



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Bases moleculares de la agregación en proteínas

T E S I S

Para obtener el título de:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MARÍA DE LOURDES RUIZ REYES

México, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

Vocal: FRANCISCO RUIZ TERAN

Secretario: ALEJANDRA HERNANDEZ SANTOYO

1er Suplente: JOSE PEDRAZA CHAVERRI

2° Suplente: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

Sitio donde se desarrollo el tema: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Alejandra Hernández Santoyo
Asesor

Maria de Lourdes Ruiz Reyes
Sustentante

DEDICATORIAS

A ti Dios, porque a lo largo de toda mi vida, siempre has estado junto a mi, en los tiempos buenos, pero sobre todo en los tiempos malos, mil gracias.

A mis padres, que son los cimientos de mi vida; a ti papá por todos esos momentos de soledad y trabajo duro que has pasado, para darnos una vida sin preocupaciones; a ti mamá por haber sacrificado parte de tu sueños, para lograr que nuestra familia tuviera un feliz hogar donde vivir. Todo lo que soy y seré es gracias a ustedes.

A mis hermanos, Paola, Sergio e Isaac, que a pesar de no ser siempre el mejor ejemplo a seguir, ustedes son las personas que más me inspiran para ser mejor cada día, los quiero mucho.

A mis abuelos, pero sobre todo a ti abuela Naty, por todas las enseñanzas y recuerdos que dejaste en mí, siempre te llevare en mi corazón.

A mi tía Blanca López, por todos los buenos consejos e interés en mi persona.

A todas las personas que quiero: amigas, amigos, primos, tíos, ya que sin ustedes, mi vida no sería tan divertida.

Y por último a la UNAM, por ser el mejor lugar de educación en México.

ÍNDICE

ABREVIATURAS _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
1.- RESUMEN _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2. INTRODUCCIÓN _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3. ANTECEDENTES _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.1 Proteínas oligoméricas _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.1.1. Funcionalidad de las PO _____	Error! Bookmark not defined.
3.1.2Tipos de interacción proteína-proteína. (PPI) en proteínas oligoméricas.	Error! Bookmark not defined.
3.1.3. Características de las interfases oligoméricas (IO) _____	Error! Bookmark not defined.
3.1.4. Tipos de interacciones en las interfases oligoméricas. _____	Error! Bookmark not defined.
3.2. Oligomerización de proteínas. _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.2.1. Mecanismos de oligomerización. _____	Error! Bookmark not defined.
3.2.2. Intercambio de dominio. _____	Error! Bookmark not defined.
3.3. Agregación de proteínas _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.3.1. Fibras amiloides _____	Error! Bookmark not defined.
4. HIPOTESÍS _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5. OBJETIVOS _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.1. Objetivo general _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.1.1 Objetivos particulares _____	Error! Bookmark not defined.
6. METODOLOGÍA _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
6.1. Conjunto de proteínas _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
6.2. Análisis de muestra _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
6.3. Definición de la interfase. _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
6.3.1. Determinación de los aminoácidos involucrados en la interfase por Crystallography & NMR System (CNS). _____	Error! Bookmark not defined.
6.3.2. Definición de la interfase por la accesibilidad al solvente (ASA). _____	Error! Bookmark not defined.
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
7.1. Determinación de los aminoácidos en la interfase entre los monómeros asociados.	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
7.2. Análisis de proteínas oligoméricas clasificadas según su función biológica	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
7.2.1. Lectinas _____	Error! Bookmark not defined.
7.2.2. Enzimas _____	Error! Bookmark not defined.
7.2.3. Chaperonas _____	Error! Bookmark not defined.
7.2.4. Intercambio de dominios (Domain Swapping) _____	Error! Bookmark not defined.
7.2.5. Fibras amiloides. _____	Error! Bookmark not defined.
7.2.6. Otras _____	Error! Bookmark not defined.
8. CONCLUSIONES _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
9. BIBLIOGRAFÍA _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
Apéndice _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

1.- RESUMEN

Las funciones biológicas de muchas proteínas dependen de su estructura cuaternaria; por lo que es importante comprender las características determinantes para que ocurra la asociación entre las subunidades que conforman un oligómero proteico. Un gran número de investigaciones han dirigido sus estudios hacia el mecanismo de oligomerización, el cual es un fenómeno de asociación entre monómeros para así llevar a cabo una determinada función biológica o ganar estabilidad. La agregación de proteínas es otro tipo de mecanismo de asociación, en la cual se observa, entre otras, la formación de fibras amiloides que ocasionan enfermedades de tipo neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington entre otras.

No obstante los esfuerzos realizados para entender este fenómeno, no se ha logrado conocer completamente su mecanismo. Estudios *in silico* realizados por varios grupos de investigación, han analizado numerosas estructuras resueltas por difracción de rayos X. Ellos han determinado los aminoácidos y el tipo de interacción en la interfase entre los monómeros asociados de proteínas con diferente grado de oligomerización. En el presente estudio se determinaron *in silico* los aminoácidos expuestos al disolvente y aquellos involucrados en la interfase entre monómeros de un grupo de proteínas oligoméricas seleccionadas del *Protein Data Bank*, teniendo en cuenta su función biológica. En este estudio se observó que a nivel de la interfase, en todas las proteínas seleccionadas se encontró un alto contenido de aminoácidos cargados, destacándose la Arg y Glu a excepción de las fibras, donde el aminoácido más frecuente fue Gln. A nivel de la superficie expuesta al disolvente, se observó una alta frecuencia de residuos polares y cargados.

2. INTRODUCCIÓN

Como se ha observado, la mayoría de las funciones celulares son a través de la interacción proteína-proteína o de la interacción proteína-ADN. La asociación de proteínas está implicada en la transducción de señales, enlace antígeno-anticuerpo, regulación de la expresión de genes, y en una gran variedad de funciones, donde el estado oligomérico es biológicamente activo. A través de muchas investigaciones se ha tratado de entender cuales son los principios que gobiernan la asociación de las proteínas y sus interacciones.

Muchas de los factores que han ayudado a entender esta asociación, han surgido a través del estudio de numerosas estructuras de proteínas, donde se han analizado las interacciones de estas a un nivel de sus bases moleculares.

3. ANTECEDENTES

3.1 Proteínas oligoméricas

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células pues constituyen más del 50 % de su peso en seco.

Estas macromoléculas en ocasiones están compuestas por una sola cadena polipeptídica; en tal caso reciben el nombre de monoméricas. Cuando la proteína está formada por varias cadenas polipeptídicas que pueden o no ser idénticas entre sí, reciben el nombre de oligoméricas. Las distintas cadenas polipeptídicas que componen una proteína oligomérica se llaman subunidades. Una gran mayoría de las proteínas que existen en organismos vivos son proteínas oligoméricas (PO).

3.1.1. Funcionalidad de las PO

Las PO presentan una proporción relativamente grande en las proteínas existentes, se han distinguido por ser capaces de realizar tareas que proteínas en estado monomérico no pueden satisfacer. El primer autor en mencionar las diferentes habilidades de las proteínas oligoméricas fue Monod *et al* (1965). De ahí en adelante los reportes de proteínas oligoméricas han sido muy variados.

La importancia funcional de los oligómeros sobre los monómeros radica en su capacidad de:

- Contener una variedad de sitios de interacción para sustratos y ligandos en una proteína (D'Alessio, 1999).
- Responder de manera flexible a diversos ambientes. (D'Alessio, 1999).
- Adquirir la aptitud de reaccionar con diversos enlaces ligado en diferentes sitios en la proteína. (Goldberg *et al.*, 1975).
- Regular la expresión de genes. (Lee, 1992)
- Transducción de señales a través de la membrana de la célula, para determinar la asociación funcional (Fantl *et al.*, 1993) o disociación (Hepler y Gilman, 1992)
- Catalizar reacciones (Shachman, 1987).
- Realizar el ciclo catalítico de la síntesis del ATP en mitocondria. (Abrahams 1994).

Anteriormente se mencionó que las PO, representan una porción importante en las proteínas. Se ha estimado que, aproximadamente el 35% total de las proteínas en las células se encuentran en estado oligomérico. (Goodsell *et al.*, 2000).

Hace algunos años se publicó acerca de las 372 proteínas de *E. coli* incluidas en la base de datos de SWISS-PROT (Goodsell *et al.*, 2000) encontraron cerca de 372 proteínas y solamente 72 eran monómeros, el resto eran proteínas oligoméricas.

La proporción de PO depositadas en el Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000) es bajo (Goodsell *et al.* 2000). Se considera que el número de multi-oligómeros es mucho más bajo aún (Jones *et al.* 1996) y representan una fracción relativamente pequeña en el grupo de las PO. Una de las razones es la dificultad de cristalización de una proteína formada con varias subunidades. Se ha calculado que el promedio de subunidades, en proteínas oligoméricas es de cuatro (Goodsell, 1991).

3.1.2 Tipos de interacción proteína-proteína. (PPI) en proteínas oligoméricas.

3.1.2.1. Complejos homo y hetero-oligómeros.

Las PO se clasifican generalmente en dos tipos homo-oligoméricas, cadenas idénticas de aminoácidos o hetero-oligoméricas, cadenas diferentes de aminoácidos unidas entre sí. (Figura 3, Nooren, 2003)

Muchas de las PO se encuentran en estado homo-oligomérico (Goodsell *et al.*, 2000), en este estudio se observa un predominio de claro del tipo anterior con respecto a al estado hetero-oligomérico.

Entre los homo-oligómeros, los más comunes son los homo-dímeros que constituyen cerca del 30 % del número total de este tipo de proteínas (Goodsell *et al.*, 2000). En un análisis reciente de 621 archivos de PDB de dímeros, (Glaser *et al.* 2001) también encontraron que 404 eran homo-dímeros (65%).

La unión de proteínas oligoméricas ocurre gracias a las interacciones proteína-proteína PPI. Las PPI se llevan acabo entre cadenas idénticas o diferentes. Los homo-oligómeros se pueden asociar en forma homóloga o heteróloga. Monod *et al.*, fue el

primero en describir el tipo de interacción en las proteínas homo-oligoméricas (Monod *et al.*, 1965).

La asociación homóloga involucra la misma superficie de contacto entre cadenas, en contraste con la asociación heteróloga, al unirse con otras cadenas presentan diferentes tipos de interfase.

Una proteína homo-dimérica solo puede interactuar con la misma superficie sobre cada monómero, dando así un dímero con simetría semejante.

Una interacción heteróloga con dos sitios complementarios es posible para grandes oligómeros por su forma de simetría cíclica. En la figura 1 se ilustra el modo de interactuar de las proteínas homo-oligoméricas y hetero-oligoméricas.

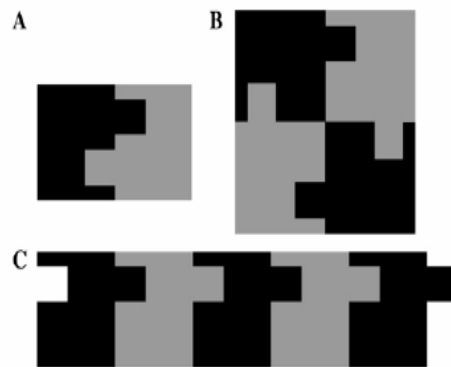


Figura 1. (A) Dímero homólogo; (B) Tetrámero heterólogo; (C) Pentámero heterólogo. Figura adaptada de la referencia (Monod, 1965)

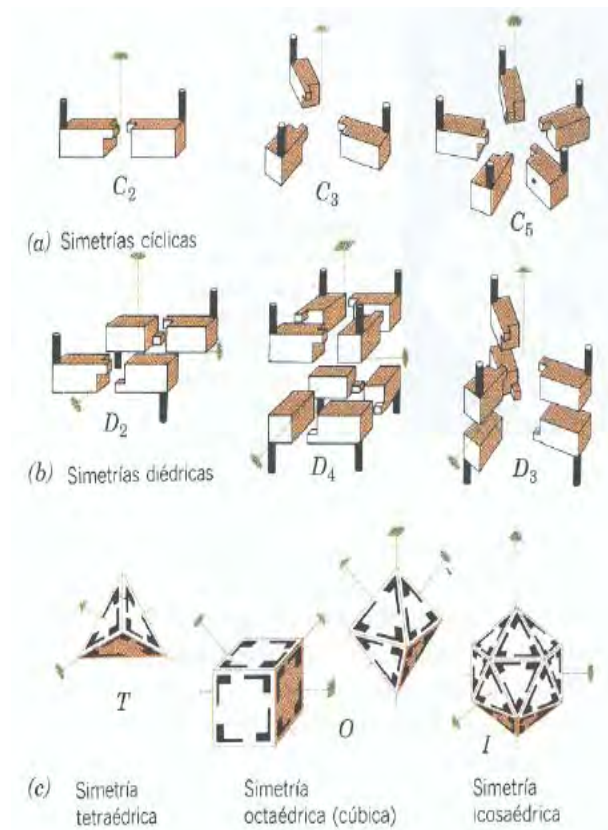
Muchas de las PO, especialmente las proteínas homo-oligoméricas son simétricas. Las simetrías más frecuentes en las PO son: cíclica, diedral y cúbica. (Goodsell *et al.*, 2000).

La simetría cíclica, es el tipo más simple, se observan en las subunidades relacionadas por un sólo eje de rotación. Los objetos con ejes de rotación de 2, 3,.....o n veces se dice que poseen simetría C_2 , C_3 ,..... C_n respectivamente. Un oligómero con simetría C_n está constituido por n subunidades que están relacionados por $(360/n)^\circ$ rotaciones. La simetría C_2 es la simetría más corriente en las proteínas; simetrías cíclicas superiores son relativamente poco frecuentes. (Goodsell *et al.*, 2000).

Simetría de diedro (D_n), es un tipo más complicado de simetría de rotación binaria, que se genera cuando un eje de rotación de n -veces y un eje de rotación binario establecen una intersección en ángulo recto. Un oligómero con simetría D_n está constituido por $2n$ subunidades. La simetría D_2 es el tipo más corriente, de simetría diédrica en las proteínas. En las condiciones adecuadas, muchas de las PO con simetría D_n se disociarán en dos monómeros, cada uno de ellos con simetría C_n . (Goodsell *et al.*, 2000).

Como ya se mencionó, existen otras simetrías de rotación como tetraedros (T), de un cubo u un octaedro (O) o de un icosaedro (I), y poseen 12, 24 y 60 posiciones equivalentes, respectivamente. Algunas PO poseen simetría helicoidal. Las subunidades que son idénticas químicamente, situadas en una hélice, no son estrictamente equivalentes debido, por ejemplo, a que en el final de la hélice se encuentran entornos diferentes que los que predominan en la parte media de ella. No obstante, los alrededores de todas las subunidades en una hélice larga, excepto aquellas que se haya próximas al extremo, son lo suficientemente semejantes para que pueda decirse que son casi equivalentes. Las subunidades de muchas proteínas estructurales, por ejemplo, las del músculo, se asocian y forman fibras con simetría helicoidal. (Goodsell *et al.*, 2000).

Los tipos de simetrías en las proteínas se ilustran en la Figura 2.



Algunas simetrías posibles de proteínas con protómeros idénticos. Las formas lenticular, triangular, cuadrada y pentagonal, en los extremos de las líneas discontinuas, indican los ejes únicos de rotación binario, ternario, cuaternario y pentagonal de los objetos mostrados. (a) Asociaciones con simetrías cíclicas C_2 , C_3 y C_5 . (b) Asociaciones con simetrías diédricas D_2 , D_4 y D_3 . En estos objetos, un eje binario es perpendicular a los ejes verticales binario, cuaternario y ternario. (c) Asociación con simetría T , O , e I . Obsérvese que el tetraedro posee alguno, aunque no todos, de los elementos de simetría del cubo, ya que el cubo y el octaedro poseen la misma simetría. [Copyright © de la figura por Irving Geis.]

Figura 2. Tipos de simetrías en las proteínas oligoméricas (Voet y Voet, 1992)

3.1.2.2. Complejo obligados y no-obligados

Jones y Thornton (1996) observaron que existen dos tipos diferentes de complejos: obligatorios y no-obligatorios (Fig 3). En una PPI obligatoria, las proteínas se encuentran estables cuando forman asociaciones entre ellas. Este tipo de interacción se encuentra, por ejemplo, en el dímero represor Arc, que se ha observado que es esencial para el enlace del ADN.

También se ha encontrado que muchas estructuras hetero-oligoméricas depositadas en el PDB (Berman, 1998) involucran interacciones no obligatorias, tales como complejos intracelulares de señalización, anticuerpo-antígeno, receptor-ligando y enzima-inhibidor. Los componentes de tales complejos inicialmente no se encuentran en estado oligomérico, sino que se presentan de forma más estable en estado monomérico (Jones y Thornton, 1996). Se ilustra en la figura 3.

3.1.2.3. Complejos permanentes y transitorios.

Las PPI, también son distinguidas por el tiempo de asociación. En el tipo permanente, la interacción regularmente es muy estable, ya que siempre las proteínas se encuentran asociadas de esta forma para llevar a cabo todas sus funciones biológicas.

En asociación transitoria, las proteínas se asocian y se disocian *in vivo* cuantas veces sean necesarias para llevar a cabo sus principales actividades. Las interacciones transitorias son clasificadas a su vez en débiles y fuertes. En las asociaciones transitorias débiles, el oligómero entra en un equilibrio dinámico en solución, donde las interacciones son rotas y formadas continuamente. Las asociaciones transitorias fuertes, requieren de un disparador molecular para cambiar su equilibrio oligomérico. Estructuralmente y funcionalmente las interacciones obligadas son usualmente permanentes y las asociaciones no obligatorias pueden ser transitorias y permanentes. (Nooren, 2003).

Es importante hacer notar, que no todas las PPI entran en este tipo de clasificación, debido a la dependencia a las condiciones ambientales y fisiológicas. Unas interacciones pueden encontrarse principalmente como transitorias *in vivo* pero convertirse en permanentes bajo ciertas condiciones celulares, como se observa en la señalización intracelular donde hay una espera antes de que la forma transitoria cambie y se requieran de la asociación y la disociación. (Nooren, 2003). Se ilustra en figura 3.

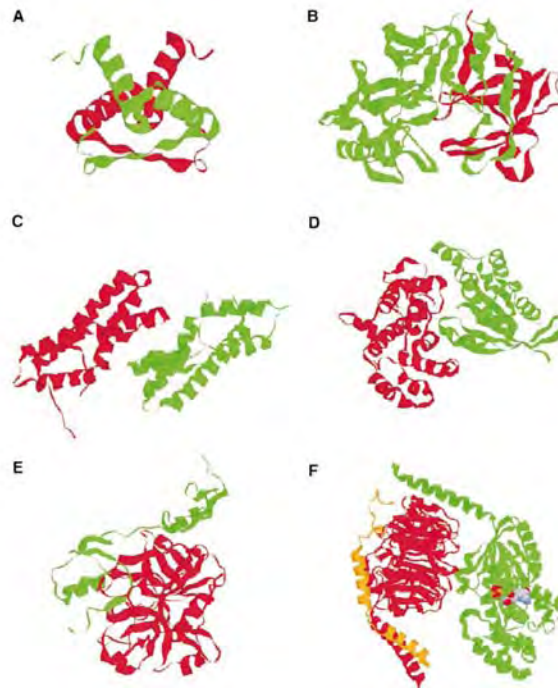


Figura 3. Tipos de interacción de proteína-proteína: **(A)** homodímero obligado; **(B)** heterodímero obligado; **(C)** homodímero no-obligado; **(D)** heterodímero no-obligado; **(E)** heterodímero no-obligado permanente transitoria; **(F)** heterotrímero no-obligado transitorio.

3.1.3. Características de las interfases oligoméricas (IO)

Dentro de la información genética en una célula no sólo se codifica la secuencia de aminoácido de las proteínas, sino también la manera en que las estructuras se asocian. En años recientes se han estudiado las características fundamentales de este complejo proceso de asociación y la manera en la cual es regulado en los sistemas vivos (Levintha,1968). La función biológica de las proteínas depende de su estructura terciaria y cuaternaria, por lo tanto es importante el entendimiento de los factores que determinan dichas interacciones.

A lo largo de muchas investigaciones se ha intentado comprender los principios que gobiernan la oligomerización en proteínas, sin embargo, no se ha logrado comprender completamente el cómo y por que se lleva acabo dicho fenómeno. Se ha observado que el fenómeno de agregación y oligomerización en proteínas es por medio de la interacción entre monómeros.

Con se mencionó anteriormente, existen distintos tipos de interacción, que a su vez se encuentran regidos por el tamaño de área de contacto, la polaridad de la interfase, conservación de residuos y planaridad. (Chothia y Janin, 1975; Miller *et al.*, 1987; Argos, 1988; Janin *et al.*, 1988; Jones y Thornton, 1995).

Sin embargo, son muchas las características que pueden ser descritas. Los residuos que se encuentran en el interior de la interfase entre dos monómeros tienden a sobresalir de la superficie de la proteína, por este motivo la forma de la superficie de la interfase tiende a ser circular (Jones y Thornton, 1996). En otro estudio se determinó que muchas interfases de hetero-oligómeros son relativamente planas (Argos, 1988). En contraste, con otros estudios donde se estudiaron homodímeros y heterodímeros obligados, se encontraron unidades monoméricas entrelazadas entre sí, se observó una interfase menos plana (Jones y Thornton, 1996; Jones y Thornton, 1997).

A lo largo de diversos estudios se han llegado a determinar ciertas características en las interfases proteína-proteína, y que son:

- i. Interfases oligoméricas grandes son asociadas a fuertes interacciones, sin embargo, interfases pequeñas pueden ser generadas por asociaciones débiles y fuertes (Nooren, 2003).
- ii. El área de la interfase de un homodímero obligatorio es usualmente mayor a 1400 \AA^2 (Miller *et al* 1987; Janin *et al* 1988). En un complejo no-obligatorio, el área de contacto es menor a 2500 \AA^2 , mientras que en una asociación débil y transitoria el área de la interfase es menor que 1000 \AA^2 (Nooren 2003).
- iii. Pero también se ha observado que las interfases de complejos obligatorios, como se observa en muchos homodímeros, son generalmente más largas e hidrofóbicas que la asociaciones no obligatorias (Jones y Thornton, 1996; LoConte *et al.*, 1999). Este tipo de homodímeros pueden plegarse a los protómeros y formar estructuras largas y entrecruzadas con interfases hidrofóbicas.
- iv. Proteínas oligoméricas con interfases largas mayores a los 1000 \AA^2 , se ha visto que es muy posible que sufran cambios en su conformación durante la asociación, como se ha visto en el complejo trombina-rodina. (LoConte *et al.*, 1999; Nooren, 2003)
- v. Existen disparadores moleculares que cambian el estado oligomérico de un complejo proteínico transitorio. Como se ha mostrado, el cambio de

GTP/GDP o la fosforilación, induce a cambios drásticos, al grado de disociación de fuertes asociaciones con interfases largas y menos polares (Nooren, 2003).

3.1.4. Tipos de interacciones en las interfases oligoméricas.

Se ha observado en muchos estudios que los residuos de una interfase oligomérica son ligeramente más frecuentes que los residuos de otras superficies, por lo tanto esto ha originado muchas preguntas al respecto. (Nooren, 2003; Caffrey, *et al* 2004;. Valdar y Thornton, 2001;. Grishin y Phillips, 1994).

Como los llamados puntos calientes o “hot spots”, frecuentemente se encuentran en el centro de la interfase, y son responsables en gran forma de la energía de enlace en las interfases oligoméricas. Estos hot spots están compuestos de residuos polares que interactúan gracias a fuerzas de van der Waals y puentes hidrógeno (Grishin y Phillips, 1994; Clackson, 1995), además se encuentran rodeados por residuos que tienen un menor efecto sobre la estabilidad (Bogan y Thorn, 1998).

Los aminoácidos que generalmente se han encontrado formando los “hot spots”, son el triptofano, Tyr y Arg (Hu *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003; Keskin *et al.*, 2005). Sin embargo, existen varios residuos polares que también se encuentran regularmente (Hu *et al.*, 2000). Múltiples regiones de “hots spots” han sido encontrados en una sola interfase (Ma *et al.*, 2003), y regularmente son agrupados en el centro de esta misma e interactúan con los equivalentes hot spots de la otra proteína con la que se está asociando (Halperin *et al.*, 2004; Keskin *et al.*, 2005).

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la definición de las interfases homo-oligoméricas, cerca de dos tercios de los residuos de las interfases son no-polares y mucho más grande es la fracción en la superficie que no interactúa. (Janin, *et al* 1988 y Miller, 1989).

D’ Alessio *et al* 1999 han observado que en este tipo de interfases existe una gran proporción de residuos polares e hidrofílicos, pero se observa un centro netamente hidrofóbico (D’ Alessio, 1999).

Aproximadamente una quinta parte de los residuos en interfases oligoméricas son polares, como se ha observado en muchas áreas de contacto entre monómeros (Miller, 1989).

En general, en casi todas las interfases de contacto se ha determinado un tamaño de 600 Å del total de área de la superficie, se ha asumido que la energía de la interacción proteína-proteína está directamente relacionada con el área de superficie hidrofóbica (Chothia y Janin, 1975; Horton y Lewis, 1992; Jones y Thornton, 1996; Privalov, 1979).

Las interacciones en los hetero-oligómeros transitorios son mucho más débiles y menos hidrofóbicas en comparación con los homo-oligómeros. En este caso la gran polaridad de la superficie puede ayudar a la solubilización del estado no asociado de subunidades (Jones y Thornton, 1996; Noreen y Thornton, 2003; Jones y Thornton, 1997).

Los puentes hidrógeno y puentes salinos juegan un papel importante para la estabilización de las interfases oligoméricas, gracias también al predominio de los puntos calientes, estudios recientes sugieren que se ha encontrado por lo menos un puente hidrógeno por cada 200 Å en la interfase entre monómeros (Janin, *et al* 1988), pero se menciona que los puentes hidrógeno rara vez se encuentra en el centro (Miller, 1988).

Se ha distinguido que el área hidrofóbica, prevalece mientras los residuos electrostáticos y los puentes hidrógeno se encuentran repartidos equitativamente a través de la superficie de contacto (Xu *et al.*, 1997; Lo Conte *et al.*, 1999), indicando una distribución uniforme de las propiedades a través de la interfase.

Se llevó a cabo un análisis importante de la información existente, (Larsen, 1998) donde se examinaron las estructuras de 136 PO, demostrando que 43 de ellas solo tenían un microárea hidrofóbica que ocupaba una porción importante de la interfase, esta área fue situada cerca o en el centro de la interfase y rodeado por interacciones polares. El resto de las proteínas, cerca de dos tercios, no demostró tal distribución; la interfase mostró ser un mosaico de los puentes de hidrógeno, residuos hidrofóbicos y moléculas de agua. Los autores también señalaron el hecho de que algunas interfases eran en gran parte hidrofílicas.

Estos trabajos son ilustrativos en el sentido que demuestran que, por lo menos hasta ahora, no hay regla general para la distribución de residuos particulares en algunas porciones de la interfase. De hecho, demuestran que en interfases de la proteína, los aminoácidos con características fisicoquímicas particulares se distribuyen irregularmente a través de la interfase.

Myers y colaboradores (2001) también utilizaron mutagénesis en la exploración de la Ala y la centrifugación analítica para comprobar la distribución de los residuos en la interfase del homodímero de la ornitina descarboxilasa de *Trypanosoma brucei* (Myers *et al* 2001).

En contraste, con los informes ya mencionados, los autores encontraron que de los 23 aminoácidos examinados, ningún aminoácido ejerció una contribución fuerte a la energía de la interacción entre las dos subunidades. Al parecer, la estabilización del dímero es debido a la suma de interacciones múltiples en la interfase del mismo (Myers *et al* 2001).

La asociación entre oligómeros puede variar en fuerza y duración. Muchas proteínas se encuentran nativamente en estado oligomérico, con una constante de disociación de rango nanomolar. Otras tienen débiles tendencias a asociarse, en forma oligomérica, porque depende de ciertas variables como concentración, temperatura y pH. Tales proteínas tienen altos valores de constante de disociación en intervalos micromolares a milimolares.

Y algunas proteínas tienden a oligomerizarse gracias a estímulos, como cambios de nucleótidos, hidrólisis de éstos o estado de fosforilación. Tales cambios tienen un efecto dramático con frecuencia en la afinidad entre los oligómeros en grandes ordenes de magnitud (Nooren y Thornthorn, 2003; Nooren y Thornthorn, 2003).

3.2. Oligomerización de proteínas.

La oligomerización es la asociación de subunidades polipeptídicas, las cuales se asocian de una manera específica geoméricamente. La disposición espacial de estas subunidades se conoce también como estructura cuaternaria de una proteína. Las razones por las cuales las proteínas con varias subunidades son tan frecuentes se debe a ciertas ventajas como el poder reparar un defecto en la subunidad por la sustitución de la unidad defectuosa para mantener diversas actividades como, la regulación de enzimas, actividades de canales iónicos, receptores y factores de transcripción.

Cuando se tratan de enzimas el incremento de tamaño por “oligomerización”, tiende a fijar mejor las posiciones tridimensionales de los grupos de los sitios activos de la enzima.

Esta asociación también ayuda a minimizar el tamaño del genoma, por la formación de módulos los cuales posteriormente se ensamblan para formar estructuras multiméricas. No obstante, la asociación también origina fibras que causan ciertas patologías.

La oligomerización proporciona ciertas ventajas a nivel estructural tales como, (Nooren y Thornton, 2003; Nooren y Thornthon, 2003; Liu, 2002; Goodsell, 1993):

- i. La introducción de nuevos sitios activos a nivel de la interfase, como se observó en una sexta parte de las enzimas oligoméricas estudiadas.
- ii. Proporciona la base estructural para la regulación de las actividades enzimáticas por ejemplo como es el caso de la regulación alostérica.
- iii. La oligomerización por ensamble permite reparar fácilmente los defectos traduccionales, debido al simple reemplazo del módulo o subunidad defectuosa en comparación a la síntesis de una sola cadena polipeptídica de gran tamaño.
- iv. En determinados casos en que la forma monomérica y oligomérica difieren en actividad, se puede regular esta actividad mediante el control en las condiciones de oligomerización
- v. La oligomerización brinda mayor resistencia a la degradación y desnaturalización de la proteína, como es el caso en organismos termófilos (Walden, 2001).

En la figura 4, se presentan las diferentes tipos de oligomerización, (Marianayagam *et al* 2004)

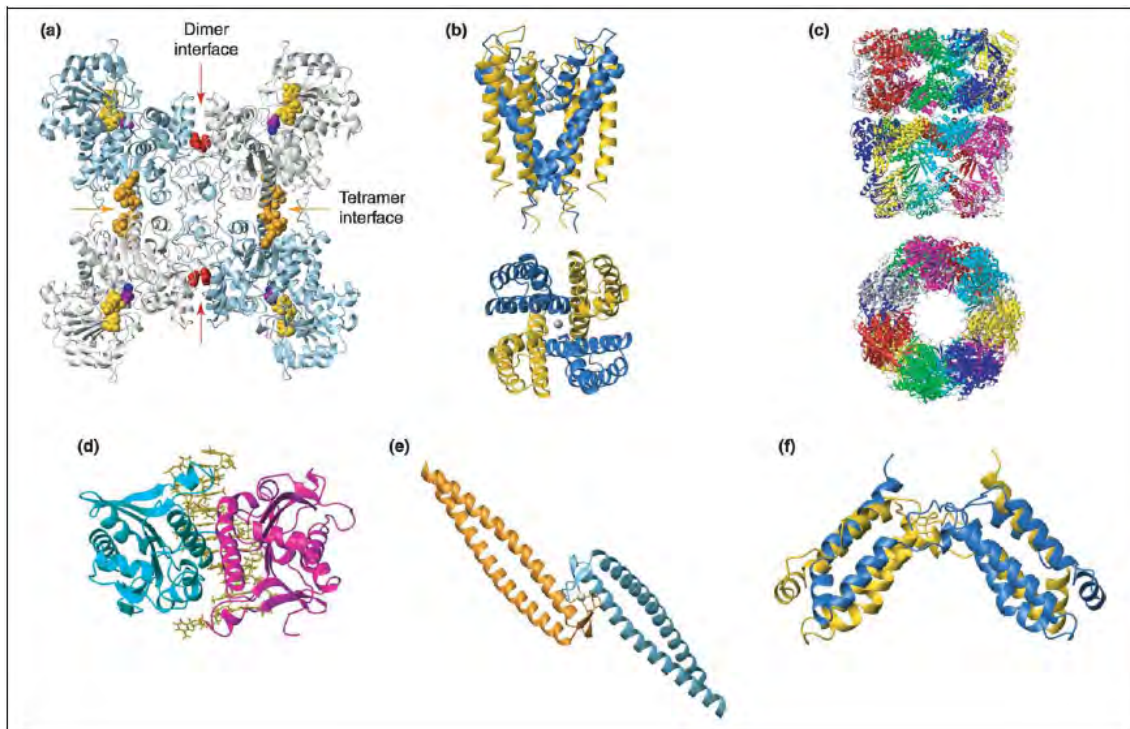


Figura 4. Múltiples modos de dimerización y oligomerización. Muestra una selección de diferentes dímeros y oligómeros por diferentes modos de asociación y regulación. **a)** NAD(P)⁺ mitocondrial humana. **b)** Kcsa canal iónico de *Streptomyces lividans* **c)** Groel vinculado a ATP **d)** Enzima de restricción Bam H1 de tipo II **e)** RAD50 enganchada a zinc **f)** Interleucina-10 su estructura se muestra como un intercambio de dominio (Marianayagam *et al* 2004)

3.2.1. Mecanismos de oligomerización.

El mecanismo de oligomerización en proteínas, a la fecha, no está claramente definido. Para algunos autores es probable que no exista un mecanismo general para estudiar tal fenómeno pero sí diferentes formas de asociaciones dependiendo de la proteína involucrada, que comprende diferentes rutas.

Genéticamente, especies oligoméricas podrían ser creadas de proteínas monoméricas a través de muchas combinaciones de pocos eventos genéticos. Sustituciones, inserciones y eliminaciones comprenden el grupo básico de mutaciones, estas actividades podrían afectar las propiedades electrostáticas o las geometrías de la superficie, ocasionando un cambio del estado oligomérico. La recombinación podría resultar en la oligomerización de un dominio que previamente se encontraba como una proteína monomérica, (D'Alessio, 1999; Xu *et al* 1998).

Para proteínas oligoméricas que se pliegan mediante dos pasos la oligomerización puede haber evolucionado específicamente hacia un estado dimérico, sin la existencia de un estado intermediario monomérico plegado (Xu *et al* 1998).

Genéticamente, las especies oligoméricas se pueden crear por uniones de proteínas a través de combinaciones genéticas (Nooren, 2003; Long *et al* 2003; Chothia *et al* 2003), sustituciones, inserciones, y mutaciones. Tales mutaciones afectan las propiedades eléctricas y geométricas de la superficie, dando un cambio en el estado oligomérico.

Las mutaciones pueden conducir a la introducción, expansión o exposición de una microárea hidrofóbica sobre la superficie de la proteína, creando una nueva interfase para oligomerizarse, como se ilustra en la figura 5 (Ali y Imperiali, 2005).

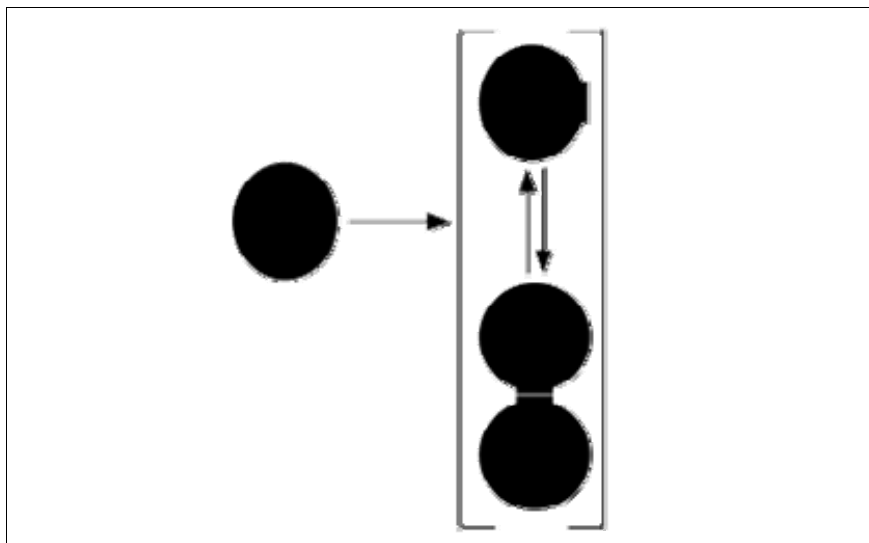


Figura 5. El desarrollo de una micro área hidrofóbica sobre la superficie de una proteína monomérica resulta en una proteína capaz de oligomerizarse (Ali y Imperiali, 2005).

Como se había mencionado no todos los residuos contribuyen de manera similar en el comportamiento en la interfase oligomérica, por lo tanto en las mutaciones son pocos los aminoácidos claves para llevar a cabo las interacciones en las asociaciones, particularmente en el estado dimérico. Xu y colaboradores (1998) han propuesto una ruta directa de evolución donde las proteínas diméricas exhiben dos estados cinéticos, en donde ambos tienen una larga interfase plana y tiene dos pequeñas cadenas polipeptídicas entrecruzadas. Muchos son los ejemplos de esta clase de proteínas, como las GCN4, mismas que son desplegadas en ausencia de interacciones oligoméricas. (Xu *et al* 1998).

En la figura 6 se ilustran los efectos funcionales de la dimerización y oligomerización (Marianayagam, 2004).

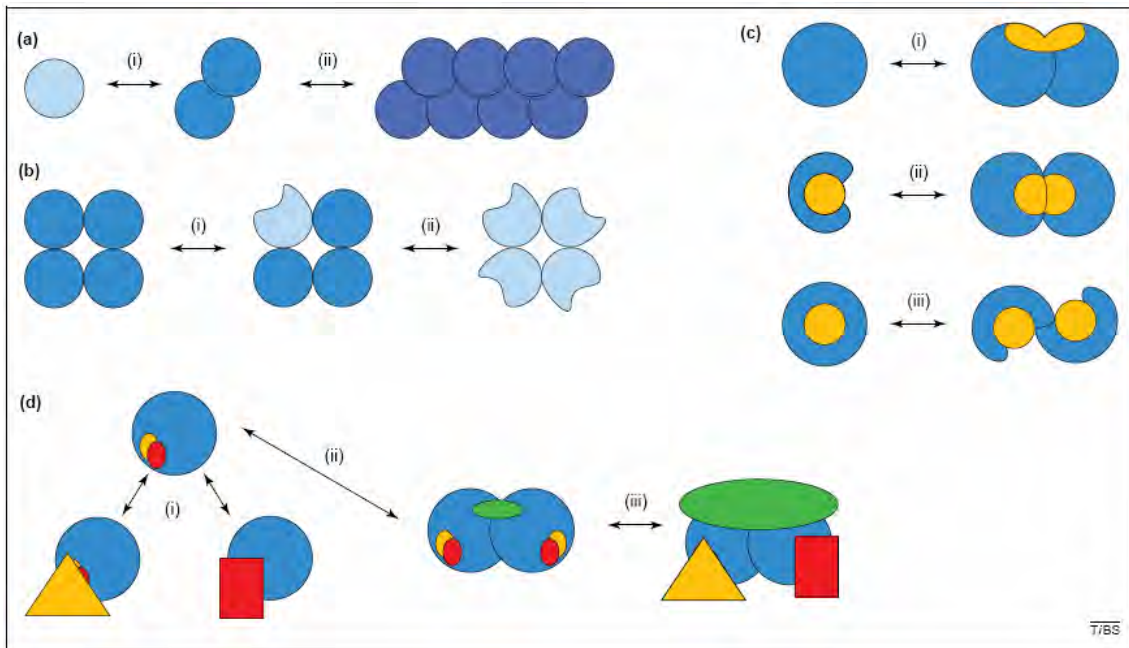


Figura 6. Efectos funcionales de la dimerización y la oligomerización. (a) Concentración, reunión y estabilidad. (i) Dimerización ocurre cuando la concentración de la proteína, es más grande que la constante de disociación. Los dímeros tienen una gran estabilidad y el área de superficie pequeña en comparación al monómero. La unión de largas estructuras por medio de unidades formadas, constituyen estructuras largas y dinámicas. (b) Cooperación y alosterismo. Las superficies intramoleculares entre monómeros y oligómeros puede generar sitios para la regulación y alosterismo. (c) Manipulación de sitios activos, (i) construcción de diferentes caras para incrementar la especificidad, (ii) Ocultar sitios activos, o (iii) Revelar sitios activos, (d) Dimerización con diversas proteínas, para la regulación de formación de diversos complejos. (Marianayagam, 2004).

3.2.2. Intercambio de dominio.

Intercambio de dominio o “*Domain Swapping*” es una elegante teoría que se propuso como un mecanismo para explicar como las proteínas con multidominios pueden estar involucradas en diferentes estados oligoméricos. Se ha observado que ciertas proteínas existen en ambos estados monomérico y oligomérico, donde las interacciones ínter-dominio pueden ocurrir dentro de un monómero o entre unidades de monómeros, (Liu, 2002), como se ilustra en la figura 7:

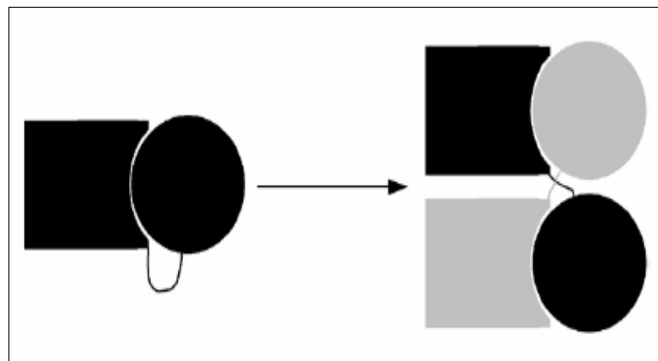


Figura 7. Intercambio de Dominio o “*Domain swapping*”. (Ali y Imperiali, 2005).

Se han documentado por lo menos cuarenta intercambios de dominio en proteínas hasta la actualidad, estos incluyen bacteriófagos represores *k cro*, RNAsa, y toxina de la difteria (Liu, 2002).

El intercambio de dominio se describe por primera por Eisenberg en 1994, cuando él y su equipo de investigadores observaron en una cristalografía de rayos-X la toxina de la difteria (Bennett *et al.*, 1994), pero un fenómeno similar se había observado 3 décadas atrás en dímeros de la ribonucleasa A, durante la liofilización en ácido acético (Crestfield *et al.*, 1962; 1963) y una triptofanasa (London *et al.*, 1974).

Cuando se lleva a cabo un “*domain swapping*” es gracias al cambio idéntico de elementos estructurales o dominios globulares entre dos proteínas oligoméricas. En otras palabras, el “*domain swapping*” toma el lugar de una estructura idéntica de otra proteína y viceversa, aparentando una sola unidad, pero que en sí esté formada por segmento de cadenas de diferentes unidades.

Una proteína es capaz de experimentar un “*domain swapping*”, si existe “*hinge loop*” o un enlace flexible, los cambios conformacionales permiten que la molécula se

despliegue parcialmente y encuentre un monómero abierto similar como se ilustra en la figura 8.

Las principales fuerzas de adhesión que permiten la formación de “*domain swapping*” es la llamada interfase cerrada entre dominios intercambiados, la cual recrea la estructura y interacción del protómero. Los tipos de interacción para formar las diferentes interfases cerradas, incluyen interacciones hidrofóbicas, puentes hidrógenos, interacciones electrostáticas, y enlaces disulfuro (Diederichs *et al*, 1991; Milburn *et al*, 1993; Knaus *et al*, 2001).

En la figura 8 se ilustra el intercambio de dominio (Jaskólski, 2001).

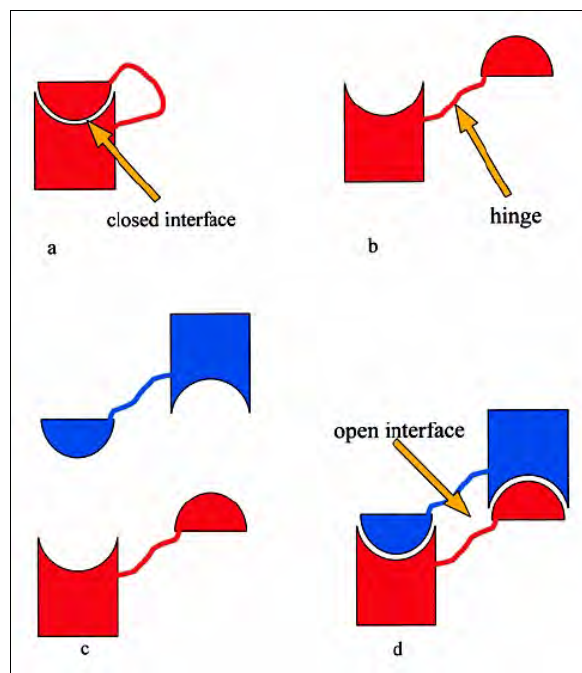


Figura 8. Formación un dímero por medio de domain swapping
 (a) Plegamiento globular (b) a través del cambio conformacional y de una bisagra flexible, (c) despliegamiento de las cadenas, (d) Por medio de cambios de estructura es posible plegar dos proteínas como un monómero (Jaskólski, 2001)

3.3. Agregación de proteínas

3.3.1. Fibras amiloides

El primer científico en usar el término amiloides fue el alemán Rudolph Virchow en 1854, al estar realizando un estudio de la anatomía cerebral utilizando yodo,

observó la presencia de un tejido fibroso parecido a la celulosa, (celulosa en latín es amyllum y en griego es amydon).

La formación de fibras está completamente ligada al término agregación de proteínas, la formación de fibras amiloides *in vivo* y *in vitro* son ejemplo de agregados ordenados. La agregación de proteínas es el proceso de asociación entre proteínas que forman grandes aglomerados con baja solubilidad que eventualmente precipita, como ya se mencionó su morfología está clasificada como agregados ordenados o desordenados (Dobson, 2004; López de la Paz, 2004). Bajo ciertas condiciones fisiológicas, como altas concentraciones, algunas proteínas pueden formar agregados amorfos (Figura 9a) (Rousseau *et al* 2006) pero bajo las mismas condiciones un pequeño grupo de proteínas forma β -amiloides (Figura 9b) (Rousseau *et al* 2006) (Dobson, 2004; Dobson, 2003). Los agregados amorfos se definen como aglomerados de proteínas mal plegados que se une a otra proteína a través de contactos hidrofóbicos no específicos. Pero también se ha observado la formación hoja- β , no sólo está relacionada a la hidrofobicidad, sino también a la estructura secundaria y a la carga, surgiendo un mecanismo específico de formación. (Chiti *et al*, 2002; Chiti *et al*, 2003; Dobson, 2002). También se ha observado la formación de fibras por medio de intercambio de dominio (Rousseau *et al*, 2003; Silow y Oliveberg, 1997; Liu, 2002; Liu *et al* 2002) como se ilustra en la figura 10 (Marianayagam, 2004). La importancia del proceso de agregación de proteínas radica en la generación de enfermedades neurodegenerativas, que se caracterizan por depósitos de un sin fin de proteínas en forma de fibras amiloides (Dobson, 2003).

Ejemplos de enfermedades de tipo neurodegenerativas son Alzheimer, Parkinson, Huntington, y mal de las vacas locas entre otras.

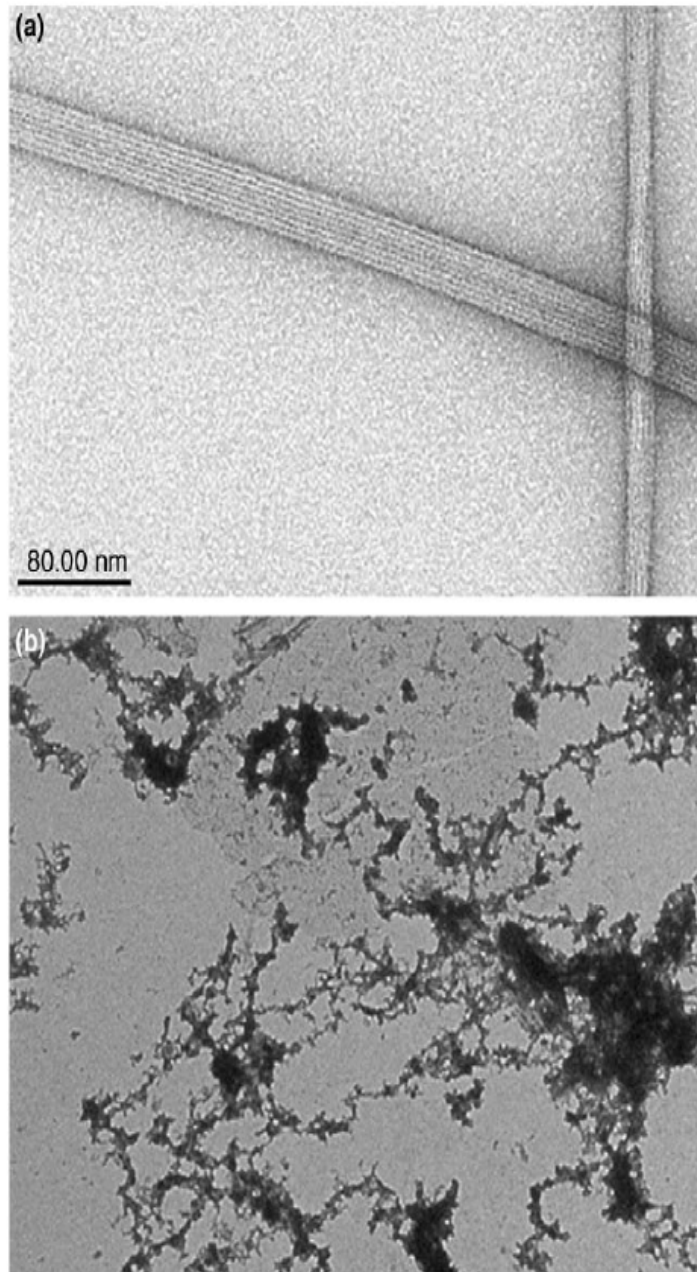


Figura 9. (a) Agregados amorfos (fusión entre NusA y β -péptido del Alzheimer's. (b) fibras amiloides (del hexapeptido STVIIE. Ambos agregados tienen un gran contenido de hoja- β , pero las diferencias entre morfologías se pueden ver a través de microscopio de electrones. (Rousseau *et al* 2006).

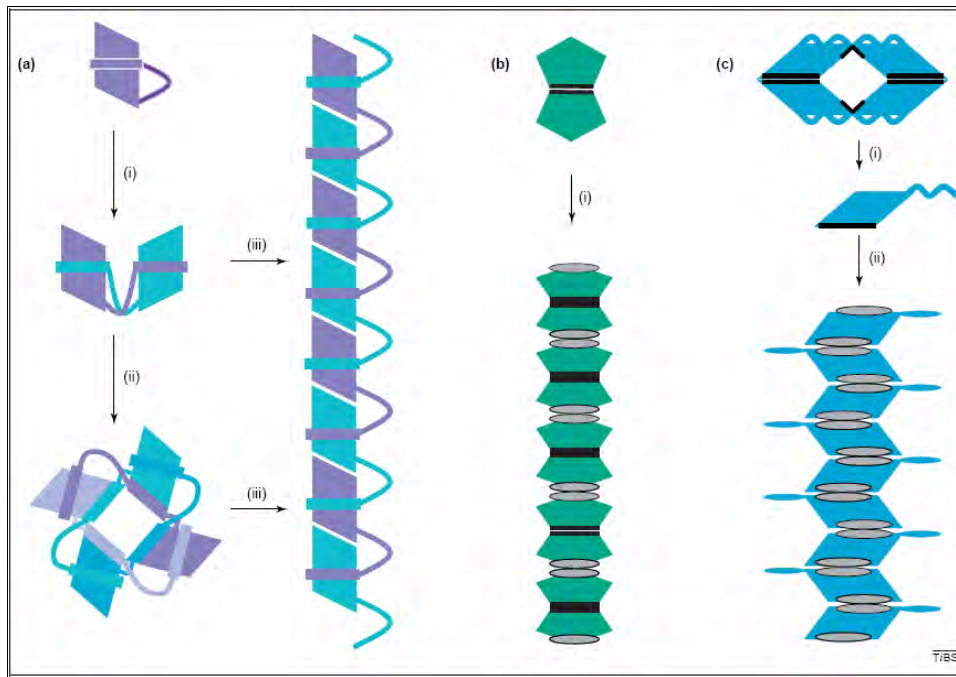


Figura 10. Tipos de agregaciones. a) Cistatina C príon humano son dos amiloides que son monómeros es su forma nativa, pero por medio del intercambio de dominio pueden formar dímeros, tetrámeros y por último agregados en forma de fibras amiloides. b) Superóxido dismutasa (SOD1) que produce desorden motor. Por medio de mutación o oxidación se asocian con otros dímeros de SOD1, a través de interfases patógenas no nativas. c) La TTR , transtretina, es un tetrámero pero por medio de una mutación forma fibras amiloides, resulta en la formación de fibras amiloides. (Marianayagam, 2004).

4. HIPOTESÍS

Según la función biológica de proteínas oligoméricas, habrá preferencias en los aminoácidos presentes en la interfase involucrados en la asociación de las subunidades.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar *in silico* los aminoácidos involucrados presentes en proteínas que sufren fenómenos de oligomerización y agregación, con el fin de establecer una relación entre la composición de los aminoácidos a nivel de la interfase y su actividad biológica

5.1.1 Objetivos particulares

Seleccionar de una base de datos, estructuras de proteínas que presentan fenómenos de oligomerización y agregación.

Clasificar el grupo de proteínas de estudio de acuerdo a su función biológica.

Identificar los aminoácidos de la interfase entre unidades monoméricas asociadas y clasificarlos de acuerdo a sus propiedades de polaridad.

Determinar el área de contacto por medio del cálculo de las superficies expuestas al disolvente de los monómeros por separado y de sus correspondientes oligómeros.

6. METODOLOGÍA

6.1. Conjunto de proteínas

El grupo de moléculas seleccionadas en el presente estudio comprende 51 proteínas oligoméricas, resueltas por difracción de rayos X y depositadas en Protein Data Bank (PDB) (Bernstein *et al.*, 1977; Berman *et al* 2000) (<http://www.pdb.org>). Este grupo seleccionado fue clasificado según su función biológica. Esta clasificación se ilustra en las tablas I; II; III; IV; V y VI.



Estas proteínas incluyen dímeros y oligómeros de todos los tipos, tales como homo-oligómeros y hetero-oligómeros, con interfase permanente y transitoria; obtenidos como archivos PDB. Las estructuras de estas proteínas fueron visualizadas con el programa PyMol versión 0.92, <http://www.pymol.org>.

Tabla I. Proteínas oligoméricas obtenidas del PDB y clasificadas según su función.

Código PDB	Nombre de la proteína	Clasificación	Especie	(Å)	Nº de cadenas	Referencia
1FAT	Fitohemaglutinina-1	Lectina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2.80	4	(Hamelryck, 1996)
1JZN	Lectina específica galactosa	Lectina	<i>Crotalus atrox</i>	2.20	5	(Walker, 2004)
1MUQ	Lectina en complejo con tiogalactosido	Lectina	<i>Crotalus atrox</i>	2.30	5	(Walker, 2004)
1LU1	Lectina de <i>Dolichos biflorus</i> en complejo con disacárido de forssman	Lectina	<i>Dolichos biflorus</i>	2.60	6	(Hamelryck, 1999)
1G7Y	Lectina vegetal 58kd	Lectina	<i>Dolichos biflorus</i>	2.50	6	(Buts, 2001)
1LUL	Lectina de leguminosa de <i>Dolichos biflorus</i> DB58	Lectina	<i>Dolichos biflorus</i>	3.30	6	(Hamelryck, 1999)
1BJQ	Lectina <i>Dolichos biflorus</i> en complejo con adenina	Lectina	<i>Dolichos biflorus</i>	2.65	8	(Hamelryck, 1999)
1QMO	Fril	Lectina	<i>Dolichos lab lab</i>	3.50	8	(Hamelryck, 2000)

Tabla II. Proteínas oligoméricas obtenidas del PDB y clasificadas según su función.

Código PDB	Nombre de la proteína	Clasificación	Especie	(Å)	Nº de cadenas	Referencia
8TIM	Triosafosfato Isomerasa	Enzima	<i>Gallus gallus</i>	2.50	2	(Artymiuk, por publicar)
1E5A	Transtirretina Humana en complejo con bromofenol	Enzima	<i>Homo sapiens</i>	1.80	2	(Ghosh, 2000)
1A3G	Aminotransferasa	Enzima	<i>Escherichia coli</i>	2.50	3	(Okada, 1997)
1GZ4	Nad(p)+ mitocondrial humano dependiente de la enzima malica por ATP y fumarato.	Enzima	<i>Homo sapiens</i>	2.20	4	(Yang, 2002)
1A16	Aminopeptidasa P	Enzima	<i>Escherichia coli</i>	2.30	5	(Wilce, 1998)
1HFB	Fosfatasa regulada por tirosina	Enzima	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.90	8	(Hartmann, 2003)

1AHU	Vainilla alcohol Oxidasa	Enzima	<i>Penicillium simplicissimum</i>	2.70	8	(Mattevi, 1997)
1A1S	Carbamoyltransferasa Omitina	Enzima	<i>Pyrococcus furiosus</i>	2.70	12	(Villeret, 1998)
1QOX	β -glucosidasa	Enzima	<i>Bacillus circulans</i>	2.70	15	(Hakulinen, 2000)
1C2Y	Luminase sintasa	Enzima	<i>Spinacia oleracea</i>	3.30	20	(Persson, 1999)

Tabla III. Proteínas oligoméricas obtenidas del PDB y clasificadas según su función.

Código PDB	Nombre de la proteína	Clasificación	Especie	(Å)	Nº de cadenas	Referencia
1SPJ	Chaperonina 60.2 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Chaperonas	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3.20	2	(Qamra, 2004)
1G31	Gp 31 co-chaperonina	Chaperonas	<i>Bacteriophage t4</i>	2.30	7	(Hunt, 1997)
1GR5	Apo-groel	Chaperonas	<i>Escherichia coli</i>	3.00	14	(Ranson, 2001)
1AON	Chaperona asimétrica (complejo Groel-Groes (ADP) ₇)	Chaperonas	<i>Escherichia coli</i>	3.00	21	(Xu, 1997)
1GRU	Groes-ADP7-Groel-ATP7	Chaperonas	<i>Escherichia coli</i>	3.00	21	(Ranson, 2001)

Tabla IV. Proteínas oligoméricas obtenidas del PDB y clasificadas según su función.

Código PDB	Nombre de la proteína	Clasificación	Especie	(Å)	Nº de cadenas	Referencia
1SNE	Intercambio de dominio β - β - α	Domain swapping	<i>Sintética</i>	1.50	2	(Ali, 2004)
1TIJ	Cistatina C humana	Domain Swapping	<i>Homo sapiens</i>	3.03	2	(Janowski, 2005)
2C3B	Ciclofilina	Domain swapping	<i>Escherichia coli</i>	1.85	2	(Limacher, 2006)
1A2W	Ribonucleasa A de pancreas de bovino	Domain swapping	<i>Bos taurus</i>	2.10	2	(Liu, 1998)
1R5D	Ribonucleasa A de semen de bovino	Domain swapping	<i>Bos taurus</i>	2.18	2	(Merlino, 2004)
1F0V	Dímero de Ribonucleasa A	Domain swapping	<i>Bos taurus</i>	1.70	2	(Liu, 2001)
1HT9	Proteína con con dominios	Domain swapping	<i>Bos taurus</i>	1.76	2	(Hakansson, 2001)

1HT9	Proteína con con dominios EF	Domain swapping	<i>Bos taurus</i>	1.76	2	(Hakansson, 2001)
1JS0	Triméero RNasa	Domain swapping	<i>Bos taurus</i>	2.20	3	(Liu, 2002)
1SNA	Intercambio de dominio β - β - α	Domain swapping	<i>Bos taurus</i>	1.50	3	(Ali, 2004)
1R4C	Cistatina C humana	Domain swapping	<i>Homo sapiens</i>	2.18	8	(Janowski, 2004)

Tabla V. Proteínas oligoméricas obtenidas del PDB y clasificadas según su función.

Código PDB	Nombre de la proteína	Clasificación	Especie	(Å)	Nº de cadenas	Referencia
1H4A	γ -Cristalina r58h humana	Fibras amiloides	<i>Homo sapiens</i>	1.15	2	(Basak, 2003)
1CQM	Proteína ribosomal S6	Fibras Amiloides	<i>Thermus thermophilus</i>	1.65	2	(Otzen,2000)
1OKI	β -B1-cristalina humana	Fibras amiloides	<i>Homo sapiens</i>	1.40	2	(Van Montfort, 2003)
1HK0	γ -D-Cristalina	Fibras amiloides	<i>Bos taurus</i>	1.25	2	(Basak, 2003)
1ELP	γ -D Cristalina	Fibras amiloides	<i>Bos taurus</i>	1.95	2	(Chirgadze, 1997)
1A5D	γ - Cristalina de rata	Fibras amiloides	<i>Rattus norvegicus</i>	2.30	2	(Norledge, 1997)
1BLB	β -Cristalina de ojos	Fibras amiloides	Sintética	3.30	4	(Nalini, 1994)

Tabla VI. Proteínas oligoméricas obtenidas del PDB y clasificadas según su función.

Código PDB	Nombre de la proteína	Clasificación	Especie	(Å)	Nº de cadenas	Referencia
1BEB	β-Lactoglobulina	Otras	<i>Bos taurus</i>	1.80	2	(Brownlow, 1997)
1VZY	HSP33	Otras	<i>Bacillus subtilis</i>	1.97	2	(Janda, 2004)
1A92	δ-Antígeno de hepatitis	Otras	<i>Hepatitis delta virus</i>	1.80	4	(Zuccola, 1998)
1BEN	Insulina en complejo con 4-hidroxibenzamida	Otras	Sintética	1.40	4	(Smith, 1996)
2A3Y	Suero amiloide	Otras	<i>Homo sapiens</i>	2	5	(Ho, 2005)
1V99	CutA	Otras	<i>P. horikoshii</i>	1.8	6	(Bagautdinov por publicar)
1QK1	Creatina kinasa humana	Otras	<i>Homo sapiens</i>	2.7	8	(Eder, 2000)
1M6X	Flpe	Otras	<i>S. cerevisiae</i>	2.8	10	(Conway, 2003)
1NF4	Transportador de e ²	Otras	<i>D. desulfuricans</i>	2.05	16	(Macedo, 2003)
2A3W	Suero amiloide	Otras	<i>Homo sapiens</i>	2.20	20	(Ho, 2005)

6.2. Análisis de muestra

Después de clasificar cada una de las moléculas seleccionadas con su respectivo archivo PDB, sin incluir en éste, moléculas de agua y heteroátomos, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se visualizó en PyMol versión 0.92, cada una de las moléculas, para observar las cadenas de aminoácidos que interaccionaban entre ellas y posteriormente se editó su archivo PDB, de forma que sólo incluyera la región de las cadenas involucradas en esta asociación.

6.3. Definición de la interfase.

6.3.1. Determinación de los aminoácidos involucrados en la interfase por *Crystallography & NMR System (CNS)*.

La determinación de los aminoácidos (vease más adelante) que forman la interfase entre los monómeros asociados se realizó usando el programa *Crystallography & NMR System (CNS)*, (1998).

Dentro del ambiente del programa anterior y utilizando cada uno de los correspondientes archivos PDB, se generó otro archivo “*Generate*”, el cual contiene los parámetros atómicos de longitud y ángulos de enlace. Una vez obtenido el archivo “*Generate*”, éste se utilizó para determinar los aminoácidos de la interfase creando otro archivo de nombre “*Contact*”, también dentro del programa CNS.

Los aminoácidos en la interfase se definieron considerando una distancia de interacción, no mayor a **3.6 Å**. Esta distancia promedio se consideró teniendo en cuenta todos los tipos de interacciones que se encuentran en las proteínas tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals entre otras, como se muestra en la tabla VII.

Tabla VII. Tipo de interacciones que se llevan a cabo entre proteínas.

Interacción	Naturaleza	Tamaño de enlace Å	Fuerza del enlace kcal/mol	Ejemplo
Enlace atómico	Covalente	1.0-1.6	>50	Enlace peptídico
Puente salino	Electroestática	1.8-4.0 (3.5) 3.5-10.0	1-6	Positivo Arg NH, Lys NZ, His NE & ND, Amino terminal N Negativo Asp OD, Glu OE, carboxilo terminal O
Puente hidrógeno	Puente hidrógeno	2.6-3.5 (2.8)	2-10	Funciona con moléculasceptoras y donadoras de protones
<u>Hidrofóbico</u>	Entropía		2-3	Cadena lateral Leu, Ile, Val, Phe, Met, Trp, Ala, Cys, Pro, Tyr
Fuerzas de <u>Van der Waals</u>	Dispersión/ Repulsión	2.8-4.0	<1	Todos los átomos
<u>Cargas parciales</u>	Electroestático			Átomos positivos Átomos negativos
Hélice dipolo	Electroestática		10	N-terminal de hélice de carga Terminal
Aromático	Puente hidrógeno	4.5-7.0 (5.5-6.0)	1-2	Cadena lateral Phe, Trp, Tyr
Aromático	Puente hidrógeno	2.9-3.6 (3.3)	2.7-4.9	Cadena lateral Phe, Trp, Tyr
Solvente de la proteína	Electroestática, Puente hidrógeno, Hidrofóbico, Dispersión/ Repulsión			H ₂ O y todos los átomos

6.3.2. Definición de la interfase por la accesibilidad al solvente (ASA).

Con el objetivo de estimar el área de la superficie accesible al disolvente de cada monómero y el área total de la molécula en asociación, se usó el programa "NACCESS" (Hubbard, *et al* 1991). En el apéndice del presente trabajo se presenta la salida del programa "NACCESS" de algunas proteínas estudiadas en el presente estudio. Se tomó el valor en Å que se encuentra en la parte inferior de la primera

columna de izquierda a derecha, este resultado es el tamaño de área total expuesta al disolvente de una molécula. Como ya se mencionó, "NACCESS", se aplicó para las parejas de monómeros en asociación, así como para los monómeros individualmente. Por lo tanto, la **diferencia** entre el valor del área de la molécula en asociación y sus respectivos monómeros por separado, da como resultado el tamaño del área de la interfase entre monómeros asociados. Así también con este programa se identificaron todos los aminoácidos de cada monómero expuestos al disolvente sin discriminar la superficie de contacto.

Naccess es un programa creado para calcular el área accesible al solvente de moléculas que se encuentren en formato PDB. Naccess calcula el área atómica accesible usando el método que sugirieron Lee & Richards (1971) que emplea una sonda de radio determinado enrollada alrededor de la superficie de una molécula. El camino trazado por dicha sonda es la medida de la superficie accesible al disolvente. Esta sonda tiene el mismo radio que el agua, 1.4 Å, de tal manera que la superficie descrita es a menudo referida como superficie accesible al disolvente.

Como ejemplo de estudio con Naccess para evaluar ASA, en la figura 11, se muestra la estructura de la proteína tetramérica con código pdb 1B77 con los residuos accesibles al disolvente (Shamoo y Steitz, 1999).

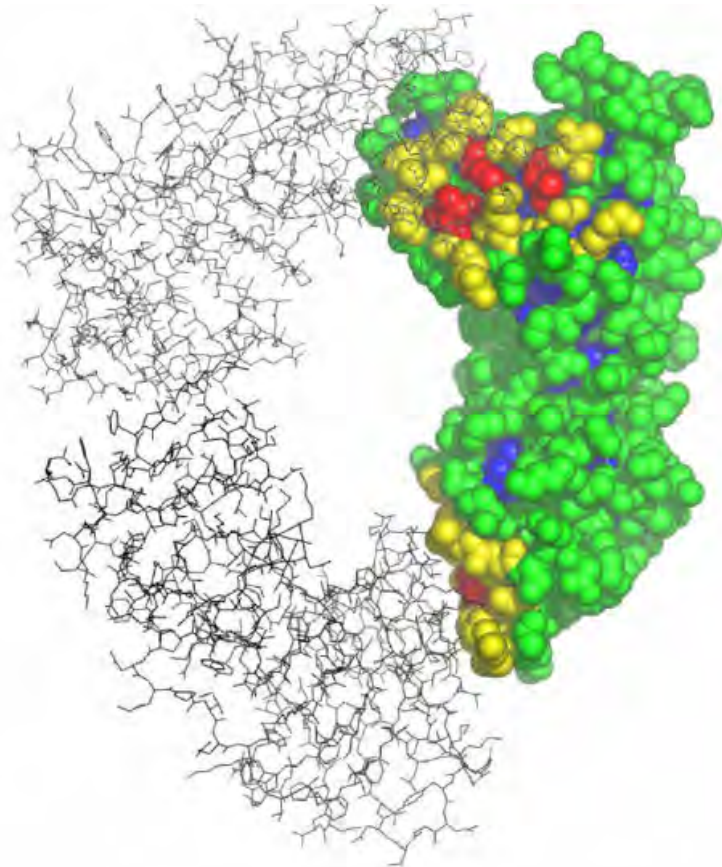


Figura 11. La visualización de un proteína oligomérica basados en la exposición al disolvente (producido usando el programa PyMol versión 0.92, <http://www.pymol.org>). La estructura es tetramérica (código PDB 1B77), una subunidad, es mostrada con esferas de Van-der-Waals, las otras dos subunidades son representadas en trazas. Los residuos exteriores de la unidad en esferas son divididos en superficie libre (verde) y los residuos que participan en la interfase y se encuentran completamente cargados (rojo) o parcialmente accesibles (amarillo). Los residuos que se encuentran en el interior de la subunidad (azul).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Determinación de los aminoácidos en la interfase entre los monómeros asociados.

La figura 12, muestra el formato que produce la salida del archivo "Contact" después de ingresar el correspondiente archivo "Generate"; para determinar los aminoácidos presentes en área de contacto.

El encabezado de la salida muestra el nombre de los monómeros que estaban interaccionando entre ellos, seguidamente se muestra la distancia máxima considerada para la interacción. A continuación, la salida del programa despliega 3 columnas. Las 2 primeras columnas muestran la lista de los aminoácidos de la interfase entre los monómeros, el número del residuo involucrado en la interacción y el grupo de átomos involucrados directamente en la interacción. La última columna despliega la distancia en Å de dicha interacción.

```
>>> Contact analysis between specified sets of atoms
-----
>>> set1= ( segid B )
>>> set2= ( segid C )
>>> definition of contact atoms: ( not ( name c or name n or name ca or name o
) )
>>> maximum distance cutoff between contact atoms: 3.6
-----

List of contacting residue pairs between set1 and set2. The atoms
that form the closest contact between the particular pair of residues
and the corresponding distance are listed.

  atom in set 1      atom in set 2      distance (Å)
-----
[ ARG 64 NH2 ] [ ARG 89 NH1 ] 2.63687
[ TRP 67 CD2 ] [ ARG 89 CD ] 3.23789
[ TRP 67 CH2 ] [ ALA 92 CB ] 3.58067
[ VAL 70 CG1 ] [ VAL 93 CG2 ] 3.34987
[ GLU 71 OE2 ] [ MET 96 CE ] 3.05563
[ THR 74 OG1 ] [ MET 96 CE ] 2.96979
[ VAL 76 CG2 ] [ MET 96 CE ] 3.22762
[ TYR 78 OH ] [ TRP 68 NE1 ] 2.71484
[ TYR 78 OH ] [ THR 72 OG1 ] 2.75617
[ ASP 80 CB ] [ TYR 82 CE2 ] 3.35287
[ PHE 103 CD1 ] [ ILE 100 CG2 ] 3.59679
[ LEU 110 CD2 ] [ LEU 105 CD1 ] 3.24498
[ PHE 114 CD1 ] [ LEU 24 CD2 ] 3.2663
[ PHE 114 CG ] [ HIS 25 CB ] 3.18484
[ PHE 114 CZ ] [ ALA 28 CB ] 3.33125
[ PHE 114 CB ] [ THR 112 CG2 ] 3.3574
```

Figura 12. Formato de salida de archivo "Contact"

7.2. Análisis de proteínas oligoméricas clasificadas según su función biológica

7.2.1. Lectinas

Con toda la información generada de tipo de salida anteriormente mostrado, se contabilizó la frecuencia de los aminoácidos presentes en todas las interfases estudiadas, para cada grupo de proteína con una función determinada. La Figura 13, muestra el histograma de la frecuencia de los aminoácidos presentes en las interfases de algunas lectinas. Se observó que en este tipo de proteínas con esta función, el área de contacto está enriquecida por residuos cargados. Distinguiéndose la presencia de Ser con una frecuencia del 14% y la Tyr con una frecuencia de aparición del 10%. La Arg y la Asn, constituyeron el 8 % de estos residuos, seguidos por otro residuos polares y cargados como la Asn. Los principales residuos hidrofóbicos presentes son Leu e Ile, también se encuentran Val, Ala y Trp con una frecuencia menor.

Esta información se complementó con estudio de varios tipos de lectinas donde se determinaron los aminoácidos presentes en la asociación intradominio. Se observó una importante presencia de aminoácidos cargados, en su mayoría Arg, pero también la presencia de Asp y Glu, las investigadoras argumentan la presencia de estos aminoácidos, para lograr una mayor estabilidad y fuerza en la unión de las proteínas (Brinda *et al*, 2005).

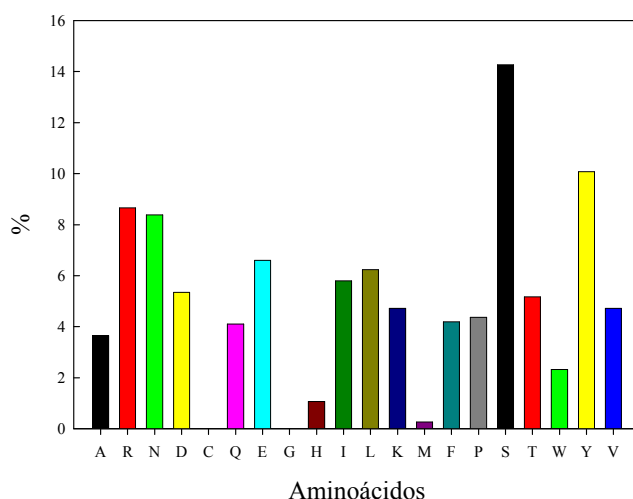


Figura 13. Porcentaje de aminoácidos presentes en la interfase de diferentes lectinas analizadas en el actual estudio.

En la Figura 14, se resumen las características electrostáticas observadas a nivel de interfase en las lectinas. En ellas se muestra una mayor abundancia de aminoácidos polares coincidiendo con datos mostrados en la Figura 13.

Los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran representados en un 30% y como se muestran en la Figura 14 constituyen los más hidrofóbicos dentro de su clasificación.

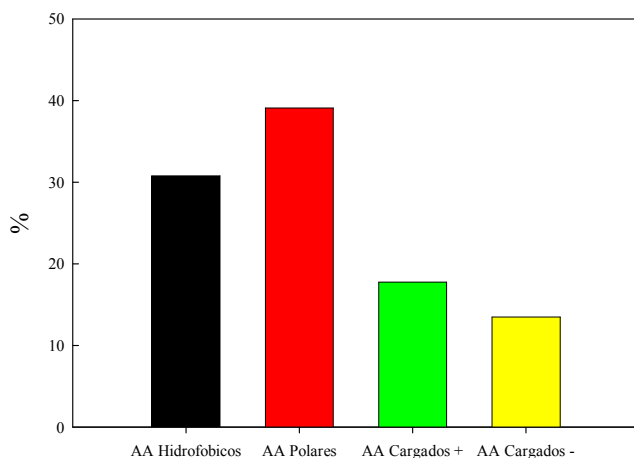


Figura 14. Porcentaje de aminoácidos. Clasificados según sus características electrostáticas. Presentes en la interfase de todas las lectinas analizadas en este estudio.

El análisis de los aminoácidos expuestos al disolvente, también mostró una mayor abundancia de aminoácidos cargados. Entre ellos se destaca la Ser, Lys, Asp, Glu, Asn y Arg. Esto corrobora toda la información deducida de las estructuras de las proteínas, las cuales tiende a exponer al disolvente sus aminoácidos cargados y ocultar los hidrofóbicos en el interior de la estructura, formando un núcleo altamente hidrofóbico que ayuda a estabilizar la estructura de la proteína (Figura 15).

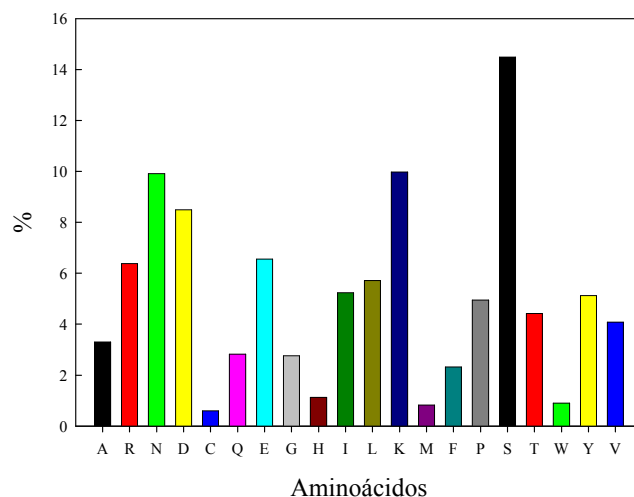


Figura 15. Porcentaje de aminoácidos presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las lectinas analizadas en el actual estudio.

En resumen y como se observa también para la interfase entre las lectinas, la superficie está constituida preponderantemente por aminoácidos polares y cargados. El porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos se encuentra en una frecuencia similar a la estimada a la interfase (figura 16)

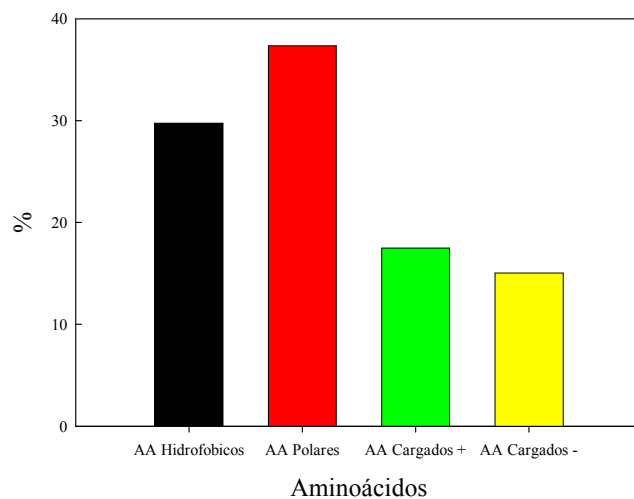


Figura 16. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las lectinas analizadas en el actual estudio.

7.2.2. Enzimas

A nivel de la interfase, en las enzimas estudiadas se observó una mayor abundancia de residuos hidrofóbicos, destacándose entre ellos la Val con una frecuencia del 19% (ver la figura 17). En menor proporción se encontraron otros residuos como Leu, Ile, Ala, y el Trp. A diferencia de lo observado en las lectinas, en la interfase de las enzimas se halló la presencia de Cys, las cuales estabilizan altamente la formación de oligómeros por la formación de enlaces covalentes de tipo puentes disulfuro. Algunos autores han observado que la presencia de Cys es para la formación de sitios catalíticos en conjunto con la Lys que se encuentre en el otro monómero que forme la asociación (Osterman *et al*, 1994).

Se observó la falta de residuos tipo Gly en lectinas y enzimas. Entre los residuos polares que se encontraron en la interfase se muestra la Arg con una frecuencia del 11%, Glu y Asp con el 10 y 5% respectivamente; Lys con 8% y Tyr 7%

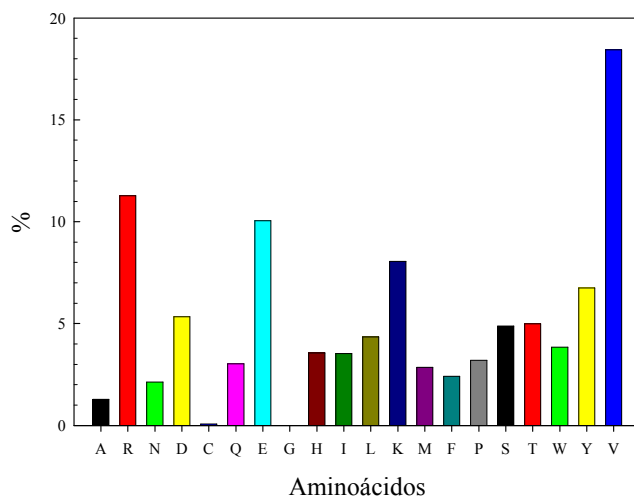


Figura 17. Porcentaje de aminoácidos presentes en la interfase de diferentes enzimas analizadas en el estudio actual.

La Figura 18, resume la característica electrostática observada a nivel de interfase en las enzimas, resalta a simple vista el carácter hidrofóbico con un 40%, contribuido por la abundancia de residuos tipo Val. Sin embargo, la sumatoria de los aminoácidos cargados y polares continua siendo mayoritaria a nivel de la interfase como se observó en la interfase de las lectinas.

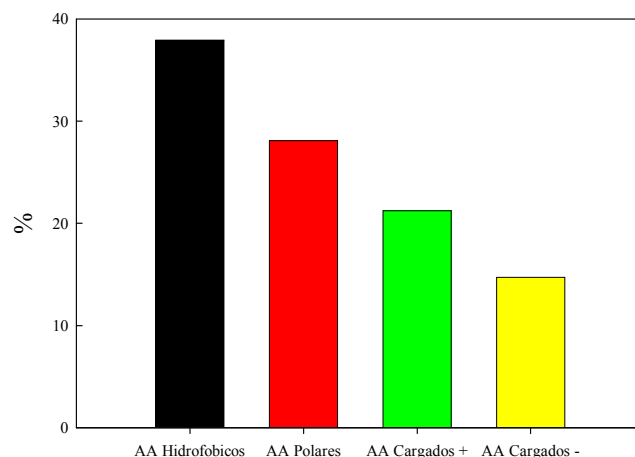


Figura 18. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la interfase de todas las enzimas analizadas en el estudio actual.

La Figura 19, muestra la frecuencia de aminoácidos en la superficie expuestos al disolvente, se destacan notablemente la mayor frecuencia de los residuos altamente cargados, como Lys en un 13%, Glu y Asp con un 11 y 7% respectivamente, y la Arg con un 10%. Los residuos polares e hidrofóbicos se encuentran distribuidos en proporciones similares.

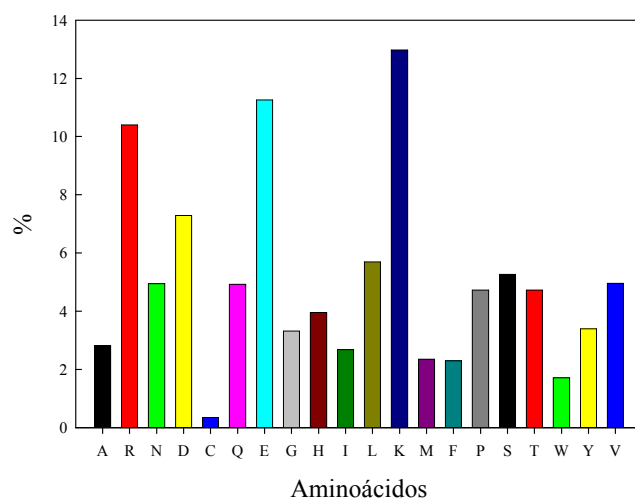


Figura 19. Porcentaje de aminoácidos presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las enzimas analizadas en el actual estudio.

En las enzimas el carácter electrostático a nivel de la superficie, no muestra una tendencia marcada hacia un grupo particular de aminoácidos, si tenemos en cuenta sólo las características por grupo, pero si agrupamos los residuos cargados estos constituirían la mayoría de los residuos expuestos en la superficie, razón ya expuesta al hacer al análisis con el grupo de las lectinas. Ver Figura 20.

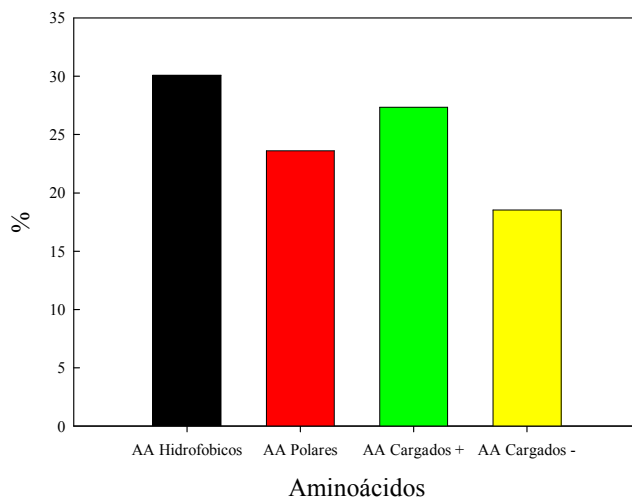


Figura 20. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las enzimas analizadas en el actual estudio.

7.2.3. Chaperonas

En las chaperonas, el aminoácido que se destaca por su mayor frecuencia (aminoácidos a nivel de área de contacto) es el Glu con 18% en la frecuencia. Otros residuos como Arg, Asn, Thr, y Asp entre los aminoácidos cargados y polares, aparecen en una proporción que es la mitad de la frecuencia encontrada para el Glu. Son pocos los residuos hidrofóbicos que se destacan en la interfase, a excepción de la Val que también aparece con una frecuencia correspondiente a la mitad de la frecuencia del Glu. Se observó también que en, este tipo de proteínas se incrementó la presencia de los residuos de Cys, contribuyendo a una mayor estabilización de estos grandes oligómeros. Ver Figura 21.

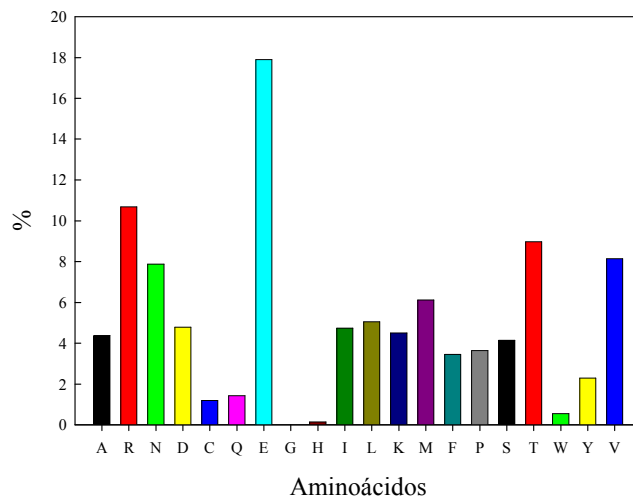


Figura 21. Porcentaje de aminoácidos presentes en la interfase de diferentes chaperonas analizadas en el actual estudio.

El carácter de la interfase en las chaperonas muestra aparentemente una tendencia hidrófoba si se observa desde el punto de vista de la clasificación electrostática de los aminoácidos. Nuevamente al sumar las contribuciones por los aminoácidos cargados y polares, la interfase mayoritariamente exhibe un carácter cargado negativo, debida a la alta frecuencia de aparición del Glu. La Arg el segundo en abundancia a nivel de interfase, proporcionaría la carga complementaria para la interacción electrostática con el ácido Glu y como consecuencia proporciona la estabilización de la asociación entre los monómeros. Ver Figura 22.

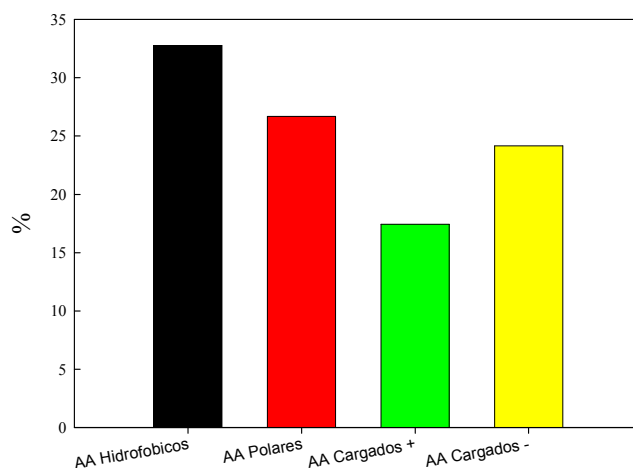


Figura 22. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la interfase de todas las chaperonas analizadas en el actual estudio.

A nivel de superficie encontramos nuevamente al Glu como el aminoácido con mayor frecuencia accesible al disolvente seguido a este aminoácido encontramos a la Lys con una carga opuesta al Glu. No se destaca notablemente la frecuencia de cualquier otro tipo de aminoácidos. Ver Figura 23.

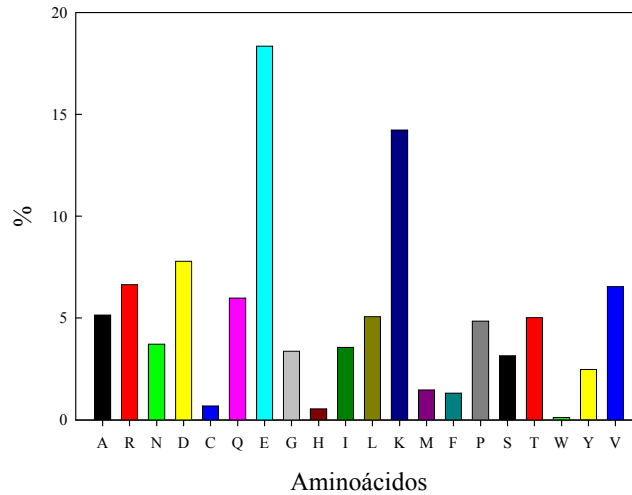


Figura 23. Porcentaje de aminoácidos presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las chaperonas analizadas en el actual estudio.

Las chaperonas al igual que las enzimas, se observa que el carácter electrostático a nivel de la superficie no muestra una tendencia marcada hacia un grupo particular de aminoácidos, si tenemos en cuenta solo las características por grupo, pero si agrupamos los residuos cargados estos constituirían la mayoría de los residuos expuestos en la superficie. Ver Figura 24.

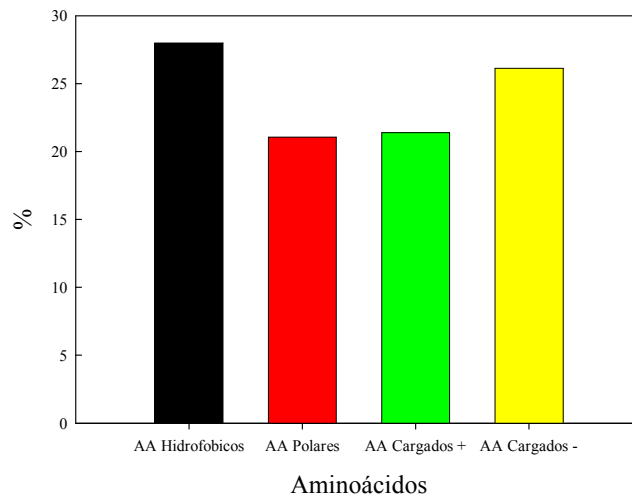


Figura 24. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características

electrostáticas, presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las chaperonas analizadas en el actual estudio.

7.2.4. Intercambio de dominios (Domain Swapping)

Las proteínas oligoméricas que presentan intercambio de dominio o conocidas también como “domain swapping” no presentan a nivel de interfase una tendencia hacia ningún tipo particular de residuo, como se observó en las lectinas, enzimas y chaperoninas.

Esta característica a nivel de interfase hace que se establezca igualmente tanto interacciones tanto hidrófobas, como interacciones tipo iónicas entre cargas opuestas. Sin que prevalezca un tipo particular de interacción. Ver Figura 25.

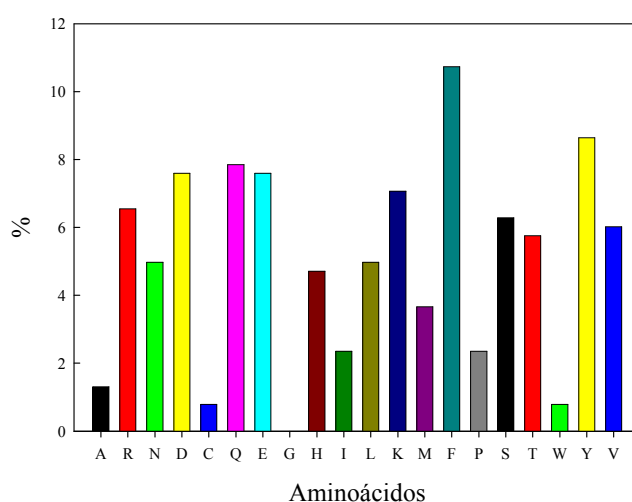


Figura 25. Porcentaje de aminoácidos presentes en la interfase de diferentes proteínas que muestran un intercambio de dominios (domain swapping) analizadas en el actual estudio.

Como ha prevalecido en todos análisis de las interfases realizados para todas las proteínas anteriormente descritas, en los domain swapping en la superficie de interacción se mantiene la presencia mayoritaria de aminoácidos polares y cargados sobre los aminoácidos hidrofóbicos. Figura 26

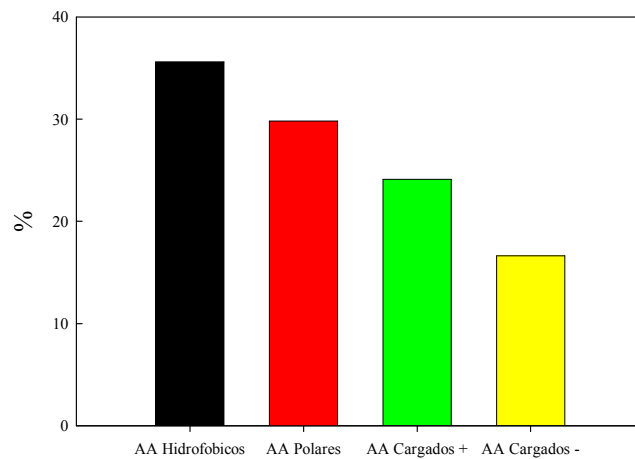


Figura 26. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la interfase de todas las proteínas que muestran “Domain swapping” analizadas en el actual estudio.

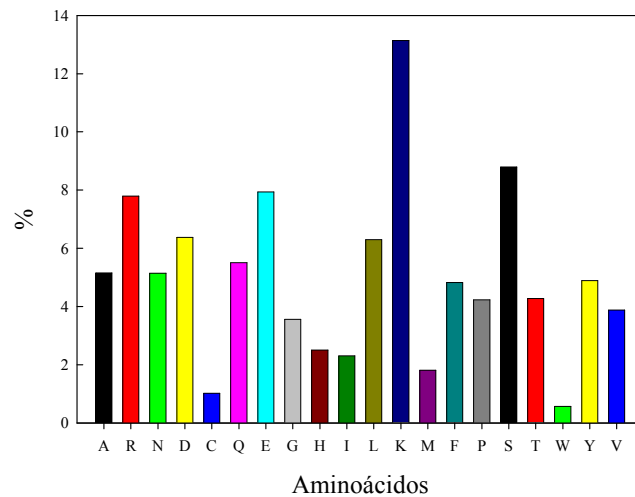


Figura 27. Porcentaje de aminoácidos presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las proteínas que muestran “Domain swapping” analizadas en el actual estudio.

La distribución de aminoácidos cargados a nivel de la superficie expuestos al disolvente es una constante que se mantiene en todas las proteínas analizadas. En los domain swapping aparece la Lys, aminoácido con carga neta positiva, como el aminoácido con más alta frecuencia (ver figura 27), le siguen en frecuencia la Arg, Asp y Glu, Asn, Gln, Ser, Tyr y Thr.

A diferencia de los anteriores grupos de proteínas analizadas, la Gly se encuentra con una apreciable frecuencia.

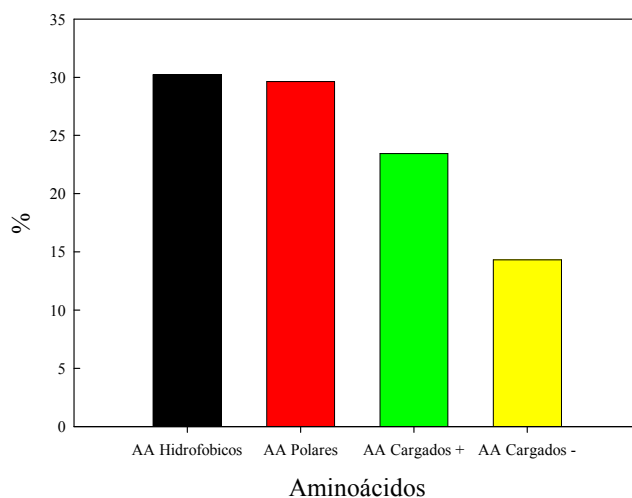


Figura 28. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las proteínas que muestran “Domain Swapping” analizadas en el actual estudio.

En los domain swapping la distribución de los aminoácidos hidrofóbicos y polares en la superficie expuesta al disolvente, muestra una igual proporción del 30%. Los aminoácidos cargados positivo constituyen el 25% y los cargados negativo aproximadamente el 15%, lo cual nos lleva a concluir que solo el 40% de la superficie expuesta al disolvente está formada por aminoácidos altamente cargados. Como resultado, el 70% de la superficie de la proteína domain swapping podían estar presentando cargas parciales o totales. Ver figura 28.

7.2.5. Fibras amiloides.

En las fibras amiloides, las cuales se forman por fenómenos de agregación caracterizados por asociaciones son altamente insolubles, y señaladas como causantes de varias enfermedades neurodegenerativas, la caracterización en la composición de los aminoácidos nivel de la interfase muestra particularmente para este tipo de proteínas una prevaecía de la Gln como aminoácido mayoritario. Este aminoácido ha sido señalado e identificado por varios grupos de investigación experimental sobre la agregación de fibras involucradas en enfermedades como un residuo clave para la

formación de las fibras amiloides por que propician los enlaces hidrógeno en los filamentos anteriores de las fibras (Higuchi *et al*, 1986; Thakur y Wetzel, 2002). Otros aminoácidos también hallados son Arg, Glu, Tyr, y Trp.

Y como una característica sobresaliente no encontrada en las interfases analizadas anteriormente sobresalen los residuos hidrofóbicos Ala, Val, y Leu, con una frecuencia cercana al 10% en cada uno de ellos. Ver figura 29.

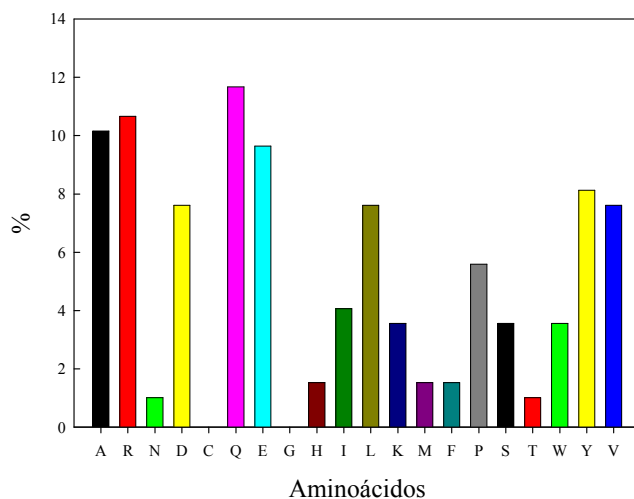


Figura 29. Porcentaje de aminoácidos presentes en la interfase de diferentes proteínas que muestran formación de fibras amiloides analizadas en el actual estudio.

La distribución de cargas a nivel de área de contacto en las fibras amiloides, exhibe una notable frecuencia de aminoácidos hidrofóbicos y un decaimiento en la frecuencia de los aminoácidos polares, en comparación con todas las interfases analizadas anteriormente. Ver Figura 30.

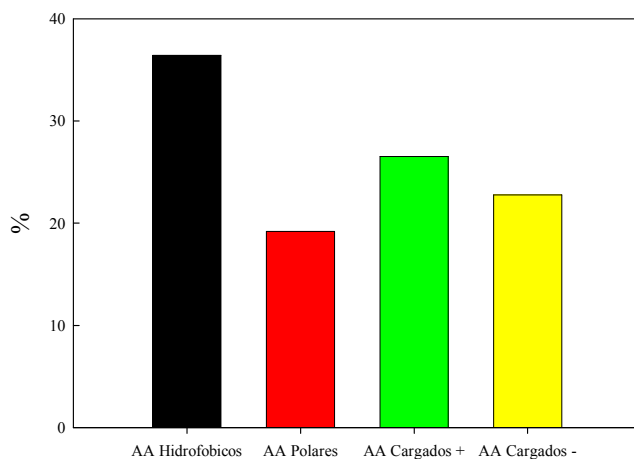


Figura 30. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la interfase de todas las proteínas que muestran formación de fibras amiloides analizadas en el presente estudio.

El análisis de la Figura 31 de los aminoácidos involucrados en la superficie expuestos al disolvente, se observa que los residuos mayoritarios son Arg con una frecuencia cercana al 20 %, seguido por el Glu en un 15% de frecuencia y la Lys y la Gln menor al 10%. Estos resultados indican que la mayor proporción de las Gln presentes en toda la estructura se hallan involucradas en el área de contacto entre las fibras. Corroborando lo descrito por Nelson y Eisenberg, (2006), observaron gran cantidad de Gln y Arg en la formación de fibras amiloides en diferentes casos de proteínas.

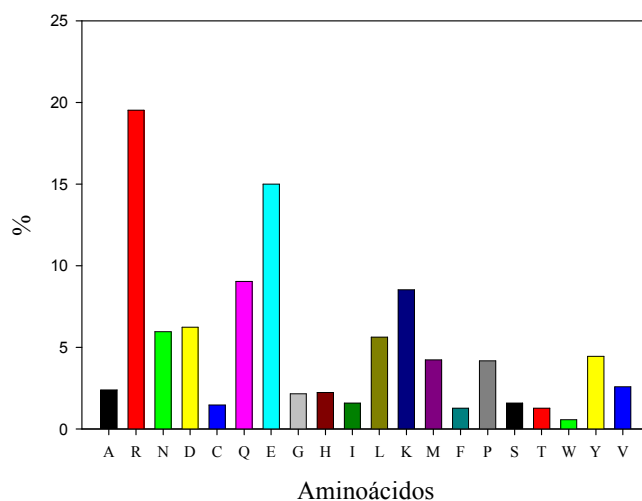


Figura 31. Porcentaje de aminoácidos presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas proteínas que muestran formación de fibras amiloides analizadas en el actual estudio.

En Figura 32, se muestra la distribución electrostática por grupo de aminoácidos en la superficie expuestos al disolvente. Se observa una característica muy particular la abundancia de residuos cargados positivamente en un 30%, atribuidos a la mayor frecuencia de aparición de las Arg, residuos altamente cargados e involucrados en fuertes interacciones electrostáticas.

Notablemente se observa por primera vez el decaimiento del porcentaje de frecuencia de los residuos hidrofóbicos, lo cual señala que este tipo de moléculas está altamente cargada en su superficie. Figura 32.

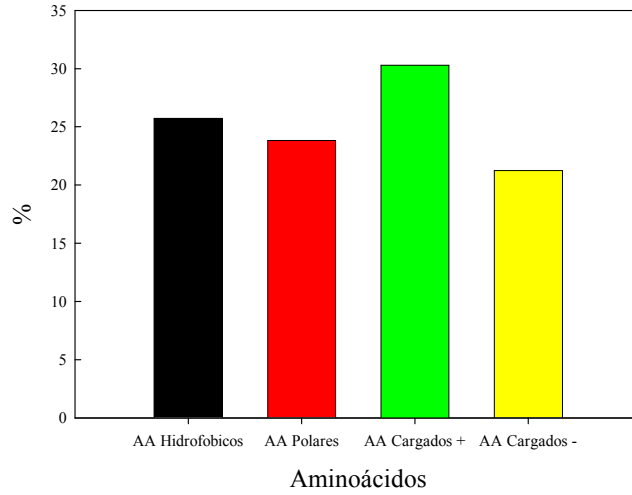


Figura 32. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las proteínas que muestran formación de fibras amiloides analizadas en el presente estudio.

7.2.6. Otras

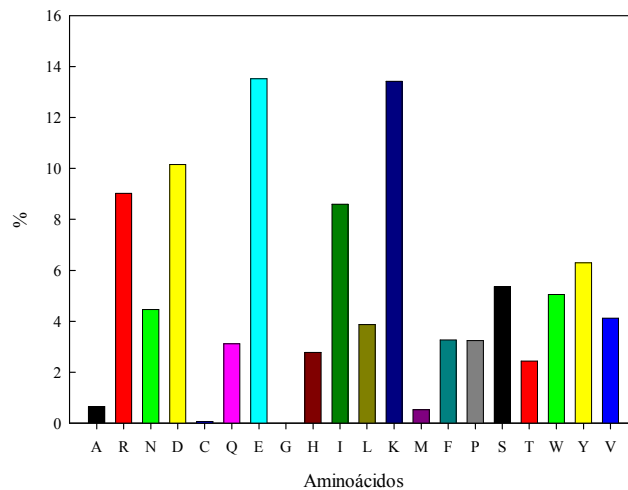


Figura 33. Porcentaje de aminoácidos presentes en la interfase de diferentes proteínas que muestran el fenómeno de oligomerización, analizadas en el actual estudio.

Dentro del grupo de otras proteínas, se agruparon proteínas oligoméricas con diversas características funcionales, entre las cuales se encuentran proteínas tipo hormonas como la insulina, proteínas transmembranales, proteínas estructurales como la del colágeno tipo IV, o proteínas globulares como la β lactoglobulina, entre otras.

El análisis de la interfase del grupo de proteínas anteriormente descrito, muestra a la Lys y Glu como los aminoácidos con la mayor frecuencia (14%) de aparición a nivel de la interfase de contacto. Seguidamente se encuentra el Asp y la Arg. Ver figura 33.

Dentro de los aminoácidos hidrofóbicos se resalta la frecuencia de Ile en lugar de la Leu o la Val, las cuales se encontraban preferentemente en todos los grupos de proteínas anteriormente estudiados. Curiosamente, la Gly es un residuo que no se encuentra presente en este tipo de interfase, de igual forma que lo observado en los otros tipos de interfase anteriormente analizados.

La figura 34, muestra la interfase de las proteínas clasificadas como **Otras** debido a sus diversas funciones. Se observa que a nivel de bloque una mayor distribución de aminoácidos hidrofóbicos en un 32% aproximadamente. Los aminoácidos cargados positivamente y negativamente se encuentran en igual proporción con un 25% cada uno de ellos. Nuevamente, se observó la tendencia de esta superficie en presentar una alta presencia de aminoácidos con carga, como se ha visto en todos los grupos analizados.

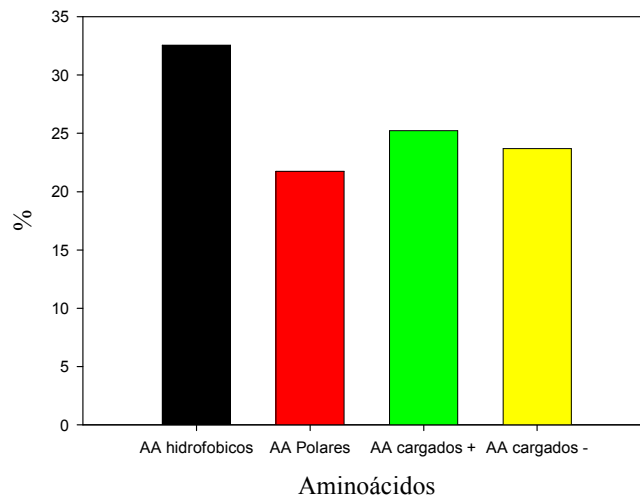


Figura 34. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la interfase de todas las proteínas, que muestran el fenómeno de oligomerización, analizadas en el actual estudio.

A nivel de superficie se observó nuevamente que la Lys y el Glu predominan en este grupo tan diverso en función biológica. Seguido a estos aminoácidos encontramos a la Arg y Gln con una frecuencia de aparición menor al 10%. Ver figura 35

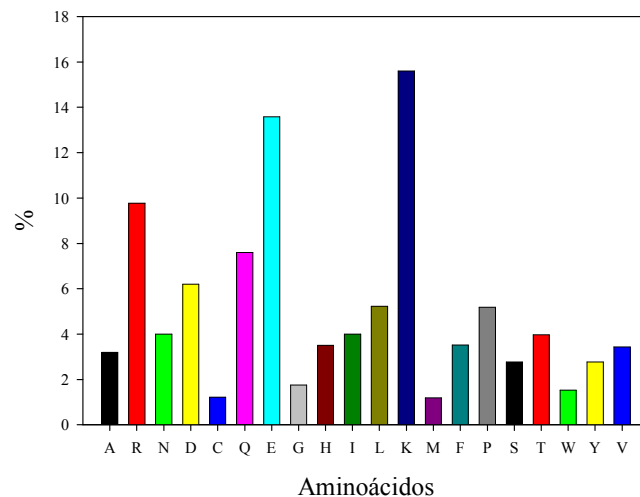


Figura 35. Porcentaje de aminoácidos presentes en la superficie expuesta al disolvente de diferentes proteínas que muestran el fenómeno de oligomerización analizadas en el actual estudio.

La figura 35 de la distribución de los aminoácidos expuestos al disolvente muestra una igual proporción del 30% entre los residuos hidrofóbicos y los cargados positivamente estos últimos representados por la Arg y Lys.

Igualmente, los aminoácidos cargados negativo representados por el Glu y Asp se encuentran con una frecuencia cercana al 25% al igual que los polares.

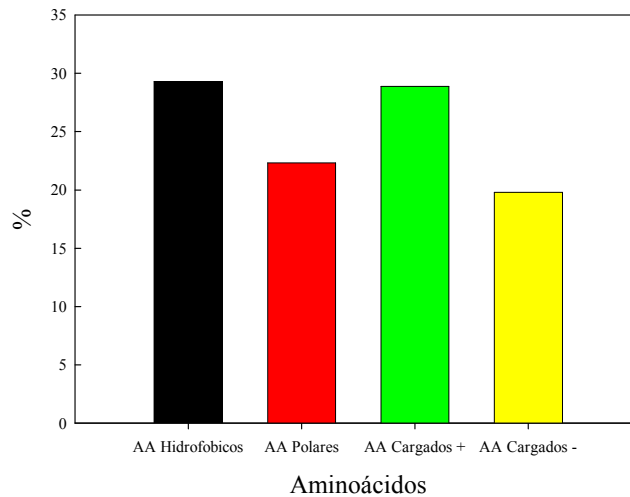


Figura 36. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la superficie expuesta al disolvente de diferentes proteínas que muestran el fenómeno de oligomerización analizadas en el actual estudio.

En la figura 36, se observa el porcentaje de aminoácidos que clasificadas por sus características electrostáticas expuestos al disolvente, se observa una igualdad entre los aminoácidos hidrofóbicos con los aminoácidos cargados positivos.

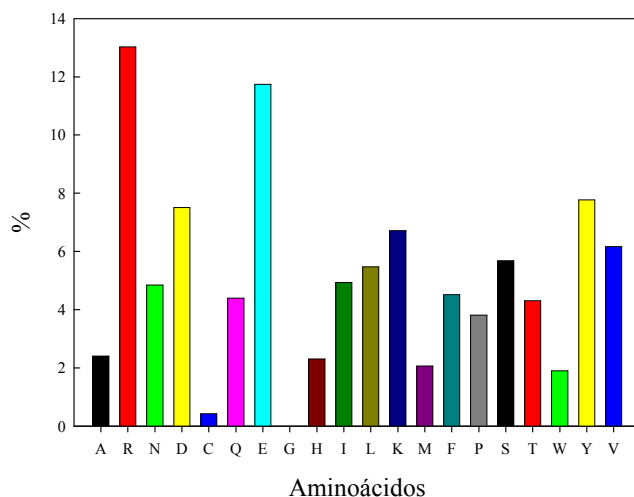


Figura 37. Porcentaje de aminoácidos presentes en la interfase de **todas** las proteínas analizadas en el actual estudio.

La Figura 37 muestra el histograma de la frecuencia de aparición en función del tipo de aminoácido de todas las proteínas estudiadas. Se observa que independientemente de la función, el área de contacto se observó una preponderancia por residuos cargados como la Arg, en un 13%, Glu cercano al 12%, y Asp y Tyr, en un 8%. Otros con una menor frecuencia como Lys y Val.

Como se ha observado a lo largo del estudio de las interfases de contacto de todos los grupos de proteínas de este estudio, la Gly no se encuentra presente en esta superficie, resultado señalado también en otros estudios (Ofra y Burkhard, 2003).

Esto se debe a que la Gly es un aminoácido muy pequeño, su función es la de ayudar a la formación de estructura secundaria, por medio de puentes hidrógeno, pero no en la formación de interacciones proteína-proteína.

La Cys constituye el aminoácido con la menor frecuencia a nivel del área de contacto, la Arg y el Glu constituyen los aminoácidos con la mayor frecuencia en todas las interfases analizadas, con una frecuencia aproximada al 13%. Estos resultados divergen de lo supuesto por muchos autores, los cuales le atribuyen a las fuerzas hidrófobas el motor inductor para llevarse a cabo la asociación en los fenómenos de oligomerización. (Janin, *et al* 1988; Janin y Chothia 1990; Young *et al* 1994; Chothia y Janin, 1975; Lijnzaad *et al* 1996).

Diversos estudios han reconocido a los aminoácidos cargados, como los protagonistas en la estabilidad entre los monómeros por sus cargas electrostáticas a

nivel de la interfase de contacto. Como mencionan (Ofra y Burkhard, 2003; Res y Lichtarge, 2005; Argos 1988; Janin y Chothia 1990; Korn y Burnett 1991, Jones y Thornton 1995, 1996, 1997a, b; Lijnzaad *et al.* 1996 Tsai *et al.* 1996, Carugo y Argos 1997; Dasgupta *et al.* 1997; Tsai *et al.* 1997, Xu *et al.* 1997, Larsen *et al.* 1998, Lo Conte *et al.* 1999, Chakrabarti and Janin 2002, Wodak y Janin 2002, Bahadur *et al.* 2003, 2004, Nooren y Thornton 2003a,b; Ofra y Rost 2003).

En los antecedentes se habló acerca de los “hot spots”, donde muchos de los autores han coincidido que están formados, preferentemente por Arg, Tyr y Trp, por que son los aminoácidos que casi siempre se encuentran en la superficie de las interfases de las proteínas oligoméricas, pero estos estudios nunca se hicieron estudiando a las proteínas por su función biológica, sino por su tipo de interfase o el tamaño del oligómero. (Hu *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003; Keskin *et al.*, 2005).

Análisis estructurales han encontrado que los hot spots se han encontrado en el centro de la interfase de las proteínas oligoméricas. (Li *et al.*, 2004).

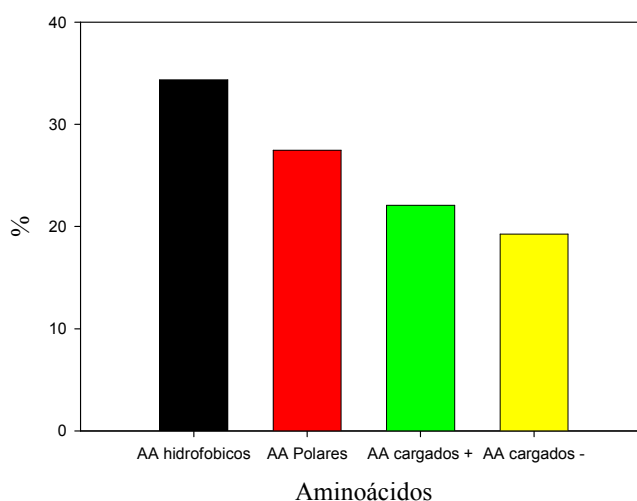


Figura 38. Porcentaje de aminoácidos clasificados según sus características electrostáticas presentes en la interfase de todas las proteínas analizadas en el actual estudio.

En la figura 38, se muestra el porcentaje de aminoácidos clasificados según sus características electrostáticas, se observa que el carácter electrofílico de la interfase es hidrofóbico, pero este es un resultado parcial ya que la suma de los aminoácidos cargados en la interfase es de más de 40% de los aminoácidos en la interfase.

Muchos estudios han mostrado que un área hidrófoba de contacto, prevalece, gracias a que los residuos cargados electrostáticos y los puentes de hidrógeno se encuentran distribuidos en la superficie del área de contacto (Xu *et al.*, 1997; Lo Conte *et al.*, 1999).

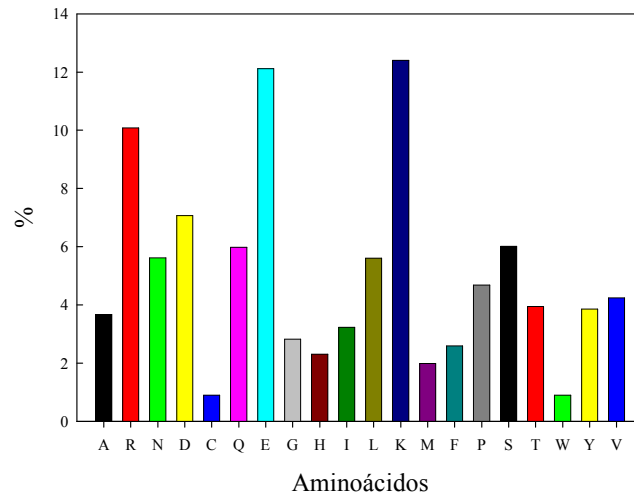


Figura 39. Porcentaje de aminoácidos presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las proteínas analizadas en el actual estudio.

En la Figura 39, observamos el estudio del porcentaje de los aminoácidos que se encuentran en la superficie de la proteína expuestos al disolvente, se muestra el Glu, Arg y Lys son los que se encuentran mayoritariamente expuestos.

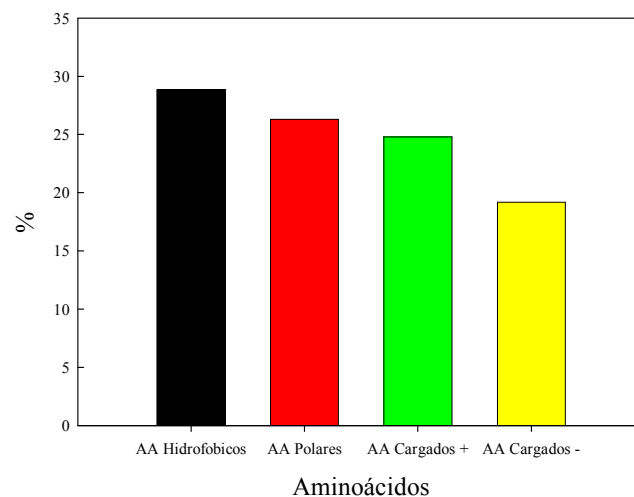


Figura 40. Porcentaje de aminoácidos, clasificados según sus características electrostáticas, presentes en la superficie expuesta al disolvente de todas las proteínas analizadas en el actual estudio.

Se compara en la Figura 40 el porcentaje de los aminoácidos en la superficie de la proteína expuestos al disolvente, clasificados según sus características electrostáticas, nuevamente logramos ver el carácter hidrofóbico en la superficie de la proteína, aunque se muestra un gran dominio de aminoácidos cargados.

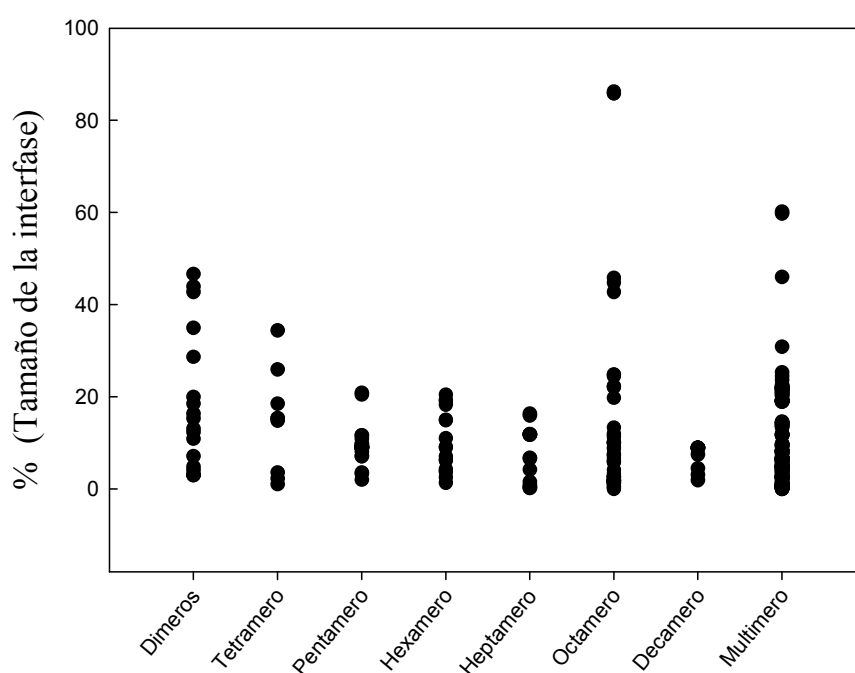


Figura 41. Porcentaje del tamaño de todas las interfases estudiadas por medio de Naccess, clasificadas dependiendo de su forma oligomérica.

En la Figura 41 se observamos el porcentaje de tamaño de todas las interfases estudiadas clasificadas según su forma oligomérica, calculadas como se explicó en la metodología por medio del programa Naccess (Hubbard, *et al* 1991), se observó que el caso de los hexámeros, heptámeros y decámeros un porcentaje de interfase alrededor del 0 al 20%. Con lo que respecta a las demás formas no muestran alguna tendencia, particular.

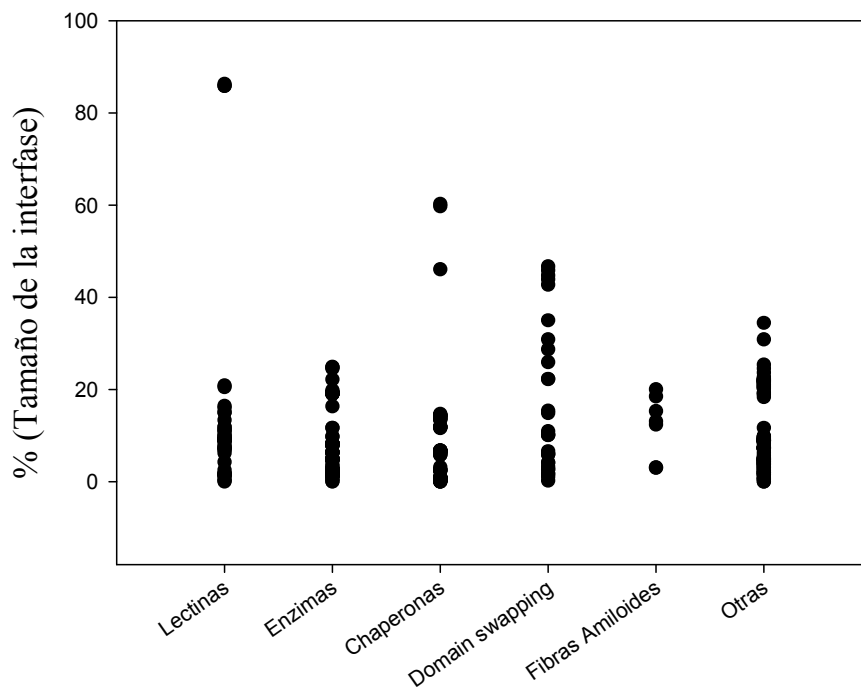


Figura 42. Porcentaje del tamaño de todas las interfases estudiadas clasificadas dependiendo de su función biológica.

En la Figura 42 observamos el porcentaje de tamaño de todas las interfases estudiadas clasificadas según su función biológica, calculadas como se explicó en la metodología por medio del programa Naccesss (Hubbard, *et al* 1991), al contrario que en la figura anterior observamos alguna una tendencia en el tamaño de la interfase dependiendo de su función biológica, en el caso de los lectinas, enzimas, chaperonas y fibras amiloides un porcentaje de interfase es alrededor del 0 al 20%. Con lo que respecta a las demás formas no muestran alguna tendencia. En el caso de domain swapping lo atribuimos a que esta clasificación está hecha en base al tipo de mecanismo de oligomerización que usa la proteína para asociarse no a la función biológica que lleve a cabo por medio del domain swapping.

8. CONCLUSIONES

El grupo de estudio estuvo conformado por 51 proteínas seleccionadas de la base de datos del Protein Data Bank, observándose que existe un bajo porcentaje de proteínas oligoméricas depositadas en dicha base de datos.

Se observó que a nivel de interfase entre los monómeros de las proteínas oligoméricas existe una mayor frecuencia de los residuos altamente cargados y los residuos polares. Mayoritariamente se destacan la Arg y el Glu. Conclusión que es avalada por varios estudios realizados.

No se detectó presencia de Gly a nivel de la superficie de interacción proteína-proteína. Esto se podría justificar por la débil contribución en la hidrofobicidad y a qué forma asociaciones del tipo puente de hidrógeno pero a nivel de estructura secundaria.

En fibras se corroboró lo expuesto por otros autores, los cuales identificaron la presencia de la Gln como aminoácido de mayor frecuencia en la interfase de contacto en fibras derivadas de los fenómenos de agregación que originan enfermedades neurodegenerativas.

Las superficies expuestas al disolvente de todas de las proteínas, muestran una alta frecuencia de residuos polares y cargados. Esto corrobora lo planteado para la conformación de las proteínas que dicta que los aminoácidos cargados o con cargas parciales se exponen al disolvente y los aminoácidos hidrofóbicos tratan de excluir el disolvente, internándose en el interior de las estructuras proteicas.

Se encontró cierta tendencia en el porcentaje del tamaño de la interfase clasificada dependiendo de su función biológica al contrario a lo observado en el porcentaje del tamaño de la interfase con respecto a la forma oligomérica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621-628.
- Ali, M.H., Peisach, E., Allen, K.N., Imperiali, B. 2004. X-ray structure analysis of a designed oligomeric miniprotein reveals a discrete quaternary architecture *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 101:12183-12188.
- Ali, M.H., Imperiali, B. 2005. Protein oligomerization: How and why. *Bioorg. Med. Chem.* 13 5013–5020.
- Argos, P. 1988. An investigation of protein subunit and domain interfaces. *Protein Eng.* 2:101-113.
- Bagautdinov, B., Tahirov, T.H. 2006. Crystal Structure of the Periplasmic divalent cation tolerance protein CutA from *Pyrococcus Horikoshii* Ot3 in the presence of CuCl₂ P
En imprenta.
- Bahadur, R.P., Chakrabarti, P., Rodier, F., Janin, J. 2004. A dissection of specific and non-specific protein–protein interfaces. *J. Mol. Biol.* 336: 943–955.
- Basak, A., Bateman, O., Slingsby, C., Pande, A., Asherie, N., Ogun, O., Benedek, G., Pande, J. 2003. High-Resolution X-Ray Crystal Structures of Human GammaD Crystallin (1.25Å) and the R58H Mutant (1.15Å) Associated with Aculeiform Cataract *J.Mol.Biol.* 328: 1137.
- Bennett, M.J., Choe, S., Eisenberg, D.S. 1994 Domain swapping: Entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3127–3131.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E: 2000 The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28:235-242.
- Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M. 1977. The ProteinData Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *Eur J Biochem.* 80,319–324.
- Bogan, A.A. and Thorn, K.S. 1998 Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* 280, 1–9.
- Brinda, K.V., Surolia, A., Vishveshwara, S. 2005. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. *J. Biochem.* 391, 1–15.
- Brownlow, S., Morais, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C., Sawyer, L. 1997. Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution—still an enigmatic lipocalin. *Structure.* 5, 481-495.

- Buts, L., Dao-Thi, M.H., Loris, R., Wyns, L., Etzler, M., Hamelryck, T. 2001. Weak protein-protein interactions in lectins: the crystal structure of a vegetative lectin from the legume *Dolichos biflorus*. *J.Mol.Biol.* 309, 193-201.
- Caffrey, D. R.; Somaroo, S.; Hughes, J. D.; Mintseris, J.; Huang, E. S. 2004. *Protein Sci.*, 13, 190–202.
- Carugo, O., Argos, P., 1997. Protein–protein crystal-packing contacts. *Protein Sci.* 6, 2261–2263.
- Chakrabarti, P., Janin, J., 2002. Dissecting protein–protein recognition sites. *Proteins.* 47, 334–343.
- Chirgadze, Y.N., Driessen, H.P.C., Wright, G., Slingsby, C., Hay, R.E., Lindley, P.F. 1996. Structure of the Bovine Eye Lens Gammad (Gamma-Iiib)-Crystallin at 1.95 Angstroms *Acta Crystallogr., Sect.D.* 52-712.
- Chiti F, Calamai M., Taddei N., Stefani M., Ramponi G., Dobson C.M: 2002. Studies of the aggregation of mutant proteins in vitro provide insights into the genetics of amyloid diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99,16419-16426.
- Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M: 2003. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature.* 424, 805-808.
- Chiti F., Taddei N., Baroni F., Capanni C., Stefani M., Ramponi G., Dobson C.M. 2002. Kinetic partitioning of protein folding and aggregation. *Nat Struct Biol.* 9,137-143.
- Chothia, C.; Gough, J.; Vogel, C.; Teichmann, S. A. 2003. Evolution of the protein repertoire. *Science.* 300, 1701–1703.
- Chothia, C. and Janin, J. 1975. Principles of protein-protein recognition. *Nature*, 256, 705-708.
- Clackson, T., Wells, J. A. 1995. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science.* 267, 383-386.
- Conway, A.B., Chen, Y., Rice, P.A. 2003. Structural Plasticity of the Flp-Holliday Junction Complex. *J.Mol.Biol.* 326, 425-434.
- Crestfield, A.M., Stein, W.H., Moore, S. 1962 On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease. *Arch. Biochem. Biophys.* 217–222.
- Crystallography & NMR 1998. System Acta Cryst. D54, 905-921.
- D'Alessio, G. 1999. The evolutionary transition from monomeric to oligomeric proteins: tools, the environment, hypotheses. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 72, 271-298.
- Dasgupta, S., Iyer, G.H., Bryant, S.H., Lawrence, C.E., Bell, J.A., 1997. Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers. *Proteins* 28, 494–514.

- Diederichs, K., Jacques, S., Boone, T., and Karplus, P.A. 1991. Low-resolution structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J. Mol. Biol.* 221, 55–60.
- Dobson CM. 2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 3-16.
- Dobson CM. 2003. Protein folding and disease: a view from the first Horizon Symposium. *Nat Rev Drug Discov.* 2, 154-160.
- Eder, M., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Wallimann, T., Schlattner, U. 2000. Crystal structure of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase. *Proteins.* 39, 216-225.
- Eifert C, Burgio M.R., Bennett P.M., Salerno J.C., Koretz J.F. 2005. N-terminal control of small heat shock protein oligomerization: changes in aggregate size and chaperone-like function. *Biochim Biophys Acta.* 15,146-56.
- Fantl, W., Johnson, D., Williams, L.1993. Signaling by receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem.* 62, 453-481.
- Ghosh, M., Meerts, I.A., Cook, A., Bergman, A., Brouwer, A., Johnson, L.N. 2000 Structure of human transthyretin complexed with bromophenols: a new mode of binding. *Acta Crystallogr., Sect.D* 56,1085-1095
- Glaser, F., Steinberg, D. M., Vakser, I.A., Ben-Tal, N. 2001. Residue frequencies and pairing preferences at protein-protein interfaces. *Proteins.* 43, 89-102.
- Goodsell, D.S., Olson, A.J., 1993. Soluble proteins: size, shape and function. *Trends in Biochemical Sciences* 18, 65-68.
- Goodsell, D. S. 1991. Inside a living cell. *Trends Biochem. Sci.* 16, 203–206.
- Goodsell,D.S. and Olson,A.J. 2000. Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 105-153.
- Graber, P., and Wells, T.N. 1993. A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 Å resolution of human interleukin-5. *Nature* 363, 172–176.
- Grishin, N. V., Phillips, M. A. 1994. The subunit interfaces of oligomeric enzymes are conserved to a similar extent to the overall protein sequences. *Protein Sci.* 3, 2455-2458.
- Halperin, I., Wolfson, H. and Nussinov, R. 2004. Protein-protein interactions; coupling of structurally conserved residues and of hot spots across interfaces. Implications for docking. *Structure*, 12, 1027-1038.
- Hakansson, M., Svensson, A., Fast, J., Linse, S. 2001. An extended hydrophobic core induces EF-hand swapping. *Protein Sci.* 10, 927-933.
- Hakulinen, N., Paavilainen, S., Korpela, T., Rouvinen, J. 2000. The crystal structure of beta-glucosidase from *Bacillus circulans* sp. *Alkalophilus*: ability to form long polymeric assemblies. *J.Struct.Biol.* 129, 69-79.

- Hamelryck, T.W., Dao-Thi, M.H., Poortmans, F., Chrispeels, M.J., Wyns, L., Loris, R. 1996. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J.Biol.Chem.* 271, 20479-20485.
- Hamelryck, T.W., Loris, R., Bouckaert, J., Dao-Thi, M.H., Strecker, G., Imberty, A., Fernandez, E., Wyns, L., Etzler, M.E. 1999. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. *J.Mol.Biol.* 286, 1161-1177.
- Hamelryck, T.W., Moore, J.G., Chrispeels, M.J., Loris, R., Wyns, L. 2000. The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. *J.Mol.Biol.* 299, 875-883.
- Hartmann, M., Schneider, T., Pfeil, A., Heinrich, G., Lipscomb, W., Braus, G. 2003. Evolution of Feedback-Inhibited Beta /Alpha Barrel Isoenzymes by Gene Duplication and a Single Mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 100, 862-865.
- Hepler, J., Gilman, A., 1992. G Proteins. *Trends Biochemical Sciences* 17, 383-387.
- Higuchi K., Yonezu T., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Takeda, T., 1986. The single proline-glutamine substitution at position 5 enhances the potency of amyloid formation of murine apo A-II. *FEBS.* 207, 23-27.
- Ho, J.G., Kitov, P.I., Paszkiewicz, E., Sadowska, J., Bundle, D.R., Ng, K.K. 2005 Ligand-assisted Aggregation of Proteins: Dimerization of serum amyloid p component by bivalent ligands. *J.Biol.Chem.* 280, 31999-32008.
- Horton, N., Lewis, M. 1992. Calculation of the free energy of association for protein complexes. *Protein Sci.* 1, 169-181.
- Hu Z., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. 2000. Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins* 39, 331-342.
- Hubbard, S. J. 1992. NACCESS: Program for calculating accessibilities. Department of Biochemistry and Molecular Biology. University College of London.
- Hubbard, S.J., Campbell, S.F., Thornton, J.M. 1991. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* 220, 507-530.
- Hunt, J.F., van der Vies, S.M., Henry, L., Deisenhofer, J. 1997. Structural adaptations in the specialized bacteriophage T4 co-chaperonin Gp31 expand the size of the Anfinsen cage. *Cell.* 90, 361-371.
- Janda, I., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Bielnicki, J., Cooper, D., Graf, P., Joachimiak, A., Jakob, U., Derewenda, Z. 2004. The Crystal Structure of the Reduced, Zn(2+)-Bound Form of the B. Subtilis Hsp33 Chaperone and its Implications for the Activation Mechanism. *Structure.* 12, 1901

- Janin, J., Miller, S., Chothia, C. 1988. Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *J. Mol. Biol.* 204, 155-64.
- Janowski, R., Kozak, M., Abrahamson, M., Grubb, A., Jaskolski, M. 2005. 3D domain-swapped human cystatin C with amyloidlike intermolecular beta-sheets. *Protein.* 61, 570-578.
- Janowski, R., Abrahamson, M., Grubb, A., Jaskólski, M. 2004. Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *J. Mol. Biol.* 341, 151-160.
- Jaskólski M. 2001. 3D Domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochimica Polonica.* 48, 807-827
- Jones, S. and Thornton, J. M. 1996. Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 93, 13-20.
- Jones, S. and Thornton, J. M. 1997. Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *J. Mol. Biol.* 272, 121-132.
- Jones, S. and Thornton, J. M. 1995. Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 63, 31-65.
- Keskin, O., Ma, B. and Nussinov, R. 2005. Hot regions in protein-protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hotspot residues. *J Mol Biol.* 345, 1281-1294.
- Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W.K., and Yee, V.C. 2001. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat. Struct. Biol.* 8, 770-774.
- Korn, A.P., Burnett, R.M., 1991. Distribution and complementarity of hydrophobicity in multisubunit proteins. *Proteins* 9, 37-55.
- Larsen, T., Olson, A.J., Goodsell, D.S., 1998. Morphology of protein-protein interfaces. *Structure* 6, 421-427.
- Lee, B. & Richards, F. M. 1971. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* 55, 379-400.
- Lee, K., 1992. Dimeric transcription factor families: it takes two to tango but who decides on partners and the venue? . *J. Cell Science* 103, 9-14.
- Levinthal C. 1968. Are there pathways for protein folding?. *J Chem Phys.* 85, 44-45.
- Li, X., Keskin, O., Ma, B., Nussinov, R. and Liang, J. 2004. Protein-protein interactions: hot spots and structurally conserved residues often locate in complemented pockets that pre-organized in the unbound states: implications for docking. *J Mol Biol,* 344, 781-795.
- Limacher, A., Kloer, D.P., Fluckiger, S., Folkers, G., Cramer, R., Scapozza, L. 2006. The Crystal Structure of *Aspergillus Fumigatus* Cyclophilin Reveals 3D Domain Swapping of a Central Element. *Structure.* 14, 185.

- Lijnzaad, P., Argos, P., 1997. Hydrophobic patches on protein subunit interfaces: characteristics and prediction. *Proteins* 28, 333-343.
- Lijnzaad, P., Berendsen, H.J.C., Argos, P., 1996a. Hydrophobic patches on the surface of proteins structures. *Proteins* 25, 389-397.
- Liu Y, Eisenberg D. 2002. 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci*, 11, 1285-1299.
- Liu Y, Gotte G, Libonati M, Eisenberg D: 2002. Structures of the two 3D domain-swapped RNase A trimers. *Protein Sci*. 11, 371-380.
- Liu, Y., Gotte, G., Libonati, M., Eisenberg, D. 2001. A domain-swapped rnaase A dimer with implications for amyloid formation. *Nat.Struct.Biol.* 8, 211-214.
- Liu, Y., Hart, P.J., Schlunegger, M.P., Eisenberg, D. 1998. The crystal structure of a 3D domain-swapped dimer of rnaase A at a 2.1-Å resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95, 3437-3442.
- Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. 1999. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* 285, 2177-2198.
- London, J., Skrzynia, C., and Goldberg, M.E. 1974. Renaturation of Escherichia coli tryptophanase after exposure to 8 M urea. Evidence for the existence of nucleation centers. *Eur. J. Biochem.* 47, 409-415.
- Long, M.; Betrán, E.; Thornton, K. Wang, W. 2003. The origin of new genes: Glimpses from the young and old.; *Nat. Rev.Genet.*, 4, 865-865
- Lopez de la Paz M, Serrano L: 2004. Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 87-92.
- Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H. and Nussinov, R. 2003. Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 5772-5777.
- Macedo, S., Romao, C.V., Mitchell, E., Matias, P.M., Liu, M.Y., Xavier, A.V., Legall, J., Teixeira, M., Lindley, P., Carrondo, M.A. 2003. The nature of the di-iron site in the bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nat.Struct.Biol.* 10, 285-290.
- Mattevi, A., Fraaije, M.W., Coda, A., van Berkel, W.J. 1997. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Proteins* 27, 601-603.
- Marianayagam, N., Sunde, M., and Matthews J. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences* 29, 618-625.
- Merlino, A., Vitagliano, L., Sica, F., Zagari, A., Mazzarella, L. 2004. Population shift vs induced fit: The case of bovine seminal ribonuclease swapping dimer *Biopolymers.* 73, 689-695.

- Milburn, M.V., Hassell, A.M., Lambert, M.H., Jordan, S.R., Proudfoot, A.E., Graber, P., Wells, T.N. 1993. A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 Å resolution of human interleukin-5. *Nature* 363, 172–176.
- Miller, S., Lesk, A.M., Janin, J., Chothia, C. 1987. The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. *Nature*. 328, 834-836.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. 1965. On the nature of the allosteric transitions: a plausible model. *J.Mol. Biol* 12, 88-118.
- Myers, D. P., Jackson, L. K., Ipe, V. G., Murphy, G. E., Phillips, M. A. 2001. Long-range interactions in the dimer interface of ornithine decarboxylase are important for enzyme function. *Biochemistry*. 40, 13230-13236.
- Nalini, V., Bax, B., Driessen, H., Moss, D.S., Lindley, P.F., Slingsby, C. 1994. Close packing of an oligomeric eye lens beta-crystallin induces loss of symmetry and ordering of sequence extensions. *J.Mol.Biol.* 236, 1250-1258.
- Nelson, R., Eisenberg, D. 2006. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Current Opinion in Structural Biology*. 16, 260-265.
- Norledge, B.V., Hay, R.E., Bateman, O.A., Slingsby, C., Driessen, H.P. 1997. Towards a molecular understanding of phase separation in the lens: a comparison of the X-ray structures of two high Tc gamma-crystallins, gammaE and gammaF, with two low Tc gamma-crystallins, gammaB and gammaD. *Exp.Eye Res.* 65, 609-630.
- Nooren, I.M.A., Thornton, J.M., 2003a. Diversity of protein–protein interactions. *J.EMBO*. 22, 3486–3492.
- Nooren, I.M.A., Thornton, J.M., 2003b. Structural characterization and functional significance of transient protein–protein interactions. *J. Mol. Biol.* 325, 991–1018.
- Ofran, Y., Rost, B., 2003. Analysing six types of protein–protein interfaces. *J. Mol. Biol.* 325, 377–387.
- Okada, K., Hirotsu, K., Sato, M., Hayashi, H., Kagamiyama, H. 1997. Three-dimensional structure of Escherichia coli branched-chain amino acid aminotransferase at 2.5 Å resolution. *J.Biochem.* 121, 637-641.
- Osterman, A., Grishin, N. V., Kinch, L. N., Phillips, M. A. 1994. Formation of functional cross-species heterodimers of ornithine decarboxylase. *Biochemistry*. 33, 13662-13667.
- Otzen, D.E., Kristensen, O., Oliveberg, M. 2000. Designed protein tetramer zipped together with a hydrophobic Alzheimer homology: a structural clue to amyloid assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 97, 9907-9912.

- Persson, K., Schneider, G., Jordan, D.B., Viitanen, P.V., Sandalova, T. 1999. Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly. *Protein Sci.* 8, 2355-2365.
- Privalov, P.L. 1979. Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33, 167-2044.
- PyMOL molecular graphics system on World Wide Web URL: <http://www.pymol.org>
- Qamra, R., Mande, S.C. 2004. Crystal Structure of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein, Chaperonin 60.2, of Mycobacterium tuberculosis. *J.Bacteriol.* 186, 8105-8113.
- Ranson, N.A., Farr, G.W., Roseman, A.M., Gowen, B., Fenton, W.A., Horwich, A.L., Saibil, H.R. 2001. ATP-bound states of groel captured by cryo-electron microscopy. *Cell* 107, 869-879.
- Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. 2006. Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds?. *Current Opinion in Structural Biology* 16, 118–126.
- Shachman, H.K., 1987. From allostery to mutagenesis: 20 years with aspartate transcarbamoylase. *Biochemical Society Transactions* 15, 772-775.
- Silow M., Oliveberg M. 1997. Transient aggregates in protein holding are easily mistaken for folding intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 6084-6086.
- Smith, G.D., Ciszak, E., Pangborn, W. 1997. A novel complex of a phenolic derivative with insulin: structural features related to the T-->R transition. *Protein Sci.* 5, 1502-1511.
- Tsai, C., Liang L.S., Wolfson, H.J., Nussinov, R., 1997a. Statistical analysis of hydrophobic at protein interfaces. *Protein Science* 6, 53-64.
- Tsai, C., Xu, D., Nussinov, R., 1997b. Structural motifs at protein=protein interfaces: protein cores versus two-state and three-state model complexes. *Protein Science* 6, 1793-1805.
- Thakur, A., Wetzel, R. 2002. Mutational analysis of the structural organization of polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 17014-17019.
- Valdar, W. S., Thornton, J. M. 2001. Protein-protein interfaces; analysis of amino acid conservation in homodimers. *Proteins.* 42, 108-124.
- Van Montfort, R.L.M., Bateman, O.A., Lubsen, N.H., Slingsby, C. 2003. Crystal Structure of Truncated Human Beta-B1-Crystallin. *Protein Sci.* 12, 2606.
- Vanacore, R.M., Shanmugasundararaj, S., Friedman, D.B., Bondar, O., Hudson, B.G., Sundaramoorthy, M. 2004. The alpha1.alpha2 network of collagen IV. Reinforced stabilization of the noncollagenous domain-1 by noncovalent forces and the absence of Met-Lys cross-links *J.Biol.Chem.* 279, 44723-44730.

- Villeret, V., Clantin, B., Tricot, C., Legrain, C., Roovers, M., Stalon, V., Glansdorff, N., Van Beeumen, J. 1998. The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 95, 2801-2806.
- Voet D and Voet J. 1992. *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona
- Walden, H.; Bell, G. S.; Russell, R. J. M.; Siebers, B.; Hensel, R.; Taylor, G. L. 2001. Tiny Tim: a small, tetramérica, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 306, 745–757.
- Walker, J.R., Nagar, B., Young, N.M., Hiramata, T., Rini, J.M. 2004. X-ray Crystal Structure of a Galactose-Specific C-Type Lectin Possessing a Novel Decameric Quaternary Structure. *Biochemistry*. 43, 3783-3792.
- Wodak, S.J., Janin, J., 2002. Structural basis of macromolecular recognition. *Adv. Prot. Chem.* 61, 9–73.
- Wilce, M.C., Bond, C.S., Dixon, N.E., Freeman, H.C., Guss, J.M., Lilley, P.E., Wilce, J.A. 1998. Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 3472-3477.
- Xu, D., Tsai, C. J. and Nussinov, R. 1997. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Eng.* 10, 999-1012.
- Xu, Z., Horwich, A.L., Sigler, P.B. 1997. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* .388, 741-750.
- Yang, Z., Lanks, C.W., Tong, L. 2002. Molecular mechanism for the regulation of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme by ATP and fumarate. *Structure*. 10, 951-960.
- Yee, V.C. 2001. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat. Struct. Biol.* 8, 770–774.
- Young, L., Jernigan, R.L. y Covell, D.G. 1994. A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. *Protein Science*. 3, 717-729.
- Zuccola, H.J., Rozzelle, J.E., Lemon, S.M., Erickson, B.W., Hogle, J.M. 1998. Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen. *Structure*. 6, 821-830.

Apéndice

Apéndice A

Salidas del archivo “Contact” del programa Crystallography & NMR System (CNS).

- A.1 Salida del programa “Contact” para Lectina con código PDB 1QMO
- A.2 Salida del programa “Contact” para Enzima con código PDB 8TIM
- A.3 Salida del programa “Contact” para Chaperona con código PDB 1AON
- A.4 Salida del programa “Contact” para Domain Swapping con código PDB 1A2W
- A.5 Salida del programa “Contact” para Fibras Amiloides con código PDB 1H4A
- A.6 Salida del programa “Contact” para Otras con código PDB1BEB

Apéndice B

Salidas del programa NACCESS.

- B.1 Salida del programa “Naccess” para Lectina con código PDB 1QMO
- B.2 Salida del programa “Naccess” para Enzima con código PDB 8TIM
- B.3 Salida del programa “Naccess” para Domain Swapping con código PDB 1A2W
- B.4 Salida del programa “Naccess” para Fibras Amiloides con código PDB 1H4A
- B.5 Salida del programa “Naccess” para Fibras Amiloides con código PDB1BEB

Apéndice C

Parte de la salida del programa “Generate” del programa Crystallography & NMR System (CNS)

- C.1 Parte de la salida del programa “Generate” para Lectina con código PDB 1QMO


```
>>> Contact analysis between specified sets of atoms
```

```
=====
>>> set1= ( segid A )
>>> set2= ( segid B )
>>> definition of contact atoms: ( not ( name c or name n or name ca or
name o ) )
>>> maximum distance cutoff between contact atoms: 3.6
=====
```

List of contacting residue pairs between set1 and set2. The atoms that form the closest contact between the particular pair of residues and the corresponding distance are listed.

atom in set 1	atom in set 2	distance (A)
[GLN 2 OE1]	[PHE 8 CE1]	3.23157
[GLN 2 NE2]	[GLN 15 NE2]	3.41425
[GLN 2 OE1]	[ASP 17 OD2]	2.21263
[PHE 8 CE1]	[GLN 2 OE1]	3.25979
[LYS 10 CD]	[ALA 1 CB]	3.09861
[LYS 10 NZ]	[GLU 60 OE2]	2.60795
[ASP 12 OD1]	[GLU 60 OE1]	3.19107
[GLN 15 NE2]	[GLN 2 NE2]	3.34325
[ASP 17 OD2]	[GLN 2 OE1]	2.10262
[GLU 60 OE1]	[ASP 12 OD1]	3.17797

```
>>> Contact analysis between specified sets of atoms
```

```
=====
>>> set1= ( segid A )
>>> set2= ( segid B )
>>> definition of contact atoms: ( not ( name c or name n or name ca or
name o ) )
>>> maximum distance cutoff between contact atoms: 3.6
=====
```

List of contacting residue pairs between set1 and set2. The atoms that form the closest contact between the particular pair of residues and the corresponding distance are listed.

atom in set 1	atom in set 2	distance (A)
[ASN 11 ND2]	[THR 75 OG1]	3.19963
[LYS 13 CG]	[THR 75 OG1]	2.89364
[MET 14 CE]	[VAL 69 CG1]	3.45192
[MET 14 SD]	[GLU 77 CB]	3.4673
[ASN 15 OD1]	[LYS 71 CB]	3.46601
[ASP 17 CB]	[ASP 85 OD1]	3.10114
[LYS 18 NZ]	[ASP 49 OD1]	2.45428
[LYS 18 CB]	[ASP 85 OD2]	3.49087
[SER 45 OG]	[SER 45 OG]	2.66938
[SER 45 OG]	[ILE 78 CD]	3.12308
[ILE 46 CG2]	[LEU 48 CD2]	3.48601
[ILE 46 CG1]	[ILE 78 CG1]	3.53786

```

[ TYR  47  OH  ] [ ASP  85  OD2 ] 2.89377
[ ASP  49  OD2 ] [ LYS  18  NZ  ] 2.94655
[ TYR  67  CE1 ] [ PHE 102  CZ  ] 3.46853
[ VAL  69  CG1 ] [ MET  14  CE  ] 3.53587
[ ALA  73  CB  ] [ GLU  97  OE2 ] 3.58564
[ THR  75  OG1 ] [ ASN  11  ND2 ] 3.18588
[ THR  75  OG1 ] [ GLU  97  OE1 ] 2.53081
[ GLU  77  OE2 ] [ ARG  98  NH1 ] 2.82031
[ GLU  77  CG  ] [ PHE 102  CZ  ] 3.54359
[ ILE  78  CG2 ] [ SER  45  OG  ] 3.51097
[ ILE  78  CG2 ] [ ILE  46  CG1 ] 3.18152
[ ASP  85  OD2 ] [ TYR  47  OH  ] 2.86216
[ HIS  95  ND1 ] [ THR  75  CB  ] 3.57335
[ GLU  97  OE2 ] [ ALA  73  CB  ] 3.54923
[ GLU  97  OE1 ] [ THR  75  OG1 ] 2.62834
[ ARG  98  NH1 ] [ GLU  77  OE1 ] 2.61282
[ PHE 102  CZ  ] [ TYR  67  CE1 ] 3.53185

```

A.3

>>> Contact analysis between specified sets of atoms

```

=====
>>> set1= ( segid A )
>>> set2= ( segid B )
>>> definition of contact atoms: ( not ( name c or name n or name ca or
name o ) )
>>> maximum distance cutoff between contact atoms: 3.6
=====

```

List of contacting residue pairs between set1 and set2. The atoms that form the closest contact between the particular pair of residues and the corresponding distance are listed.

atom in set 1	atom in set 2	distance (A)
[MET 69 CE]	[VAL 39 CG1]	3.37494
[MET 69 CG]	[ASP 41 OD1]	3.30619
[GLU 76 OE2]	[GLU 386 CB]	3.56839
[GLU 76 OE1]	[VAL 387 CG1]	3.11414
[PRO 113 CD]	[ARG 36 NH2]	3.08157
[ILE 305 CD1]	[TYR 203 OH]	3.2051
[ILE 305 CG2]	[VAL 263 CG1]	3.54905
[GLN 351 CG]	[THR 210 OG1]	2.93388
[SER 509 OG]	[THR 385 CG2]	2.949
[SER 509 OG]	[GLU 388 OE2]	3.15078
[THR 516 OG1]	[ASN 37 ND2]	3.03323
[GLU 518 OE1]	[ARG 36 NH1]	2.92645
[THR 522 OG1]	[ASP 41 OD2]	3.37759

```
>>> Contact analysis between specified sets of atoms
```

```
=====
>>> set1= ( segid A )
>>> set2= ( segid B )
>>> definition of contact atoms: ( not ( name c or name n or name ca or
name o ) )
>>> maximum distance cutoff between contact atoms: 3.6
=====
```

List of contacting residue pairs between set1 and set2. The atoms that form the closest contact between the particular pair of residues and the corresponding distance are listed.

atom in set 1	atom in set 2	distance (A)
[ALA 4 CB]	[VAL 118 CG2]	3.31052
[GLU 9 OE1]	[LEU 51 CD2]	3.56963
[HIS 12 NE2]	[ASN 44 OD1]	3.12634
[HIS 12 NE2]	[PHE 120 CB]	3.52022
[MET 13 CE]	[VAL 54 CG2]	3.57899
[ASP 14 OD2]	[TYR 25 OH]	2.73756
[ASP 14 OD2]	[HIS 48 CE1]	3.21963
[ALA 19 CB]	[GLN 101 OE1]	3.47476
[SER 21 OG]	[GLN 101 NE2]	2.63384
[TYR 25 OH]	[ASP 14 OD2]	2.92664
[LEU 35 CD2]	[GLN 11 CB]	3.44502
[ASN 44 OD1]	[HIS 12 CE1]	2.95995
[LYS 98 NZ]	[THR 100 CG2]	3.46304
[GLN 101 NE2]	[SER 22 OG]	2.81501
[GLN 101 NE2]	[SER 23 OG]	3.26799
[PHE 120 CB]	[HIS 12 CE1]	3.58531
[VAL 124 OXT]	[SER 89 OG]	2.91257

```
>>> Contact analysis between specified sets of atoms
```

```
=====
>>> set1= ( segid A )
>>> set2= ( segid B )
>>> definition of contact atoms: ( not ( name c or name n or name ca or
name o ) )
>>> maximum distance cutoff between contact atoms: 3.6
=====
```

List of contacting residue pairs between set1 and set2. The atoms that form the closest contact between the particular pair of residues and the corresponding distance are listed.

atom in set 1			atom in set 2			distance (A)
[VAL	130	CG2]	[GLU	172	OE2]	3.2286
[ARG	142	CD]	[ARG	142	CD]	3.16019
[GLN	143	NE2]	[LEU	145	CB]	3.31006
[LEU	145	CB]	[GLN	143	NE2]	3.54738
[ASP	147	OD1]	[ARG	168	NH2]	2.80985
[ARG	168	NH2]	[LEU	145	CD2]	3.5185
[ARG	168	NH2]	[ASP	147	OD1]	2.74794
[ILE	170	CD]	[LEU	145	CD2]	3.55262
[GLU	172	CB]	[GLU	172	OE1]	2.84666

A.6

>>> Contact analysis between specified sets of atoms

```

=====
>>> set1= ( segid A )
>>> set2= ( segid B )
>>> definition of contact atoms: ( not ( name c or name n or name ca or
name o ) )
>>> maximum distance cutoff between contact atoms: 3.6
=====

```

List of contacting residue pairs between set1 and set2. The atoms that form the closest contact between the particular pair of residues and the corresponding distance are listed.

atom in set 1			atom in set 2			distance (A)
[ASP	33	OD2]	[ARG	40	NH2]	2.88844
[ARG	40	NH2]	[ASP	33	OD2]	2.86837
[HIS	146	CD2]	[SER	150	OG]	3.15976
[ILE	147	CD]	[LEU	149	CD2]	3.08237
[LEU	149	CD2]	[ILE	147	CD]	3.40247
[SER	150	OG]	[HIS	146	CD2]	3.29499

B.1

```

REM Relative accessibilities read from external file
"/usr/local/naccess/naccess2.1.1/standard.data"
REM File of summed (Sum) and % (per.) accessibilities for
REM RES _ NUM      All-atoms   Total-Side   Main-Chain   Non-polar
All polar
REM              ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL
ABS    REL
RES ALA A   1    78.54  72.8  39.34  56.7  39.20 101.7  39.49  55.3
39.05 106.7
RES GLN A   2    54.20  30.4  21.18  15.0  33.02  88.0  14.94  28.6
39.26  31.1
RES SER A   3    58.02  49.8  57.34  73.4   0.69   1.8  34.21  70.5
23.81  35.0
RES LEU A   4    42.62  23.9  10.72   7.6  31.90  85.0  10.74   7.6
31.88  87.8

```


RES ASP A	61	144.43	102.9	119.96	116.8	24.46	64.9	50.80	103.2
		93.63	102.7						
RES SER A	62	107.94	92.7	85.39	109.3	22.55	58.7	50.59	104.2
		57.35	84.4						
RES ALA A	63	27.28	25.3	26.55	38.2	0.73	1.9	26.55	37.2
		0.73	2.0						
RES VAL A	64	135.36	89.4	112.86	98.8	22.50	60.6	117.28	101.6
		18.08	50.3						
RES LEU A	65	161.39	90.4	139.11	98.6	22.29	59.4	139.37	97.9
		22.02	60.6						
RES THR A	66	65.31	46.9	44.88	44.1	20.42	54.4	35.20	46.5
		30.11	47.4						
RES SER A	67	95.34	81.8	64.33	82.4	31.01	80.8	37.34	76.9
		58.00	85.4						
RES PHE A	68	114.27	57.3	95.70	58.3	18.58	52.5	95.70	57.9
		18.58	54.3						
RES ASP A	69	139.26	99.2	106.17	103.4	33.08	87.8	49.24	100.0
		90.02	98.8						
RES THR A	70	71.16	51.1	48.75	47.9	22.41	59.7	31.73	41.9
		39.43	62.1						
RES ILE A	71	152.78	87.2	136.66	99.1	16.12	43.4	136.66	98.2
		16.12	44.8						
RES ILE A	72	87.90	50.2	67.92	49.2	19.98	53.8	67.92	48.8
		19.98	55.5						
RES ASN A	73	137.72	95.7	108.41	102.0	29.31	77.7	43.73	94.6
		94.00	96.2						
RES PHE A	74	125.52	62.9	98.75	60.2	26.76	75.7	101.08	61.2
		24.44	71.4						
RES GLU A	75	149.95	87.1	122.53	90.9	27.41	73.1	50.70	84.1
		99.25	88.6						
RES ILE A	76	112.48	64.2	81.14	58.8	31.34	84.3	81.24	58.4
		31.25	86.8						
RES SER A	77	80.12	68.8	58.56	75.0	21.56	56.2	37.07	76.4
		43.05	63.4						
RES THR A	78	52.55	37.7	29.98	29.5	22.57	60.1	25.95	34.3
		26.59	41.8						
RES PRO A	79	83.67	61.5	55.20	46.0	28.47	175.4	56.25	46.5
		27.42	180.5						
RES TYR A	80	115.80	54.4	107.94	60.9	7.86	22.2	87.15	63.8
		28.66	37.6						
RES THR A	81	144.11	103.5	114.01	112.1	30.10	80.1	84.16	111.1
		59.95	94.3						
RES SER A	82	80.13	68.8	68.15	87.3	11.98	31.2	56.79	117.0
		23.34	34.4						
RES ARG A	83	98.41	41.2	74.70	37.1	23.71	63.2	75.01	96.4
		23.40	14.5						
RES ILE A	84	111.08	63.4	92.67	67.2	18.41	49.5	92.78	66.7
		18.30	50.9						
RES ALA A	85	89.94	83.3	44.91	64.7	45.03	116.8	50.85	71.2
		39.09	106.9						
RES ASP A	86	91.51	65.2	44.30	43.1	47.21	125.2	14.05	28.5
		77.47	85.0						
RES GLY A	87	44.70	55.8	13.02	40.3	31.67	66.3	15.05	40.1
		29.65	69.7						
RES LEU A	88	77.55	43.4	48.35	34.3	29.20	77.8	48.45	34.0
		29.10	80.1						

RES LEU B	4	42.21	23.6	10.77	7.6	31.45	83.8	10.83	7.6
31.38		86.4							
RES SER B	5	60.59	52.0	60.53	77.5	0.06	0.2	31.70	65.3
28.89		42.5							
RES PHE B	6	89.14	44.7	64.02	39.0	25.12	71.0	64.73	39.2
24.40		71.3							
RES SER B	7	46.62	40.0	46.05	58.9	0.58	1.5	27.57	56.8
19.06		28.0							
RES PHE B	8	43.28	21.7	16.55	10.1	26.73	75.6	16.69	10.1
26.59		77.7							
RES THR B	9	101.13	72.6	68.64	67.5	32.49	86.5	65.26	86.2
35.87		56.4							
RES LYS B	10	26.90	13.4	24.86	15.2	2.03	5.4	24.86	21.3
2.03		2.4							
RES PHE B	11	39.87	20.0	39.67	24.2	0.20	0.6	39.76	24.1
0.11		0.3							
RES ASP B	12	11.25	8.0	11.24	10.9	0.01	0.0	1.77	3.6
9.48		10.4							
RES PRO B	13	112.35	82.5	89.60	74.7	22.75	140.2	91.14	75.4
21.21		139.6							
RES ASN B	14	97.23	67.6	96.01	90.4	1.23	3.3	34.69	75.0
62.54		64.0							
RES GLN B	15	11.93	6.7	3.15	2.2	8.77	23.4	2.67	5.1
9.26		7.3							
RES GLU B	16	113.72	66.0	98.63	73.2	15.09	40.2	49.29	81.7
64.43		57.5							
RES ASP B	17	8.60	6.1	8.18	8.0	0.42	1.1	5.81	11.8
2.78		3.1							
RES LEU B	18	19.16	10.7	7.07	5.0	12.09	32.2	7.07	5.0
12.09		33.3							
RES ILE B	19	77.83	44.4	77.83	56.4	0.00	0.0	77.83	55.9
0.00		0.0							
RES PHE B	20	75.20	37.7	47.65	29.0	27.55	77.9	48.57	29.4
26.63		77.8							
RES GLN B	21	24.50	13.7	24.50	17.4	0.00	0.0	15.63	29.9
8.87		7.0							
RES GLY B	22	50.34	62.8	14.21	43.9	36.13	75.6	17.76	47.3
32.58		76.6							
RES HIS B	23	92.37	50.5	89.86	61.1	2.51	7.0	60.01	61.8
32.36		37.7							
RES ALA B	24	3.41	3.2	0.00	0.0	3.41	8.9	0.00	0.0
3.41		9.3							
RES THR B	25	66.68	47.9	66.68	65.6	0.00	0.0	55.64	73.5
11.03		17.4							
RES SER B	26	11.49	9.9	0.85	1.1	10.64	27.7	0.18	0.4
11.32		16.7							
RES THR B	27	72.95	52.4	72.95	71.7	0.00	0.0	58.48	77.2
14.48		22.8							
RES ASN B	28	132.74	92.2	115.56	108.8	17.18	45.6	35.22	76.2
97.52		99.8							
RES ASN B	29	95.38	66.3	88.14	83.0	7.24	19.2	12.81	27.7
82.56		84.5							
RES VAL B	30	72.32	47.8	72.32	63.3	0.00	0.0	72.32	62.6
0.00		0.0							
RES LEU B	31	47.45	26.6	29.24	20.7	18.21	48.6	29.24	20.5
18.21		50.1							

RES GLN B	32	58.05	32.5	58.03	41.2	0.01	0.0	5.63	10.8
		52.42	41.5						
RES VAL B	33	47.47	31.3	46.93	41.1	0.55	1.5	46.93	40.6
		0.55	1.5						
RES THR B	34	52.62	37.8	51.06	50.2	1.57	4.2	29.14	38.5
		23.48	37.0						
RES LYS B	35	22.33	11.1	22.33	13.7	0.00	0.0	22.33	19.2
		0.00	0.0						
RES LEU B	36	78.41	43.9	47.12	33.4	31.29	83.4	47.12	33.1
		31.29	86.1						
RES ASP B	37	55.92	39.8	52.93	51.5	2.99	7.9	12.10	24.6
		43.82	48.1						
RES SER B	38	128.24	110.1	90.96	116.4	37.29	97.1	61.85	127.4
		66.39	97.7						
RES ALA B	39	80.86	74.9	48.30	69.6	32.56	84.5	52.27	73.2
		28.59	78.2						
RES GLY B	40	49.84	62.2	24.17	74.8	25.67	53.7	24.43	65.1
		25.41	59.7						
RES ASN B	41	39.37	27.4	39.37	37.1	0.00	0.0	0.42	0.9
		38.95	39.9						
RES PRO B	42	45.34	33.3	37.11	30.9	8.23	50.7	37.60	31.1
		7.73	50.9						
RES VAL B	43	78.32	51.7	62.19	54.4	16.13	43.4	64.45	55.8
		13.87	38.6						
RES SER B	44	91.70	78.7	81.26	104.0	10.43	27.2	44.50	91.7
		47.20	69.5						
RES SER B	45	82.69	71.0	58.42	74.8	24.26	63.2	26.98	55.6
		55.71	82.0						
RES SER B	46	22.40	19.2	2.34	3.0	20.06	52.2	2.34	4.8
		20.06	29.5						
RES ALA B	47	14.35	13.3	13.91	20.0	0.44	1.1	13.91	19.5
		0.44	1.2						
RES GLY B	48	20.62	25.7	0.00	0.0	20.62	43.2	0.00	0.0
		20.62	48.5						
RES ARG B	49	11.86	5.0	11.86	5.9	0.00	0.0	8.02	10.3
		3.84	2.4						
RES VAL B	50	29.41	19.4	10.94	9.6	18.47	49.7	11.25	9.7
		18.16	50.5						
RES LEU B	51	33.25	18.6	33.25	23.6	0.00	0.0	33.25	23.4
		0.00	0.0						
RES TYR B	52	34.97	16.4	17.19	9.7	17.78	50.3	15.24	11.2
		19.73	25.9						
RES SER B	53	29.54	25.4	12.09	15.5	17.45	45.5	10.30	21.2
		19.23	28.3						
RES ALA B	54	7.71	7.1	0.00	0.0	7.71	20.0	0.23	0.3
		7.48	20.4						
RES PRO B	55	35.65	26.2	34.32	28.6	1.32	8.2	34.32	28.4
		1.32	8.7						
RES LEU B	56	107.90	60.4	78.81	55.8	29.09	77.6	81.22	57.1
		26.68	73.5						
RES ARG B	57	91.89	38.5	76.09	37.8	15.79	42.1	35.67	45.8
		56.22	34.9						
RES LEU B	58	73.32	41.0	67.29	47.7	6.03	16.1	69.29	48.7
		4.03	11.1						
RES TRP B	59	143.91	57.7	129.78	61.4	14.13	37.1	113.20	59.7
		30.71	51.4						

RES LEU B 88	77.36	43.3	48.17	34.1	29.18	77.8	48.34	34.0
29.01 79.9								
RES ALA B 89	43.52	40.3	20.12	29.0	23.40	60.7	22.32	31.3
21.20 58.0								
RES PHE B 90	109.65	55.0	83.41	50.8	26.24	74.2	83.41	50.5
26.24 76.7								
RES PHE B 91	41.11	20.6	29.91	18.2	11.20	31.7	29.91	18.1
11.20 32.7								
RES ILE B 92	108.73	62.1	85.25	61.8	23.48	63.2	85.25	61.3
23.48 65.3								
RES ALA B 93	42.89	39.7	19.44	28.0	23.45	60.8	22.73	31.8
20.16 55.1								
RES PRO B 94	94.29	69.3	92.41	77.1	1.88	11.6	92.41	76.4
1.88 12.4								
RES PRO B 95	96.34	70.8	80.67	67.3	15.67	96.5	81.99	67.8
14.36 94.5								
RES ASP B 96	117.72	83.9	108.45	105.6	9.27	24.6	56.11	113.9
61.62 67.6								
RES SER B 97	25.06	21.5	22.61	28.9	2.45	6.4	13.64	28.1
11.42 16.8								
RES VAL B 98	113.15	74.7	101.72	89.0	11.43	30.8	101.72	88.1
11.43 31.8								
RES ILE B 99	53.89	30.8	37.06	26.9	16.83	45.3	37.06	26.6
16.83 46.8								
RES SER B 100	27.73	23.8	18.04	23.1	9.69	25.2	17.79	36.6
9.94 14.6								
RES TYR B 101	137.86	64.8	137.83	77.7	0.03	0.1	94.29	69.1
43.57 57.1								
RES HIS B 102	77.39	42.3	72.62	49.4	4.77	13.3	47.57	49.0
29.82 34.8								
RES GLY B 103	32.78	40.9	26.43	81.7	6.35	13.3	26.43	70.4
6.35 14.9								
RES GLY B 104	59.99	74.9	23.87	73.8	36.11	75.6	24.53	65.3
35.46 83.3								
RES PHE B 105	63.32	31.7	62.81	38.3	0.51	1.4	62.95	38.1
0.38 1.1								
RES LEU B 106	65.86	36.9	54.09	38.3	11.77	31.4	58.71	41.3
7.15 19.7								
RES GLY B 107	2.57	3.2	1.37	4.2	1.20	2.5	1.37	3.6
1.20 2.8								
RES LEU B 108	42.45	23.8	21.12	15.0	21.33	56.9	21.12	14.8
21.33 58.7								
RES PHE B 109	123.54	61.9	123.54	75.3	0.00	0.0	123.54	74.8
0.00 0.0								
RES PRO B 110	77.79	57.1	68.03	56.7	9.76	60.1	69.03	57.1
8.76 57.7								
RES ASN B 111	77.30	53.7	75.54	71.1	1.76	4.7	34.80	75.3
42.50 43.5								
RES ALA B 112	89.20	82.6	60.16	86.7	29.04	75.4	63.52	89.0
25.68 70.2								
RES ASN B 113	181.86	126.3	110.26	103.8	71.60	189.9	66.83	144.6
115.03 117.7								
END Absolute sums over single chains surface								
CHAIN 1 A	8256.6	6467.6		1789.0		5065.9		3190.7
CHAIN 2 B	8231.0	6441.7		1789.3		5044.9		3186.1
END Absolute sums over all chains								
TOTAL	16487.6	12909.3		3578.3		10110.8		6376.8

B.2

```

REM Relative accessibilites read from external file
"/usr/local/naccess/naccess2.1.1/standard.data"
REM File of summed (Sum) and % (per.) accessibilities for
REM RES _ NUM      All-atoms    Total-Side    Main-Chain    Non-polar
All polar
REM              ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL
ABS    REL
RES ALA A  2      93.17  86.3  69.23  99.7  23.94  62.1  73.77 103.4
19.39  53.0
RES PRO A  3     146.20 107.4 116.82  97.4  29.37 181.0 125.33 103.6
20.87 137.4
RES ARG A  4      74.75  31.3  47.68  23.7  27.07  72.2  11.96  15.4
62.79  39.0
RES LYS A  5      81.20  40.4  79.49  48.7   1.72   4.6  52.82  45.3
28.38  33.7
RES PHE A  6      20.60  10.3  18.86  11.5   1.73   4.9  18.86  11.4
1.73   5.1
RES PHE A  7       0.49   0.2   0.49   0.3   0.00   0.0   0.49   0.3
0.00   0.0
RES VAL A  8       0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0
0.00   0.0
RES GLY A  9       4.17   5.2   4.15  12.8   0.03   0.1   4.17  11.1
0.00   0.0
RES GLY A 10       1.58   2.0   0.00   0.0   1.58   3.3   0.65   1.7
0.93   2.2
RES ASN A 11       2.17   1.5   1.75   1.6   0.42   1.1   1.63   3.5
0.55   0.6
RES TRP A 12       3.59   1.4   3.05   1.4   0.54   1.4   3.40   1.8
0.18   0.3
RES LYS A 13      33.41  16.6  33.41  20.5   0.00   0.0   8.36   7.2
25.05  29.7
RES MET A 14       0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0
0.00   0.0
RES ASN A 15      32.56  22.6  32.56  30.6   0.00   0.0   7.27  15.7
25.28  25.9
RES GLY A 16      31.79  39.7  11.33  35.0  20.46  42.8  13.41  35.7
18.38  43.2
RES ASP A 17      48.47  34.5  48.47  47.2   0.00   0.0  12.03  24.4
36.44  40.0
RES LYS A 18      62.52  31.1  56.05  34.3   6.47  17.3  41.78  35.8
20.74  24.6
RES LYS A 19     161.38  80.4 155.84  95.4   5.54  14.8 106.89  91.7
54.50  64.7
RES SER A 20      46.34  39.8  36.88  47.2   9.46  24.6  37.66  77.6
8.68  12.8
RES LEU A 21       2.08   1.2   2.08   1.5   0.00   0.0   2.08   1.5
0.00   0.0
RES GLY A 22      19.74  24.6  13.13  40.6   6.61  13.8  17.25  45.9
2.48   5.8
RES GLU A 23     101.40  58.9  99.03  73.5   2.37   6.3  50.97  84.5
50.42  45.0

```


RES ARG A	52	47.56	19.9	42.63	21.2	4.93	13.1	22.01	28.3
		25.55	15.9						
RES GLN A	53	116.84	65.5	91.01	64.6	25.83	68.9	42.40	81.2
		74.44	58.9						
RES LYS A	54	109.41	54.5	100.05	61.3	9.36	25.0	53.78	46.1
		55.63	66.0						
RES LEU A	55	9.46	5.3	1.06	0.8	8.40	22.4	1.51	1.1
		7.95	21.9						
RES ASP A	56	58.96	42.0	58.96	57.4	0.00	0.0	15.23	30.9
		43.72	48.0						
RES ALA A	57	103.82	96.2	74.48	107.3	29.35	76.1	75.89	106.3
		27.93	76.4						
RES LYS A	58	107.28	53.4	79.42	48.6	27.87	74.3	73.61	63.1
		33.67	40.0						
RES ILE A	59	1.48	0.8	1.48	1.1	0.01	0.0	1.48	1.1
		0.00	0.0						
RES GLY A	60	18.42	23.0	15.87	49.1	2.54	5.3	15.87	42.3
		2.54	6.0						
RES VAL A	61	0.01	0.0	0.01	0.0	0.00	0.0	0.01	0.0
		0.00	0.0						
RES ALA A	62	3.11	2.9	3.11	4.5	0.00	0.0	3.11	4.4
		0.00	0.0						
RES ALA A	63	1.32	1.2	1.32	1.9	0.00	0.0	1.32	1.8
		0.00	0.0						
RES GLN A	64	5.99	3.4	1.88	1.3	4.11	11.0	1.91	3.7
		4.08	3.2						
RES ASN A	65	18.20	12.6	13.29	12.5	4.91	13.0	3.58	7.7
		14.62	15.0						
RES CYS A	66	1.80	1.3	1.80	1.9	0.00	0.0	1.80	1.8
		0.00	0.0						
RES TYR A	67	13.92	6.5	13.92	7.8	0.00	0.0	2.93	2.1
		10.99	14.4						
RES LYS A	68	62.73	31.2	52.68	32.3	10.05	26.8	24.33	20.9
		38.40	45.6						
RES VAL A	69	47.20	31.2	47.20	41.3	0.00	0.0	47.20	40.9
		0.00	0.0						
RES PRO A	70	64.30	47.2	58.54	48.8	5.76	35.5	59.18	48.9
		5.12	33.7						
RES LYS A	71	148.62	74.0	137.06	83.9	11.56	30.8	93.53	80.2
		55.09	65.4						
RES GLY A	72	13.46	16.8	13.46	41.6	0.00	0.0	13.46	35.8
		0.00	0.0						
RES ALA A	73	53.74	49.8	45.22	65.1	8.52	22.1	45.22	63.3
		8.52	23.3						
RES PHE A	74	37.30	18.7	37.30	22.7	0.00	0.0	37.30	22.6
		0.00	0.0						
RES THR A	75	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES GLY A	76	24.01	30.0	3.40	10.5	20.61	43.1	4.39	11.7
		19.62	46.1						
RES GLU A	77	18.29	10.6	18.26	13.6	0.03	0.1	2.95	4.9
		15.34	13.7						
RES ILE A	78	15.51	8.9	12.40	9.0	3.11	8.4	12.40	8.9
		3.11	8.7						
RES SER A	79	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						

RES ALA B	2	141.96	131.5	74.69	107.6	67.27	174.6	78.94	110.6
		63.02	172.3						
RES PRO B	3	121.10	89.0	110.62	92.3	10.48	64.6	111.05	91.8
		10.05	66.2						
RES ARG B	4	71.86	30.1	43.73	21.7	28.13	75.0	11.74	15.1
		60.12	37.3						
RES LYS B	5	81.46	40.6	77.61	47.5	3.86	10.3	58.37	50.1
		23.10	27.4						
RES PHE B	6	21.74	10.9	18.33	11.2	3.41	9.6	18.33	11.1
		3.41	10.0						
RES PHE B	7	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES VAL B	8	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES GLY B	9	1.88	2.4	1.88	5.8	0.00	0.0	1.88	5.0
		0.00	0.0						
RES GLY B	10	1.30	1.6	0.00	0.0	1.30	2.7	0.00	0.0
		1.30	3.1						
RES ASN B	11	2.29	1.6	1.58	1.5	0.71	1.9	1.52	3.3
		0.77	0.8						
RES TRP B	12	0.48	0.2	0.32	0.2	0.16	0.4	0.47	0.2
		0.01	0.0						
RES LYS B	13	39.92	19.9	39.92	24.4	0.00	0.0	15.22	13.1
		24.70	29.3						
RES MET B	14	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES ASN B	15	29.00	20.1	29.00	27.3	0.00	0.0	5.07	11.0
		23.93	24.5						
RES GLY B	16	27.94	34.9	8.61	26.6	19.33	40.5	10.79	28.7
		17.15	40.3						
RES ASP B	17	49.61	35.3	49.61	48.3	0.00	0.0	23.13	47.0
		26.47	29.0						
RES LYS B	18	60.17	30.0	58.38	35.8	1.79	4.8	39.02	33.5
		21.15	25.1						
RES LYS B	19	168.38	83.8	165.66	101.4	2.72	7.2	116.82	100.2
		51.56	61.2						
RES SER B	20	47.01	40.4	43.00	55.0	4.01	10.5	42.74	88.0
		4.27	6.3						
RES LEU B	21	3.27	1.8	3.27	2.3	0.00	0.0	3.27	2.3
		0.00	0.0						
RES GLY B	22	22.52	28.1	12.88	39.8	9.65	20.2	17.47	46.5
		5.05	11.9						
RES GLU B	23	111.08	64.5	107.04	79.4	4.04	10.8	44.70	74.1
		66.38	59.3						
RES LEU B	24	12.87	7.2	12.73	9.0	0.15	0.4	12.73	8.9
		0.15	0.4						
RES ILE B	25	3.97	2.3	3.97	2.9	0.00	0.0	3.97	2.9
		0.00	0.0						
RES HIS B	26	129.19	70.6	127.53	86.7	1.67	4.7	77.81	80.1
		51.39	59.9						
RES THR B	27	62.31	44.7	59.13	58.1	3.19	8.5	46.85	61.9
		15.46	24.3						
RES LEU B	28	3.25	1.8	2.72	1.9	0.53	1.4	2.72	1.9
		0.53	1.5						
RES ASN B	29	55.33	38.4	36.19	34.1	19.13	50.7	14.77	32.0
		40.56	41.5						

RES GLY B	30	68.65	85.7	34.52	106.8	34.13	71.4	37.09	98.8
		31.56	74.2						
RES ALA B	31	37.20	34.5	19.95	28.7	17.25	44.8	22.13	31.0
		15.07	41.2						
RES LYS B	32	166.38	82.9	158.05	96.8	8.33	22.2	111.50	95.7
		54.88	65.1						
RES LEU B	33	37.91	21.2	20.56	14.6	17.35	46.3	20.56	14.5
		17.35	47.8						
RES SER B	34	19.39	16.6	15.24	19.5	4.15	10.8	12.72	26.2
		6.68	9.8						
RES ALA B	35	94.01	87.1	73.81	106.3	20.21	52.4	75.03	105.1
		18.98	51.9						
RES ASP B	36	104.74	74.6	99.61	97.0	5.13	13.6	23.03	46.8
		81.71	89.6						
RES THR B	37	12.22	8.8	1.57	1.5	10.65	28.3	0.00	0.0
		12.22	19.2						
RES GLU B	38	49.92	29.0	49.92	37.0	0.00	0.0	19.91	33.0
		30.01	26.8						
RES VAL B	39	12.65	8.4	8.22	7.2	4.43	11.9	8.22	7.1
		4.43	12.3						
RES VAL B	40	3.49	2.3	2.68	2.3	0.80	2.2	3.45	3.0
		0.03	0.1						
RES CYS B	41	1.91	1.4	1.62	1.7	0.30	0.8	1.62	1.6
		0.30	0.8						
RES GLY B	42	0.50	0.6	0.00	0.0	0.50	1.0	0.00	0.0
		0.50	1.2						
RES ALA B	43	0.35	0.3	0.35	0.5	0.00	0.0	0.35	0.5
		0.00	0.0						
RES PRO B	44	0.85	0.6	0.85	0.7	0.00	0.0	0.85	0.7
		0.00	0.0						
RES SER B	45	18.10	15.5	14.85	19.0	3.25	8.5	11.02	22.7
		7.08	10.4						
RES ILE B	46	2.80	1.6	0.00	0.0	2.80	7.5	0.03	0.0
		2.77	7.7						
RES TYR B	47	0.43	0.2	0.43	0.2	0.00	0.0	0.11	0.1
		0.32	0.4						
RES LEU B	48	0.32	0.2	0.11	0.1	0.21	0.6	0.11	0.1
		0.21	0.6						
RES ASP B	49	10.39	7.4	10.21	9.9	0.18	0.5	3.71	7.5
		6.69	7.3						
RES PHE B	50	13.58	6.8	12.88	7.8	0.70	2.0	12.88	7.8
		0.70	2.1						
RES ALA B	51	1.49	1.4	1.49	2.2	0.00	0.0	1.49	2.1
		0.00	0.0						
RES ARG B	52	48.21	20.2	43.20	21.5	5.01	13.4	20.72	26.6
		27.49	17.1						
RES GLN B	53	118.05	66.1	88.12	62.5	29.93	79.8	44.18	84.6
		73.87	58.5						
RES LYS B	54	95.73	47.7	89.71	54.9	6.02	16.0	58.22	49.9
		37.51	44.5						
RES LEU B	55	9.41	5.3	0.00	0.0	9.41	25.1	0.13	0.1
		9.28	25.6						
RES ASP B	56	55.64	39.6	55.64	54.2	0.00	0.0	20.55	41.7
		35.09	38.5						
RES ALA B	57	88.38	81.9	64.35	92.7	24.03	62.4	64.84	90.8
		23.54	64.3						

RES LYS B	58	169.57	84.4	143.89	88.1	25.68	68.5	96.78	83.0
		72.80	86.4						
RES ILE B	59	4.55	2.6	4.05	2.9	0.50	1.4	4.53	3.3
		0.02	0.1						
RES GLY B	60	15.63	19.5	14.79	45.7	0.85	1.8	14.79	39.4
		0.85	2.0						
RES VAL B	61	0.99	0.7	0.28	0.2	0.71	1.9	0.28	0.2
		0.71	2.0						
RES ALA B	62	1.14	1.1	1.14	1.6	0.00	0.0	1.14	1.6
		0.00	0.0						
RES ALA B	63	1.52	1.4	1.52	2.2	0.00	0.0	1.52	2.1
		0.00	0.0						
RES GLN B	64	4.88	2.7	1.76	1.3	3.12	8.3	1.69	3.2
		3.20	2.5						
RES ASN B	65	21.82	15.2	16.37	15.4	5.45	14.4	4.81	10.4
		17.01	17.4						
RES CYS B	66	1.22	0.9	1.22	1.3	0.00	0.0	1.22	1.3
		0.00	0.0						
RES TYR B	67	18.11	8.5	18.01	10.2	0.10	0.3	3.44	2.5
		14.68	19.2						
RES LYS B	68	68.12	33.9	60.64	37.1	7.48	19.9	18.23	15.6
		49.89	59.2						
RES VAL B	69	46.30	30.6	46.30	40.5	0.00	0.0	46.30	40.1
		0.00	0.0						
RES PRO B	70	59.07	43.4	54.19	45.2	4.89	30.1	55.25	45.7
		3.82	25.2						
RES LYS B	71	142.38	70.9	132.31	81.0	10.08	26.9	84.42	72.4
		57.97	68.8						
RES GLY B	72	15.18	19.0	15.18	47.0	0.00	0.0	15.18	40.4
		0.00	0.0						
RES ALA B	73	53.37	49.4	46.05	66.3	7.33	19.0	46.05	64.5
		7.33	20.0						
RES PHE B	74	42.22	21.2	42.22	25.7	0.00	0.0	42.22	25.5
		0.00	0.0						
RES THR B	75	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES GLY B	76	28.73	35.9	4.70	14.5	24.03	50.3	6.26	16.7
		22.46	52.8						
RES GLU B	77	13.21	7.7	13.13	9.7	0.08	0.2	3.90	6.5
		9.31	8.3						
RES ILE B	78	12.13	6.9	11.42	8.3	0.71	1.9	11.42	8.2
		0.71	2.0						
RES SER B	79	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES PRO B	80	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
END Absolute sums over single chains surface									
CHAIN 1 A		9645.5		7995.4		1650.2		5538.9	4106.6
CHAIN 2 B		9965.7		8352.1		1613.6		5779.5	4186.2
END Absolute sums over all chains									
TOTAL		19611.2		16347.4		3263.8		11318.4	8292.8

B.3

REM Relative accessibilites read from external file
"/usr/local/naccess/naccess2.1.1/standard.data"

```

REM File of summed (Sum) and % (per.) accessibilities for
REM RES _ NUM      All-atoms    Total-Side    Main-Chain    Non-polar
All polar
REM              ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL
ABS    REL
RES LYS A  1  228.29 113.7 158.07  96.8  70.22 187.2 119.05 102.1
109.25 129.7
RES GLU A  2   90.55  52.6  65.82  48.8  24.73  65.9  37.83  62.8
52.72  47.1
RES THR A  3   75.46  54.2  74.64  73.4   0.82   2.2  68.19  90.1
7.27  11.4
RES ALA A  4   46.86  43.4  38.11  54.9   8.75  22.7  38.11  53.4
8.75  23.9
RES ALA A  5   28.63  26.5  26.03  37.5   2.60   6.8  26.03  36.5
2.60   7.1
RES ALA A  6   40.15  37.2  36.82  53.0   3.34   8.7  36.84  51.6
3.31   9.1
RES LYS A  7   65.88  32.8  65.88  40.3   0.00   0.0  56.18  48.2
9.70  11.5
RES PHE A  8    0.91   0.5   0.91   0.6   0.00   0.0   0.91   0.6
0.00   0.0
RES GLU A  9   64.40  37.4  61.51  45.7   2.89   7.7  17.75  29.4
46.65  41.7
RES ARG A 10   73.50  30.8  72.96  36.3   0.55   1.5  47.00  60.4
26.51  16.5
RES GLN A 11   31.26  17.5  31.26  22.2   0.00   0.0   0.00   0.0
31.26  24.8
RES HIS A 12   12.10   6.6  12.10   8.2   0.00   0.0   4.95   5.1
7.15   8.3
RES MET A 13   10.58   5.5   8.55   5.5   2.04   5.4   9.30   5.9
1.28   3.5
RES ASP A 14    7.78   5.5   7.78   7.6   0.00   0.0   1.57   3.2
6.21   6.8
RES SER A 15   59.42  51.0  29.84  38.2  29.59  77.0  27.15  55.9
32.27  47.5
RES SER A 16  117.39 100.8  85.63 109.6  31.76  82.7  50.54 104.1
66.85  98.4
RES THR A 17   70.40  50.6  67.57  66.4   2.83   7.5  44.34  58.6
26.06  41.0
RES SER A 18   89.00  76.4  80.18 102.7   8.82  23.0  41.60  85.7
47.40  69.8
RES ALA A 19   32.18  29.8  12.63  18.2  19.55  50.7  12.63  17.7
19.55  53.4
RES ALA A 20   52.88  49.0  35.72  51.5  17.15  44.5  37.22  52.1
15.66  42.8
RES SER A 21   24.01  20.6  18.26  23.4   5.75  15.0  19.66  40.5
4.36   6.4
RES SER A 22   64.33  55.2  58.96  75.5   5.37  14.0  41.19  84.8
23.15  34.1
RES SER A 23   55.19  47.4  45.87  58.7   9.32  24.3  17.76  36.6
37.42  55.1
RES ASN A 24   78.89  54.8  77.52  73.0   1.37   3.6  27.19  58.8
51.70  52.9
RES TYR A 25   39.36  18.5  39.36  22.2   0.00   0.0  39.36  28.8
0.00   0.0
RES CYS A 26    0.04   0.0   0.04   0.0   0.00   0.0   0.04   0.0
0.00   0.0

```

RES ASN A	27	40.88	28.4	38.54	36.3	2.33	6.2	15.90	34.4
		24.98	25.6						
RES GLN A	28	119.57	67.0	119.08	84.5	0.49	1.3	30.29	58.0
		89.28	70.7						
RES MET A	29	26.38	13.6	26.38	16.8	0.00	0.0	26.38	16.7
		0.00	0.0						
RES MET A	30	0.19	0.1	0.19	0.1	0.00	0.0	0.19	0.1
		0.00	0.0						
RES LYS A	31	121.05	60.3	116.10	71.1	4.95	13.2	89.96	77.2
		31.08	36.9						
RES SER A	32	72.27	62.0	52.74	67.5	19.53	50.9	51.19	105.4
		21.08	31.0						
RES ARG A	33	52.59	22.0	52.50	26.1	0.09	0.2	15.11	19.4
		37.48	23.3						
RES ASN A	34	77.36	53.7	66.30	62.4	11.05	29.3	14.16	30.6
		63.19	64.7						
RES LEU A	35	14.52	8.1	7.09	5.0	7.43	19.8	8.50	6.0
		6.02	16.6						
RES THR A	36	12.77	9.2	6.70	6.6	6.07	16.2	2.79	3.7
		9.98	15.7						
RES LYS A	37	112.45	56.0	105.66	64.7	6.78	18.1	73.68	63.2
		38.76	46.0						
RES ASP A	38	133.52	95.1	109.22	106.4	24.31	64.5	44.10	89.6
		89.42	98.1						
RES ARG A	39	136.92	57.3	136.48	67.8	0.44	1.2	57.83	74.3
		79.09	49.1						
RES CYS A	40	13.23	9.9	5.16	5.3	8.07	21.5	5.16	5.3
		8.07	22.2						
RES LYS A	41	42.42	21.1	42.42	26.0	0.00	0.0	36.19	31.0
		6.23	7.4						
RES PRO A	42	63.78	46.9	59.61	49.7	4.17	25.7	59.80	49.4
		3.98	26.2						
RES VAL A	43	82.53	54.5	77.30	67.6	5.23	14.1	77.30	66.9
		5.23	14.6						
RES ASN A	44	4.30	3.0	4.30	4.0	0.00	0.0	4.30	9.3
		0.00	0.0						
RES THR A	45	10.70	7.7	9.44	9.3	1.26	3.4	0.00	0.0
		10.70	16.8						
RES PHE A	46	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES VAL A	47	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES HIS A	48	6.81	3.7	0.01	0.0	6.80	19.0	0.00	0.0
		6.81	7.9						
RES GLU A	49	43.49	25.2	42.80	31.8	0.69	1.8	8.27	13.7
		35.22	31.5						
RES SER A	50	52.95	45.5	48.06	61.5	4.89	12.7	43.09	88.7
		9.86	14.5						
RES LEU A	51	61.59	34.5	57.09	40.5	4.50	12.0	57.09	40.1
		4.50	12.4						
RES ALA A	52	69.51	64.4	61.22	88.2	8.29	21.5	62.41	87.4
		7.11	19.4						
RES ASP A	53	70.32	50.1	69.00	67.2	1.32	3.5	14.41	29.3
		55.91	61.3						
RES VAL A	54	0.16	0.1	0.16	0.1	0.00	0.0	0.16	0.1
		0.00	0.0						

RES THR B 99	2.93	2.1	1.64	1.6	1.29	3.4	1.50	2.0	
1.44 2.3									
RES THR B 100	21.65	15.5	21.60	21.2	0.04	0.1	13.95	18.4	
7.70 12.1									
RES GLN B 101	18.29	10.2	10.59	7.5	7.70	20.5	7.77	14.9	
10.53 8.3									
RES ALA B 102	21.49	19.9	18.08	26.1	3.40	8.8	19.52	27.3	
1.97 5.4									
RES ASN B 103	99.35	69.0	77.90	73.3	21.45	56.9	28.54	61.7	
70.81 72.5									
RES LYS B 104	74.83	37.3	74.83	45.8	0.00	0.0	42.94	36.8	
31.89 37.9									
RES HIS B 105	50.83	27.8	50.83	34.6	0.00	0.0	27.94	28.8	
22.90 26.7									
RES ILE B 106	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	
0.00 0.0									
RES ILE B 107	12.58	7.2	12.58	9.1	0.00	0.0	12.58	9.0	
0.00 0.0									
RES VAL B 108	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	
0.00 0.0									
RES ALA B 109	9.61	8.9	9.61	13.8	0.00	0.0	9.61	13.5	
0.00 0.0									
RES CYS B 110	0.55	0.4	0.00	0.0	0.55	1.5	0.00	0.0	
0.55 1.5									
RES GLU B 111	97.90	56.8	93.56	69.4	4.34	11.6	34.75	57.6	
63.15 56.4									
RES GLY B 112	59.73	74.6	38.55	119.2	21.18	44.3	41.27	109.9	
18.46 43.4									
RES ASN B 113	152.02	105.6	116.22	109.4	35.80	95.0	35.61	77.0	
116.41 119.1									
RES PRO B 114	99.97	73.4	98.29	82.0	1.68	10.3	98.29	81.3	
1.68 11.0									
RES TYR B 115	93.79	44.1	79.45	44.8	14.34	40.5	68.35	50.1	
25.44 33.4									
RES VAL B 116	21.81	14.4	21.75	19.0	0.06	0.2	21.75	18.8	
0.06 0.2									
RES PRO B 117	4.16	3.1	3.04	2.5	1.11	6.9	3.04	2.5	
1.11 7.3									
RES VAL B 118	26.08	17.2	21.45	18.8	4.63	12.5	21.45	18.6	
4.63 12.9									
RES HIS B 119	87.63	47.9	87.63	59.6	0.00	0.0	59.55	61.3	
28.08 32.7									
RES PHE B 120	23.79	11.9	13.71	8.4	10.08	28.5	13.71	8.3	
10.08 29.4									
RES ASP B 121	16.18	11.5	4.97	4.8	11.21	29.7	0.00	0.0	
16.18 17.8									
RES ALA B 122	27.51	25.5	27.51	39.6	0.00	0.0	27.51	38.5	
0.00 0.0									
RES SER B 123	34.99	30.0	11.82	15.1	23.17	60.3	10.39	21.4	
24.60 36.2									
RES VAL B 124	92.42	61.0	61.06	53.4	31.36	84.4	63.46	55.0	
28.96 80.5									
END Absolute sums over single chains surface									
CHAIN 1 A	6449.4		5518.5		930.9		3607.2		2842.2
CHAIN 2 B	6277.4		5385.8		891.6		3448.8		2828.6
END Absolute sums over all chains									
TOTAL	12726.8		10904.3		1822.5		7056.0		5670.8

```

REM Relative accessibilites read from external file
"/usr/local/naccess/naccess2.1.1/standard.data"
REM File of summed (Sum) and % (per.) accessibilities for
REM RES _ NUM      All-atoms    Total-Side    Main-Chain    Non-polar
All polar
REM              ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL
ABS    REL
RES GLY A  86    103.96 129.8   46.51 143.9   57.45 120.3   49.92 132.9
54.04 127.0
RES GLN A  87    130.00  72.8  120.64  85.6    9.36  25.0   43.76  83.8
86.24  68.3
RES TYR A  88     28.95  13.6   21.54  12.1    7.41  20.9   19.49  14.3
9.47  12.4
RES LYS A  89     62.76  31.3   62.76  38.4    0.00   0.0   17.83  15.3
44.93  53.3
RES ILE A  90      0.04   0.0    0.00   0.0    0.04   0.1    0.00   0.0
0.04   0.1
RES GLN A  91     30.63  17.2   30.63  21.7    0.00   0.0    0.00   0.0
30.63  24.3
RES ILE A  92      0.34   0.2    0.34   0.2    0.00   0.0    0.34   0.2
0.00   0.0
RES PHE A  93     15.98   8.0   15.98   9.7    0.00   0.0   15.98   9.7
0.00   0.0
RES GLU A  94     63.92  37.1   56.39  41.8    7.53  20.1   15.92  26.4
47.99  42.9
RES LYS A  95    119.27  59.4  119.27  73.0    0.00   0.0   72.86  62.5
46.41  55.1
RES GLY A  96     18.14  22.6    7.14  22.1   11.00  23.0    8.16  21.7
9.98  23.5
RES ASP A  97     70.11  49.9   57.20  55.7   12.90  34.2   27.28  55.4
42.83  47.0
RES PHE A  98     38.21  19.2   20.71  12.6   17.50  49.5   20.71  12.5
17.50  51.1
RES SER A  99     48.58  41.7   48.58  62.2    0.00   0.0   40.80  84.0
7.79  11.5
RES GLY A 100     43.63  54.5   12.75  39.4   30.89  64.7   17.17  45.7
26.47  62.2
RES GLN A 101    100.08  56.1   96.27  68.3    3.81  10.2   27.13  52.0
72.95  57.8
RES MET A 102     65.50  33.7   55.22  35.3   10.29  27.4   55.22  35.0
10.29  28.3
RES TYR A 103     56.41  26.5   56.29  31.7    0.12   0.3   39.67  29.1
16.74  22.0
RES GLU A 104     84.97  49.3   56.59  42.0   28.38  75.7   18.77  31.1
66.20  59.1
RES THR A 105     15.71  11.3   15.71  15.5    0.00   0.0    9.43  12.5
6.28   9.9
RES THR A 106     73.60  52.8   65.73  64.6    7.87  21.0   40.48  53.5
33.12  52.1
RES GLU A 107     99.61  57.8   99.61  73.9    0.00   0.0   38.20  63.4
61.41  54.8
RES ASP A 108     47.61  33.9   35.34  34.4   12.27  32.5   11.66  23.7
35.95  39.4

```


RES PRO B 162	39.46	29.0	39.39	32.9	0.06	0.4	39.46	32.6
0.00 0.0								
RES ALA B 163	42.78	39.6	41.89	60.3	0.90	2.3	41.89	58.7
0.90 2.4								
RES VAL B 164	0.16	0.1	0.09	0.1	0.07	0.2	0.09	0.1
0.07 0.2								
RES GLN B 165	20.74	11.6	20.74	14.7	0.00	0.0	1.85	3.5
18.89 15.0								
RES SER B 166	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
0.00 0.0								
RES PHE B 167	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
0.00 0.0								
RES ARG B 168	58.51	24.5	58.51	29.1	0.00	0.0	10.97	14.1
47.54 29.5								
RES ARG B 169	66.54	27.9	65.92	32.8	0.62	1.6	0.63	0.8
65.91 40.9								
RES ILE B 170	3.55	2.0	3.55	2.6	0.00	0.0	3.55	2.6
0.00 0.0								
RES VAL B 171	94.35	62.3	74.71	65.4	19.63	52.8	74.84	64.8
19.51 54.2								
RES GLU B 172	104.42	60.6	23.66	17.6	80.76	215.3	33.34	55.3
71.08 63.5								
END Absolute sums over single chains surface								
CHAIN 1 A	4555.9		3937.4		618.5		2216.5	2339.4
CHAIN 2 B	4582.7		3943.0		639.7		2278.5	2304.3
END Absolute sums over all chains								
TOTAL	9138.6		7880.4		1258.2		4494.9	4643.6

```

REM Relative accessibilites read from external file
"/usr/local/naccess/naccess2.1.1/standard.data"
REM File of summed (Sum) and % (per.) accessibilities for
REM RES _ NUM      All-atoms    Total-Side    Main-Chain    Non-polar
All polar
REM              ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL      ABS    REL
ABS    REL
RES GLN A   5   204.00 114.3 161.31 114.4  42.69 113.8  74.35 142.4
129.65 102.7
RES THR A   6    33.00  23.7  23.22  22.8   9.78  26.0  11.35  15.0
21.65  34.1
RES MET A   7    31.04  16.0  30.10  19.2   0.94   2.5  30.10  19.1
0.94   2.6
RES LYS A   8   150.96  75.2 130.19  79.7  20.77  55.4 110.08  94.4
40.88  48.5
RES GLY A   9    63.58  79.4  36.60 113.2  26.98  56.5  37.91 100.9
25.68  60.3
RES LEU A  10    11.12   6.2   0.18   0.1  10.94  29.2   0.27   0.2
10.85  29.9
RES ASP A  11    62.92  44.8  62.92  61.3   0.00   0.0  24.98  50.7
37.94  41.6
RES ILE A  12    19.34  11.0  16.34  11.8   3.00   8.1  16.34  11.7
3.00   8.3
RES GLN A  13    86.97  48.7  75.15  53.3  11.82  31.5  53.74 102.9
33.23  26.3
RES LYS A  14   116.41  58.0 110.23  67.5   6.17  16.5  79.09  67.9
37.31  44.3
RES VAL A  15     0.53   0.3   0.53   0.5   0.00   0.0   0.53   0.5
0.00   0.0
RES ALA A  16    46.61  43.2  35.73  51.5  10.87  28.2  36.76  51.5
9.84  26.9
RES GLY A  17    22.03  27.5  19.89  61.5   2.13   4.5  19.89  53.0
2.13   5.0
RES THR A  18    67.12  48.2  59.96  59.0   7.16  19.1  32.76  43.3
34.35  54.1
RES TRP A  19     0.74   0.3   0.00   0.0   0.74   1.9   0.00   0.0
0.74   1.2
RES TYR A  20    57.10  26.8  57.10  32.2   0.00   0.0  28.68  21.0
28.42  37.3
RES SER A  21     7.32   6.3   0.37   0.5   6.95  18.1   0.37   0.8
6.95  10.2
RES LEU A  22     0.52   0.3   0.52   0.4   0.00   0.0   0.52   0.4
0.00   0.0
RES ALA A  23     0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0
0.00   0.0
RES MET A  24     0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0
0.00   0.0
RES ALA A  25     0.22   0.2   0.22   0.3   0.00   0.0   0.22   0.3
0.00   0.0
RES ALA A  26     0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0   0.00   0.0
0.00   0.0
RES SER A  27     5.82   5.0   0.75   1.0   5.07  13.2   0.75   1.6
5.07   7.5

```

RES ASP A	28	35.62	25.4	35.62	34.7	0.00	0.0	1.63	3.3
		33.99	37.3						
RES ILE A	29	11.52	6.6	11.39	8.3	0.14	0.4	11.39	8.2
		0.14	0.4						
RES SER A	30	65.10	55.9	60.52	77.5	4.58	11.9	49.83	102.6
		15.28	22.5						
RES LEU A	31	19.09	10.7	19.09	13.5	0.00	0.0	19.09	13.4
		0.00	0.0						
RES LEU A	32	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
		0.00	0.0						
RES ASP A	33	24.79	17.7	17.55	17.1	7.24	19.2	5.21	10.6
		19.59	21.5						
RES ALA A	34	25.00	23.2	25.00	36.0	0.00	0.0	25.00	35.0
		0.00	0.0						
RES GLN A	35	59.58	33.4	55.40	39.3	4.18	11.2	44.04	84.3
		15.54	12.3						
RES SER A	36	74.97	64.3	57.89	74.1	17.07	44.5	35.11	72.3
		39.86	58.7						
RES ALA A	37	4.90	4.5	4.47	6.4	0.43	1.1	4.47	6.3
		0.43	1.2						
RES PRO A	38	67.73	49.8	67.72	56.5	0.01	0.1	67.72	56.0
		0.01	0.1						
RES LEU A	39	6.21	3.5	5.89	4.2	0.32	0.9	5.89	4.1
		0.32	0.9						
RES ARG A	40	5.37	2.3	5.34	2.7	0.04	0.1	0.00	0.0
		5.37	3.3						
RES VAL A	41	3.94	2.6	3.94	3.4	0.00	0.0	3.94	3.4
		0.00	0.0						
RES TYR A	42	16.50	7.8	16.50	9.3	0.00	0.0	16.21	11.9
		0.29	0.4						
RES VAL A	43	6.02	4.0	0.83	0.7	5.18	13.9	0.83	0.7
		5.18	14.4						
RES GLU A	44	38.56	22.4	36.39	27.0	2.17	5.8	17.92	29.7
		20.64	18.4						
RES GLU A	45	53.96	31.3	53.96	40.0	0.00	0.0	10.39	17.2
		43.57	38.9						
RES LEU A	46	9.37	5.2	9.01	6.4	0.37	1.0	9.01	6.3
		0.37	1.0						
RES LYS A	47	68.99	34.4	68.99	42.2	0.00	0.0	42.81	36.7
		26.18	31.1						
RES PRO A	48	23.18	17.0	6.92	5.8	16.26	100.2	6.94	5.7
		16.24	106.9						
RES THR A	49	41.48	29.8	41.48	40.8	0.00	0.0	40.26	53.2
		1.22	1.9						
RES PRO A	50	131.58	96.7	105.57	88.0	26.01	160.3	105.57	87.3
		26.01	171.2						
RES GLU A	51	123.35	71.6	116.61	86.5	6.74	18.0	60.05	99.6
		63.29	56.5						
RES GLY A	52	18.49	23.1	15.47	47.8	3.03	6.3	15.47	41.2
		3.03	7.1						
RES ASP A	53	29.80	21.2	29.80	29.0	0.00	0.0	2.21	4.5
		27.59	30.3						
RES LEU A	54	8.95	5.0	7.78	5.5	1.17	3.1	8.95	6.3
		0.00	0.0						
RES GLU A	55	32.33	18.8	32.33	24.0	0.00	0.0	2.07	3.4
		30.27	27.0						

RES GLU B 65	111.87	64.9	111.87	83.0	0.00	0.0	41.09	68.1	
70.79	63.2								
RES CYS B 66	55.61	41.4	26.81	27.7	28.79	76.7	26.81	27.4	
28.79	79.2								
RES ALA B 67	21.37	19.8	20.95	30.2	0.42	1.1	21.37	29.9	
0.00	0.0								
RES GLN B 68	119.57	67.0	89.91	63.8	29.66	79.1	23.59	45.2	
95.98	76.0								
RES LYS B 69	63.17	31.5	62.89	38.5	0.28	0.8	57.70	49.5	
5.48	6.5								
RES LYS B 70	113.12	56.3	84.56	51.8	28.56	76.2	52.05	44.7	
61.07	72.5								
RES ILE B 71	14.90	8.5	14.90	10.8	0.00	0.0	14.90	10.7	
0.00	0.0								
RES ILE B 72	97.02	55.4	82.17	59.6	14.86	40.0	82.17	59.1	
14.86	41.3								
RES ALA B 73	0.05	0.0	0.05	0.1	0.00	0.0	0.05	0.1	
0.00	0.0								
RES GLU B 74	100.35	58.3	100.35	74.5	0.00	0.0	31.51	52.3	
68.84	61.5								
RES LYS B 75	102.23	50.9	93.43	57.2	8.81	23.5	60.90	52.2	
41.33	49.1								
RES THR B 76	22.45	16.1	9.91	9.7	12.55	33.4	12.21	16.1	
10.24	16.1								
RES LYS B 77	163.37	81.4	142.96	87.5	20.40	54.4	128.99	110.7	
34.37	40.8								
RES ILE B 78	93.49	53.4	93.39	67.7	0.10	0.3	93.39	67.1	
0.10	0.3								
RES PRO B 79	73.66	54.1	72.97	60.9	0.69	4.3	72.98	60.3	
0.68	4.5								
END Absolute sums over single chains surface									
CHAIN 1 A	7515.4		6614.5		900.9		4314.0		3201.4
CHAIN 2 B	7350.5		6440.7		909.9		4216.7		3133.8
END Absolute sums over all chains									
TOTAL	14865.9		13055.2		1810.7		8530.7		6335.2

C.1

REMARK FILENAME="1QMOAyB.pdb"

REMARK coordinates built for atom: A LYS 10 CG

REMARK coordinates built for atom: A LYS 10 CD

REMARK coordinates built for atom: A LYS 10 CE

REMARK coordinates built for atom: A LYS 10 NZ

REMARK coordinates built for atom: A ILE 19 CD

REMARK coordinates built for atom: A LYS 35 CG

REMARK coordinates built for atom: A LYS 35 CD

REMARK coordinates built for atom: A LYS 35 CE

REMARK coordinates built for atom: A LYS 35 NZ

REMARK coordinates built for atom: A ILE 71 CD

REMARK coordinates built for atom: A ILE 72 CD

REMARK coordinates built for atom: A ILE 76 CD

REMARK coordinates built for atom: A ARG 83 CG

REMARK coordinates built for atom: A ARG 83 CD

REMARK coordinates built for atom: A ARG 83 NE

REMARK coordinates built for atom: A ARG 83 CZ

REMARK coordinates built for atom: A ARG 83 NH1

REMARK coordinates built for atom: A ARG 83 NH2

REMARK coordinates built for atom: A ILE 84 CD
 REMARK coordinates built for atom: A ILE 92 CD
 REMARK coordinates built for atom: A ILE 99 CD
 REMARK coordinates built for atom: A ASN 113 OT1
 REMARK coordinates built for atom: A ASN 113 OXT
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 10 CG
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 10 CD
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 10 CE
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 10 NZ
 REMARK coordinates built for atom: B ILE 19 CD
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 35 CG
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 35 CD
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 35 CE
 REMARK coordinates built for atom: B LYS 35 NZ
 REMARK coordinates built for atom: B ILE 71 CD
 REMARK coordinates built for atom: B ILE 72 CD
 REMARK coordinates built for atom: B ILE 76 CD
 REMARK coordinates built for atom: B ARG 83 CG
 REMARK coordinates built for atom: B ARG 83 CD
 REMARK coordinates built for atom: B ARG 83 NE
 REMARK coordinates built for atom: B ARG 83 CZ
 REMARK coordinates built for atom: B ARG 83 NH1
 REMARK coordinates built for atom: B ARG 83 NH2
 REMARK coordinates built for atom: B ILE 84 CD
 REMARK coordinates built for atom: B ILE 92 CD
 REMARK coordinates built for atom: B ILE 99 CD
 REMARK coordinates built for atom: B ASN 113 OT1
 REMARK coordinates built for atom: B ASN 113 OXT
 REMARK DATE:04-May-99 14:30:36 created by user: alex
 REMARK VERSION:1.1

ATOM	1	CB	ALA	A	1	66.388	-5.357	21.924	1.00	81.50	A
ATOM	2	C	ALA	A	1	66.525	-3.365	23.451	1.00	71.13	A
ATOM	3	O	ALA	A	1	65.801	-2.376	23.279	1.00	69.63	A
ATOM	4	N	ALA	A	1	68.614	-4.421	22.506	1.00	81.44	A
ATOM	5	CA	ALA	A	1	67.175	-4.080	22.259	1.00	78.19	A
ATOM	6	N	GLN	A	2	66.756	-3.901	24.647	1.00	59.66	A
ATOM	7	CA	GLN	A	2	66.207	-3.340	25.867	1.00	42.08	A
ATOM	8	CB	GLN	A	2	64.817	-3.873	26.122	1.00	32.17	A
ATOM	9	CG	GLN	A	2	64.102	-3.081	27.148	1.00	23.26	A
ATOM	10	CD	GLN	A	2	62.638	-2.990	26.846	1.00	30.65	A
ATOM	11	OE1	GLN	A	2	61.910	-2.272	27.513	1.00	34.08	A
ATOM	12	NE2	GLN	A	2	62.190	-3.721	25.828	1.00	36.12	A
ATOM	13	C	GLN	A	2	67.060	-3.590	27.084	1.00	38.17	A
ATOM	14	O	GLN	A	2	67.787	-4.573	27.158	1.00	39.43	A
ATOM	15	N	SER	A	3	67.017	-2.648	28.010	1.00	36.21	A
ATOM	16	CA	SER	A	3	67.750	-2.745	29.262	1.00	30.27	A
ATOM	17	CB	SER	A	3	69.138	-2.117	29.098	1.00	31.46	A
ATOM	18	OG	SER	A	3	69.658	-1.683	30.339	1.00	34.22	A
ATOM	19	C	SER	A	3	66.966	-2.027	30.361	1.00	25.97	A
ATOM	20	O	SER	A	3	66.411	-0.960	30.129	1.00	26.99	A
ATOM	21	N	LEU	A	4	66.885	-2.619	31.544	1.00	22.80	A
ATOM	22	CA	LEU	A	4	66.202	-1.974	32.657	1.00	19.06	A
ATOM	23	CB	LEU	A	4	64.809	-2.548	32.876	1.00	16.52	A
ATOM	24	CG	LEU	A	4	64.199	-2.116	34.218	1.00	16.92	A
ATOM	25	CD1	LEU	A	4	64.376	-0.616	34.402	1.00	19.57	A
ATOM	26	CD2	LEU	A	4	62.729	-2.483	34.278	1.00	16.95	A
ATOM	27	C	LEU	A	4	66.998	-2.161	33.929	1.00	21.92	A

ATOM	28	O	LEU	A	4	67.425	-3.259	34.247	1.00	28.88	A
ATOM	29	N	SER	A	5	67.207	-1.084	34.660	1.00	20.82	A
ATOM	30	CA	SER	A	5	67.939	-1.190	35.898	1.00	23.55	A
ATOM	31	CB	SER	A	5	69.417	-0.918	35.639	1.00	27.67	A
ATOM	32	OG	SER	A	5	70.077	-0.575	36.846	1.00	44.21	A
ATOM	33	C	SER	A	5	67.387	-0.209	36.920	1.00	22.89	A
ATOM	34	O	SER	A	5	67.232	0.973	36.627	1.00	28.63	A
ATOM	35	N	PHE	A	6	67.100	-0.697	38.121	1.00	19.01	A
ATOM	36	CA	PHE	A	6	66.579	0.154	39.180	1.00	15.07	A
ATOM	37	CB	PHE	A	6	65.047	0.150	39.192	1.00	15.77	A
ATOM	38	CG	PHE	A	6	64.439	-1.153	39.558	1.00	17.69	A
ATOM	39	CD1	PHE	A	6	64.401	-1.567	40.886	1.00	19.60	A
ATOM	40	CD2	PHE	A	6	63.858	-1.953	38.578	1.00	20.61	A
ATOM	41	CE1	PHE	A	6	63.784	-2.764	41.238	1.00	27.26	A
ATOM	42	CE2	PHE	A	6	63.238	-3.155	38.915	1.00	27.61	A
ATOM	43	CZ	PHE	A	6	63.198	-3.565	40.249	1.00	29.19	A
ATOM	44	C	PHE	A	6	67.135	-0.171	40.552	1.00	9.66	A
ATOM	45	O	PHE	A	6	67.493	-1.296	40.844	1.00	15.85	A
ATOM	46	N	SER	A	7	67.247	0.839	41.387	1.00	6.12	A
ATOM	47	CA	SER	A	7	67.785	0.631	42.704	1.00	8.89	A
ATOM	48	CB	SER	A	7	69.228	1.110	42.710	1.00	7.30	A
ATOM	49	OG	SER	A	7	69.762	1.085	44.012	1.00	21.35	A
ATOM	50	C	SER	A	7	66.976	1.347	43.788	1.00	14.98	A
ATOM	51	O	SER	A	7	66.499	2.469	43.588	1.00	19.39	A
ATOM	52	N	PHE	A	8	66.786	0.666	44.918	1.00	16.49	A
ATOM	53	CA	PHE	A	8	66.072	1.215	46.078	1.00	15.94	A
ATOM	54	CB	PHE	A	8	64.824	0.388	46.384	1.00	14.37	A
ATOM	55	CG	PHE	A	8	63.691	0.604	45.433	1.00	18.75	A
ATOM	56	CD1	PHE	A	8	62.976	1.794	45.440	1.00	23.40	A
ATOM	57	CD2	PHE	A	8	63.291	-0.406	44.572	1.00	25.51	A
ATOM	58	CE1	PHE	A	8	61.867	1.978	44.603	1.00	25.47	A
ATOM	59	CE2	PHE	A	8	62.183	-0.233	43.730	1.00	30.95	A
ATOM	60	CZ	PHE	A	8	61.470	0.963	43.749	1.00	26.07	A
ATOM	61	C	PHE	A	8	67.024	1.105	47.277	1.00	18.51	A
ATOM	62	O	PHE	A	8	67.688	0.083	47.423	1.00	22.48	A
ATOM	63	N	THR	A	9	67.125	2.134	48.118	1.00	18.12	A
ATOM	64	CA	THR	A	9	68.004	2.030	49.288	1.00	21.42	A
ATOM	65	CB	THR	A	9	69.286	2.881	49.173	1.00	19.87	A
ATOM	66	OG1	THR	A	9	68.944	4.267	49.214	1.00	26.94	A
ATOM	67	CG2	THR	A	9	70.034	2.566	47.894	1.00	19.73	A
ATOM	68	C	THR	A	9	67.254	2.473	50.531	1.00	23.70	A
ATOM	69	O	THR	A	9	67.748	2.370	51.655	1.00	29.42	A
ATOM	70	N	LYS	A	10	66.049	2.967	50.306	1.00	22.34	A
ATOM	71	CA	LYS	A	10	65.175	3.416	51.370	1.00	26.33	A
ATOM	72	CB	LYS	A	10	65.412	4.900	51.682	1.00	24.65	A
ATOM	73	CG	LYS	A	10	65.618	5.861	50.537	1.00	49.56	A
ATOM	74	CD	LYS	A	10	66.130	7.192	51.104	1.00	49.56	A
ATOM	75	CE	LYS	A	10	65.022	8.072	51.667	1.00	49.56	A
ATOM	76	NZ	LYS	A	10	64.145	8.585	50.586	1.00	49.56	A
ATOM	77	C	LYS	A	10	63.815	3.229	50.737	1.00	30.41	A
ATOM	78	O	LYS	A	10	63.709	3.175	49.515	1.00	37.29	A
ATOM	79	N	PHE	A	11	62.775	3.103	51.538	1.00	31.51	A
ATOM	80	CA	PHE	A	11	61.466	2.949	50.951	1.00	37.32	A
ATOM	867	CB	ALA	B	1	66.986	7.782	48.185	1.00	81.50	B
ATOM	868	C	ALA	B	1	67.042	5.786	46.659	1.00	71.13	B
ATOM	869	O	ALA	B	1	66.325	4.799	46.870	1.00	69.63	B
ATOM	870	N	ALA	B	1	69.178	6.839	47.496	1.00	81.44	B

ATOM	871	CA	ALA	B	1	67.752	6.503	47.815	1.00	78.19	B
ATOM	872	N	GLN	B	2	67.215	6.318	45.451	1.00	59.66	B
ATOM	873	CA	GLN	B	2	66.605	5.754	44.262	1.00	42.08	B
ATOM	874	CB	GLN	B	2	65.205	6.290	44.074	1.00	32.17	B
ATOM	875	CG	GLN	B	2	64.439	5.497	43.087	1.00	23.26	B
ATOM	876	CD	GLN	B	2	62.991	5.410	43.462	1.00	30.65	B
ATOM	877	OE1	GLN	B	2	62.229	4.692	42.834	1.00	34.08	B
ATOM	878	NE2	GLN	B	2	62.596	6.145	44.499	1.00	36.12	B
ATOM	879	C	GLN	B	2	67.397	5.999	43.003	1.00	38.17	B
ATOM	880	O	GLN	B	2	68.122	6.980	42.890	1.00	39.43	B
ATOM	881	N	SER	B	3	67.306	5.054	42.083	1.00	36.21	B
ATOM	882	CA	SER	B	3	67.976	5.146	40.796	1.00	30.27	B
ATOM	883	CB	SER	B	3	69.369	4.515	40.893	1.00	31.46	B
ATOM	884	OG	SER	B	3	69.826	4.076	39.629	1.00	34.22	B
ATOM	885	C	SER	B	3	67.137	4.427	39.740	1.00	25.97	B
ATOM	886	O	SER	B	3	66.592	3.362	40.002	1.00	26.99	B
ATOM	887	N	LEU	B	4	66.999	5.016	38.560	1.00	22.80	B
ATOM	888	CA	LEU	B	4	66.260	4.369	37.484	1.00	19.06	B
ATOM	889	CB	LEU	B	4	64.859	4.946	37.333	1.00	16.52	B
ATOM	890	CG	LEU	B	4	64.184	4.511	36.024	1.00	16.92	B
ATOM	891	CD1	LEU	B	4	64.347	3.010	35.836	1.00	19.57	B
ATOM	892	CD2	LEU	B	4	62.712	4.882	36.036	1.00	16.95	B
ATOM	893	C	LEU	B	4	66.993	4.550	36.174	1.00	21.92	B
ATOM	894	O	LEU	B	4	67.406	5.646	35.832	1.00	28.88	B
ATOM	895	N	SER	B	5	67.163	3.471	35.437	1.00	20.82	B
ATOM	896	CA	SER	B	5	67.833	3.572	34.164	1.00	23.55	B
ATOM	897	CB	SER	B	5	69.321	3.297	34.350	1.00	27.67	B
ATOM	898	OG	SER	B	5	69.920	2.949	33.113	1.00	44.21	B
ATOM	899	C	SER	B	5	67.228	2.589	33.173	1.00	22.89	B
ATOM	900	O	SER	B	5	67.085	1.408	33.477	1.00	28.63	B
ATOM	901	N	PHE	B	6	66.883	3.074	31.987	1.00	19.01	B
ATOM	902	CA	PHE	B	6	66.308	2.221	30.957	1.00	15.07	B
ATOM	903	CB	PHE	B	6	64.779	2.229	31.021	1.00	15.77	B
ATOM	904	CG	PHE	B	6	64.155	3.533	30.682	1.00	17.69	B
ATOM	905	CD1	PHE	B	6	64.053	3.943	29.356	1.00	19.60	B
ATOM	906	CD2	PHE	B	6	63.625	4.337	31.687	1.00	20.61	B
ATOM	907	CE1	PHE	B	6	63.422	5.140	29.032	1.00	27.26	B
ATOM	908	CE2	PHE	B	6	62.992	5.539	31.378	1.00	27.61	B
ATOM	909	CZ	PHE	B	6	62.887	5.946	30.046	1.00	29.19	B
ATOM	910	C	PHE	B	6	66.797	2.541	29.558	1.00	9.66	B
ATOM	911	O	PHE	B	6	67.142	3.664	29.246	1.00	15.85	B
ATOM	912	N	SER	B	7	66.865	1.529	28.722	1.00	6.12	B
ATOM	913	CA	SER	B	7	67.337	1.731	27.379	1.00	8.89	B
ATOM	914	CB	SER	B	7	68.777	1.249	27.303	1.00	7.30	B
ATOM	915	OG	SER	B	7	69.246	1.269	25.976	1.00	21.35	B
ATOM	916	C	SER	B	7	66.474	1.014	26.339	1.00	14.98	B
ATOM	917	O	SER	B	7	66.005	-0.106	26.565	1.00	19.39	B
ATOM	918	N	PHE	B	8	66.230	1.693	25.218	1.00	16.49	B
ATOM	919	CA	PHE	B	8	65.458	1.142	24.096	1.00	15.94	B
ATOM	920	CB	PHE	B	8	64.198	1.971	23.850	1.00	14.37	B
ATOM	921	CG	PHE	B	8	63.113	1.761	24.856	1.00	18.75	B
ATOM	922	CD1	PHE	B	8	62.396	0.572	24.888	1.00	23.40	B
ATOM	923	CD2	PHE	B	8	62.759	2.774	25.733	1.00	25.51	B
ATOM	924	CE1	PHE	B	8	61.329	0.393	25.780	1.00	25.47	B
ATOM	925	CE2	PHE	B	8	61.693	2.606	26.629	1.00	30.95	B
ATOM	926	CZ	PHE	B	8	60.977	1.412	26.649	1.00	26.07	B
ATOM	927	C	PHE	B	8	66.349	1.246	22.851	1.00	18.51	B

ATOM	928	O	PHE	B	8	67.008	2.266	22.669	1.00	22.48	B
ATOM	929	N	THR	B	9	66.406	0.215	22.009	1.00	18.12	B
ATOM	930	CA	THR	B	9	67.226	0.312	20.797	1.00	21.42	B
ATOM	931	CB	THR	B	9	68.511	-0.541	20.850	1.00	19.87	B
ATOM	932	OG1	THR	B	9	68.164	-1.926	20.831	1.00	26.94	B
ATOM	933	CG2	THR	B	9	69.322	-0.224	22.090	1.00	19.73	B
ATOM	934	C	THR	B	9	66.415	-0.132	19.594	1.00	23.70	B
ATOM	935	O	THR	B	9	66.853	-0.033	18.446	1.00	29.42	B
ATOM	936	N	LYS	B	10	65.221	-0.622	19.880	1.00	22.34	B
ATOM	937	CA	LYS	B	10	64.294	-1.072	18.861	1.00	26.33	B
ATOM	938	CB	LYS	B	10	64.512	-2.557	18.543	1.00	24.65	B
ATOM	939	CG	LYS	B	10	65.894	-2.898	17.986	1.00	49.56	B
ATOM	940	CD	LYS	B	10	65.991	-2.773	16.459	1.00	49.56	B
ATOM	941	CE	LYS	B	10	66.046	-1.329	15.961	1.00	49.56	B
ATOM	942	NZ	LYS	B	10	64.733	-0.632	16.024	1.00	49.56	B
ATOM	943	C	LYS	B	10	62.968	-0.880	19.561	1.00	30.41	B
ATOM	944	O	LYS	B	10	62.923	-0.822	20.786	1.00	37.29	B
ATOM	945	N	PHE	B	11	61.890	-0.754	18.812	1.00	31.51	B
ATOM	946	CA	PHE	B	11	60.612	-0.595	19.462	1.00	37.32	B
ATOM	947	CB	PHE	B	11	60.037	0.782	19.169	1.00	34.07	B

END