτεΐνης λάμδα Cro. Οι θέσεις των  $C_{\alpha}$  ατόμων των αμινοξέων σ' αυτό το μοτίβο έχουν προβληθεί στο επίπεδο, ενώ οι δύο έλικες σχηματίζονται. Η δεύτερη έλικα (κόκκινη) ονομάζεται έλικα αναγνώρισης, γιατί εμπλέκεται στην ειδική για την αλληλουχία αναγνώριση του DNA.

να προσδεθεί στη μεγάλη αύλακα του DNA αλλά μία στροφή (του DNA) παρακάτω. Έτσι, αυτή η  $\alpha$ -έλικα (η δεύτερη στο μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, χρωματισμένη κόκκινη στις Εικόνες) ονομάστηκε  **$\alpha$ -έλικα αναγνώρισης**. Βασισμένος σε αυτή την παρατήρηση, ο Matthews πρότεινε ένα μοντέλο για ένα πιθανό σύμπλοκο Cro-DNA.



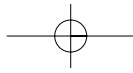
## 8.7 Το μοντέλο προβλέπει τις αλληλεπιδράσεις Cro-DNA

Ο Matthews μπόρεσε να δείξει, δημιουργώντας με τη βοήθεια υπολογιστή ένα μοντέλο του συμπλόκου Cro-DNA, ότι όντως οι δύο  $\alpha$ -έλικες του διμερούς της Cro εφαρμόζουν πολύ καλά στη μεγάλη αύλακα ενός τμήματος κανονικού B-DNA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.9. Ο προσανατολισμός των δύο  $\alpha$ -ελίκων αναγνώρισης ακολουθεί τον προσανατολισμό της αύλακας και στις δύο θέσεις. Αμινοξικά κατάλοιπα από αυτές τις  $\alpha$ -έλικες μπορούν να έρθουν σε επαφή με άτομα των βάσεων της μεγάλης αύλακας. Θεωρήθηκε, λοιπόν, ότι τα αμινοξέα αυτά εμπλέκονται στην αναγνώριση ειδικών ρυθμιστικών περιοχών.

Για μία στροφή στο B-DNA απαιτούνται 10 περίπου ζεύγη βάσεων. Τα κέντρα των παλίνδρομων αλληλουχιών στις περιοχές πρόσδεσης στο χειριστή απέχουν επίσης 10 περίπου ζεύγη βάσεων (βλ. Πίνακα 8.1). Έτσι, αν μία από τις έλικες αναγνώρισης προσδεθεί σε μια παλίνδρομη αλληλουχία DNA, η δεύτερη έλικα αναγνώρισης (του πρωτεϊνικού διμερούς) τοποθετείται προς πρόσδεση στη δεύτερη παλίνδρομη αλληλουχία DNA.

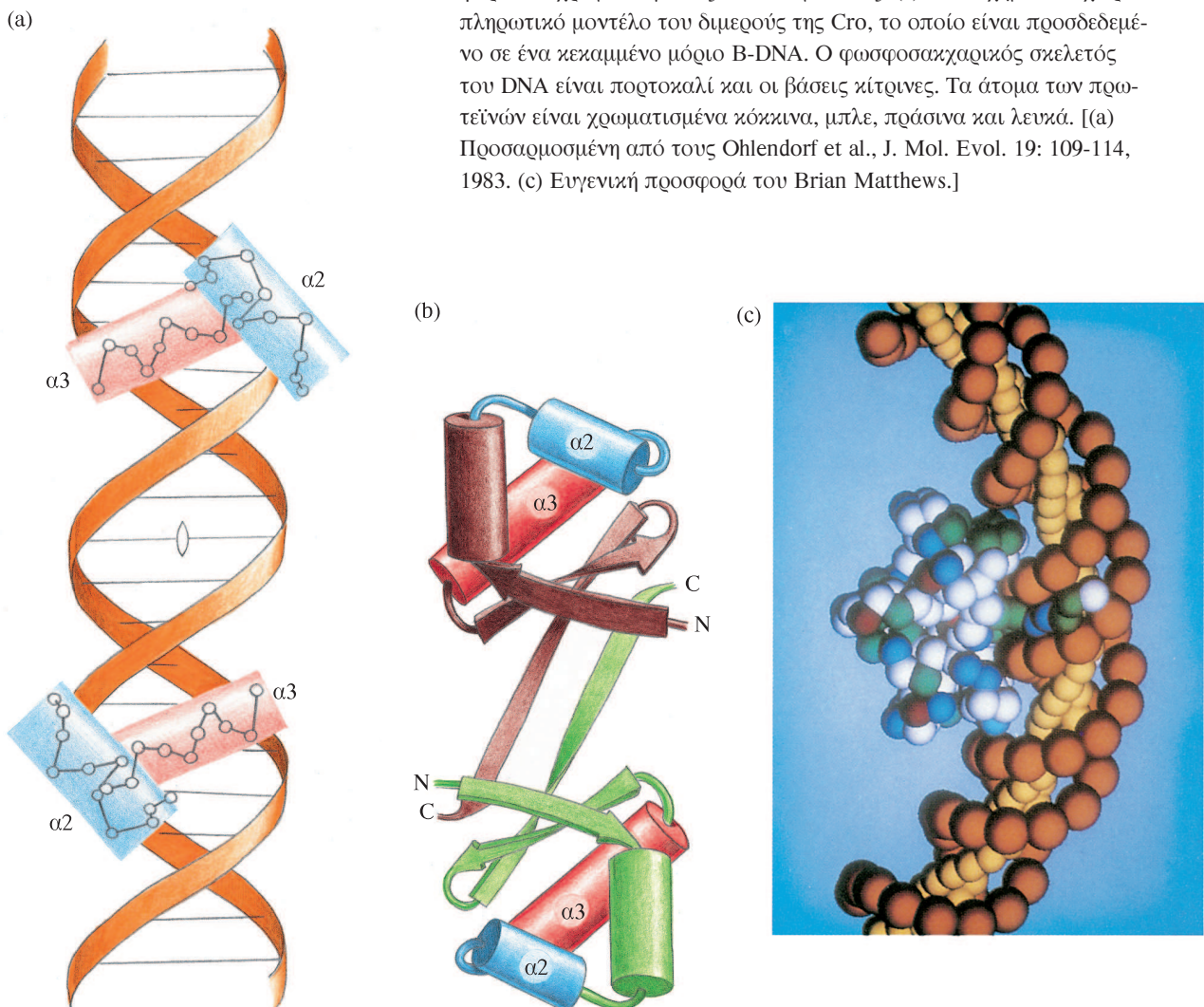
Ο σχετικός προσανατολισμός των  $\alpha$ -ελίκων και η απόσταση μεταξύ τους καθορίζεται από τον τρόπο με τον οποίο σχηματίζεται το διμερές (μέσω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπομονάδων). Έτσι, τρία χαρακτηριστικά της δομής της Cro θεωρούνται σημαντικά για την ειδική σύνδεση στον DNA χειριστή: (1) η παρουσία του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα, το οποίο παρέχει την  $\alpha$ -έλικα αναγνώρισης που προσδένεται στη μεγάλη αύλακα του B-DNA (2) η αμινοξική αλληλουχία αυτής της  $\alpha$ -έλικας, η οποία αναγνωρίζει διαφορετικές περιοχές του χειριστή, και (3) οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων, που παρέχουν τη σωστή απόσταση και το σωστό σχετικό προσανατολισμό των δύο  $\alpha$ -ελίκων αναγνώρισης του διμερούς, αυξάνοντας έτσι τη συγγένεια μεταξύ της Cro και του DNA χειριστή.

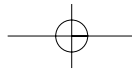
Διείσθηση και ευφυΐα χρειάστηκε να συνδυαστούν για τη δημιουργία του μοντέλου που εξηγεί τον τρόπο με τον οποίο η Cro προσδένεται στο DNA. Η εγκυρότητα του μοντέλου ενισχύθηκε



σημαντικά όταν στη συνέχεια παρατηρήθηκαν τα ίδια χαρακτηριστικά στις DNA-προσδένουσες επικράτειες του μορίου του λάμδα καταστολέα. Το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα με μία έλικα αναγνώρισης υπάρχει και στις DNA-προσδένουσες επικράτειες του καταστολέα, οι οποίες επιπλέον διμερίζονται στους κρυστάλλους με τέτοιο τρόπο, ώστε οι έλικες αναγνώρισης να απέχουν μεταξύ τους 34 Å, όπως στην Cro.

**Εικόνα 8.9** Το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα της λάμδα Cro προσδεδεμένο στο DNA (πορτοκαλί), με τις δύο έλικες αναγνώρισης (κόκκινες) του διμερούς της Cro τοποθετημένες στη μεγάλη αύλακα του DNA. Το μοντέλο πρόσδεσης, που προτάθηκε από τον Brian Matthews, απεικονίζεται σχηματικά στο (a), με συνδεδεμένους κύκλους για τις θέσεις των C<sub>α</sub>. (b) Ένα σχηματικό διάγραμμα του διμερούς της Cro με διαφορετικά χρώματα για τις δύο υπομονάδες. (c) Ένα σχηματικό χωροπληρωτικό μοντέλο του διμερούς της Cro, το οποίο είναι προσδεδεμένο σε ένα κεκαμμένο μόριο B-DNA. Ο φωσφοσακχαρικός σκελετός του DNA είναι πορτοκαλί και οι βάσεις κίτρινες. Τα άτομα των πρωτεϊνών είναι χρωματισμένα κόκκινα, μπλε, πράσινα και λευκά. [(a) Προσαρμοσμένη από τους Ohlendorf et al., J. Mol. Evol. 19: 109-114, 1983. (c) Ευγενική προσφορά του Brian Matthews.]



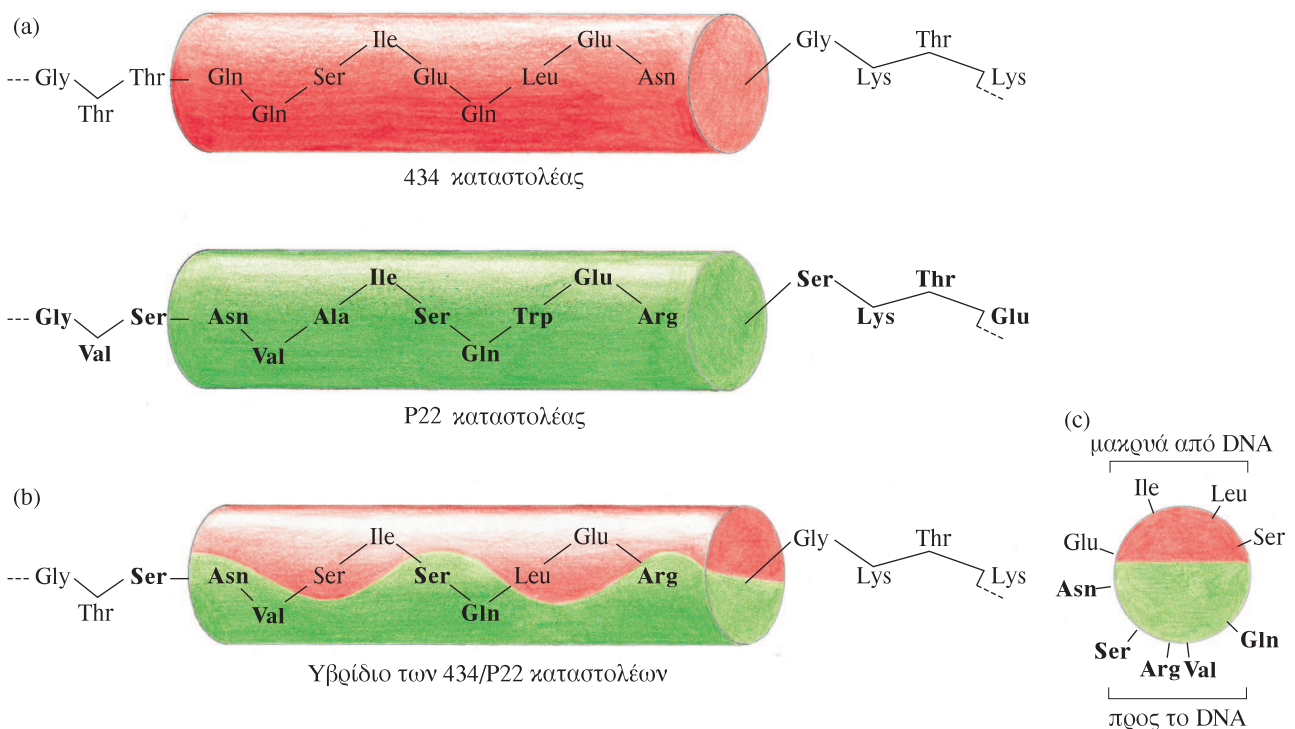


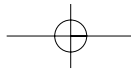
## 8.8 Οι γενετικές μελέτες συμφωνούν με το δομικό μοντέλο

Η παρουσία στη λάμδα Cro και στον καταστολέα του κοινού αυτού DNA-προσδενόμενου μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα παρείχε σημαντικό έρεισμα για περαιτέρω γενετικές και δομικές μελέτες σε αυτές αλλά και σε άλλες προκαρυωτικές DNA-προσδένουσες πρωτεΐνες. Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τον προτεινόμενο τρόπο πρόσδεσης αυτών των ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο DNA.

Τα πιο αποδοτικά γενετικά πειράματα έγιναν από την ομάδα του Mark Ptashne στο Πανεπιστήμιο του Harvard. Σε ένα από τα πειράματα, για παράδειγμα, τροποποίησαν τον καταστολέα του φάγου 434, αντικαθιστώντας την α-έλικα αναγνώρισης αυτής της πρωτεΐνης με την αντίστοιχη α-έλικα της πρωτεΐνης Cro του ίδιου φάγου (διαφορά πέντε αμινοξέων). Εντυπωσιακά, ο τροποποιημένος 434 καταστολέας απέκτησε τις ιδιότητες πρόσδεσης (και την ειδικότητα) της 434 Cro. Σε ένα άλλο πείραμα, επιλεγμένα αμινοξικά κατάλοιπα της α-έλικας αναγνώρισης του 434 καταστολέα αντικαταστάθηκαν από τα αντίστοιχα αμινοξέα του καταστολέα του φάγου P22 (βλ. Εικόνα 8.10). Τα αμινοξέα που επιλέχθηκαν για αντικατάσταση ήταν αυτά που στο δομικό μοντέλο αντικρίζουν το DNA και πιθανώς αλληλεπιδρούν με αυτό. Οι συνέπειες των αλλαγών αυτών ήταν εντυπωσιακές. *In vivo*, ο φυσικός 434 καταστολέας δεν παρουσιάζει συγγένεια για τον P22 χειριστή, αλλά ο τροποποιημένος 434 καταστολέας ρυθμιζε μόνο P22 χειριστές και όχι τον 434 χειριστή. *In vitro*, ο τροποποιημένος 434 καταστολέας προσδέθηκε ειδικά στο DNA του P22 χειριστή και έδειξε την ίδια ιεραρχία στη συγγένεια πρόσδεσης στις τρεις περιοχές OR1, OR2 και OR3, όπως και ο φυσικός P22 καταστολέας.

**Εικόνα 8.10** Η προτεινόμενη ως DNA-προσδένουσα επιφάνεια της έλικας αναγνώρισης του καταστολέα του βακτηριοφάγου 434 ανασχεδιάστηκε γενετικά σε αυτήν του καταστολέα P22 αλλάζοντας έξι αμινοξικά κατάλοιπα. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων των ελίκων αναγνώρισης των καταστολέων άγριου τύπου φαίνονται στο (a) και αυτές των ανασχεδιασμένων στο (b) και (c) (από πλάγια και κατά μήκος της έλικας άποψη αντίστοιχα). Ο ανασχεδιασμένος 434 καταστολέας απέκτησε όλες τις ιδιότητες του P22 καταστολέα. Τα έξι αμινοξικά κατάλοιπα που άλλαξαν στον 434 καταστολέα απεικονίζονται με έντονα τυπογραφικά στο (b) και στο (c). (Προσαρμοσμένη από τους Wharton και Ptashne, *Nature* 316: 601-605, 1985.).





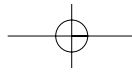
Τα γενετικά αυτά πειράματα απέδειξαν ολοφάνερα ότι το προτεινόμενο δομικό μοντέλο για την πρόσδεση αυτών των πρωτεϊνών στους χειριστές των φάγων ήταν βασικά σωστό. Η δεύτερη α-έλικα στο μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα εμπλέκεται στην αναγνώριση θέσεων του χειριστή, καθώς και στην επιλογή χειριστών από την P22 Cro και τον P22 καταστολέα. Παρ' όλα αυτά, απαιτείται προσοχή, καθώς πολλά άλλα μοντέλα αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεϊνών αποδείχτηκαν παραπλανητικά, αν όχι λανθασμένα. Σήμερα υπάρχουν προηγμένες τεχνικές για την κατασκευή μοντέλων, αλλά και πάλι δεν είναι αλάθητες, και σίγουρα δεν μπορούν να υποκαταστήσουν τον πειραματικό προσδιορισμό των μακρομοριακών δομών.

### **8.9 Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων του DNA με καθεμία από τις πρωτεΐνες 434 Cro και 434 καταστολέα αποκάλυψαν νέα χαρακτηριστικά των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-DNA**

Τα γενικά χαρακτηριστικά του μοντέλου για την πρόσδεση του DNA επιβεβαιώθηκαν πειραματικά το 1987, όταν η ομάδα του Stephen Harrison, στο Πανεπιστήμιο του Harvard, προσδιόρισε τη δομή συμπλόκου του DNA με την DNA-προσδένουσα επικράτεια του 434 καταστολέα σε διακριτικότητα 3.2 Å. Τόσο με βάση τη δομή αυτού του συμπλόκου όσο και από περαιτέρω πειράματα θέση-κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, δείχτηκε ότι η επιλεκτική αναγνώριση διαφορετικών περιοχών του χειριστή από τον 434 καταστολέα εξαρτάται κυρίως από άλλους παράγοντες και όχι από τα αμινοξικά κατάλοιπα της έλικας αναγνώρισης. Επακόλουθες μελέτες του Harrison με σύμπλοκα διαφορετικών περιοχών του χειριστή τόσο με την 434 Cro όσο και με την DNA-προσδένουσα επικράτεια του 434 καταστολέα κατέδειξαν την πολυπλοκότητα και την ευαισθησία του συντονισμού που απαιτείται για τη ρύθμιση της μεταγραφής.

Για καθαρά πρακτικούς λόγους, τα σύμπλοκα που μελέτησε αρχικά ο Harrison περιείχαν την αμινοτελική DNA-προσδένουσα επικράτεια του καταστολέα από το φάγο 434 (που αποτελείται από 69 αμινοξέα) σε σύμπλοκο με ένα κομμάτι συνθετικού DNA 14 ζευγών βάσεων (14μερές) με πλήρως παλίνδρομη αλληλουχία. Δηλαδή, το DNA του συμπλόκου είχε μία ακριβή διπλή συμμετρία ανάλογη της διπλής συμμετρίας στο διμερές μόριο του καταστολέα. Έτσι, αυτό το συνθετικό DNA συνίσταται από δύο πανομοιότυπα μισά, καθένα από τα οποία, όπως θα δούμε παρακάτω, προσδένει μία υπομονάδα της Cro ή ένα τμήμα του καταστολέα.

Πρέπει να σημειωθεί όμως πως οι τρεις περιοχές του χειριστή, μήκους 14 ζευγών βάσεων, που αναγνωρίζει ο καταστολέας 434 στο δεξιό (right-hand) χειριστή του φάγου (OR), δεν είναι τέλεια παλίνδρομες (βλ. Πίνακα 8.2). Η αλληλουχία του 14μερούς μοιάζει περισσότερο με την αλληλουχία μιας θέσης (της θέσης OL2) ενός δεύτερου χειριστή του φάγου, του αριστερού χειριστή



**Πίνακας 8.2** Οι έξι περιοχές του χειριστή (OR1-OR3 και OL1-OL3) στο βακτηριοφάγο 434

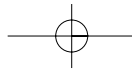
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
OR1	5'	A	C	A	A	G	A	A	A	G	T	T	T	G	T	3'
	3'	T	G	T	T	C	T	T	T	C	A	A	A	C	A	5'
OR2	5'	A	C	A	A	G	A	T	A	G	T	T	T	G	T	3'
	3'	T	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	A	C	A	5'
OR3	5'	A	C	A	A	G	A	A	A	A	A	C	T	G	T	3'
	3'	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T	G	A	C	A	5'
OL1	5'	A	C	A	A	G	G	A	A	G	A	T	T	G	T	3'
	3'	T	G	T	T	C	C	T	T	C	T	A	A	C	A	5'
OL2	5'	A	C	A	A	T	A	A	A	T	A	T	T	G	T	3'
	3'	T	G	T	T	A	T	T	T	A	T	A	A	C	A	5'
OL3	5'	A	C	A	A	T	G	G	A	G	T	T	T	G	T	3'
	3'	T	G	T	T	A	C	C	T	C	A	A	A	C	A	5'
Συνθετικό DNA	5'	A	C	A	A	T	A	T	A	T	A	T	T	G	T	3'
	3'	T	G	T	T	A	T	A	T	A	T	A	A	C	A	5'
		14'	13'	12'	11'	10'	9'	8'	7'	6'	5'	4'	3'	2'	1'	

Κάθε περιοχή του χειριστή έχει μήκος 14 ζεύγη βάσεων. Τα παλίνδρομα ζεύγη βάσεων αυτών των περιοχών είναι χρωματισμένα πράσινα. Έχουν προσδιοριστεί κρυσταλλικές δομές συμπλόκων τόσο της 434 Cro όσο και τμημάτων του 434 καταστολέα με συνθετικά τμήματα DNA - ένα μήκους 14 ζευγών βάσεων (14μερές), το οποίο είναι ακριβώς παλινδρομικό, και ένα μήκους 20 ζευγών βάσεων (20μερές), το οποίο περιέχει την αλληλουχία της OR1 στη μεσαία περιοχή του.

(OL), όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.2. Η μόνη διαφορά τους είναι μια αναστροφή του ζεύγους βάσεων 7, από A-T σε T-A. Πειράματα έδειξαν ότι η αναστροφή αυτή δεν αλλάζει τη συγγένεια του καταστολέα (είτε του ακέραιου μορίου είτε του DNA-προσδένοντος αμινοτελικού τμήματος) για το DNA.

Δυστυχώς, οι κρύσταλλοι συμπλόκων της DNA-προσδένουσας επικράτειας του καταστολέα με 14μερή DNA έδιναν διαγράμματα περιθλασης μέσης μόνο διακριτικότητας. Αργότερα, με συστηματικές αλλαγές του μήκους του DNA και των αλληλουχιών στα άκρα του, ο Harrison και οι συνεργάτες του βρήκαν ένα κομμάτι DNA που έδωσε κρυστάλλους οι οποίοι περιθλούσαν σε υψηλή διακριτικότητα, τόσο με την 434 Cro όσο και με την DNA-προσδένουσα επικράτεια του 434 καταστολέα. Αυτά τα κομμάτια DNA περιέχουν 20 νουκλεοτίδια σε κάθε αλυσίδα και η αλληλουχία στη μεσαία τους περιοχή είναι πανομοιότυπη με αυτήν της OR1 (βλ. Πίνακα 8.2). Τα 5' άκρα φέρουν ένα αζευγάρωτο νουκλεοτίδιο που εμπλέκεται στο πακετάρισμα του συμπλόκου στον κρύσταλλο. Ο Harrison, συγκρίνοντας τις κρυσταλλικές δομές αυτών των συμπλόκων με ένα ακόμη σύμπλοκο, της DNA-προσδένουσας επικράτειας του 434 καταστολέα με συνθετικό DNA που περιείχε την περιοχή του χειριστή OR3, κατάφερε, κατά ένα μέρος τουλάχιστον,





χιστον, να βρει τη δομική βάση της διαφορετικής συγγένειας πρόσδεσης της 434 Cro και του 434 καταστολέα, για τις διάφορες περιοχές του χειριστή 434.

## 8.10 Οι δομές της 434 Cro και της DNA-προσδένουσας επικράτειας του 434 καταστολέα είναι παρόμοιες

Το μόριο της 434 Cro αποτελείται από 71 αμινοξικά κατάλοιπα που παρουσιάζουν 48% αμινοξική ταυτότητα με τα 69 κατάλοιπα της αμινοτελικής DNA-προσδένουσας επικράτειας του 434 καταστολέα. Έτσι, η ομοιότητα των τρισδιάστατων δομών τους ήταν αναμενόμενη (βλ. Εικόνα 8.11). Η κύρια διαφορά εντοπίζεται σε δύο επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του μορίου της Cro, τα οποία όμως δεν εμπλέκονται στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Ο Harrison, επιλέγοντας τα μόρια της 434 Cro και του 434 καταστολέα για τις μελέτες του, ελαχιστοποίησε την πιθανότητα οι διαφορετικές ιδιότητές τους στην πρόσδεση του DNA να οφείλονται σε κάποιες μεγάλες και προφανείς δομικές διαφορές αυτών των δύο μορίων.

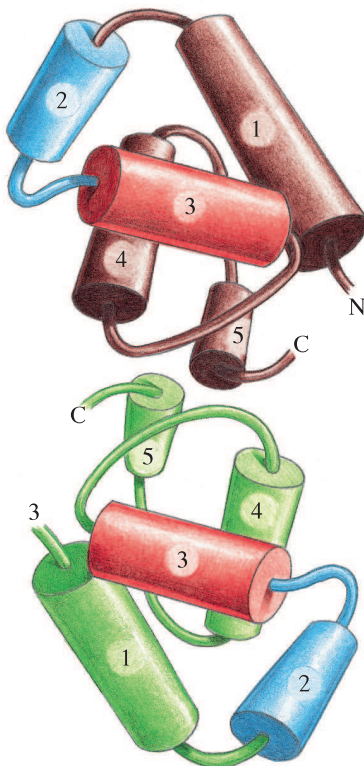
Η DNA-προσδένουσα επικράτεια του 434 καταστολέα παρουσιάζει επίσης σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία (26% ταυτότητα) με το αντίστοιχο τμήμα του λάμδα καταστολέα και έχει παρόμοια τρισδιάστατη δομή (σύγκρινε τις Εικόνες 8.7 και 8.11). Σε αναλογία με το αντίστοιχο τμήμα του λάμδα καταστολέα, η δομή της υπομονάδας της DNA-προσδένουσας επικράτειας του 434 καταστολέα, καθώς και η δομή της 434 Cro περιέχουν μια συνάθροιση τεσσάρων α-ελίκων, με τις έλικες 2 και 3 να σχηματίζουν το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα. Τα δύο μοτίβα έλικα-στροφή-έλικα βρίσκονται στα άκρα του διμερούς και συμβάλλουν στις κύριες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA, ενώ οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τμήμα των αλυσίδων και είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία του πρωτεϊνικού διμερούς. Τόσο η 434 Cro όσο και η DNA-προσδένουσα επικράτεια του 434 καταστολέα είναι πρωτεΐνες μονομερείς σε διάλυμα, ακόμη και σε υψηλές πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις, ενώ σχηματίζουν διμερή όταν προσδένονται στο DNA.

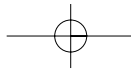
Παρ' όλα αυτά, πρέπει να επισημανθεί, για μια ακόμη φορά, ότι στο ακέραιο μόριο του καταστολέα οι κύριες αλληλεπιδράσεις για το διμερισμό συμβαίνουν στην καρβοξυτελική επικράτεια, η οποία απουσιάζει από το κρυσταλλικό σύμπλοκο.

## 8.11 Στα σύμπλοκα, οι πρωτεΐνες προκαλούν παραμορφώσεις στο B-DNA

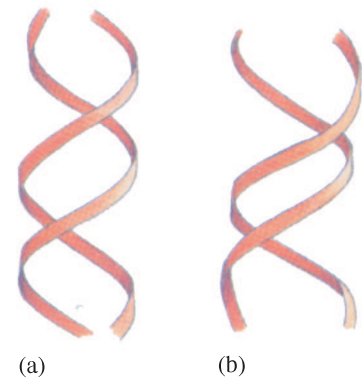
Η πραγματική σημασία της δουλειάς του Harrison με αυτά τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-DNA δε βρίσκεται τόσο στον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνικών επικρατειών όσο στις λεπτομέρειες της δομής του προσδεμένου DNA και στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA. Σε όλα τα σύμπλοκα, το DNA βρίσκεται στη B-μορφή

**Εικόνα 8.11** Η DNA-προσδένουσα επικράτεια του 434 καταστολέα. Στα σύμπλοκά της με τμήματα DNA είναι ένα διμερές. Κάθε υπομονάδα (πράσινο και καφέ) αναδιπλώνεται σε ένα δεμάτιο τεσσάρων α-ελίκων (1-4) οι οποίες έχουν παρόμοια δομή με την αντίστοιχη περιοχή του λάμδα καταστολέα (βλ. Εικόνα 8.7), συμπεριλαμβανομένου και του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα (μπλε και κόκκινο). Μια πέμπτη α-έλικα (5) εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων. Οι λεπτομέρειες αυτής της αλληλεπιδράσης διαφέρουν από αυτές στο αντίστοιχο τμήμα του λάμδα καταστολέα. Η δομή του διμερούς της 434 Cro είναι παρόμοια με τη δομή του 434 καταστολέα που παρουσιάζεται εδώ.





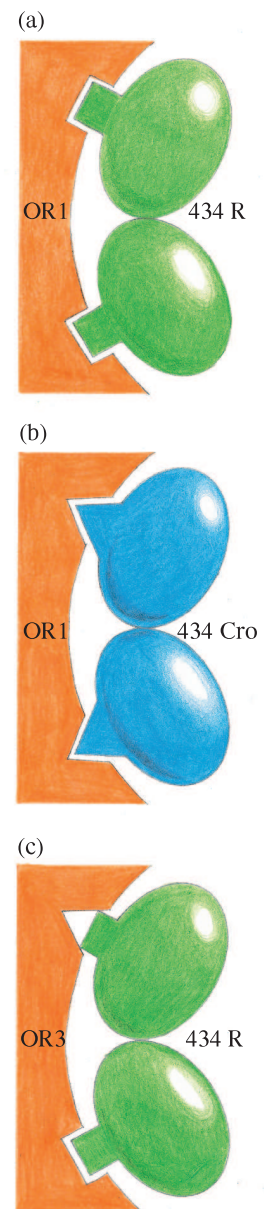
**Εικόνα 8.12** Οι αλλαγές στη δομή του DNA από την κανονική B-DNA μορφή (a) σε μια εκδοχή μη κανονικής δομής (b) όταν η 434 Cro και ο καταστολέας προσδένονται στην περιοχή του χειριστή. Οι αποκλίσεις από την κανονική δομή αφορούν κυρίως την κάμψη του DNA και την υπερελίκωση (overwinding) των μεσαίων περιοχών του. Στο διάγραμμα, ο φωσφοσακχαρικός σκελετός του DNA παρουσιάζεται ως πορτοκαλί ταινίες. Η στενή αύλακα διακρίνεται στο μέσο της περιοχής του χειριστή.

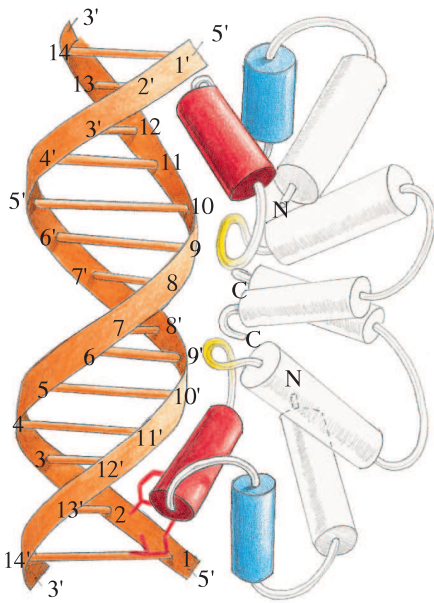
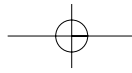


αλλά με σημαντικές παραμορφώσεις. Εξέταση της τοπικής συστροφής μεταξύ των ζευγών των βάσεων έδειξε ότι το DNA είναι υπερελικωμένο στο κέντρο του σε σχέση με τα άκρα του. Επίσης, ο άξονας της έλικας του DNA κλίνει κατά κάποιον τρόπο προς τις έλικες αναγνώρισης στα άκρα του πρωτεϊνικού διμερούς. Αυτές οι παραμορφώσεις στενεύουν τη μικρή αύλακα στο κέντρο και την πλαταίνουν στα άκρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.12, όπου συγκρίνεται η δομή του DNA στο σύμπλοκο με την αμινοτελική επικράτεια του 434 καταστολέα με τη δομή του κανονικού B-DNA. Αφού παρατηρήθηκαν οι ίδιες παραμορφώσεις στα σύμπλοκα της DNA-προσδένουσας επικράτειας του 434 καταστολέα με διάφορες αλληλουχίες DNA (με το 14μερές, το OR1-20μερές, το OR2-20μερές και άλλες) και σε περισσότερα από ένα μοτίβα πακεταρίσματος στους κρυστάλλους, είναι εύλογο να συμπεράνουμε ότι τα χαρακτηριστικά των διαμορφώσεων των τμημάτων DNA σ' αυτά τα σύμπλοκα είναι άμεσο αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-DNA.

Στα σύμπλοκα με την Cro, η συνολική κάμψη και συστρόφη του DNA είναι παρόμοια με αυτή στα σύμπλοκα με τον καταστολέα, υπάρχει όμως μια σημαντική διαφορά στην τοπική δομή δύο νουκλεοτιδίων σε καθένα από τα συμμετρικά ημίσεια της δομής. Έτσι, η πρόσδεση της 434 Cro ή της DNA-προσδένουσας επικράτειας του 434 καταστολέα επάγει μια ξεχωριστή τοπική δομή (βλ. Εικόνα 8.13), η οποία είναι αποτέλεσμα των διαφορών τόσο στην ταυτότητα όσο και στη διαμόρφωση των αμινοξικών καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με το DNA σε κάθε περίπτωση. Οι λεπτομέρειες της διαμόρφωσης του DNA είναι σημαντικές για τις σχετικές συγγένειες της Cro και του καταστολέα για τις διάφορες θέσεις, όπως περιγράφεται σε επόμενη Ενότητα.

**Εικόνα 8.13** Πρόσδεση τμήματος του 434 καταστολέα (a) και της 434 Cro (b) στην περιοχή του χειριστή OR1. Αυτή η πρόσδεση επάγει διαφορετικές δομικές αλλαγές στην περιοχή του DNA που προσδένει τις πρωτεΐνες, οι οποίες απεικονίζονται με διαφορετικά σχήματα των περιοχών πρόσδεσης της OR1. Στο σύμπλοκο του χειριστή OR3 με το τμήμα του 434 καταστολέα (c), τα δύο μισά της θέσης OR3 είναι διαφορετικά: το ένα μοιάζει με την OR1 όταν έχει προσδεμένο τον καταστολέα, ενώ το άλλο έχει διαφορετική νουκλεοτιδική αλληλουχία η οποία αποκτά διαμόρφωση πρόσδεσης τύπου Cro κατά την πρόσδεση του καταστολέα. Οι επιφάνειες πρόσδεσης του DNA και του τμήματος του καταστολέα δεν είναι συμπληρωματικές, όπως στο σύμπλοκο της OR1, και κατά συνέπεια ο καταστολέας προσδένεται λιγότερο ισχυρά στην OR3 απ' ό,τι στην OR1. Το DNA απεικονίζεται σχηματικά με πορτοκαλί και οι πρωτεΐνες με μπλε ή πράσινο.





**Εικόνα 8.14** Γενική άποψη του συμπλόκου του τμήματος του 434 καταστολέα με ένα συνθετικό παλίνδρομο 14μερές DNA (βλ. Πίνακα 8.2). Οι δύο θέσεις πρόσδεσης του διμερούς του καταστολέα στο DNA είναι πανομοιότυπες. Οι έλικες αναγνώρισης του καταστολέα είναι κόκκινες και η πρώτη έλικα του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα είναι μπλε. (Προσαρμοσμένη από τους Anderson et al., *Nature* 326: 846-852, 1987.)

**Εικόνα 8.15** Οι ειδικές για την αλληλουχία (sequence-specific) αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA παρέχουν ένα γενικό σήμα αναγνώρισης για τις περιοχές του χειριστή στο βακτηριοφάγο 434. (a) Σ' αυτό το σύμπλοκο του τμήματος του 434 καταστολέα με ένα συνθετικό DNA υπάρχουν δύο κατάλοιπα γλουταμίνης (28 και 29) στην αρχή της έλικας αναγνώρισης στο μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα τα οποία παρέχουν τέτοιες αλληλεπιδράσεις με τα τρία πρώτα ζεύγη βάσεων της περιοχής του χειριστή. (b) Η πλευρική ομάδα της Gln 28 σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με άτομα της αδενίνης του ζεύγους βάσεων T14'-A1 στη μεγάλη αύλακα του DNA. (Προσαρμοσμένη από τους Anderson et al., *Nature* 326: 846-852, 1987.)

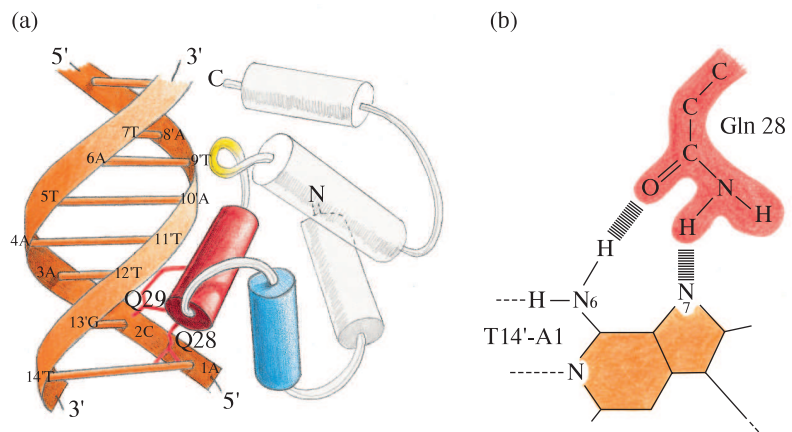
## 8.12 Οι περιοχές του χειριστή αναγνωρίζονται μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-DNA

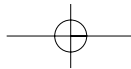
Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA αναλύθηκαν σε υψηλή διακριτικότητα στο σύμπλοκο του αμινοτελικού τμήματος του 434 καταστολέα με ένα 20μερές DNA το οποίο περιείχε την OR1. Ένας ψευδής άξονας συμμετρίας τάξεως 2 συσχετίζει τα δύο μισά αυτού του συμπλόκου. Η συμμετρία δεν είναι απόλυτη, αφού η νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA διαφέρει λίγο σε κάθε μισό (βλ. Πίνακα 8.2). Παρ' όλα αυτά, οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη μία πρωτεϊνική υπομονάδα και στο ένα μισό του DNA είναι πολύ όμοιες με αυτές ανάμεσα στη δεύτερη υπομονάδα και στο άλλο μισό του DNA, αφού οι περισσότερες βάσεις που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη είναι οι ίδιες και στα δύο μισά.

Οι λεπτομέρειες της αλληλεπιδράσης είναι πολύ όμοιες με αυτές του συμπλόκου με το παλίνδρομο συνθετικό 14μερές DNA, όπως φαίνεται στις Εικόνες 8.14 και 8.15. Τα ζεύγη βάσεων στο ένα άκρο του DNA, 1-14', 2-13' κτλ., ονομάζονται ζεύγη 1, 2 κτλ.

Όπως είχε προβλεφθεί, το πρωτεϊνικό διμερές προσδένεται έτσι ώστε οι  $\alpha$ -έλικες αναγνώρισης στα αντίθετα άκρα του πρωτεϊνικού μορίου να τοποθετούνται στη μεγάλη αύλακα του DNA, όπου αλληλεπιδρούν με τα ζεύγη βάσεων στα άκρα του μορίου DNA. Αφού αυτές οι θέσεις πρόσδεσης χωρίζονται από μία στροφή της έλικας του DNA, στο κέντρο του μορίου η μικρή αύλακα αντικρίζει την πρωτεΐνη (βλ. Εικόνα 8.14). Σ' αυτή τη μεσαία περιοχή του χειριστή δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και των βάσεων του DNA.

Αμινοξικά κατάλοιπα της έλικας αναγνώρισης προβάλλουν τις πλευρικές τους ομάδες στη μεγάλη αύλακα και αλληλεπιδρούν με τις πλευρές των ζευγών των βάσεων στο τοίχωμα της έλικας (βλ. Εικόνα 8.15a). Η Gln(Q) 28 σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το N6 και το N7 της A1 στο ζεύγος βάσεων 1 (T14'-A1) (βλ. Εικόνα 8.15b) και η Gln 29 σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το O6 της G13' στο ζεύγος βάσεων 2 (G13'-C2). Το ζεύγος βάσεων 3 (T12'-A3) δε σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη,





ενώ όλες οι άμεσες αλληλεπιδράσεις είναι υδρόφοβες. Οι μεθυλομάδες των πλευρικών ομάδων της Thr (T) 27 και της Gln (Q) 29 σχηματίζουν μια υδρόφοβη εσοχή για την υποδοχή της μεθυλομάδας της T12'.

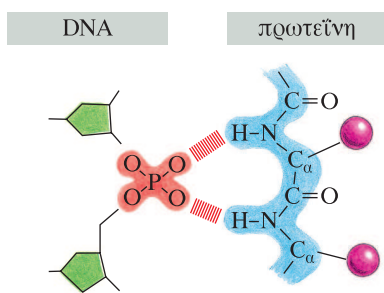
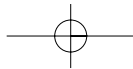
Τα πρώτα τρία ζεύγη βάσεων των έξι περιοχών του χειριστή που αναγνωρίζονται από τον καταστολέα του φάγου 434 είναι ταυτόσημα (βλ. Πίνακα 8.2). Αυτό σημαίνει ότι οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σ' αυτά τα τρία ζεύγη βάσεων και στα δύο κατάλοιπα γλουταμίνης (28 και 29) δεν μπορούν να συνεισφέρουν στη διάκριση μεταξύ των έξι θέσεων πρόσδεσης στο DNA. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές παρέχουν, κυρίως, μια γενική θέση αναγνώρισης των περιοχών του χειριστή. Έτσι, το απλό αυτό πρότυπο υδρογονικών δεσμών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων εξηγεί την ειδικότητα των πρωτεϊνών Cro και καταστολέα του φάγου 434 για τις περιοχές του 434 χειριστή. Ο ρόλος της Gln 29 είναι ιδιαίτερα σημαντικός, αφού αλληλεπιδρά με τα ζεύγη βάσεων 2 και 3. Ο δεσμός υδρογόνου με τη γουανίνη απαιτεί (καθορίζει) την παρουσία C-G στη θέση 2 και η υδρόφοβη εσοχή, που σχηματίζεται από το υδρόφοβο τμήμα της πλευρικής της ομάδας και το κατάλοιπο 27, απαιτεί την παρουσία A-T στο ζεύγος βάσεων 3.

Αυτή η γενική διαδικασία αναγνώρισης είναι ζωτικής σημασίας για το φάγο. Όταν οι γλουταμίνες 28 και 29 αντικατασταθούν από οποιαδήποτε άλλα αμινοξέα, οι μεταλλαγμένοι φάγοι δεν είναι πλέον βιώσιμοι. Επιπλέον, και όπως είναι αναμενόμενο, αφού προσδένεται στον ίδιο χειριστή, η πρωτεΐνη 434 Cro φέρει επίσης κατάλοιπα γλουταμίνης σ' αυτές τις δύο θέσεις στην έλικα αναγνώρισης.

### **8.13 Η διαμόρφωση του DNA καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις του σκελετού του με πρωτεΐνες**

Είναι προφανές από τις κρυσταλλικές δομές αυτών των συμπλόκων πρωτεΐνης-DNA ότι οι διαφορετικές συγγένειες του 434 καταστολέα και της 434 Cro για τις διάφορες περιοχές του χειριστή δεν καθορίζονται από ειδικές για την αλληλουχία αλληλεπιδράσεις (sequence-specific interactions) μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων της έλικας αναγνώρισης και των ζευγών των βάσεων της μεγάλης αύλακας. Αντίθετα, φαίνεται ότι καθορίζονται κυρίως από την ικανότητα του DNA να υφίσταται συγκεκριμένες δομικές αλλαγές που επιτρέπουν τη δημιουργία συμπληρωματικών επιφανειών ανάμεσα στις πρωτεΐνες και στο DNA. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φωσφοσακχαρικού σκελετού του DNA και των πρωτεϊνών είναι σημαντικές για την υιοθέτηση τέτοιων δομικών αλλαγών και επομένως για τη σωστή τοποθέτηση της έλικας αναγνώρισης στη μεγάλη αύλακα.

Η μεσεπιφάνεια ανάμεσα στην DNA-προσδένουσα επικράτεια του καταστολέα και στο DNA καταλαμβάνει μια εκτεταμένη περιοχή. Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο ένα



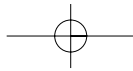
**Εικόνα 8.16** Μη ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA δημιουργούνται συχνά με δεσμούς υδρογόνου (κόκκινο) μεταξύ απόμων οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας του σκελετού του DNA και ομάδων NH της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης.

μονομερές της εν λόγω επικράτειας του καταστολέα και στο DNA συμβαίνουν μέσα στο ένα ήμισυ μιας θέσης αναγνώρισης (δηλαδή, κάθε υπομονάδα του καταστολέα «βλέπει» μόνο το ένα μισό του χειριστή). Για να συμβούν αλληλεπιδράσεις και στα δύο μισά κάθε θέσης (συντελώντας με αυτόν τον τρόπο στην ισχυρή πρόσδεση), είναι απαραίτητο η δομική αλλαγή του DNA να συμπίπτει με την οργάνωση του καταστολέα σε διμερές. Έτσι, οι αναγκαστικές αλλαγές στη διαμόρφωση των κεντρικών ζευγών βάσεων δεν προέρχονται μόνο από τις τοπικές αλληλεπιδράσεις του σκελετού με την πρωτεΐνη, αλλά και από τον τρόπο με τον οποίο η μεσεπιφάνεια του πρωτεϊνικού διμερούς ρυθμίζει τη σχετική θέση και τον προσανατολισμό των δύο ελίκων αναγνώρισης και τις αντίστοιχες επαφές τους με τη μεγάλη αύλακα.

Σε όλα τα σύμπλοκα που έχουν μελετηθεί, η πρωτεϊνική υπομονάδα είναι αγκυροβολημένη στη μεγάλη αύλακα, με εκτεταμένες επαφές κατά μήκος δύο τμημάτων του φωσφοσακχαρικού σκελετού, ένα σε κάθε πλευρά της αύλακας. Σ' αυτές τις επαφές κυριαρχούν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των φωσφορικών ομάδων του DNA και των ομάδων NH του πρωτεϊνικού σκελετού (βλ. Εικόνα 8.16).

Μία από αυτές τις περιοχές αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνει το βρόχο μετά την έλικα αναγνώρισης (κατάλοιπα 40-44 του καταστολέα, παρουσιάζονται με κίτρινο στις Εικόνες 8.14 και 8.15a), όπου τρεις ομάδες NH της κύριας αλυσίδας δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεοτιδίων 9' και 10'. Σ' αυτό το βρόχο, η πλευρική ομάδα της Arg 43 προβάλλει στη μικρή αύλακα και πιθανώς σταθεροποιεί την παρατηρούμενη σύμπυξη της μικρής αύλακας μέσω της εισαγωγής ενός θετικού φορτίου μεταξύ των φωσφορικών ομάδων. Όλα τα κατάλοιπα αυτού του βρόχου (τα οποία βρίσκονται εκτός του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα) συμβάλλουν στη συμπληρωματικότητα των επιφανειών της πρωτεΐνης και του φωσφοσακχαρικού σκελετού των νουκλεοτιδίων 9' και 10'.

Αυτές και άλλες αλληλεπιδράσεις, μεταξύ ομάδων της πρωτεΐνης και του φωσφοσακχαρικού σκελετού του DNA, σταθεροποιούν τη μη κανονική διαμόρφωση του DNA. Σ' αυτές τις αλληλεπιδράσεις εμπλέκεται ένας μεγάλος αριθμός καταλοίπων που κατανέμονται στο μεγαλύτερο τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Άλλα κατάλοιπα, που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων στο πρωτεϊνικό διμερές, διασφαλίζουν την κατάλληλη τοποθέτηση κάθε υπομονάδας, για πρόσδεση στο αντίστοιχο μισό της θέσης πρόσδεσης στο χειριστή. Έτσι, η «μονάδα» που είναι υπεύθυνη για τη διαφορική σύνδεση σε διαφορετικές περιοχές του χειριστή DNA είναι στην πραγματικότητα ολόκληρο το διμερές, και όλες σχεδόν οι επαφές πρωτεΐνης-DNA συμβάλλουν σ' αυτή την ειδικότητα.



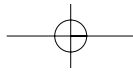
### 8.14 Οι αλλαγές στη διαμόρφωση του DNA είναι σημαντικές για τη διαφορική σύνδεση του καταστολέα και της Cro στις διάφορες θέσεις του χειριστή

Ο καταστολέας και η Cro ξεχωρίζουν τις διάφορες θέσεις του χειριστή με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος αφορά το ζεύγος βάσεων 4, το οποίο είναι παντού A-T, εκτός από ένα μισό θέσης στην OR3 (βλ. Πίνακα 8.2). Η Cro, που προσδένεται ισχυρότερα στην OR3, είναι αδιάφορη στην παρουσία A-T ή G-C στη θέση 4, ενώ ο καταστολέας, που προσδένεται ισχυρότερα στην OR1, προτιμά κυρίως A-T. Η διαμόρφωση ενός συνθετικού DNA που περιείχε τη θέση OR3 του χειριστή σε σύμπλοκο με το DNA-προσδεδόμενο τμήμα του καταστολέα έδωσε σημαντικά στοιχεία για τη μοριακή βάση αυτής της διάκρισης. Η πρόσδεση αυτού του τμήματος του 434 καταστολέα στο DNA προκαλεί διάφορες αλλαγές στη διαμόρφωση των δύο μισών της OR3. Το αριστερό μισό, το οποίο περιέχει την ομόφωνη αλληλουχία 5'-ACAA..., έχει τη διαμόρφωση που έχουν και τα δύο μισά σε άλλα σύμπλοκα με το τμήμα του καταστολέα, ενώ το δεξί μισό έχει τη διαμόρφωση που απαντάται (στην περιοχή γύρω από το φωσφόρο 11) στα σύμπλοκα με την Cro.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το τμήμα του καταστολέα δεν μπορεί να επάγει στη μη ομόφωνη αλληλουχία, στη δεξιά πλευρά της OR3, τη διαμόρφωση που απαιτείται για την ισχυρή πρόσδεση του καταστολέα στο DNA.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η ασθενέστερη πρόσδεση του καταστολέα στην OR3 είναι αποτέλεσμα της λιγότερο καλής «εφαρμογής» μεταξύ της πρωτεΐνης και του σκελετού του DNA (βλ. Εικόνα 8.13).

Ο δεύτερος τρόπος με τον οποίο ο καταστολέας και η Cro ξεχωρίζουν διάφορες θέσεις του χειριστή αφορά τα κεντρικά ζεύγη βάσεων, τα οποία αποτελούν τη μοναδική πηγή ποικιλότητας στις θέσεις πρόσδεσης (εκτός από την OR3). Η ικανότητα των επαφών πρωτεΐνης-DNA να προκαλούν τις κατάλληλες αλλαγές στη δομή του DNA, και ιδιαίτερα την υπερελίκωση στην κεντρική περιοχή, μπορεί να ρυθμιστεί από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA. Η υπερελίκωση προκαλεί ένα στένεμα της μικρής αύλακας στην κεντρική περιοχή του χειριστή. Πιστεύεται γενικά ότι τα ζεύγη A-T είναι πιο συμβατά με τη δομή μιας τέτοιας υπερελίκωσης από τα G-C ζεύγη. Αυτό σημαίνει ότι ένα DNA που φέρει ζεύγη A-T στην κεντρική περιοχή των αλληλουχιών του χειριστή μπορεί να υιοθετήσει γρηγορότερα και ευκολότερα τη διαμόρφωση που είναι απαραίτητη για τη σωστή αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-DNA από ένα DNA που φέρει ζεύγη G-C σ' αυτές τις θέσεις. Πειραματικές μεταλλάξεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν συνθετικοί χειριστές το επιβεβαιώνουν: αποδεικνύουν ότι η αλλαγή της συγγένειας μεταξύ καταστολέα και DNA είναι δυνατή, αλλάζοντας τα ζεύγη βάσεων στη μεσαία περιοχή. Έτσι, αν αλλάξουμε τα ζεύγη βάσεων 7 και 8 από T-A και A-T σε G-C και C-G, η συγγέ-

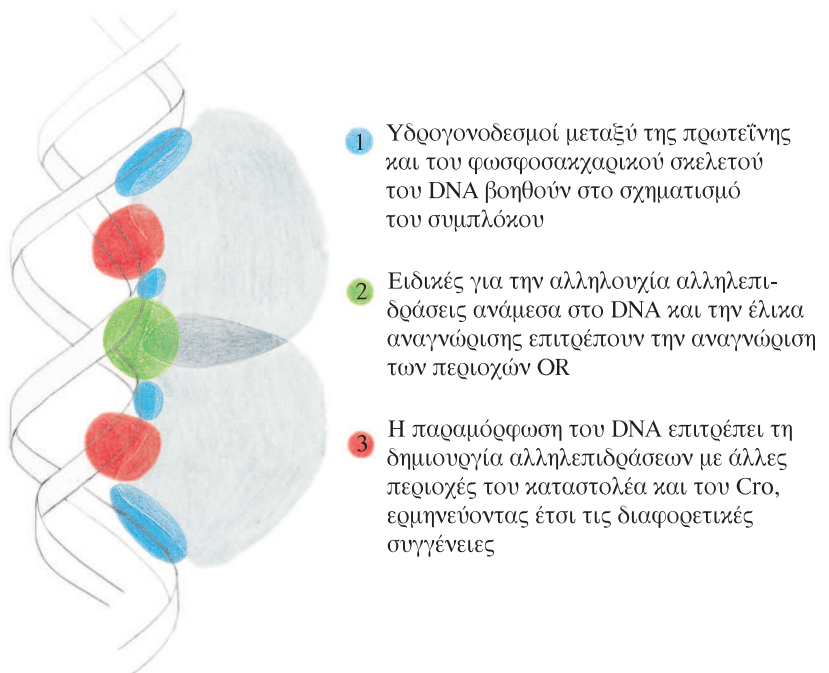


νεια για το DNA-προσδενόμενο τμήμα του καταστολέα είναι δεκαπέντε φορές μικρότερη. Με άλλα λόγια, η αλληλουχία των βάσεων αυτής της περιοχής αλλάζει τη συγγένεια του καταστολέα για το DNA, επηρεάζοντας τις τοπικές αλλαγές στη διαμόρφωση. Συνεπώς, πρόκειται περισσότερο για μια τοπική δομή DNA που ρυθμίζει την πρόσδεση του καταστολέα παρά για άμεσες ειδικές για την αλληλουχία αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης.

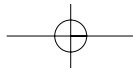
### 8.15 Τα βασικά χαρακτηριστικά του καταστολέα και της Cro

Οι DNA-προσδένουσες πρωτεΐνες Cro και καταστολέας των τριών φάγων, λάμδα, P22 και 434, αναγνωρίζουν τις περιοχές του χειριστή στο DNA μέσω ενός μοτίβου έλικά-στροφή-έλικά. Η δεύτερη α-έλικα αυτού του μοτίβου (η έλικά αναγνώρισης) προσδένεται στη μεγάλη αύλακα του DNA. Οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν διμερή, με αποτέλεσμα δύο πανομοιότυπες έλικες αναγνώρισης, οι οποίες απέχουν 34 Å μεταξύ τους και βρίσκονται στα δύο άκρα του επιμήκους διμερούς, να προσδένονται στα άκρα του χειριστή.

Τα δύο πρώτα αμινοξικά κατάλοιπα στις έλικες αναγνώρισης αυτών των δύο πρωτεϊνών από το φάγο 434 είναι γλουταμίνες που δημιουργούν συγκεκριμένους δεσμούς υδρογόνου με τα δύο πρώτα ζεύγη βάσεων της περιοχής του χειριστή. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι πανομοιότυπες σε όλες τις περιοχές πρόσδεσης στο χειριστή του φάγου 434. Έτσι, μερικά μόνο κατάλοιπα στην έλικά αναγνώρισης του μοτίβου έλικά-στροφή-έλικά αρκούν για να εξηγήσουν την ικανότητα αναγνώρισης και πρόσδεσης των πρωτεϊνών Cro και καταστολέα στις περιοχές του χειριστή. Αυτές οι αλληλεπι-



**Εικόνα 8.17** Σχηματικό διάγραμμα των κύριων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DNA και του μοτίβου έλικά-στροφή-έλικά στις DNA-προσδένουσες πρωτεΐνες.



δράσεις είναι ειδικές (με τις πλευρές των ζευγών των βάσεων στη μεγάλη αύλακα του DNA), όπως είχε προβλέψει ο Matthews.

Παρ' όλα αυτά, τέτοιες ειδικές για την αλληλουχία αλληλεπιδράσεις δεν εξηγούν τη διαφορετική συγγένεια της Cro και του καταστολέα για τις διαφορετικές περιοχές του χειριστή. Αυτές οι συγγένειες φαίνεται να καθορίζονται από την ικανότητα του DNA να υφίσταται συγκεκριμένες δομικές αλλαγές. Δύο παράγοντες τουλάχιστον είναι σημαντικοί για την ικανότητα του συμπλόκου να επιτυγχάνει την κατάλληλη διαμόρφωση του DNA (βλ. Εικόνα 8.17). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φωσφοσακχαρικού σκελετού του DNA και περιοχών της πρωτεΐνης δημιουργούν μια μεγάλη περιοχή αλληλεπιδράσεων (μεταξύ συμπληρωματικών επιφανειών), η οποία σταθεροποιεί τη δομική αλλαγή στο DNA. Αυτές οι πρωτεϊνικές περιοχές δεν περιορίζονται στο μοτίβο έλικαστροφή-έλικα, αλλά διασκορπίζονται σε όλη σχεδόν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η ικανότητα αυτών των αλληλεπιδράσεων να επιφέρουν μια δομική αλλαγή μπορεί να καθοριστεί από την αλληλουχία του DNA.

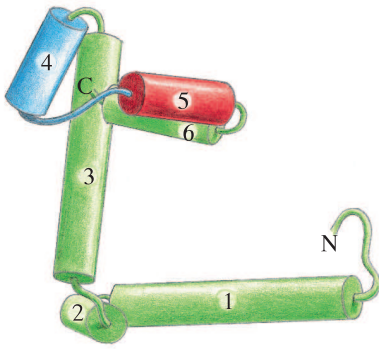
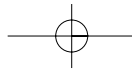
### 8.16 Η πρόσδεση στο DNA ρυθμίζεται αλλοστερικά

Η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA των περισσότερων καταστολέων και ενεργοποιητών ρυθμίζεται από μικρά μόρια, όπως σάκχαρα, αμινοξέα ή κυκλικό AMP, τα οποία προσδέονται στην πρωτεΐνη σε μια θέση διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης DNA. Η πρόσδεσή τους στην πρωτεΐνη προκαλεί μια αλλαγή στην πρωτεϊνική διαμόρφωση, η οποία με τη σειρά της αλλάζει τη θέση πρόσδεσης του DNA και έτσι ρυθμίζει τη συγγένεια της πρωτεΐνης για το DNA. Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 6, ο Jacques Monod, στο Ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι, εισήγαγε τον όρο «αλλοστερική πρόσδεση» για να τονίσει ότι οι θέσεις στις οποίες προσδέονται οι μικροί προσδέτες, γνωστοί ως αλλοστερικοί τελεστές, είναι διαφορετικές (διακριτές στο χώρο) από τις λειτουργικές θέσεις πρόσδεσης. Θα συζητήσουμε ένα παράδειγμα αλλοστερικού ελέγχου της πρόσδεσης DNA όπως παρατηρείται στον καταστολέα της τρυπτοφάνης (trp) από την *Escherichia coli*.

### 8.17 Ο trp καταστολέας περιέχει ένα μοτίβο έλικαστροφή-έλικα

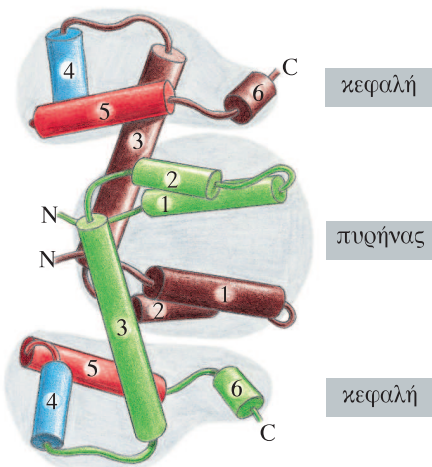
Ο **trp καταστολέας** ελέγχει το οπερόνιο για τη σύνθεση της L-τρυπτοφάνης στην *Escherichia coli* με έναν απλό **θρόχο αρνητικής ανάδρασης**. Απουσία L-τρυπτοφάνης, ο καταστολέας είναι ανενεργός, το οπερόνιο λειτουργεί και παράγονται τα ένζυμα που συνθέτουν την L-τρυπτοφάνη. Καθώς η συγκέντρωση της L-τρυπτοφάνης αυξάνεται, προσδέεται στον καταστολέα και τον ενεργοποιεί, ώστε να μπορεί να προσδεθεί στο χειριστή και να καταστείλει τη μεταγραφή του γονιδίου.





**Εικόνα 8.18** Η υπομονάδα του trp καταστολέα. Η υπομονάδα περιέχει 107 κατάλοιπα αμινοξέων που αναδιπλώνονται σε έξι α-έλικες. Οι έλικες 4 (μπλε) και 5 (κόκκινο) σχηματίζουν το DNA-προσδεμένο μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα. (Προσαρμοσμένη από τους Schevitz et al., *Nature* 317: 782-786, 1985.)

**Εικόνα 8.19** Οι α-έλικες της N-τελικής περιοχής του trp καταστολέα εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων και σχηματίζουν ένα σταθερό πυρήνα στο μέσο του διμερούς. Οι έλικες 4-6, οι οποίες περιλαμβάνουν το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, σχηματίζουν δύο «κεφαλές» στα δύο άκρα του μορίου. Η έλικα 3 συνδέει τον πυρήνα με την «κεφαλή» και στις δύο υπομονάδες. (Προσαρμοσμένη από τους Schevitz et al., *Nature* 317: 782-786, 1985.)



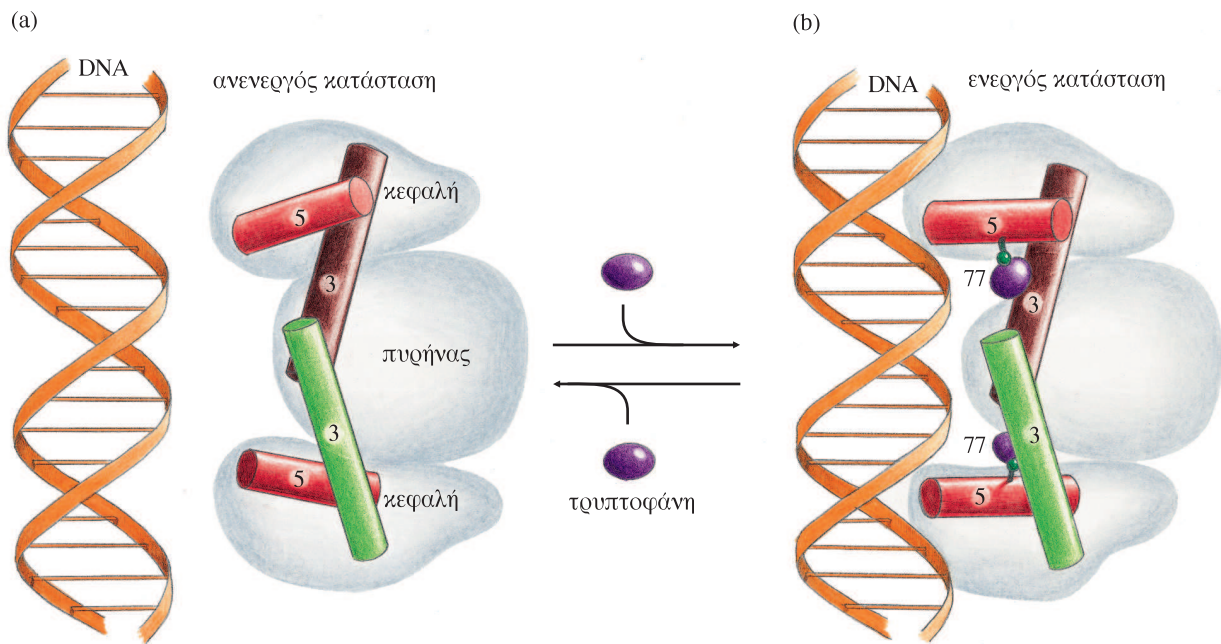
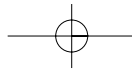
Η δομή του trp καταστολέα προσδιορίστηκε απουσία και παρουσία προσδεμένης τρυπτοφάνης σε διακριτικότητα 1.8 Å από την ομάδα του Paul Sigler, στο Πανεπιστήμιο του Σικάγο. Ο trp καταστολέας είναι ένα διμερές, όπως οι άλλες πρωτεΐνες που συζητήθηκαν σ' αυτό το Κεφάλαιο. Η πολυπεπτιδική του αλυσίδα αποτελείται από 107 αμινοξέα και αναδιπλώνεται σε έξι α-έλικες (βλ. Εικόνα 8.18). Έτσι, έχει δομή α-τύπου, όπως ο λάμδα καταστολέας, αλλά η διάταξη των ελίκων στην υπομονάδα είναι αρκετά διαφορετική. Οι έξι έλικες δεν πακετάρονται σε μια κανονική δομή με υδρόφοβο πυρήνα και είναι αμφίβολο το κατά πόσο μονομερή με διάταξη ελίκων, όπως αυτή που φαίνεται στην Εικόνα 8.18, θα ήταν σταθερά. Η σταθερότητα προέρχεται από το διμερισμό, καθώς οι δύο υπομονάδες εφαρμόζουν μεταξύ τους και δίνουν ένα λειτουργικό μόριο που, σε αντίθεση με τις υπομονάδες του, έχει μια σφαιρική και συμπαγή μορφή (βλ. Εικόνα 8.19).

Οι έλικες στις N-τελικές περιοχές των δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων συμπλέκονται και δημιουργούν εκτεταμένες επαφές στο κεντρικό τμήμα του μορίου για να σχηματίσουν ένα σταθερό πυρήνα. Ο πυρήνας αυτός φέρει δύο «κεφαλές», καθεμιά από τις οποίες περιλαμβάνει τις τρεις τελευταίες έλικες μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η έλικα 3 στο μέσο της πεπτιδικής αλυσίδας της υπομονάδας είναι αρκετά επιμήκης και αποτελεί το βασικό σύνδεσμο του πυρήνα με την «κεφαλή».

Δομικές μελέτες του συμπλόκου καταστολέας-DNA έδειξαν ότι οι έλικες 4 και 5 σχηματίζουν ένα μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα και ότι οι πλευρικές ομάδες της έλικας αναγνώρισης 5 αλληλεπιδρούν με βάσεις στη μεγάλη αύλακα με τη διαμεσολάβηση μορίων νερού.

## 8.18 Μια δομική αλλαγή ρυθμίζει ένα λειτουργικό διακόπτη

Ποιος είναι ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η πρόσδεση της τρυπτοφάνης –του αλλοστερικού τελεστή– επιτρέπει την πρόσδεση του trp καταστολέα στο DNA; Οι δομές του καταστολέα με και χωρίς προσδεμένη τρυπτοφάνη έδωσαν μια απλή απάντηση. Απουσία τρυπτοφάνης, οι «κεφαλές», και συγκεκριμένα οι έλικες αναγνώρισης, κλίνουν προς τα μέσα, προς τον πυρήνα (βλ. Εικόνα 8.20a). Αυτό κάνει την απόσταση ανάμεσα στις δύο θέσεις πρόσδεσης DNA στο μόριο του καταστολέα πολύ μικρή, μικρότερη κατά 5-6 Å απ' ό,τι θα έπρεπε για να είναι δυνατή η πρόσδεση στη μεγάλη αύλακα. Η ειδική πρόσδεση του DNA δεν είναι δυνατή και ο καταστολέας είναι ανενεργός. Η πρόσδεση της τρυπτοφάνης προκαλεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση του καταστολέα, η οποία αλλάζει τον προσανατολισμό των ελίκων αναγνώρισης. Οι «κεφαλές» κλίνουν προς τα έξω και σχηματίζονται δύο πανομοιότυπες κοιλότητες ανάμεσα σ' αυτές και στον πυρήνα (βλ. Εικόνα 8.20b). Δύο μόρια τρυπτοφάνης που βρίσκονται προσδεμένα σ' αυτές τις κοιλότητες του διμερισμένου καταστολέα, σφηνώνονται ανά-



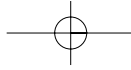
μεσα στις μακριές α-έλικες (3) και στις έλικες αναγνώρισης των «κεφαλών». Όταν η τρυπτοφάνη είναι προσδεσμένη σ' αυτές τις κοιλότητες, οι έλικες αναγνώρισης απέχουν μεταξύ τους 34 Å, απόσταση κατάλληλη για την πρόσδεση στη μεγάλη αύλακα του DNA, όπως συμβαίνει και στον 434 καταστολέα.

Οι γενετικές μελέτες από την ομάδα του Charles Yanofsky στο Πανεπιστήμιο Stanford, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν πριν γίνει γνωστή η κρυσταλλική δομή, επιβεβαιώνουν αυτό το μηχανισμό. Η πλευρική ομάδα της Ala 77, η οποία βρίσκεται στην περιοχή του βρόχου του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα, αντικρίζει την κοιλότητα στην οποία προσδένεται η τρυπτοφάνη. Όταν αυτή η πλευρική ομάδα αντικατασταθεί από τη μεγαλύτερη πλευρική ομάδα της Val, ο μεταλλαγμένος καταστολέας δεν απαιτεί την παρουσία της τρυπτοφάνης για την ειδική πρόσδεση στον DNA χειριστή. Η παρουσία της ογκωδέστερης πλευρικής ομάδας της βαλίνης στη θέση 77 διατηρεί τις «κεφαλές» σε ενεργή διαμόρφωση ακόμη και απουσία προσδεσμένης τρυπτοφάνης. Η κρυσταλλική δομή αυτού του μεταλλαγμένου καταστολέα, απουσία τρυπτοφάνης, είναι βασικά ίδια με αυτήν του καταστολέα άγριου τύπου με τρυπτοφάνη. Πρόκειται για ένα εξαιρετικό παράδειγμα για το πώς αντικαταστάσεις αμινοξέων στην πρωτεΐνη μπορούν να μιμηθούν τις αλλαγές που επάγονται στην πρωτεϊνική διαμόρφωση από τους αλλοστερικούς τελεστές.

**Εικόνα 8.20** Σχηματικό διάγραμμα του trp καταστολέα και του DNA (a) στην ανενεργή και (b) στην ενεργή μορφή του. Όταν η L-τρυπτοφάνη, που είναι ένας συγκαταστολέας, προσδεθεί στον καταστολέα, οι «κεφαλές» αλλάζουν τη σχετική τους θέση ως προς τον πυρήνα και προκύπτει η ενεργή μορφή του καταστολέα, ο οποίος προσδένεται στο DNA. Οι δομές του DNA και του trp καταστολέα περιγράφονται σε γενικές γραμμές. Επισημαίνονται οι θέσεις των ελίκων αναγνώρισης του DNA (5) και των ελίκων (3) που συνδέουν τον πυρήνα με τις «κεφαλές». Η πλευρική ομάδα του καταλοίπου 77 είναι πράσινη, η τρυπτοφάνη είναι μοβ (βλ. στο κείμενο τη σημασία αυτού του καταλοίπου). (Προσαρμοσμένη από τους Zhang et al., *Nature* 327: 591-597, 1987.)

### 8.19 Ο Lac καταστολέας προσδένεται τόσο στη μεγάλη όσο και στη μικρή αύλακα, επάγοντας μια μεγάλη κάμψη στο DNA

Το lac οπερόνιο της *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως μοντέλο για τη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης από τους Jacob και Monod πριν από περίπου 30 χρόνια. Το μόριο



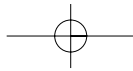
του *lac* καταστολέα λειτουργεί ως διακόπτης που, ρυθμιζόμενος από μόρια-επαγωγείς, ελέγχει τη σύνθεση ενζύμων απαραίτητων ώστε η *E. coli* να μπορεί να χρησιμοποιήσει τη λακτόζη ως πηγή ενέργειας. Απουσία λακτόζης, ο καταστολέας προσδένεται ισχυρά στον DNA χειριστή, εμποδίζοντας τη σύνθεση αυτών των ενζύμων. Αντίθετα, παρουσία λακτόζης, ο καταστολέας αποδεσμεύει το χειριστή, επιτρέποντας τη μεταγραφή του οπερονίου.

Το μονομερές του *lac* καταστολέα, μια αλυσίδα 360 αμινοξέων, συναθροίζεται σε ένα λειτουργικά ενεργό ομοτετραμερές. Είναι το τυπικό μέλος μιας μεγάλης οικογένειας ομόλογων βακτηριακών καταστολέων. Η PurR, η οποία λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής στην πορεία βιοσύνθεσης της πουρίνης, είναι ένα άλλο μέλος αυτής της οικογένειας. Σε αντίθεση με το *lac* καταστολέα, η λειτουργική μορφή της PurR είναι ένα διμερές. Οι κρυσταλλικές δομές και των δύο αυτών μελών της οικογένειας Lac I είναι γνωστές σε σύμπλοκά τους με τμήματα DNA. Η δομή του συμπλόκου του τετραμερούς του *lac* καταστολέα με το DNA προσδιορίστηκε από την ομάδα του Mitchell Lewis στο Πανεπιστήμιο Pennsylvania στη Philadelphia και το σύμπλοκο της διμερούς PurR με DNA από την ομάδα του Richard Brennan στο Oregon Health Sciences του Portland.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της υπομονάδας του *lac* καταστολέα οργανώνεται σε τέσσερις επικράτειες (βλ. Εικόνα 8.21): μία N-τελική DNA-προσδένουσα επικράτεια που περιέχει το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, μία συνδετική έλικα που προσδένεται στη μικρή αύλακα του DNA, μία μεγάλη κεντρική επικράτεια στην οποία προσδένεται ο συγκαταστολέας και η οποία έχει παρόμοια δομή με την περιπλασματική **αραθινόζη**-προσδένουσα πρωτεΐνη που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 4 και, τέλος, μία C-τελική α-έλικα που εμπλέκεται στον τετραμερισμό. Αυτή η α-έλικα απουσιάζει από τη δομή της υπομονάδας της PurR, κατά τ' άλλα, οι δομές τους είναι παρόμοιες.

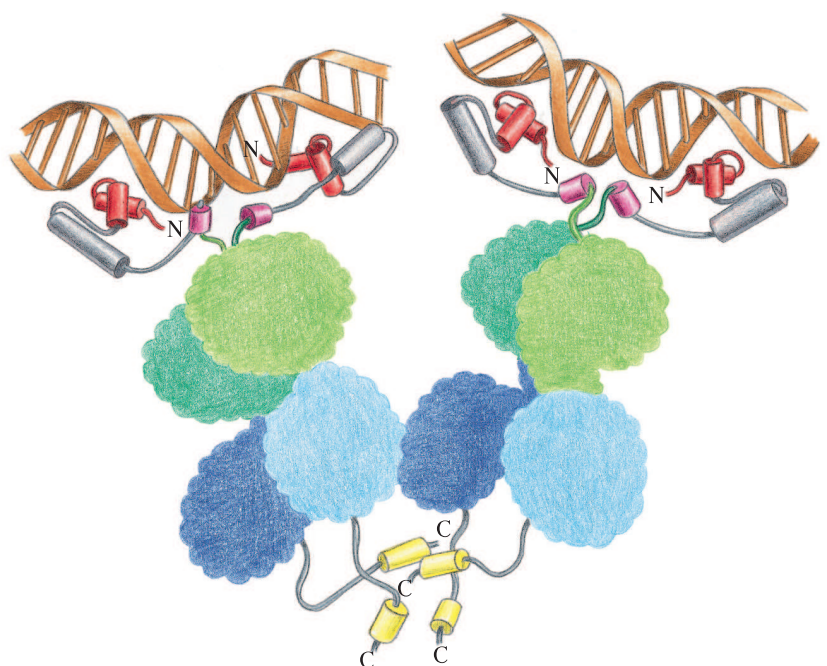
Η τετραμερής δομή του *lac* καταστολέα έχει ένα αρκετά ασυνήθιστο σχήμα V (βλ. Εικόνα 8.22). Κάθε βραχίονας του σχήματος V του μορίου είναι ένα συμπαγές διμερές το οποίο είναι παρόμοιο στη δομή με το διμερές της PurR και φέρει τις δύο N-τελικές DNA-προσδένουσες επικράτειες μαζί στην άκρη του βραχίονα. Τα δύο διμερή του *lac* καταστολέα συγκρατούνται μαζί στο άλλο άκρο από τις τέσσερις καρβοξυτελικές α-έλικες, οι οποίες σχηματίζουν ένα 4-α-ελικοειδές δεμάτιο.

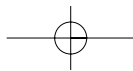
Κάθε διμερής βραχίονας προσδένει ένα ξεχωριστό αντίγραφο μιας παλίνδρομης αλληλουχίας DNA. Οι έλικες αναγνώρισης των δύο υπομονάδων εισέρχονται σε δύο διαδοχικές μεγάλες αύλακες με τρόπο παρόμοιο με αυτόν της πρόσδεσης των βακτηριοφαγικών μορίων της Cro και του καταστολέα, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Επιπλέον, οι δύο συνδετικές έλικες του διμερούς, που βρίσκονται κοντά στο χώρο, αλληλεπιδρούν με τη μικρή αύλακα, που βρίσκεται ανάμεσα στις δύο θέσεις πρόσδεσης των μοτί-



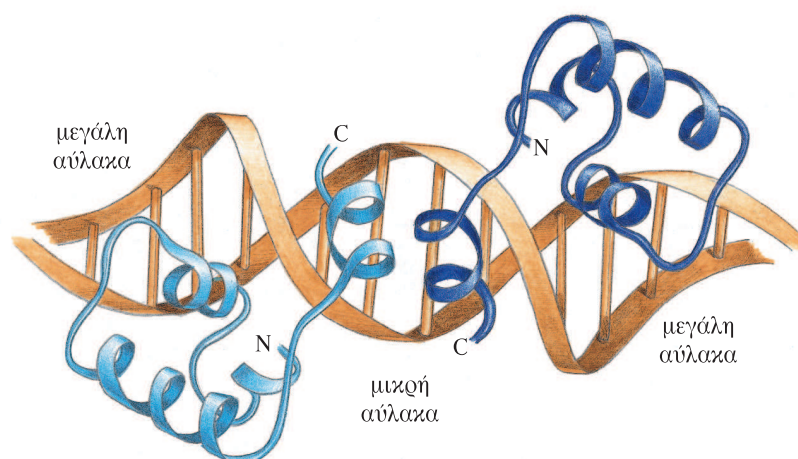
**Εικόνα 8.21** Διάγραμμα τύπου Richardson της μιας υπομονάδας του lac καταστολέα. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα οργανώνεται σε τέσσερις επικράτειες, μία αμινοτελική DNA-προσδένουσα επικράτεια (κόκκινο) που περιλαμβάνει το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, μία συνδετική έλικα (μοβ), μία μεγάλη κεντρική επικράτεια που αποτελείται από δύο υποεπικράτειες (πράσινο και μπλε) και μία C-τελική α-έλικα. (Προσαρμοσμένη από τους Lewis et al., *Science* 271: 1247-1254, 1996.)

**Εικόνα 8.22** Το μόριο του lac καταστολέα είναι ένα τετραμερές σχήματος V στο οποίο κάθε βραχίονας είναι ένα διμερές που περιέχει μία θέση πρόσδεσης DNA. Τα μοτίβα έλικα-στροφή-έλικα (κόκκινο) κάθε διμερούς προσδένονται σε δύο διαδοχικές μεγάλες αύλακες και οι συνδετικές έλικες (μοβ) προσδένονται (δίπλα ή μία στην άλλη) στη μικρή αύλακα, ανάμεσα στις δύο θέσεις πρόσδεσης της μεγάλης αύλακας. Οι τέσσερις υπομονάδες του τετραμερούς συγκροτούνται μαζί από τέσσερις C-τελικές έλικες (κίτρινο) που σχηματίζουν ένα 4-α-ελικοειδές δεμάτιο. Τα προσδεμένα τμήματα DNA κάμπτονται. (Προσαρμοσμένη από τους Lewis et al., *Science* 271: 1247-1254, 1996.)



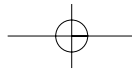


**Εικόνα 8.23** Τα μοτίβα έλικα-στροφή-έλικα των υπομονάδων τόσο της PurR όσο και του Iac καταστολέα προσδένονται στη μεγάλη αύλακα του DNA, με το αμινοτελικό άκρο της δεύτερης έλικας (έλικα αναγνώρισης) να κατευθύνεται προς την αύλακα. Οι δύο συνδετικές έλικες κάθε βραχίονα του τετραμερούς προσδένονται (δίπλα η μία στην άλλη) στη μικρή αύλακα του DNA, η οποία είναι πλατιά και ρηχή εξαιτίας της παραμόρφωσης της δομής του B-DNA. (Προσαρμοσμένη από τους Schumacher et al., *Science* 266: 763-770, 1994.)



βων έλικα-στροφή-έλικα (βλ. Εικόνα 8.23). Τόσο η έλικα αναγνώρισης όσο και η συνδετική έλικα σχηματίζουν ειδικές για την αλληλουχία αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών πλευρικών τους ομάδων και των νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA.

Παρακάτω ακολουθεί ένα παράδειγμα αναγνώρισης βάσεων στη μικρή αύλακα του DNA και ο συσχετισμός της με την αναγνώριση στη μεγάλη αύλακα. Δύο ογκώδη κατάλοιπα λευκίνης από τις συνδετικές έλικες αναγκάζουν τη μικρή αύλακα να ανοίξει και να γίνει πλατιά και ρηχή. Ως συνέπεια, παραμορφώνεται η Β-μορφή του DNA και το μόριο κάμπτεται απότομα, απομακρυνόμενο από την πρωτεΐνη (βλ. Εικόνα 8.22). Εξαιτίας αυτής της κάμψης, η απόσταση των δύο ελίκων αναγνώρισης στη μεγάλη αύλακα και ο σχετικός τους προσανατολισμός διαφέρουν από αυτά στα σύμπλοκα των βακτηριοφαγικών Cro και καταστολέα με το DNA. Οι άγριου τύπου περιοχές του χειριστή για το Iac καταστολέα είναι ψευδο-παλίνδρομες με ένα κεντρικό ζεύγος βάσεων ανάμεσα στα ψευδο-συμμετρικά μισά, ενώ στους κρυστάλλους το DNA είναι αυστηρά παλίνδρομο και απουσιάζει το κεντρικό ζεύγος βάσεων. Αυτή η διαφορά δε θα μπορούσε να επηρεάσει την πρόσδεση των ελίκων αναγνώρισης στο DNA, αλλά λεπτομέρειες στην κάμψη του και στην πρόσδεση των συνδετικών ελίκων στο κεντρικό τμήμα θα μπορούσαν να διαφέρουν στους κρυστάλλους σε σχέση με την κατάσταση *in vivo*. Παρ' όλα αυτά, τέτοιες διαφορές αναμένεται να είναι ελάχιστον σημασίας, αφού ο διμερής καταστολέας PurR κάμπει επίσης το DNA και βασικά μοιάζει με τον ένα βραχίονα του τετραμερισμένου Iac καταστολέα. Στους κρυστάλλους του συμπλόκου PurR-DNA, το μόριο του DNA έχει τον ίδιο αριθμό βάσεων με το χειριστή PurR. Καθένας από τους δύο βραχίονες του τετραμερούς (μορφής V) του Iac καταστολέα προσδένεται στο αντίστοιχο τμήμα DNA με παρόμοιο τρόπο. Αφού στο τετραμερές οι περιοχές πρόσδεσης είναι απομακρυσμένες, στις άκρες των δύο βραχίωνων του V τα δύο τμήματα του DNA δεν αλληλεπιδρούν (βλ. Εικόνα 8.22).



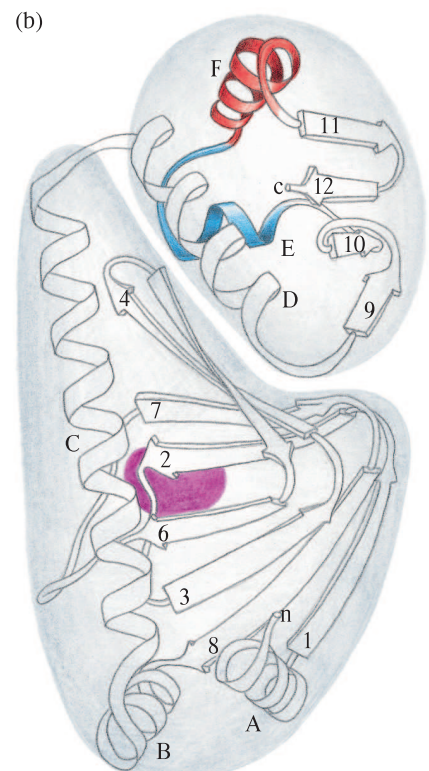
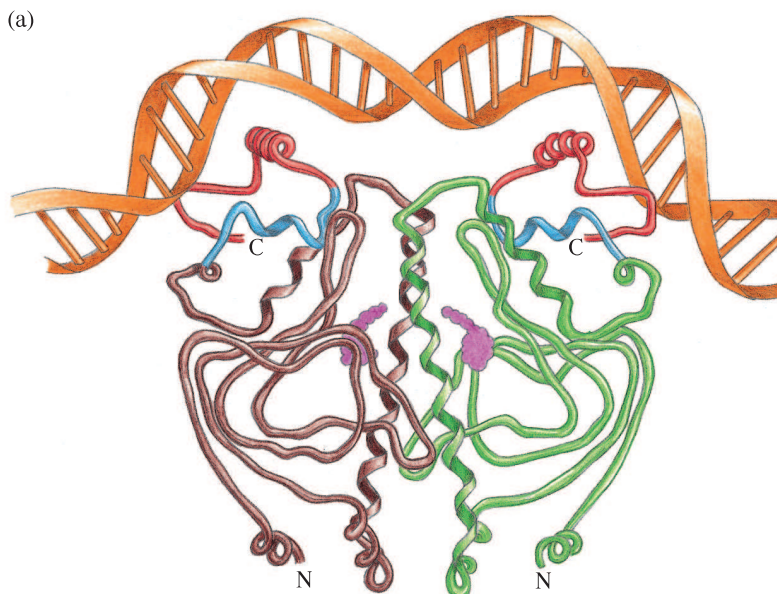
## 8.20 Η CAP-επαγόμενη κάμψη του DNA θα μπορούσε να ενεργοποιεί τη μεταγραφή

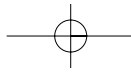
Η **CAP** (**catabolite gene activating protein**) είναι μια DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη που βοηθά την RNA πολυμεράση στην αποτελεσματική πρόσδεσή της σε ορισμένους εκκινητές της *Escherichia coli*. Με άλλα λόγια, είναι μια **πρωτεΐνη θετικού ελέγχου** που προάγει τη συχνότερη έναρξη της σύνθεσης RNA. Η CAP μόνη της είναι μία μη ειδική DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη, αλλά με πρόσδεση κυκλικού AMP μετατρέπεται σε μια μορφή που προσδένεται ισχυρά σε ειδικούς χειριστές.

Η CAP ελέγχει οπερόνια τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολισμό σακχάρων. Ένα από αυτά είναι το *lac* οπερόνιο. Όταν το επίπεδο των μεταβολικών προϊόντων της λακτόζης είναι χαμηλό, η συγκέντρωση του κυκλικού AMP στο κύτταρο αυξάνεται, και ενεργοποιείται η CAP, η οποία προσδένεται σε ειδικούς χειριστές και αυξάνει το ρυθμό μεταγραφής των παρακείμενων οπερονίων.

Πολλές βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες των συμπλόκων CAP-DNA σε διάλυμα έδειξαν ότι η CAP με την πρόσδεσή της επάγει μια απότομη κάμψη στο DNA. Αυτό επιβεβαιώθηκε όταν η ομάδα του Thomas Steitz, στο Πανεπιστήμιο του Yale, προσδιόρισε την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της CAP με κυκλικό AMP και DNA σε διακριτικότητα 3 Å. Το μόριο της CAP αποτελείται από δύο πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 209 αμινοξικών καταλοίπων η καθεμία (βλ. Εικόνα 8.24). Κάθε αλυσίδα αναδιπλώνεται σε δύο επικράτειες που έχουν ξεχωριστές λειτουργίες (βλ. Εικόνα 8.24b). Η μεγαλύτερη επικράτεια, η N-τελική, προσδένει το μόριο του αλλοστερικού τελεστή, το κυκλικό AMP, και συμμετέχει σε όλες τις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων για το σχηματισμό του διμερούς. Η C-τελική επικράτεια περιέχει το μοτίβο έλικα-στροφής-έλικα που προσδένει το DNA.

**Εικόνα 8.24** (α) Η δομή του συμπλόκου CAP-κυκλικό AMP-DNA. Οι δύο πρωτεϊνικές αλυσίδες του διμερούς μορίου της CAP είναι χρωματισμένες με πράσινο και καφέ. Το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα είναι μπλε και κόκκινο, με την έλικα αναγνώρισης και το C-τελικό άκρο κόκκινο. Το DNA, το οποίο είναι κεκαμμένο στο σημείο πρόσδεσης της έλικας αναγνώρισης, χρωματίζεται πορτοκαλί, ενώ τα μόρια του κυκλικού AMP χρωματίζονται μοβ. (β) Σχηματικό διάγραμμα της δομής μιας υπομονάδας της CAP. Οι β κλώνοι (1-12) και οι α-έλικες (A-F) αριθμούνται από το αμινοτελικό άκρο. Το DNA-προσδεδεμένο μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα είναι χρωματισμένο μπλε και κόκκινο, με την έλικα αναγνώρισης κόκκινη. Η θέση πρόσδεσης του κυκλικού AMP είναι μοβ. [(α) Προσαρμοσμένη από τους Schultz et al., *Science* 253: 1001-1007, 1991. (β) Προσαρμοσμένη από τους McKay και Steitz, *Nature* 290: 744-749, 1981.]



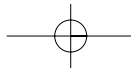


Το διμερές της CAP αλληλεπιδρά άμεσα με 27 από τα 30 ζεύγη βάσεων του τμήματος DNA που είναι παρόντα στον κρύσταλλο. Τα αμινοξικά άκρα των ελίκων αναγνώρισης (κόκκινα στην Εικόνα 8.24) των μοτίβων έλικα-στροφή-έλικα προσδένονται στη μεγάλη αύλακα του DNA. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές παρέχουν ειδική για την αλληλουχία αναγνώριση μεταξύ των πρωτεϊνικών πλευρικών ομάδων και των εκτεθειμένων πλευρών των ζευγών βάσεων. Επιπλέον, 22 από τις φωσφορικές ομάδες του DNA αλληλεπιδρούν άμεσα με πρωτεϊνικές πλευρικές ομάδες ή ομάδες αμιδίων της κύριας αλυσίδας, παρέχοντας ένα μεγάλο αριθμό επαφών.

Τα 10 κεντρικά ζεύγη βάσεων του παλίνδρομου μορίου DNA έχουν κανονική B-δομή. Ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων 5 και 6, σε κάθε μισό του τμήματος DNA (τα ζεύγη μετρώνται από το κέντρο) παρατηρείται μία κάμψη  $40^\circ$ , η οποία προκαλεί την απομάκρυνση των ζευγών (βλ. Εικόνα 8.24a). Μετά από αυτή την τοπική κάμψη, οι δύο ακραίες περιοχές έχουν μια δομή παρόμοια με του B-DNA. Η κάμψη συμβαίνει σε ένα ζεύγος TG, στην αλληλουχία GTG. Τα ζεύγη TG στις θέσεις 5 και 6 είναι υψηλά συντηρημένα και στα δύο μισά των διαφόρων θέσεων CAP-πρόσδεσης, ίσως επειδή διευκολύνουν την κάμψη.

Από πού όμως προέρχεται η ενέργεια για την κάμψη σ' αυτό το σύμπλοκο; Τα 10 κεντρικά ζεύγη βάσεων είναι αγκυροβολημένα στην πρωτεΐνη μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, στους οποίους συμμετέχουν οι έξι φωσφορικές ομάδες του DNA που αντικρίζουν την πρωτεΐνη σ' αυτή την περιοχή. Η επιφάνεια της πρωτεΐνης είναι συμπληρωματική με το B-DNA, επομένως δεν απαιτείται κάμψη του μορίου για τη δημιουργία αυτών των αλληλεπιδράσεων. Αντίθετα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της CAP και των 10 ζευγών βάσεων σε κάθε άκρο του DNA απαιτούν την κάμψη του μορίου. Αυτά τα ζεύγη βάσεων αλληλεπιδρούν εκτεταμένα με την πρωτεΐνη και οδηγούν στο σχηματισμό πέντε ιοντικών αλληλεπιδράσεων και τεσσάρων δεσμών υδρογόνου (μέσω των φωσφορικών ομάδων του DNA) σε κάθε μισό του μορίου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δε θα ήταν δυνατές με ευθύγραμμο DNA και γι' αυτό μπορούν να συμβάλουν στην πρόσδεση μόνο όταν το DNA έχει καμφθεί. Έτσι, η ενέργεια που απαιτείται για την κάμψη του DNA στο σύμπλοκο παρέχεται από εκτεταμένους δεσμούς υδρογόνου και ιοντικές αλληλεπιδράσεις με τις φωσφορικές ομάδες των δύο ακραίων τμημάτων DNA.

Ο Steitz διατύπωσε την άποψη ότι η κάμψη του DNA από την CAP μπορεί να συμβάλει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής: το τύλιγμα του DNA γύρω από την CAP επιτρέπει τη δημιουργία επαφών μεταξύ της RNA πολυμεράσης και του DNA στο 5' της θέσης πρόσδεσης της CAP. Ένα τέτοιο μοντέλο μπορεί να εξηγήσει πώς η CAP ενεργοποιεί τη μεταγραφή από μια ποικιλία αποστάσεων από τις θέσεις πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης.



## 8.21 Συμπεράσματα

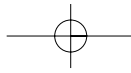
Πολλές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν τη γονιδιακή έκφραση στα βακτήρια είναι διμερή μόρια και οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν είναι παλίνδρομες στα άκρα τους. Έτσι, η πρωτεϊνική συμμετρία (τάξεως 2) ταιριάζει με τη συμμετρία τάξεως 2 στα άκρα της αλληλουχίας αναγνώρισης.

Οι μονομερείς υπομονάδες έχουν ένα μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα που λειτουργεί ως ειδική DNA-προσδένουσα περιοχή. Η δεύτερη έλικα αυτού του μοτίβου είναι η έλικα αναγνώρισης και οι πλευρικές της ομάδες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες επαφές με νουκλεοτιδικές βάσεις στον πυθμένα της μεγάλης αύλακας του B-DNA. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αποτελούν το σήμα αναγνώρισης των πρωτεϊνών Cro και καταστολέα για τις περιοχές του χειριστή. Στα διμερή πρωτεϊνικά μόρια, οι έλικες αναγνώρισης σε καθένα από τα δύο μοτίβα έλικα-στροφή-έλικα, στα δύο άκρα του επιμήκους μορίου, απέχουν 34 Å, απόσταση που αντιστοιχεί σε μια στροφή του B-DNA. Όταν η μία έλικα αναγνώρισης προσδένεται στη μεγάλη αύλακα του DNA, η δεύτερη, που απέχει 34 Å, προσδένεται επίσης στη μεγάλη αύλακα του DNA αλλά μία στροφή παρακάτω.

Η πρόσδεση της 434 Cro και του καταστολέα στις θέσεις του χειριστή προκαλεί στο DNA δομικές αλλαγές. Οι αλλαγές που προκαλούνται από τις δύο πρωτεΐνες είναι σε γενικές γραμμές παρόμοιες, αλλά διαφέρουν σε ένα τμήμα του σκελετού του DNA που είναι σημαντικό για τη διαφορά στην ειδικότητα της Cro και του καταστολέα (δηλαδή για τις σχετικές τους συγγένειες για την OR1 και την OR3). Η διαμόρφωση του DNA σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φωσφοσακχαρικού σκελετού και περιοχών της πρωτεΐνης, που δημιουργούν μια μεγάλη περιοχή αλληλεπιδράσεων με συμπληρωματικές επιφάνειες. Η ικανότητα αυτών των αλληλεπιδράσεων να προκαλέσουν δομικές αλλαγές μπορεί να ρυθμιστεί από την εκάστοτε αλληλουχία DNA, γεγονός που εξηγεί τις διαφορετικές συγγένειες για τις διάφορες θέσεις.

Η ειδική αναγνώριση θέσεων-στόχων του DNA από το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα δε βασίζεται μόνο σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων της έλικας αναγνώρισης και των βάσεων στη μεγάλη αύλακα, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπληρωματικών επιφανειών της πρωτεΐνης και του DNA. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν συχνά δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα σε άτομα της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης και στο σκελετό του DNA, τόσο στη μεγάλη όσο και στη μικρή αύλακα, και εξαρτώνται από την αλληλουχία-εξαρτώμενη παραμόρφωση του DNA-στόχου. Αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν και μόρια νερού (water-mediated interactions) συμβαίνουν συχνά ακόμη και μεταξύ βάσεων της μεγάλης αύλακας και πλευρικών ομάδων από την έλικα αναγνώρισης.





Μερικές από τις προκαρυωτικές DNA-προσδένουσες πρωτεΐνες ενεργοποιούνται με την πρόσδεση ενός μορίου αλλοστερικού τελεστή. Το γεγονός αυτό αλλάζει τη διαμόρφωση του διμερούς της πρωτεΐνης, προκαλεί τη μετατόπιση των μοτίβων έλικαστροφής-έλικα, ώστε να απέχουν 34 Å, και τις καθιστά ικανές να προσδεθούν στη μεγάλη αύλακα. Ο διμερής καταστολέας της βιοσύνθεσης πουρινών, ο PurR, επάγει μια απότομη κάμψη στο DNA κατά την πρόσδεση, η οποία προκαλείται από την εισχώρηση αελίκων στη μικρή αύλακα ανάμεσα στις δύο θέσεις πρόσδεσης του μοτίβου έλικαστροφής-έλικα (στη μεγάλη αύλακα). Κάθε διμερές του τετραμερούς του lac καταστολέα, ο οποίος έχει σχήμα V και αλληλουχία όμοια με αυτήν του PurR, προσδένεται σε ανεξάρτητα τμήματα DNA, με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του διμερούς καταστολέα PurR. Αυτή η επαγόμενη κάμψη του DNA μπορεί να επιτρέπει την πρόσδεση του μορίου του lac καταστολέα στις δύο θέσεις του χειριστή, οι οποίες απέχουν μεταξύ τους στο οπερόνιο.

Η πρόσδεση της πρωτεΐνης CAP στο DNA προκαλεί την κάμψη του, δημιουργώντας δύο τοπικές κάμψεις (kinks) της τάξεως των 40°. Μια τέτοια κάμψη του DNA θα μπορούσε να ενεργοποιεί τη μεταγραφή διευκολύνοντας τις επαφές της RNA πολυμεράσης με το DNA στην περιοχή της θέσης πρόσδεσης της CAP. Η αλληλουχία-ειδική (sequence-specific) πρόσδεση της CAP προκύπτει τόσο από αλληλουχία-εξαρτώμενες (sequence-dependent) παραμορφώσεις της έλικας DNA όσο και από άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων της πρωτεΐνης και των εκτεθειμένων άκρων των ζευγών βάσεων στη μεγάλη αύλακα.

Η γενετική και η δημιουργία μοντέλων παρέχουν ένα πλαίσιο για την ερμηνεία δομικών δεδομένων, αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν με αξιοπιστία για την πρόβλεψη των στερεοχημικών λεπτομερειών των ειδικών αλληλεπιδράσεων, μέσα ή ανάμεσα σε μόρια.