



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΓΑΛΑΡΗΣ**

**ΔΟΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΧΡΩΜΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

**ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ ΜΠΟΛΗΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336946



Αρ. εισ.:.....11044/2013





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΓΑΛΑΡΗΣ**

**ΔΟΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΧΡΩΜΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

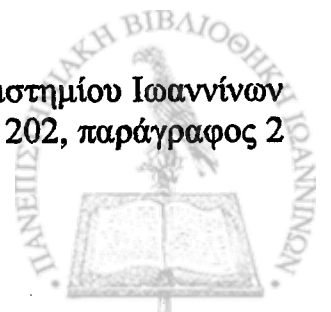
**ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ ΜΠΟΛΗΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2  
(νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπόλη Δημοσθένη: 11-7-2001**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 451<sup>α</sup>/6-11-2001**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Παπαμαρκάκη Θωμαΐς Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

Φριλίγγος Ευστάθιος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-12-2001**

*«Δομικός και Λειτουργικός χαρακτηρισμός χρωμοπρωτεϊνών»*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 484<sup>α</sup>/15-  
10-2002**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής**

Επιβλέπουσα

Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Παπαμαρκάκη Θωμαΐς Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φριλίγγος Ευστάθιος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 610<sup>α</sup>/19-6-2007**

**Γεωργάτος Σπυρίδων**

Καθηγητής Βιολογικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

**Τσίκαρης Βασίλειος**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

**Φώτης Θεόδωρος**

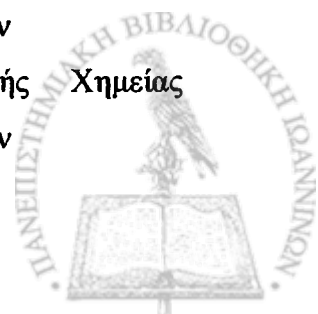
Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Παπαμαρκάκη Θωμαΐς**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Φράγκου –Λαζαρίδη Μαρία**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



**Πολίτου Αναστασία**

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής  
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Φριλίγγος Ευστάθιος**

Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής  
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 6-7-2007

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Επαμεινώνδας Τσιάνος**

Καθηγητής Παθολογίας



*Η διδακτορική διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) & Εθνικούς Πόρους, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» το οποίο εντάσσεται στο ΕΠΕΑΕΚ II του 3<sup>ου</sup> Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ.*

*This Ph.D. thesis is co-funded by the European Union - European Social Fund (ESF) & National Sources, in the framework of the program "HRAKLEITOS" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3<sup>rd</sup> Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education.*



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ  
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ  
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Εκπαίδευσης και Αρχικής  
Επαγγελματικής Κατάρτισης





*Λίγοι καλοί κι αυτοί μοιραίοι,  
παραιτημένοι κατά βάθος,  
Ω, με πόση ένταση και πάθος  
γίνονται πρώτοι οι τελευταίοι...*

**Δήμος Μούτσης,**  
*Μια φουσαρμόνικα που κλαίει, Να! (1987)*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ



|   |              |
|---|--------------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟΙ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>  | <b>1-24</b>  |
| 1.1 Οργάνωση της γενετικής πληροφορίας εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου  | 3            |
| 1.1.1 Χρωματίνη   | 3            |
| 1.1.2 Το νουκλεόσωμα ως επαναλαμβανόμενη δομική υπομονάδα της χρωματίνης  | 5            |
| 1.1.3 Δομή και οργάνωση των πυρηνικών ιστονών   | 7            |
| 1.2 Κατανομή επιμέρους μορφών χρωματίνης εντός του πυρήνα   | 8            |
| 1.3 Δυναμική φύση της χρωματίνης  | 9            |
| 1.3.1 Αναδιοργάνωση της χρωματίνης  | 9            |
| 1.3.2 Παράγοντες αναδιοργάνωσης χρωματίνης  | 10           |
| 1.4 Υπόθεση του κώδικα των ιστονών  | 12           |
| 1.5.1 Επιμέρους δομικές περιοχές που εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης- το chromodomain και ο ρόλος του                         | 15           |
| 1.5.2 Chromodomain που φέρονται να διαφοροποιούνται λειτουργικά   | 19           |
| 1.6 Σύντομη περιγραφή του ρόλου και της δομικής οργάνωσης της dMi-2   | 20           |
| 1.7 Διαφοροποιήσεις των chromodomain της dMi-2 σε σχέση με αυτά των HP1 και Pc στη βάση της πρωτοταγούς δομής                               | 21           |
| 1.8 Ενδεχόμενη λειτουργική συσχέτιση μεταξύ chromodomain και Sac7d/ Sso7d βάσει δομικής ομολογίας- DALI                                     | 22           |
| 1.9 Σκοπός της διατριβής  | 24           |
| <br>  |              |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ</b>   | <b>25-40</b> |
| 2.1 Βακτηριακά στελέχη –πλασμιδιακοί φορείς   | 27           |
| 2.2 Κλωνοποίηση –πλασμιδιακές κατασκευές  | 29           |
| 2.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA  | 29           |
| 2.2.2 Παρασκευή των κωδικοποιών τμημάτων DNA των πολυπεπτιδίων του chromodomain c2 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) | 29           |
| 2.2.3 Ηλεκτροφόρηση gel αгарόζης  | 30           |
| 2.2.4 Ενζυμικές πέψεις- κατεργασία πλασμιδιακών φορέων  | 30           |
| 2.2.5 Ενζυμικές πέψεις- κατεργασία ενθεμάτων (inserts)  | 31           |
| 2.2.6 Κατάλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών από την T4 λιγάση  | 31           |
| 2.2.7 Μετασχηματισμός επιδεκτικών (competent) βακτηρίων   | 31           |
| 2.2.7.1 Παρασκευή επιδεκτικών E.Coli  | 31           |
| 2.2.7.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών E.coli με τις πλασμιδιακές κατασκευές   | 32           |
| 2.3 Υπερέκφραση πολυπεπτιδίων   | 32           |
| 2.3.1 Υπερέκφραση ισοτοπικά μη σημασμένων πολυπεπτιδίων   | 32           |
| 2.3.2 Υπερέκφραση ισοτοπικά σημασμένων πολυπεπτιδίων  | 33           |
| 2.4 Απομόνωση πολυπεπτιδίων   | 33           |
| 2.4.1 Λύση των βακτηρίων  | 33           |
| 2.4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές  | 34           |
| 2.4.2.1 Χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου  | 34           |
| 2.4.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας αμυλόζης   | 34           |
| 2.4.3 Αποκοπή πρόσθετων –επικουρικών κατά την απομόνωση– πεπτιδικών τμημάτων με χρήση της πρωτεάσης TEV                                     | 34           |
| 2.4.4 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε gel SDS-πολυακρυλαμιδίου συστήματος διαλυμάτων Tris-γλυκίνης   | 35           |
| 2.4.5 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε gel SDS-πολυακρυλαμιδίου συστήματος διαλυμάτων Tris-Tricine  | 35           |
| 2.4.6 Διαπίδυση   | 35           |
| 2.4.7 Συμπύκνωση δειγμάτων NMR  | 36           |
| 2.5 Εκτίμηση του βαθμού ολιγομερισμού του chromodomain c2   | 36           |
| 2.5.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης   | 36           |
| 2.5.2 Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση  | 36           |
| 2.6 Φασματοσκοπικές τεχνικές  | 37           |
| 2.6.1 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)  | 37           |
| 2.6.2 Φασματοσκοπία φθορισμού πρωτεϊνών   | 38           |
| 2.6.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)  | 38           |



|   |               |
|---|---------------|
| 2.7 Ανίχνευση μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας  | 39            |
| 2.8 Ανίχνευση αλληλεπιδράσεων ακινητοποιημένου chromodomain με πειράματα συγκατακρήμνισης (pull-down assay)   | 40            |
| 2.9 Πειράματα φασματοσκοπίας μαζών (MALDI-TOF και tandem MS/MS)   | 40            |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΟΥ NMR</b>  | <b>41-51</b>  |
| 3.1 Εισαγωγή στην αρχή λειτουργίας του NMR  | 43            |
| 3.1.1 Αλληλεπίδραση πυρήνων- μαγνητικού πεδίου  | 43            |
| 3.1.2 Διέγερση και παραγωγή σήματος στο NMR   | 43            |
| 3.1.3 Αποδιέγερση   | 44            |
| 3.1.4 Μαγνητική διαφοροποίηση- Χημική μετατόπιση  | 45            |
| 3.1.5 Μαγνητικές συζεύξεις  | 46            |
| 3.2 Χρήσεις του βιομοριακού NMR   | 46            |
| 3.2.1 Χρήση του NMR για τον προσδιορισμό τριτοταγών δομών βιομορίων   | 47            |
| 3.2.2 Χρήση του NMR για το χαρακτηρισμό της δυναμικής φύσης βιομορίων   | 48            |
| 3.2.3 Χρήση του NMR για το χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων   | 48            |
| 3.2.4 Χρήση του NMR για το βιοχημικό χαρακτηρισμό πολυπεπτιδίων- Μοριακό μέγεθος και NMR  | 49            |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>   | <b>53-121</b> |
| 4.1 Απομόνωση- αρχικός βιοφυσικός χαρακτηρισμός πολυπεπτιδίων   | 55            |
| 4.1.1 Στρατηγική απομόνωσης πρωτεϊνών για δομικές μελέτες   | 55            |
| 4.1.2 Αρχικές προσπάθειες απομόνωσης του c2- αρχικά προβλήματα  | 55            |
| 4.1.3 Πιθανές αιτίες που καθιστούσαν δυσχερή την απομόνωση δείγματος NMR  | 57            |
| 4.1.4 Προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν ώστε να καταστεί δυνατή η απομόνωση δείγματος c2 συμβατού με τις απαιτήσεις προσδιορισμού τριτοταγούς δομής με NMR | 59            |
| 4.1.4.1 Χρήση αποδιατακτικών παραγόντων   | 59            |
| 4.1.4.2 Τροποποίηση παραμέτρων κατά την επαγωγή και την απομόνωση   | 61            |
| 4.1.4.3 Χρήση εναλλακτικών φορέων έκφρασης  | 62            |
| 4.1.4.4 Χρήση εναλλακτικών ενθεμάτων- νέες πλασμιδιακές κατασκευές  | 63            |
| 4.1.5 Έκφραση, απομόνωση και αρχικός χαρακτηρισμός του chromodomain c2  | 67            |
| 4.1.5.1 Απομόνωση c2 από His-GST-c2   | 67            |
| 4.1.5.1.2 Φασματοσκοπικός έλεγχος της δομικής ακεραιότητας του c2   | 68            |
| 4.1.5.1.3 Προσδιορισμός βέλτιστων βιοχημικών συνθηκών για την καταγραφή πολυδιάστατων φασμάτων NMR δειγμάτων c2   | 70            |
| 4.1.5.1.4 Αρχικές ενδείξεις ολιγομερισμού του c2  | 71            |
| 4.1.5.1.5 Δραστική επίπτωση του ολιγομερισμού δειγμάτων c2 στην ικανότητα μαγνητικών συζεύξεων “μέσω δεσμών”- φασματοσκοπία TOCSY                       | 73            |
| 4.1.5.2.1 Έκφραση His-NusA-c2, His-MBP-c2 και απομόνωση c2  | 75            |
| 4.1.5.2.2 Αρχικός χαρακτηρισμός δείγματος c2 που απομονώθηκε από His-MBP-c2 με χρήση φασματοσκοπίας NMR   | 76            |
| 4.1.5.2.3 Εκτίμηση του βαθμού ολιγομερισμού του c2 με χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης- εξάρτηση από τη συγκέντρωση                               | 77            |
| 4.1.5.3 Διερεύνηση της διάταξης πολυμερών c2- ηλεκτρονική μικροσκοπία   | 79            |
| 4.1.5.4 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ολιγομερών εναλλακτικών κατασκευών c2   | 80            |
| 4.1.5.4.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης   | 80            |
| 4.1.5.4.2 Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση  | 82            |
| 4.1.5.4.2.1 Ισορροπία φυγοκέντρου- άνωσης- τριβής   | 82            |
| 4.1.5.4.2.2 Ταχύτητα καταβύθισης  | 83            |
| 4.1.5.4.3 Φασματοσκοπία NMR   | 85            |
| 4.1.5.5 Αντίκτυπος της συγκέντρωσης δειγμάτων chromodomain c2 στο βαθμό πολυμερισμού- συμπεράσματα  | 87            |
| 4.2 Πειραματική στρατηγική για τον υπολογισμό της τριτοταγούς του EED-c2- Παρουσίαση και επεξήγηση φασμάτων NMR- Ανάλυση των επιλυμένων δομών           | 89            |
| 4.2.1 Επιλογή παρουσιαζόμενων φασμάτων  | 89            |
| 4.2.2 Πιστοποίηση αναδίπλωσης με NMR  | 89            |



|   |                |
|---|----------------|
| 4.2.3 Καταγραφή τρισδιάστατων φασμάτων με σκοπό την άρση αλληλεπικαλύψεων- Φάσματα NOE αποκαλύπτουν μαγνητικές συζεύξεις μέσω χώρου | 91             |
| 4.2.4 Αντιστοίχιση κορυφών σε πυρήνες- Μαγνητικές συζεύξεις μέσω δικτύου ομοιοπολικών δεσμών  | 94             |
| 4.2.4.1 Απόδοση κορυφών σε πυρήνες της κύριας πολυπεπτιδικής αλυσίδας πλην του H <sub>α</sub> - Φάσματα HNCa, HNCaCb                | 95             |
| 4.2.4.2 Απόδοση κορυφών σε πυρήνες αλειφατικών πλευρικών ομάδων και τον H <sub>α</sub> - Φάσμα HCCH-TOSCY                           | 97             |
| 4.2.7.3 Απόδοση κορυφών σε πυρήνες αρωματικών πλευρικών ομάδων- Φάσματα CbHd, CbHe  | 98             |
| 4.2.7.4 Πληρότητα αντιστοίχισης χημικών μετατοπίσεων σε πυρήνες- Πρόσθετη πληροφορία  | 100            |
| 4.2.8 Δυναμική συμπεριφορά κατά μήκος της κύριας πολυπεπτιδικής αλυσίδας  | 100            |
| 4.2.9 Περιορισμοί διέδρων γωνιών- TALOS   | 103            |
| 4.2.10 Μετάβαση από περιοριστικές συνθήκες στην τριτοταγή δομή  | 105            |
| 4.2.10.1 Υπολογισμός τριτοταγούς δομής  | 107            |
| 4.2.10.2 Μοριακή δυναμική- Εξευγενισμός σε νερό   | 109            |
| 4.2.11 Τριτοταγής δομή του EED-c2 σε ατομική λεπτομέρεια  | 110            |
| 4.2.11.1 “Αρωματικός κλωβός”  | 111            |
| 4.2.11.2 Ηλεκτροχημικό δυναμικό στην επιφάνεια του EED-c2- Διάταξη δραστικών ομάδων πλευρικών αλυσίδων                              | 112            |
| 4.3 Αλληλεπιδράσεις c2  | 115            |
| 4.3.1.1 Πρόδεση δίκλωνων μορίων DNA στο c2- Πειράματα ανίχνευσης μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (band- shift assays)      | 115            |
| 4.3.1.2 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης του c2 με δίκλιωνα μόρια DNA περιορισμένου μήκους   | 116            |
| 4.3.1.3 Αλληλεπίδραση ακινητοποιημένου σε στήλη c2 με δίκλιωνα DNA 31bp   | 118            |
| 4.3.2 Αλληλεπίδραση c2- ιστώνων   | 119            |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>   | <b>123-140</b> |
| 5.1 Σύντομη επισκόπηση των στόχων και των αποτελεσμάτων της πειραματικής μελέτης  | 125            |
| 5.2 Σύγκριση με chromodomain επιλυμένης δομής   | 126            |
| 5.3 Ηλεκτροχημικό δυναμικό- σύγκριση με Sac7D   | 130            |
| 5.4 Chromodomain “σε σειρά”   | 134            |
| 5.5 Ολιγομερισμός του c2  | 138            |
| 5.6 Σύνοψη  | 139            |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>   | <b>141-143</b> |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>   | <b>i-iv</b>    |
| <b>SUMMARY</b>  | <b>v-viii</b>  |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ ΤΟΥ CHROMODOMAIN c2 ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ dMi-2</b>  | <b>ix-xiv</b>  |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>   | <b>xv-xxiv</b> |



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

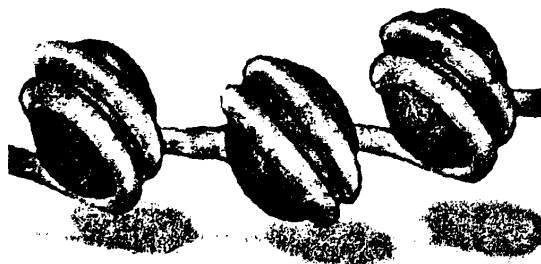
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.1. Οργάνωση της γενετικής πληροφορίας εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου

### 1.1.1 Χρωματίνη

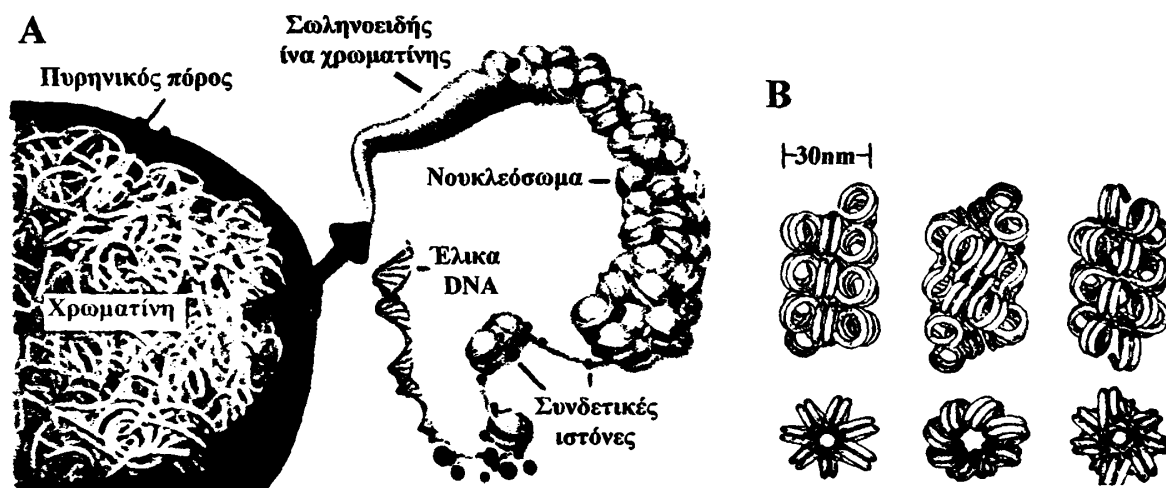
Η πηγή της γενετικής πληροφορίας ενός ευκαρυωτικού κυττάρου βρίσκεται στον πυρήνα του, όπου ενδημεί το μακρομόριο που φέρει αυτή την πληροφορία, το DNA. Όμως, όσο επιτυχής “χωροταξικά” είναι η παραπάνω απλή πρόταση, άλλο τόσο αποτυγχάνει να φωτίσει τη δυσκολία του εγχειρήματος. Γιατί πόσο εύκολα μπορεί να “διευθετήσει” το κύτταρο μια ράβδο μήκους δύο μέτρων σε ένα πυρήνα εντός του οποίου η μακρύτερη ευθεία γραμμή είναι της τάξης της μιας δεκάδας μικρομέτρων; Η χαοτική όμως διαφορά των δυο συγκρινόμενων μεγεθών συνυπάρχει με το δυσανάλογα μικρό πάχος της ράβδου του DNA σε σχέση με το μήκος της. Αφού λοιπόν η έλικα ενός δίκλωνου μορίου β-DNA έχει διάμετρο 20Å μόνο (ή αλλιώς  $2 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ ) για να χωρέσει το DNA στον πυρήνα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου αρκεί να ...“διπλωθεί”. Όμως, όσο και αν το συμπέρασμα αυτό δεν μπορεί παρά να είναι διαλεκτικά σωστό, γεννά με τη σειρά του ερωτηματικά και νέα προβλήματα, αφού υπάρχει καλός λόγος για τον οποίο το δίκλωνο μόριο του DNA παίρνει τη μορφή ράβδου. Σε αυτή τη στερεοδιάταξη, κάθε φωσφορική ομάδα απέχει τη μέγιστη δυνατή απόσταση, τόσο από την επόμενη όσο και από την προηγούμενή της, έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται και να ισορροπούν οι απωστικές δυνάμεις στην εξωτερική επιφάνεια της ράβδου. Επομένως τυχόν κάμψη του DNA θα οδηγούσε σε τοπική διαταραχή της δίκλωνης δομής του που με τη σειρά της θα συνεπαγόταν απόκλιση από την ισορροπία απώσεων που επιτυγχάνει η δομή της ράβδου. Επιπλέον αποκλίσεις θα επάγονταν και στα ιδανικά μήκη και γωνίες των υδρογονοδεσμών μεταξύ των ζευγών βάσεων στο εσωτερικό της ράβδου. Πολλαπλές τοπικές κάμψεις λοιπόν θα ήταν μη ευνοημένες ενεργειακά διαδικασίες καθώς έτσι θα αυξανόταν η εσωτερική ενέργεια του βιομορίου. Ποιά είναι λοιπόν η απάντηση της εξέλιξης σε αυτή τη “σπαζοκεφαλιά”; Με ποιά μηχανισμό επιτυγχάνεται η διευθέτηση του DNA στον πυρήνα του



Σχήμα 1.1 “Beads on a string”– η διαδοχή νουκλεοσωμάτων έχει παρομοιασθεί με «χάνδρες σε νήμα»

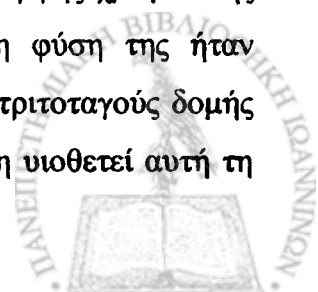
ευκαρυωτικού κυττάρου;

Όπως και στην πλειοψηφία των βιολογικών ερωτημάτων (πλην εκείνων δηλαδή όπου μόριο ή μόρια RNA καλούνται να παίζουν καταλυτικό-λειτουργικό ρόλο) η απάντηση στο συγκεκριμένο δίνεται με την επιστράτευση εξειδικευμένων πρωτεϊνών που καλούνται να χαμηλώσουν τα ενεργειακά φράγματα των εκάστοτε διεργασιών προσφέροντας εναλλακτικές ενεργειακές διαδρομές. Οι **ιστόνες** είναι οι πρωτεΐνες τις οποίες το ευκαρυωτικό κύτταρο χρησιμοποιεί για να συμπυκνώσει το δίκλωνο DNA εντός του πυρήνα του. Τα μέλη της πρωτεϊνικής αυτής ομάδας δομούνται πρωτοταγώς –ως επί το πλείστον– από αμινοξέα με θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, ιδιότητα που τα καθιστά “ηλεκτρονιακά συμπληρωματικά” του αρνητικά φορτισμένου DNA. Έτσι, η κάμψη του DNA –και άρα ο περιορισμός του μήκους του– επιτυγχάνεται με περιέλιξή του γύρω από επαναλαμβανόμενες μονάδες του πρωτεϊνικού συμπλόκου που σχηματίζουν τέσσερις ιστόνες σαν ένα νήμα που περιελίσσεται γύρω από διαδοχικούς κυλίνδρους (Σχ.1.1). Αυτό είναι και το πρώτο στάδιο μιας διαδικασίας που συμπυκνώνει το DNA σε σωληνοειδή πάχους 30 nm (Σχ.1.2) και τελικά σε δομές υψηλότερης τάξης. DNA και πρωτεΐνες αποτελούν τη **χρωματίνη**, ενώ κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα της –κάθε κύλινδρος με το περιελιγμένο “νήμα” DNA– το **νουκλεόσωμα**.



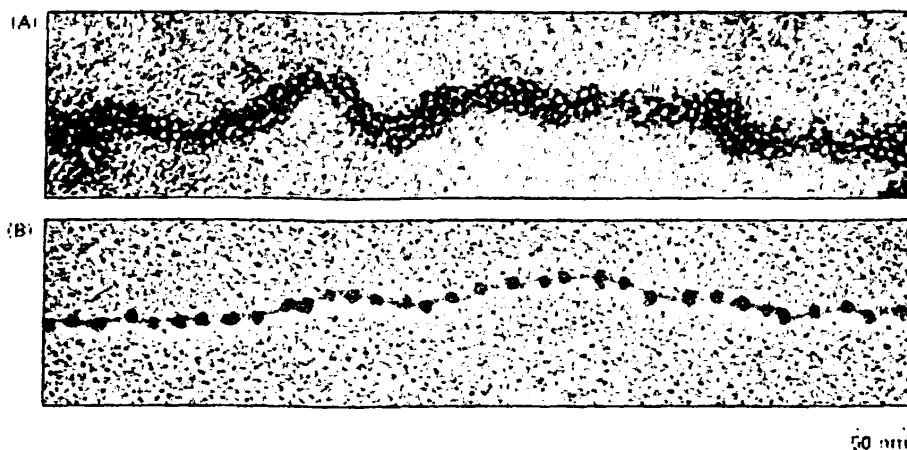
Σχήμα 1.2 (A) Η συμπύκνωση του γενετικού υλικού εντός του πυρήνα και οι υποδομές της χρωματίνης. (B) Πιθανές διατάξεις νουκλεοσωμάτων στις σωληνοειδείς ίνες χρωματίνης.

Ενώ η χαμηλής ανάλυσης εικόνα της λιγότερο συμπυκνωμένης μορφής χρωματίνης (Σχ.1.3B) στην οποία μπορούσε κανείς να δει την επαναλαμβανόμενη φύση της ήταν διαθέσιμη για αρκετό καιρό, η δημοσίευση το 1997<sup>[2]</sup> του μοντέλου της τριτοταγούς δομής του νουκλεοσώματος σε **ατομική λεπτομέρεια** εξήγησε πώς η χρωματίνη υιοθετεί αυτή τη





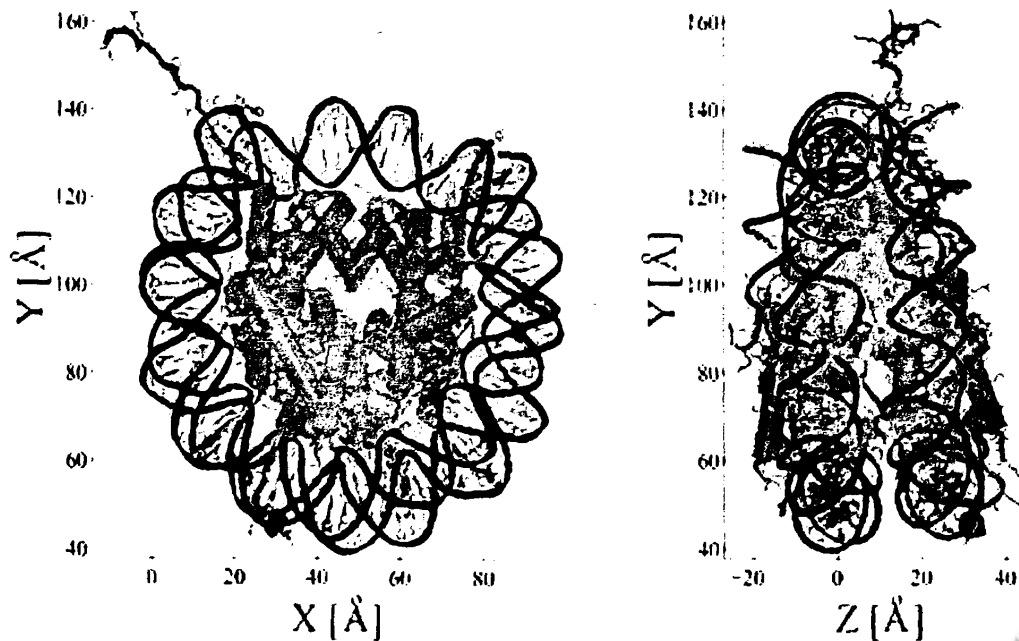
διαμόρφωση. Και ενώ ο Kornberg από το 1974<sup>[1]</sup> εισήγαγε την έννοια του νουκλεοσώματος προσπαθώντας να εξηγήσει την εικόνα των “χανδρών σε νήμα” (*beads on a string*) έπρεπε να παρέλθει εικοσαετία ώστε να ξεκαθαρίσει η “νεφελώδης” αυτή έννοια και ταυτόχρονα να υποδειχθούν νέες κατευθύνσεις προβληματισμού στον τομέα της χρωματίνης και του ελέγχου έκφρασης γονιδίων.



Σχήμα 1.3 Χρωματίνη σε δομή (A) σωληνοειδούς διαμέτρου 30nm και (B) “χανδρών σε νήμα” όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο<sup>[4]</sup>

### 1.1.2 Το νουκλεόσωμα ως επαναλαμβανόμενη δομική υπομονάδα της χρωματίνης

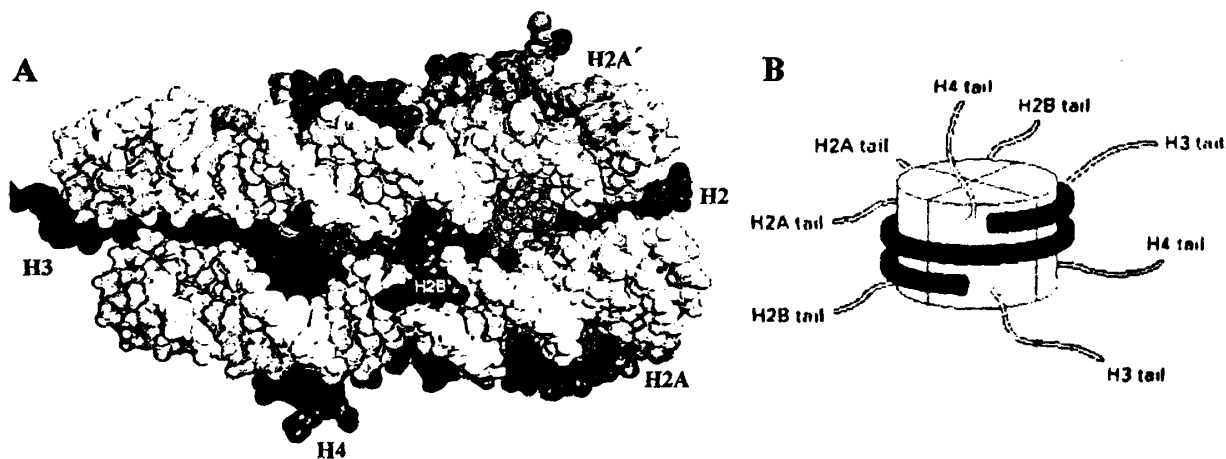
Με τη δημοσίευση της κρυσταλλικής δομής του νουκλεοσώματος (Σχ.1.4) αποκαλύφθηκαν 146 ζεύγη βάσεων που απαρτίζουν δύο σχεδόν πλήρεις περιστροφές δίκλωνου DNA γύρω



Σχήμα 1.4 Το μοντέλο της δομής του νουκλεοσώματος όπως προσδιορίστηκε με τη χρήση περίθλασης ακτίνων X. Οι ιστόνες απεικονίζονται με πράσινο χρώμα ενώ το DNA με μωβ.



από το ιστονικό σωματίδιο του νουκλεοσωμικού πυρήνα (*histone core particle*). Το οκταμερές αυτό πρωτεϊνικό σύμπλοκο συνθέτουν οι τέσσερις ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα (*core histones*), οι ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4, συνεισφέροντας η καθεμία ένα ζεύγος μορίων. Κάθε οκταμερές συντίθεται από ένα τετραμερές (διμερές διμερών) (H3-H4)<sub>2</sub> και δύο διμερή H2A-H2B. Το σχήμα του νουκλεοσώματος προσεγγίζει κύλινδρο με διάμετρο 10 και ύψος 6nm περίπου. Από το σώμα του κυλίνδρου και περνώντας δίπλα από μία ή ανάμεσα από δύο έλικες DNA “διαφεύγουν” τα αμινοτελικά τμήματα των ιστονών γνωστά και ως αμινοτελικές ουρές (*N-terminal tails*) εξ αιτίας της ευελιξίας τους που εν μέρει οφείλεται στη δομή του τυχαίου σπειράματος (*random coil*) που αυτές υιοθετούν απουσία τοπικών δευτεροταγών αλληλεπιδράσεων. Αυτός είναι και ο λόγος –η ευελιξία τους δηλαδή– για τον οποίο δεν εικονίζονται ολόκληρες, μιας και η μέθοδος της περίθλασης ακτίνων Χ αδυνατεί να οδηγήσει σε προσδιορισμό της δομής ασαφώς ορισμένων και ιδιαίτερα ευκίνητων περιοχών μορίων. Εξαιρέση αποτελούν μακρύτερα τμήματα της ουράς ενός μορίου ιστόνης H3 και λιγότερο ενός της H4 τα οποία λόγω διανουκλεοσωμικών αλληλεπιδράσεων ακινητοποιούνται στον κρύσταλλο και έτσι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα των ατόμων που τα αποτελούν μπορεί –εστιασμένη πια– να αποδοθεί σε αυτά (Σχ.1.5A). Ακόμα όμως και αν δεν “φαίνονται” ολόκληρες οι ουρές των ιστονών, παραμένει το γεγονός ότι ξεπροβάλλουν από τον πυρήνα και είναι προσιτές στην εξωτερική επιφάνεια του νουκλεοσώματος (Σχ.1.5B). Πρέπει να προστεθεί σε αυτό το σημείο ότι διαδοχικά νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό (*linker*) DNA μήκους που ποικίλλει



Σχήμα 1.5 (A) Χωροληρωτικό μοντέλο του νουκλεοσώματος<sup>[5]</sup>. Το DNA –που εδώ εικονίζεται λευκό– αφήνει ακάλυπτες τόσο τις αμινοτελικές ουρές όσο και την επιφάνεια των ιστονών που βρίσκεται στις δυο βάσεις του ‘νουκλεοσωμικού κυλίνδρου’. (B) Σχηματική παράσταση του νουκλεοσώματος όπου φαίνονται οι ‘προσιτές’ (μη καλυμμένες από το DNA) πρωτεϊνικές περιοχές<sup>[4]</sup>.



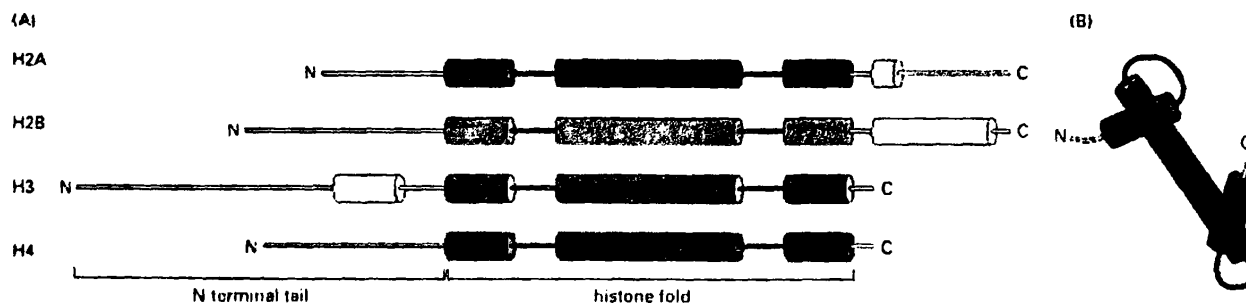
από 8 έως 14 ζευγών βάσεων ανά νουκλεόσωμα. Η συνδετική ιστόνη H1 σφραγίζει τα σημεία εισόδου και εξόδου του DNA συμμετέχοντας έτσι στο σχηματισμό χρωματινικών δομών υψηλότερης τάξης.

### 1.1.3 Δομή και οργάνωση των πυρηνικών ιστονών

|            | #αμινοξέων | M.W (kDa) | pI   | αμινοξική αλληλουχία  |
|------------|------------|-----------|------|---|
| <b>H2A</b> | 130        | 14.10     | 10.9 | SGRGKQGGKARAKSKSRSSRAGLQFPVGRIRLLR<br>KGNYAERIGAGAPVYLAADVLEYLTAEIFELAGNAS<br>RDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLGGVTVIAQGG<br>VLPNIQAVLLPKKTESHHKAQSK       |
| <b>H2B</b> | 125        | 13.82     | 10.3 | PEPSKSAPAPKKGSKKAITKAQKKDGGKRRKRSRKE<br>SYSIYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGMNSFVNDIFE<br>RIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAK<br>HAVSEGTKAVTKYTSSK           |
| <b>H3</b>  | 135        | 15.27     | 11.1 | ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGG<br>VKKPHRYRPGTVALREIRR YQKSTELLIRKLPFQRL<br>VREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACEAYLVGLFE<br>DTNLCAIHAKRVTMPKDIQLARRIRGERA |
| <b>H4</b>  | 102        | 11.24     | 11.4 | SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLKRDNIQGITKPAIR<br>RLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKVFLENVIRDAVT<br>YTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRITLYGFGG                                    |

Πίνακας 1.1 Μερικά χαρακτηριστικά των ιστονών του νουκλεοσωμικού πυρήνα του ανθρώπου

Οι τέσσερις ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα είναι σχετικά μικρές (η μεγαλύτερη –η H3– στον άνθρωπο αποτελείται από 135 αμινοξέα) βασικές, πυρηνικές πρωτεΐνες (Πιν.1.1). Δομικά, αποτελούνται από ένα κεντρικό, συντηρημένο μεταξύ των ιστονών, πυρήνα που απαρτίζεται από τρία ελικοειδή τμήματα και δύο μικρές συνδετικές θηλίες (*loops*) γνωστό ως **χαρακτηριστική αναδίπλωση των ιστονών (*histone fold*)**. Εκατέρωθεν αυτού, παρατηρούνται αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα ποικίλης έκτασης (Σχ.1.6). Οι αμινοτελικές ουρές των τεσσάρων ιστονών καθώς και το καρβοξυτελικό τμήμα της H2A δεν καλύπτονται από το DNA που περιβάλλει το πρωτεϊνικό οκταμερές και έτσι είναι



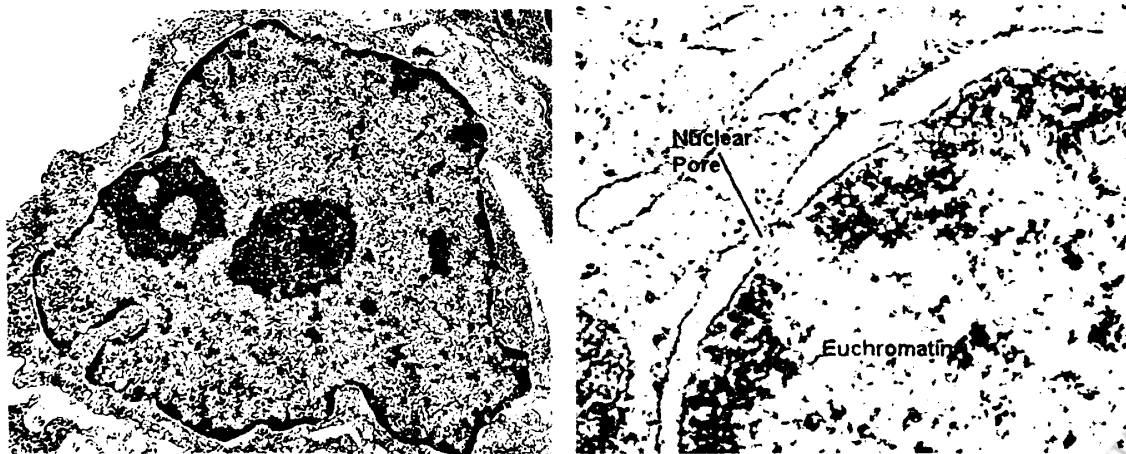
Σχήμα 1.6 (A) Απεικόνιση των τμημάτων των ιστονών του νουκλεοσωμικού πυρήνα και της δευτεροταγούς δομής τους. (B) Η χαρακτηριστική τριτοταγής δομή ιστονών (*histone fold*) όπως φαίνεται στο αντίστοιχο (ομόλογο μεταξύ των ιστονών) τμήμα της H2A<sup>[4]</sup>.



προσπελάσιμα από την εξωτερική επιφάνεια του νουκλεοσώματος. Περιορισμένες διακυμάνσεις, τόσο ως προς το μήκος, όσο και ως προς την αμινοξική αλληλουχία των ιστονικών πολυπεπτιδίων έχουν βρεθεί, ο λειτουργικός όμως ρόλος των ιστονικών αυτών ισομορφών (*histone variants*) δεν έχει χαρακτηριστεί ικανοποιητικά<sup>[12]</sup>. Πάντως, η σχετική διευθέτηση των ιστονικών ισομορφών στο πλαίσιο του νουκλεοσώματος δεν μεταβάλλεται.

## 1.2 Κατανομή επιμέρους μορφών χρωματίνης εντός του πυρήνα

Παρατηρώντας τον πυρήνα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί κανείς να δει περισσότερο και λιγότερο ηλεκτροσκοιερές περιοχές χρωματίνης (Σχ.1.7). Ήδη από τη δεκαετία του '30, ορίστηκαν δύο τύποι χρωματίνης ανάλογα με το βαθμό συμπτύκνωσης που αντανακλάται στην «πυκνότητα» που παρουσίαζαν σε μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Στις πιο σκούρες περιοχές η χρωματίνη είναι πιο συμπτύκνωμένη και ονομάζεται ετεροχρωματίνη (*heterochromatin*), ενώ αντίστοιχα στις πιο ανοιχτές βρίσκεται πιο “χαλαρή” (*relaxed*) η ευχρωματίνη (*euchromatin*). Σήμερα είναι γνωστό πως η ετεροχρωματίνη περιέχει πρόσθετες σε σχέση με την ευχρωματίνη –μη-ιστονικές– πρωτεΐνες, οι οποίες συντελούν στο σχηματισμό δομών ανώτερης τάξης από αυτή της πιο πυκνής ευχρωματινικής διάταξης, της σωληνοειδούς ίνας πάχους 30nm. Ωστόσο δεν μπορούν να περιγραφούν η δομή ή οι δομές που αυτή υιοθετεί σε μοριακό επίπεδο στο βαθμό που γίνεται για την ευχρωματίνη, καθώς και οι κυτταρικοί μηχανισμοί που τις δημιουργούν ή τις διασπούν. Η πλειοψηφία του DNA που βρίσκεται στην ετεροχρωματίνη δεν περιέχει γονίδια, ενώ πολύ μικρό ποσοστό αυτών που περιέχει είναι ενεργά<sup>[4]</sup>. Στα θηλαστικά, εκτιμάται ότι το 10% του γονιδιώματος βρίσκεται στην ετεροχρωματίνη. Η τελευταία απαντάται κοντά στην



Σχήμα 1.7 Ευκαρυωτικό κύτταρο όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (Α) Η ετεροχρωματίνη, ως πυκνότερη, διακρίνεται πιο σκουρόχρωμη από την ευχρωματίνη<sup>[6]</sup> εντός του πυρήνα. (Β) Κατανομή των δύο τύπων χρωματίνης κοντά σε πυρηνικό πόρο.

περιφέρεια του πυρήνα –με εξαίρεση τα σημεία εισόδου–εξόδου στο πυρηνόπλασμα– γύρω από τους πυρηνίσκους και σε νησίδες εντός της ευχρωματινικής “λίμνης”. Μεταγραφή γονιδίων λαμβάνει χώρα στις ευχρωματινικές περιοχές ενώ ο ρόλος της ετεροχρωματινής δεν είναι ξεκάθαρος. Παρόλο που είναι γενικά αποδεκτό ότι αποτελεί την “αποθήκη” για τη γενετική πληροφορία που δεν χρησιμοποιείται σε δεδομένο χρόνο, είναι αμφίβολο ότι ο έλεγχος της μεταγραφής είναι και ο λόγος της ύπαρξής της, αφού αποτελείται κυρίως από DNA που δεν προορίζεται για την έκφραση πρωτεϊνών. Ίσως –εν μέρει τουλάχιστο– να παίζει στηρικτικό-δομικό ρόλο ή να επικουρεί σε στόχευση λειτουργώντας ως ενδοπυρηνικό δίκτυο νησίδων αναγνώρισης.

### 1.3 Δυναμική φύση της χρωματινής

#### 1.3.1 Αναδιοργάνωση της χρωματινής

Μπορεί οι διεργασίες που οδηγούν στο σχηματισμό της ετεροχρωματινής να μην είναι ακόμα κατανοητές, δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και για την ευχρωματινή όπου βρίσκεται η συντριπτική πλειοψηφία του γονιδιώματος. Η διαθέσιμη πληροφορία αφήνει επιμέρους κενά σχετικά με τη φύση της ευχρωματινής και το μηχανισμό δημιουργίας της, οι βασικές αρχές του οποίου περιγράφηκαν παραπάνω. Όμως, ενώ ο μηχανισμός “τακτοποίησης” της γενετικής πληροφορίας εντός του πυρήνα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου είναι περίτεχνος, η συμπίεση της, την οποία αυτός επάγει ως απάντηση στο πρόβλημα του περιορισμένου ενδοπυρηνικού χώρου, οδηγεί σε νέους προβληματισμούς. Και αυτό γιατί η διαδικασία αποθήκευσης του DNA που προαναφέρθηκε περιορίζει δραστικά την εκτεθειμένη στο υδατικό περιβάλλον του πυρήνα επιφάνειά του, καθιστώντας έτσι αδύνατη την πρόσβαση ενζύμων και πρωτεϊνικών συμπλόκων προς τις αλυσίδες του στο μεγαλύτερο μέρος του μήκους τους. Συνεπώς, κάτω από αυτές τις συνθήκες, κεφαλαιώδεις λειτουργίες του κυττάρου όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η επιδιόρθωση του DNA δεν μπορούν να έλθουν σε πέρας αφού οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές μηχανές δεν έχουν πρόσβαση στο υπόστρωμά τους. Αρκεί μια δεύτερη ματιά στο σχήμα 2 για να αρχίσει να συνειδητοποιεί κανείς πως ένα μόνο νουκλεόσωμα μπορεί να εμποδίσει την έκφραση ενός γονιδίου, πόσω μάλλον περισσότερα από ένα σε ευθύγραμμη διαδοχή ή σε διάταξη σωληνοειδούς. Πώς λοιπόν το DNA δικαιολογεί τη φήμη του ως “φέρων τη γενετική πληροφορία μόριο” αν η προσβασιμότητά του είναι τόσο περιορισμένη; Μοιραία λοιπόν, και ενώ η δημιουργία της ευχρωματινής



μπορεί να εκληφθεί ως μέρος της διαδικασίας του ελέγχου της μεταγραφής<sup>17]</sup> στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η ανάγκη για συμπύκνωση του DNA προκαθορίζει τη δυνατότητα αποσυμπύκνωσής του. Το σύνολο των κυτταρικών διεργασιών που αλλάζει το βαθμό συμπύκνωσης και, ως εκ τούτου, την τοπική προσβασιμότητα της ευχρωματινής αναδεικνύοντας έτσι τη δυναμική φύση της, είναι γνωστό ως αναδιοργάνωση της χρωματινής (*chromatin remodeling*) ή αναδιοργάνωση νουκλεοσωμάτων (*nucleosome remodeling*).

### 1.3.2 Παράγοντες αναδιοργάνωσης χρωματινής

Αξίζει να τονισθεί ότι η χρωματινή έχει εγγενώς δυναμικό χαρακτήρα, που μπορεί να εκφρασθεί και απουσία οποιωνδήποτε επικουρικών παραγόντων. Έχει δείχθει ότι τα νουκλεοσώματα έχουν τη δυνατότητα να “αναπνέουν”, να εναλλάσσονται δηλαδή ταχύτατα μεταξύ διαμορφώσεων, κάποιες από τις οποίες επιτρέπουν την πρόσβαση στο DNA της μεταγραφικής μηχανής χωρίς τη συνεπικουρία κάποιου εξωγενούς παράγοντα<sup>[122]</sup>. Η δυναμική της χρωματινής εκφράζεται επίσης με τη συνεχή αντικατάσταση των ιστονών του νουκλεοσώματος, κυρίως του διμερούς H2A/H2B, και την ανταλλαγή ιστονικών ισομορφών<sup>[123]</sup>. Συχνά όμως την αναδιοργάνωση της χρωματινής αναλαμβάνουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα-μηχανές γνωστά ως παράγοντες αναδιοργάνωσης χρωματινής (*chromatin*

| Factor                 | ATPase    | ATPase Essential?       | Organism               | No. of Subunits | Comments  |
|------------------------|-----------|-------------------------|------------------------|-----------------|---|
| <b>SWI/SNF family</b>  |           |                         |                        |                 |   |
| SWI/SNF                | SWI2/SNF2 | no                      | <i>S. cerevisiae</i>   | 11              | Required for activation and repression of specific genes. Shares subunit similarities with SWI/SNF complex. <i>Drosophila</i> counterpart of yeast SWI/SNF. hSNF5/INI1 is associated with malignant rhabdoid tumors. Have tissue-specific subunit heterogeneity.  |
| RSC                    | STH1      | yes                     | <i>S. cerevisiae</i>   | 15              |   |
| Brahma                 | BRM       | yes                     | <i>D. melanogaster</i> | ≥7              |   |
| hSWI/SNF               | hBRM      | no                      | <i>H. sapiens</i>      | ~10             |   |
| hSWI/SNF               | BRG1      | yes                     | <i>H. sapiens</i>      | ~10             |   |
| <b>Mi-2/CHD family</b> |           |                         |                        |                 |   |
| Mi-2 complex           | Mi-2/CHD  | yes                     | <i>X. laevis</i>       | 6               | NuRD, NRD, NURD, and Mi-2 complex are related or identical. Complexes contain Mi-2α/CHD3 and/or Mi-2β/CHD4. Mi-2 subunit is a dermatomyositis-specific autoantigen. MTA2 subunit is related to metastasis-associated factor MTA1. HDAC1/HDAC2 subunits are histone deacetylase enzymes. Interacts directly or indirectly with methylated DNA. |
| NuRD                   | Mi-2/CHD  | (in <i>Drosophila</i> ) | <i>H. sapiens</i>      | ≥7              |   |
| <b>ISWI family</b>     |           |                         |                        |                 |   |
| ISW1                   | ISW1      | no                      | <i>S. cerevisiae</i>   | 4               | Has nucleosome disruption and spacing activities.   |
| ISW2                   | ISW2      | no                      | <i>S. cerevisiae</i>   | 2               | Has nucleosome spacing activity.  |
| NURF                   | ISWI      | ?                       | <i>D. melanogaster</i> | 4               | Disrupts nucleosomes during transcriptional activation.   |
| ACF                    | ISWI      | ?                       | <i>D. melanogaster</i> | 2               | Mediates chromatin assembly, spacing, and remodeling.   |
| CHRAC                  | ISWI      | ?                       | <i>D. melanogaster</i> | 5               | Contains topoisomerase II. Has disruption and spacing activities.   |
| RSF                    | hSNF2h    | ?                       | <i>H. sapiens</i>      | 2               | Facilitates transcription from chromatin templates.   |

"Nucleosome disruption activity" refers to the ability of the factor to increase the accessibility of a nucleosome to nucleosomal DNA. "Nucleosome spacing activity" refers to the ability of the factor to form a regularly spaced nucleosome array from randomly distributed nucleosomes. "Nucleosome remodeling activity" refers to the ability of the factor to alter the structure and/or position of a nucleosome.

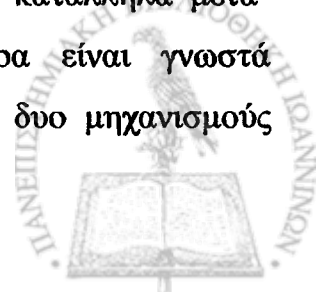
Πίνακας 1.2 Γνωστοί παράγοντες αναδιοργάνωσης χρωματινής<sup>17]</sup>.



*remodeling factors*) ή αναδιοργανωτές χρωματίνης (*chromatin remodelers*). Καθεμία από τις πρωτεΐνες που συνθέτουν τις μηχανές αυτές είναι επιφορτισμένη με έναν επιμέρους ρόλο της διαδικασίας. Αν και ο τελευταίος δεν είναι πάντα ξεκαθαρισμένος, είναι γνωστό ότι κάποιες είναι απολύτως απαραίτητες, ενώ άλλες βελτιστοποιούν μια διαδικασία που μπορεί να έρθει σε πέρας και χωρίς τη συνδρομή τους. Ανάλογα με τον αριθμό των επιμέρους πρωτεϊνικών συστατικών αυτών των συμπλόκων, το μοριακό τους βάρος μπορεί να ξεπερνά και το 1MDa, γεγονός που υποδηλώνει το πλήθος, αλλά και την πολυπλοκότητα των επιμέρους διεργασιών που πρέπει να συντελεσθούν προκειμένου να αλλάξει τοπικά η προσβασιμότητα της χρωματίνης (*Hiv1.2*).

Ποιές είναι όμως οι συνέπειες για τα νουκλεοσώματα της αναδιοργάνωσης που επιφέρουν αυτοί οι παράγοντες; Ας σκεφτούμε την περίπτωση που η έκφραση ενός γονιδίου παρεμποδίζεται από μια σειρά διαδοχικών νουκλεοσωμάτων που με τη φυσική τους παρουσία και μόνο καθιστούν μη προσιτό στην RNA πολυμεράση μέρος του DNA του συγκεκριμένου γονιδίου, ενώ την ίδια στιγμή απαγορεύουν το άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA. Με δεδομένο ότι η έκφραση αυτού του γονιδίου έχει “εγκριθεί” από τους αρμόδιους κυτταρικούς μηχανισμούς ελέγχου της μεταγραφής, το μόνο που μένει είναι να υπερκεραστεί η παρεμπόδιση που συνεπάγεται η παρουσία των νουκλεοσωμάτων. Αυτή την παρεμπόδιση καλούνται να άρουν οι παράγοντες αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. Η αναδιοργάνωση σε αυτή την περίπτωση λοιπόν συνεπάγεται μια αρχική διαταραχή (χαλάρωση) της δομής των νουκλεοσωμάτων, η οποία μπορεί να οδηγήσει είτε σε διάσπαση είτε σε μετακίνηση τους πάνω στο “νήμα” του DNA, έτσι ώστε να εκτεθεί η “κρυμμένη” περιοχή DNA. Αντίστοιχες αρχές εφαρμόζονται και στην αντίστροφη περίπτωση, όταν δηλαδή ένα τμήμα DNA χρειάζεται να υιοθετήσει μια πιο συμπυκνωμένη διαμόρφωση είτε για περιορισμό του χώρου που καταλαμβάνει (αποθήκευση) είτε για καταστολή της μεταγραφής του<sup>[7]</sup>.

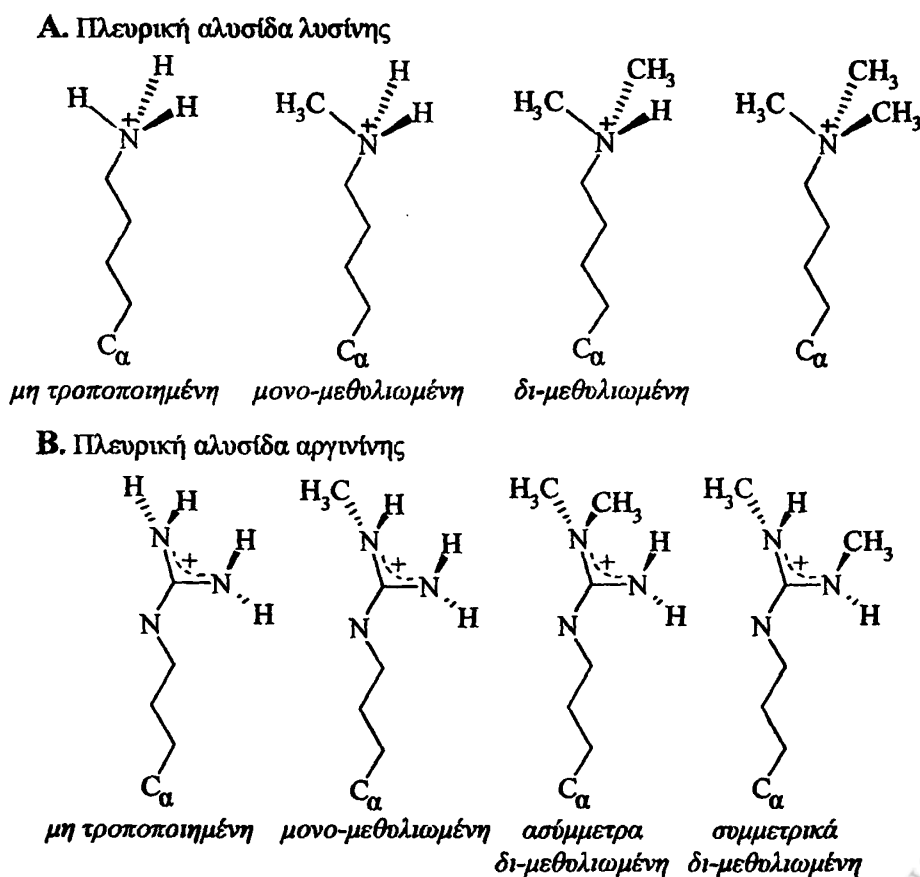
Όμως, με ποιους μηχανισμούς δρουν οι πρωτεϊνικές αυτές μηχανές; Πώς επιτυγχάνουν τη μετακίνηση ή τη διάσπαση νουκλεοσωμάτων; Αρχικά είχαν προταθεί δύο **αμοιβαία αποκλειόμενοι** μηχανισμοί. Σύμφωνα με τη μέχρι πρότινος επικρατούσα άποψη, κάποιιοι παράγοντες αναδιοργάνωσης της χρωματίνης δρουν χρησιμοποιώντας την εκλυόμενη ενέργεια από την υδρόλυση του ATP, ενώ άλλοι αλληλεπιδρώντας με κατάλληλα μεταμεταφραστικά τροποποιημένες εκτεθειμένες ιστονικές ουρές. Σήμερα είναι γνωστά παραδείγματα αναδιοργανωτών χρωματίνης οι οποίοι συνδυάζουν τους δυο μηχανισμούς



φιλοξενώντας ένζυμα που ανήκουν σε καθεμιά από τις δύο κατηγορίες ή ταυτόχρονα και στις δύο<sup>[124]</sup>.

#### 1.4 Υπόθεση του κώδικα των ιστονών

Ο συζευγμένος με την υδρόλυση του ATP μηχανισμός κατάλυσης είναι γνωστός και καλά χαρακτηρισμένος, μια και απαντάται σε πολλές βιολογικές διεργασίες, αφήνοντας μόνο μερικά επιμέρους μηχανιστικά ερωτήματα προς διαλεύκανση κατά περίπτωση. Αντίθετα, η ύπαρξη ενός μηχανισμού χρωματινικής αναδιοργάνωσης βασισμένου σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις νουκλεοσωμικών πρωτεϊνών εμφανιζόταν ιδιαίτερα καινοφανής και “γοητευτική”. Η δυνατότητα μάλιστα ποικιλίας συνδυασμών τροποποιήσεων, καθώς και η αρχική συσχέτιση κάποιων εξ αυτών με μεταγραφική καταστολή ή ενεργοποίηση, οδήγησε γρήγορα στην ιδέα της ύπαρξης ενός κώδικα που “εγγράφεται” πάνω στα εκτεθειμένα αμινοτελικά τμήματα των ιστονών ενός νουκλεοσώματος και καθορίζει την προσβασιμότητα (και άρα τη χρήση) σε δεδομένο χρόνο του αντίστοιχου τμήματος DNA. Η θεωρία του



**Σχήμα 1.8** Γνωστές, βιολογικά υπαρκτές μορφές μεθυλίωσης πλευρικών αμινομάδων καταλοίπων (A) λυσίνης και (B) αργινίνης





ιστονικού κώδικα (*histone code*)<sup>[8]</sup> αναπτύχθηκε για να εξηγήσει τη σημασία συνδυασμών τροποποιήσεων δραστικών ομάδων πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων που συνέθεταν τις αμινοτελικές ουρές των τεσσάρων ιστονών του νουκλεοσωμικού πυρήνα. Άλλωστε ήταν ήδη γνωστά εξειδικευμένα ένζυμα που καταλύουν μόνο- δι- και τρι- μεθυλίωση πλευρικής αμινομάδας λυσίνης, μονομεθυλίωση, συμμετρική και ασύμμετρη διμεθυλίωση της γουανιδινικής ομάδας αργινίνης (Σχ.1.8), ακετυλίωση πλευρικής αμινομάδας λυσίνης, φωσφορυλίωση της υδροξυλομάδας καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης, οι οποίες ήταν μερικές μόνο από τις αρχικά διαθέσιμες τροποποιήσεις στη “φαρέτρα” του κώδικα. Έτσι οι πρώτες συσχετίσεις τροποποιήσεων ή απλών συνδυασμών τροποποιήσεων και μεταγραφικής ενεργότητας άρχισαν να διαμορφώνουν τον κώδικα<sup>[9]</sup>, ο οποίος έμελλε να συμπληρώνεται τα επόμενα χρόνια με ζέση (Σχ.1.9).

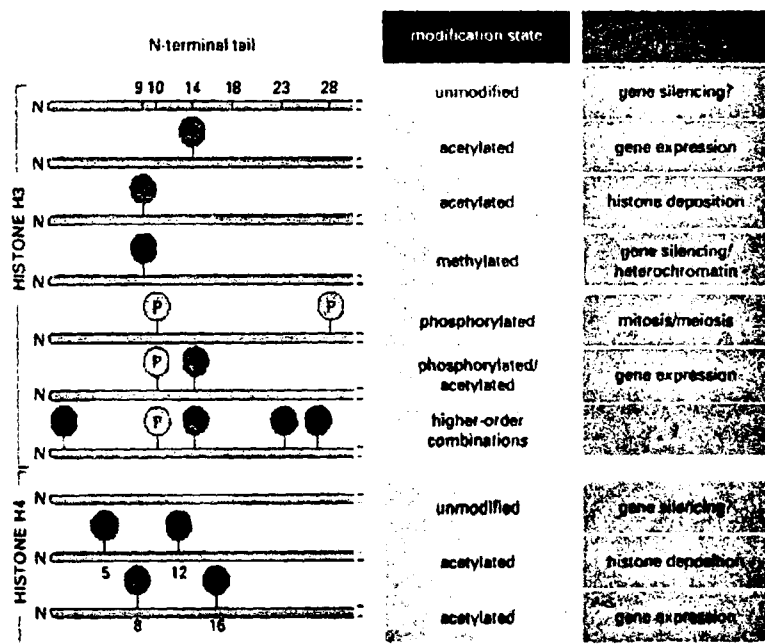
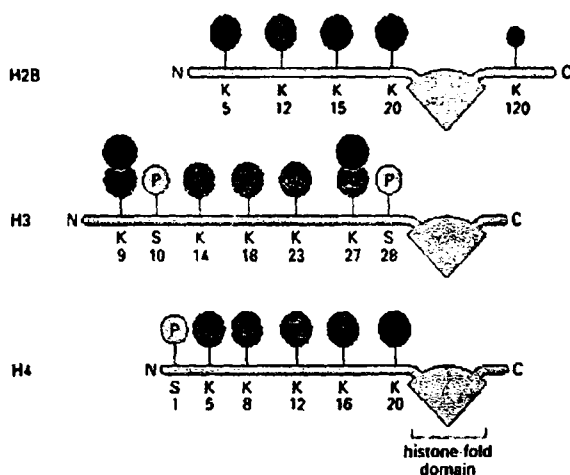
Τελευταία άρχισε να διαφαίνεται ότι η πραγματικότητα δεν είναι τόσο “απλή”. Αρκεί κανείς να σκεφτεί ότι σε κάθε νουκλεόσωμα υπάρχουν οκτώ ιστόνες, περισσότερες της μίας θέσεις τροποποίησης ανά ιστονική ουρά, και περισσότερα του ενός νουκλεοσώματα ανά γονίδιο ώστε να αντιληφθεί την υπεραπλουστευμένη φύση της ερμηνείας που επιχειρείτο. Η κατάσταση περιπλέκεται περαιτέρω με βάση ορισμένα νεότερα δεδομένα, αλλά και μια κριτικότερη αντιμετώπιση των βιβλιογραφικών αποτελεσμάτων, που μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

- i) Η χρήση αντισωμάτων “ειδικών” έναντι κάποιας τροποποίησης δεν μπορεί να αποκλείσει την ταυτόχρονη ύπαρξη κάποιας άλλης τροποποίησης (και άρα διαφορετικό συνδυασμό) σε παρακείμενο αμινοξύ της ίδιας ή άλλης ιστονικής ουράς του ίδιου νουκλεοσώματος, πόσω μάλλον παρακείμενου νουκλεοσώματος.
- ii) Σε κάθε νουκλεόσωμα επαναλαμβάνονται σε δύο “αντίγραφα” τέσσερις ιστόνες. Με τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους δεν μπορούσε να δειχθεί ότι **αμφότερα τα μόρια** καθεμίας από τις τέσσερις ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα ενός νουκλεοσώματος εμφάνιζαν τον ίδιο συνδυασμό μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων.
- iii) Συμπεράσματα που εξάγονται από συγκεκριμένη κυτταρική σειρά συγκεκριμένου οργανισμού δεν είναι απαραίτητο να έχουν γενικότερη ισχύ.



iv) Θέσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων<sup>[10]</sup> και αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες που “αποδεδειγμένα” χαρακτηρίζουν κάποια μορφή χρωματίνης (π.χ ετεροχρωματίνη)<sup>[11]</sup> έχουν εντοπισθεί όχι μόνο στις ιστονικές ουρές, αλλά και στο κεντρικό τμήμα των ιστονών.

Μοιραία λοιπόν, την εμφάνισή τους στη βιβλιογραφία άρχισαν να κάνουν μελέτες, των οποίων τα συμπεράσματα έρχονταν σε αντιδιαστολή με τον κώδικα έτσι όπως αυτός έως τότε διαμορφωνόταν<sup>[12,13]</sup>. Αν και το σχετικό πεδίο έρευνας γνωρίζει εξαιρετική άνθιση και εξακολουθεί να προσελκύει έντονο ενδιαφέρον, την αρχική “φρενήρη” δημοσιοποίηση ερμηνειών του κώδικα των ιστονών έχει πρόσφατα διαδεχθεί ένας σκεπτικισμός όσον αφορά



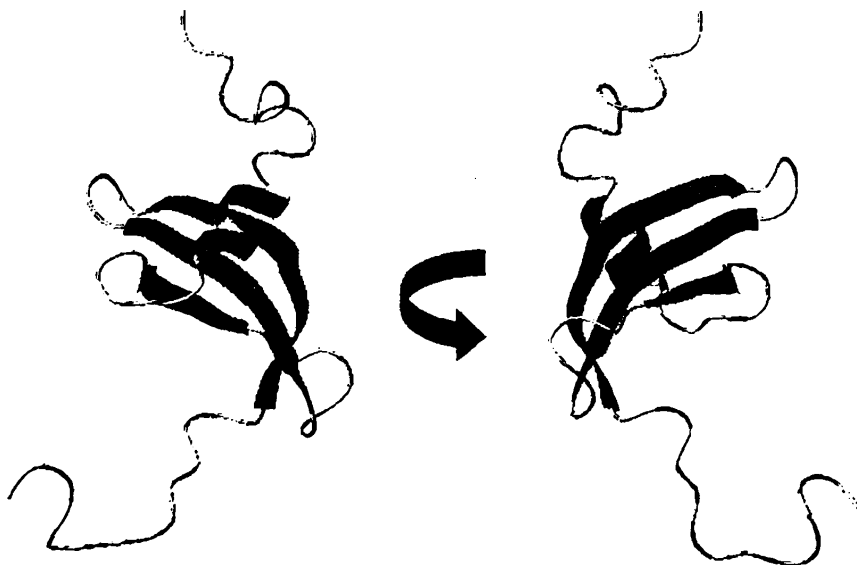
Σχήμα 1.9 Σχηματική παράσταση μερικών τροποποιήσεων που έχουν βρεθεί σε τρεις από τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος καθώς και μερικών από τα προβλεπόμενα από τον ιστονικό κώδικα για τις H3 και H4<sup>[4]</sup>.



τη θεωρία αυτή<sup>[125-128]</sup>. Έτσι σήμερα πολλοί μελετητές αναφέρονται σε “υπόθεση” του κώδικα των ιστονών, ίσως όχι γιατί αποκλείουν την πιθανότητα να υπάρχει, αλλά γιατί η πιστοποίηση της ύπαρξής του είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την “αποκωδικοποίηση” των συστατικών αρχών ενός τέτοιου κώδικα.

### 1.5.1 Επιμέρους δομικές περιοχές που εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης- το chromodomain και ο ρόλος του

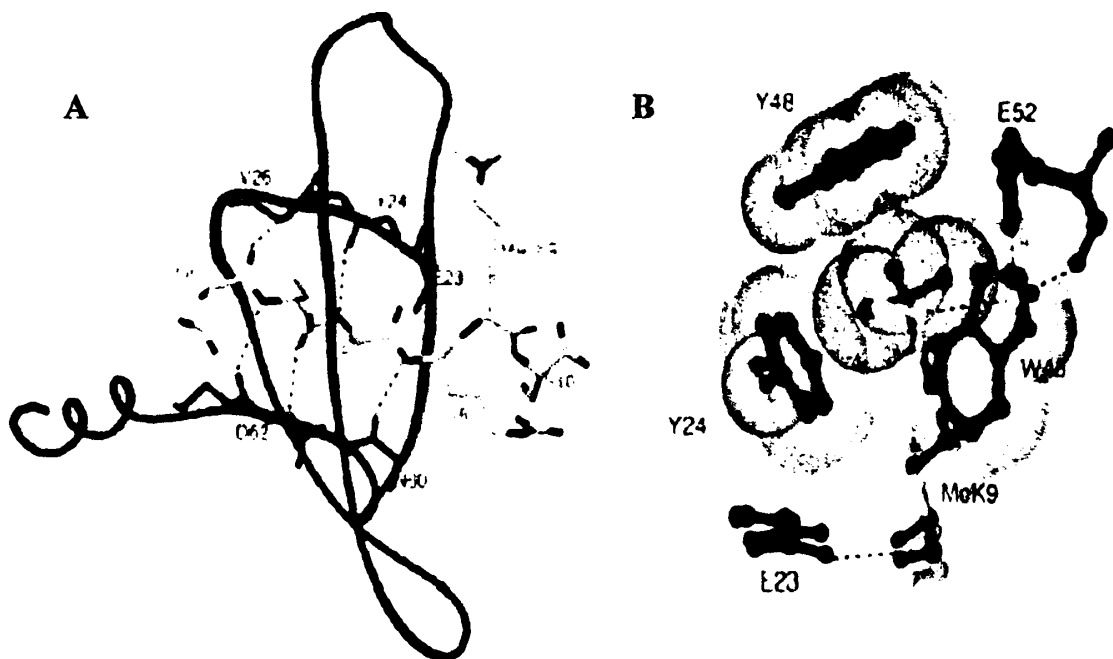
Πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αναδιοργανωτές χρωματίνης ή που σχετίζονται με κάποιο τρόπο με τη χρωματίνη, φιλοξενούν, μεταξύ άλλων<sup>[14]</sup>, εντός της αμινοξικής αλληλουχίας τους τουλάχιστον ένα αυτόνομο –δομικά και λειτουργικά– πεπτιδικό τμήμα γνωστό ως χρωμοπεριοχή (*chromodomain*). Πάνω από 400 τέτοιες πρωτεϊνικές περιοχές έχουν ταυτοποιηθεί σήμερα σε διάφορους οργανισμούς. Παρά το μικρό του μέγεθος (περίπου 55 αμινοξέα –6.5kDa– ενώ μπορεί να είναι και λίγο μεγαλύτερο κατά περίπτωση) το chromodomain θεωρείται ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Αυτό είναι εμφανές από το ακρωνύμιο –πρώτο συνθετικό του ονόματός του– το οποίο συντέμνει τη φράση: “τροποποιητής της χρωματινικής οργάνωσης” (*CHR*omat*in* *OR*ganization *MO*difier). Το 1997, με χρήση φασματοσκοπίας NMR, δημοσιεύθηκε σε ατομική λεπτομέρεια η τριτοταγής δομή του καλύτερα χαρακτηρισμένου εκπροσώπου<sup>[15]</sup> της πρωτεϊνικής αυτής οικογένειας, του chromodomain της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης 1 ή **HP1** (*Heterochromatin Protein 1*). Η δευτεροταγής δομή του αποτελείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια (*β-sheet*) τριών κλώνων (*strands*) και μια καρβοξυτελική έλικα. Η β-



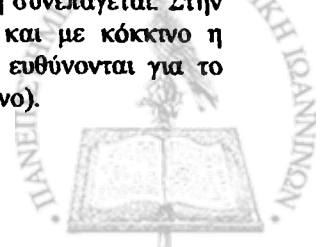
Σχήμα 1.10 Η τριτοταγής δομή του chromodomain της HP1<sup>β</sup> ποντικού (M31)<sup>[15]</sup>.

πτυχωτή επιφάνεια αποκλίνει από την επιπεδότητα και προς το κοίλο της μέρος βρίσκεται η έλικα, ο κύριος άξονας της οποίας είναι κατά προσέγγιση κάθετος προς τις διευθύνσεις των κλώνων (Σχ.1.10).

Η HP1<sup>β</sup>, μία από τις τρεις ταυτοποιημένες ισομορφές της HP1 ομόλογη της M31 ποντικού, θεωρείται ότι συμβάλλει καθοριστικά στο σχηματισμό της ετεροχρωματινής και συνεπώς χαρακτηριστική για τον τύπο αυτό χρωματινής. Αρχικά, αυτό θεωρείτο ότι ίσχυε για όλες τις ισομορφές της HP1, εξ ου και η ονομασία-ομπρέλα. Προοδευτικά, την εμφάνισή τους στη βιβλιογραφία έκαναν αναφορές που αμφισβητούσαν τον αμιγή ετεροχρωματινικό ενδοπυρηνικό εντοπισμό του συνόλου των ισομορφών, όπως για παράδειγμα της HP1<sup>γ</sup><sup>[12,16-19]</sup>. Ακόμα και έτσι όμως, ο χρωματινικός εντοπισμός της HP1 θεωρείται ότι καθορίζεται από το chromodomain της. Γιατί ενώ την HP1 καρβοξυτελικά του chromodomain συμπληρώνει μία παρόμοια σε μέγεθος και δομή πεπτιδική περιοχή, γνωστή ως “συνοδός του chromodomain περιοχή” (*chromoshadow domain*), μόνο το chromodomain έχει δείχθει να αλληλεπιδρά άμεσα με κάποιο από τα χρωματινικά συστατικά. Αντιθέτως το chromoshadow domain θεωρείται ότι ευθύνεται για το διμερισμό της HP1 και για την αλληλεπίδραση με



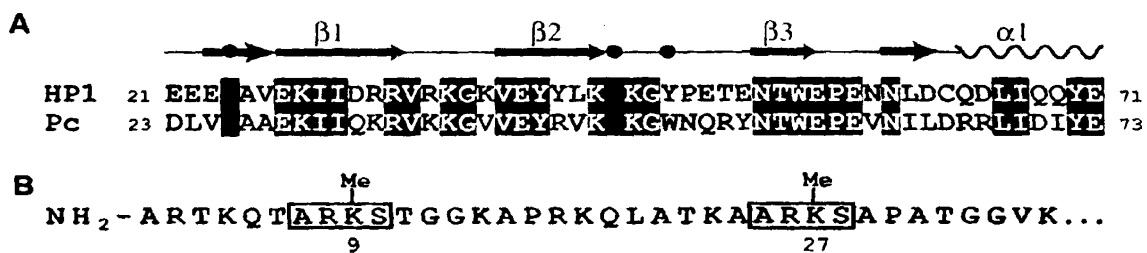
Σχήμα 1.11 (Α) Τριτοταγής δομή σε ατομική λεπτομέρεια του συμπλόκου που σχηματίζει το chromodomain της HP1 από *Drosophila melanogaster* με το πεπτίδιο ARTKQ(TARK)<sup>Me2</sup>-STGGKAY που αντιστοιχεί στα πρώτα 16 αμινοξέα της ιστόνης H3 με διμεθυλίωση στη λυσίνη 9. (Β) Λεπτομέρεια στην οποία φαίνεται η διάταξη των αρωματικών αμινοξέων Y24, W45, Y48 του chromodomain και ο εγκλωβισμός των μεθυλομάδων της πλαϊνής αλυσίδας της λυσίνης 9 της H3 που αυτή συνεπάγεται. Στην αλληλεπικάλυψη διακρίνεται με κίτρινο η διμεθυλωμένη εκδοχή του πεπτιδίου και με κόκκινο η τριμεθυλωμένη<sup>[20]</sup>. Με στικτές γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου που ευθύνονται για το σχηματισμό της επαγόμενης από την αλληλεπίδραση β-πτυχωτής επιφάνειας (βλ. κείμενο).



πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χρωματίνη αλλά όχι απ' ευθείας με αυτή<sup>[88,89]</sup>.

Η ιστόνη H3, και πιο συγκεκριμένα ένα τμήμα της αμινοτελικής ουράς της που φέρει μετα-μεταφραστική τροποποίηση, είναι το χρωματινικό στοιχείο που αναγνωρίζει το chromodomain της HP1. Η τροποποίηση αυτή είναι μεθυλίωση της πλευρικής αμινομάδας της λυσίνης στη θέση 9 επί της H3. Ο βαθμός μάλιστα της μεθυλίωσης είναι ανάλογος του βαθμού συγγένειας των δύο αλληλεπιδρώντων μορίων *in vitro*<sup>[20]</sup>. Έτσι ολιγοπεπτίδιο που αντιστοιχεί στην αμινοτελική ουρά της H3 με μεθυλωμένη την πλευρική αμινομάδα της λυσίνης 9 προσδέεται ισχυρότερα στο chromodomain της HP1 αν φέρει τρεις μεθυλομάδες αντί για δύο και δύο αντί για μία.

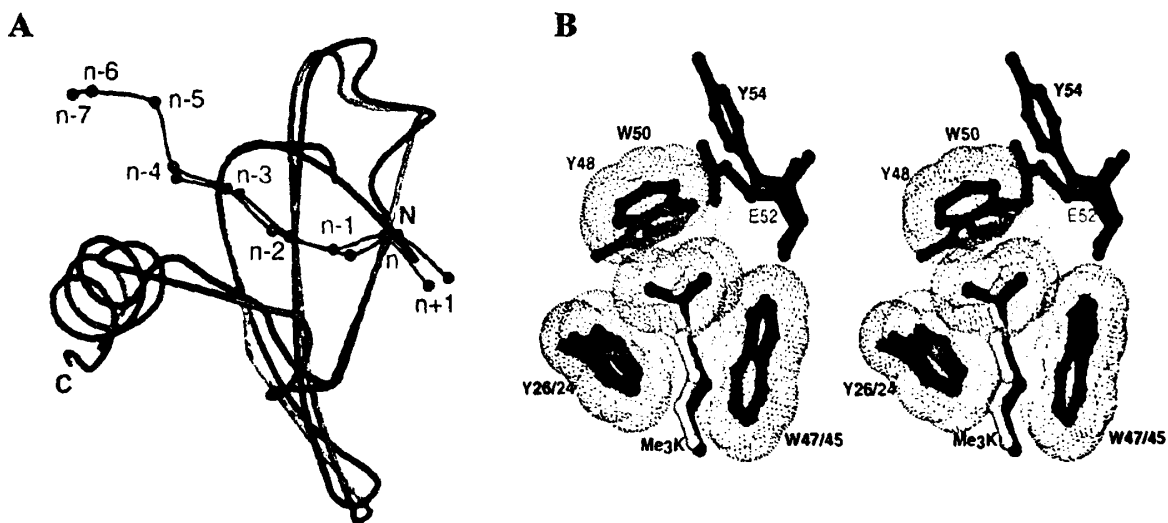
Η εξήγηση για αυτή τη διαφοροποίηση στη συγγένεια δόθηκε με την επίλυση της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια του συμπλόκου του chromodomain της HP1 με ολιγοπεπτίδιο που αντιστοιχεί στην ουρά της ιστόνης H3 μεθυλωμένης στην λυσίνη 9<sup>[20,21]</sup> και αποτελεί το “σήμα κατατεθέν” της αλληλεπίδρασης. Δύο κατάλοιπα τυροσίνης και ένα τρυπτοφάνης που ανήκουν στο chromodomain της HP1 διατάσσουν τις πλευρικές αλυσίδες τους έτσι ώστε να σχηματίσουν έναν “αρωματικό κλωβό” (*aromatic cage*) εντός του οποίου δυνάμεις van der Waals σταθεροποιούν τις ογκώδεις N<sup>ε</sup>-μεθυλομάδες του ιστονικού πεπτιδίου (Σχ.1.11B). Πρόσφατα, η κινούσα δύναμη για την πρόσδεση αυτή αποδόθηκε σε ισχυρή αλληλεπίδραση κατιοντικής ομάδας (απο τη λυσίνη 9 της H3) με το π-σύστημα του αρωματικού δακτυλίου της Trp45 του chromodomain<sup>[129]</sup>. Επιπλέον, η κύρια αλυσίδα της ιστονικής ουράς συμμετέχει στο σχηματισμό μιας νέας, επαγόμενης από την αλληλεπίδραση, αντιπαράλληλης β- πτυχωτής επιφάνειας τριών κλώνων συνεισφέροντας τον μεσαίο εξ αυτών. Εκατέρωθεν αυτού, μη δομημένα στο ελεύθερο chromodomain τμήματα σχηματίζουν τους άλλους δύο κλώνους της “υβριδικής” αυτής β- πτυχωτής επιφάνειας στο σύμπλοκο



Σχήμα 1.12 (A) Στοιχισή πρωτοταγούς αλληλουχίας των chromodomain από τις πρωτεΐνες HP1 και polycomb από *Drosophila*. Με κόκκινους κύκλους επισημαίνονται τα αμινοξέα του αρωματικού κλωβού ενώ με μπλε τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής το σχηματισμό των οποίων επάγει η πρόσδεση της πεπτιδικής ουράς της H3. (B) Η πρωτοταγής αλληλουχία της ουράς της H3. Εντός κόκκινου παραλληλογράμμου τα αμινοξέα που πλαισιώνουν τα κατάλοιπα λυσίνης επί των δύο θέσεων τροποποίησης<sup>[22]</sup>.

(Σχ.1.11A). Αλληλεπιδράσεις πλευρικών ομάδων αμινοξέων που προηγούνται της λυσίνης 9 στη γραμμική αλληλουχία του πεπτιδίου με το chromodomain της HP1 συμπληρώνουν την εικόνα της πρόσδεσης αποδίδοντας ειδικότητα ως προς την H3 αλλά και τη συγκεκριμένη θέση τροποποίησης.

Τα ευρήματα που προέκυψαν από την ανάλυση της δομής του συμπλόκου του chromodomain της HP1 με την μεθυλιωμένη στη λυσίνη 9 ουρά της H3 αποκάλυψαν βασικά χαρακτηριστικά του μηχανισμού πρόσδεσης που δεν άργησαν να γενικευθούν σε μια ολόκληρη τάξη αφού επαληθεύθηκαν και για άλλες περιπτώσεις chromodomain προερχόμενων από διάφορες πρωτεΐνες ποικιλίας οργανισμών όπως αυτού της πρωτεΐνης της *Drosophila melanogaster* **Polycomb (Pc)**. Η ομολογία του με αυτό της HP1 είναι πολύ υψηλή και, ενώ αναγνωρίζει τροποποίηση σε διαφορετική θέση επί της H3 (μεθυλίωση στη λυσίνη 27), εν τούτοις τα γειτνιάζοντα με τη θέση της τροποποίησης αμινοξέα της H3 είναι τα ίδια και στις δύο περιπτώσεις (Σχ.1.12). Οι ομοιότητες αυτές αντικατοπτρίζονται και στις δομές των δύο συμπλόκων των οποίων οι πολυπεπτιδικοί κορμοί (*C<sub>α</sub>-trace*) αλληλεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό (Σχ.1.13A). Όμοια διάταξη εμφανίζουν και τα αρωματικά αμινοξέα που σχηματίζουν τους δύο “αρωματικούς κλωβούς” εντός των οποίων βρίσκονται οι *N<sup>ε</sup>*- μεθυλικές ομάδες των μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων λυσινών παρά το γεγονός ότι τη θέση μίας εκ των τυροσινών του chromodomain της HP1 καταλαμβάνει



**Σχήμα 1.13** (A) Απεικόνιση της αλληλεπικάλυψης των κύριων αλυσίδων των συμπλόκων των chromodomain των πρωτεϊνών Polycomb (καφέ) και HP1 (μπλε) με τα τριμεθυλιωμένα πεπτιδία  $APRKQLATKAARK^{Me3}SAPST$  και  $ARTKQTARK^{Me3}STGGKAY$  που αντιπροσωπεύουν την ουρά της H3 τροποποιημένη στις θέσεις 27 και 9 αντίστοιχα. (B) Στερεοδιάγραμμα αλληλεπικάλυψης των αρωματικών κλωβών και των εγκλωβιζόμενων σε αυτούς πλευρικών αλυσίδων των μέθυλ-λυσινών. Τα κατάλοιπα της Pc διακρίνονται με μπλε ενώ της HP1 με πράσινο. Η μέθυλ-λυσίνη 9 με κίτρινο ενώ η 27 με κόκκινο<sup>[22]</sup>.

κατάλοιπο τρυπτοφάνης στην αλληλουχία αυτού της Polycomb (Σχ.1.13B).

### 1.5.2 Chromodomain που φέρονται να διαφοροποιούνται λειτουργικά

Η επίλυση των δομών των συμπλόκων chromodomain με μεθυλιωμένες ιστονικές ουρές χρησιμοποιώντας περίθλαση ακτίνων X ή φασματοσκοπία NMR, έριξε φως στο μηχανισμό αναγνώρισης μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων επί των ιστονών από μέλη χρωματινικών αναδιοργανωτών προωθώντας έτσι σημαντικά την κατανόηση στο πεδίο της χρωματίνης και κατήυθνε στο εξής εν πολλοίς την ερευνητική σκέψη. Την ίδια στιγμή όμως, ενίσχυσε περαιτέρω την ήδη επικρατούσα αντίληψη σχετικά με το ρόλο των chromodomain στην χρωματινική οργάνωση. Έτσι κατέστη γενικώς αποδεκτό ότι οι εκπρόσωποι αυτής της τάξης πρωτεϊνικών περιοχών συλλήβδην είναι σε θέση να “διαβάζουν” τον ιστονικό κώδικα αναγνωρίζοντας μεθυλιώσεις πλευρικών ομάδων λυσινών στην αλληλουχία ιστονικών ουρών (η αντίληψη αυτή μάλιστα επεκτάθηκε και στην πιθανή λειτουργία άλλων domain όπως τα Tudor, PHD, PWWP, WDR5 χωρίς εξίσου ισχυρή βάση). Και ενώ αυτή η δυνατότητα πρόσδεσης τροποποιημένων ιστονών ήταν πλέον καλά θεμελιωμένη για μερικά μέλη της οικογένειας των chromodomain, στη βιβλιογραφία υπήρξαν αναφορές που προσέδιδαν σε κάποια άλλα έναν διαφορετικό ρόλο. Αν και απομονωμένες, οι αναφορές αυτές για πρώτη φορά ενέπλεκαν chromodomain στην αναγνώριση μη ιστονικών χρωματινικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, το chromodomain της πρωτεΐνης MOF από *Drosophila melanogaster* ενεπλάκη στην αναγνώριση των μη κωδικοποιών RNA *roX1* και *roX2* που καλύπτουν το ανενεργό X χρωμόσωμα<sup>[24]</sup>, ενώ το ένα εκ των δύο chromodomain της dMi-2 από *Drosophila*



Σχήμα 1.14 Στερεοδιάγραμμα της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια του “χρωμοβαρελίου” (*chromobarrel*) της πρωτεΐνης της μύγας (*Drosophila melanogaster*) MOF όπως επιλύθηκε με χρήση φασματοσκοπίας NMR.

melanogaster στην απ' ευθείας αναγνώριση νουκλεοσωμικού DNA<sup>[23]</sup>. Πρόσφατα δείχθηκε ότι το "chromodomain" της MOF εσφαλμένα κατηγοριοποιήθηκε ως τέτοιο, με βάση περιορισμένη ομολογία σε στοίχιση πρωτοταγούς αλληλουχίας με αυτά των HP1 και Pc, μιας και δεν υιοθετεί την χαρακτηριστική τριτοταγή διαμόρφωση (Σχ.1.14), ενώ δεν κατέστη δυνατή η επιβεβαίωση της πρόσδεσης RNA<sup>[25]</sup>. Έτσι, ένας μόνο εκπρόσωπος της οικογένειας των chromodomain εξακολουθεί να διαφοροποιείται ως προς το χρωματινικό συστατικό που πιθανότατα αναγνωρίζει και να ενέχεται σε πρόσδεση νουκλεϊκού οξέος.

### 1.6 Σύντομη περιγραφή του ρόλου και της δομικής οργάνωσης της dMi-2

Η dMi-2, η πρωτεΐνη στην οποία την αλληλουχία συμπεριλαμβάνεται το chromodomain που πιθανόν να ενέχεται σε πρόσδεση DNA, πήρε το όνομά της από την ομόλογη ανθρώπινη Mi-2β. Είναι μέλος της οικογένειας *χρωματινικών ελικασών/ΑΤΡασών προσδετών DNA ή CHD family (Chromo-Helicase/ATPase- DNA binding family)* και φαίνεται να εμπλέκεται στη μεταγραφική καταστολή ομοιωτικών γονιδίων, στη διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων και στην ομαλή ανάπτυξη εμβρύων *Drosophila*<sup>[130-133]</sup>. In vivo, λειτουργεί ως υπομονάδα του πρωτεϊνικού συμπλόκου της dMi-2. Το σύμπλοκο αυτό –το αντίστοιχο του οποίου στα θηλαστικά ονομάζεται σύμπλοκο αναδιοργάνωσης νουκλεοσωμάτων και απο-ακετυλίωσης NuRD (*Nucleosome Remodeling and De-acetylation*)– εκτελεί και τις δύο αυτές διεργασίες, δηλαδή αναδιοργάνωση χρωματίνης και απο-ακετυλίωση ιστονών. Η dMi-2 αποτελεί βασικό συστατικό του –άλλωστε δίνει το όνομά της στο σύνολο– συντίθεται από 1982 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος ίσο με περίπου 218kDa και επιτελεί τη διεργασία της χρωματινικής αναδιοργάνωσης μέσω σύζευξής της με υδρόλυση ATP<sup>[23]</sup>. In vitro, αυτό επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση νουκλεοσωμάτων κατά μήκος της αλυσίδας DNA ώστε να μεταβάλλονται τα εκτεθειμένα τμήματά του<sup>[23]</sup>. Εκτός από την, κεντρική στην αμινοξική αλληλουχία, αυτόνομη δομικά και λειτουργικά περιοχή (domain) ΑΤΡάσης υπεύθυνη για την κατάλυση του ΑΤΡ σε



Σχήμα 1.15 Σχηματική παράσταση της dMi-2 όπου διακρίνονται τα είδη και οι θέσεις δομικά και λειτουργικά ανεξάρτητων περιοχών που περιέχονται σε αυτή. Με κόκκινο επισημαίνονται τα δύο chromodomain.



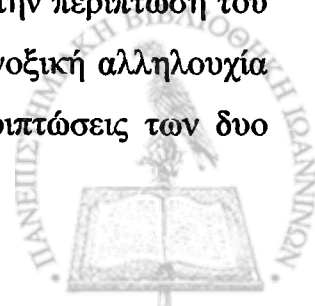


ADP, εντός του πλαισίου της dMi-2 συναντώνται και άλλες, εξίσου ενδιαφέρουσες. Αμινοτελικά της περιοχής ΑΤΡάσης βρίσκονται μία περιοχή HMG (*High Mobility Group*), δύο περιοχές PHD (*Plant HomeoDomain fingers*) και δύο chromodomain (Σχ.1.15).

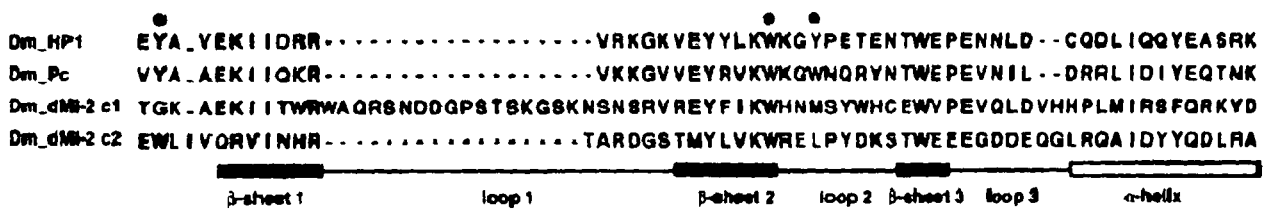
Αν και περιοχές ομόλογες των HMG και PHD της dMi-2 έχουν συσχετιστεί με πρόσδεση DNA και νουκλεοσωμάτων<sup>[27-29]</sup>, ο ρόλος των περιοχών αυτών της dMi-2 δεν έχει εξακριβωθεί. Η βιοτεχνολογική αφαίρεσή τους πάντως, δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση είτε με το ένα είτε με το άλλο<sup>[23]</sup>. Εξ άλλου, στην ανθρώπινη Mi-2β τα PHD τμήματα ευθύνονται για την αλληλεπίδραση της με την απο-ακετυλάση του NuRD HDAC1<sup>[26]</sup>. Ενδέχεται λοιπόν οι περιοχές αυτές στη dMi-2 να εμπλέκονται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ή, αν όντως αναγνωρίζουν DNA, τότε ο ρόλος τους να είναι επικουρικός και όχι κριτικής σημασίας. Αξίζει πάντως να αναφερθεί ότι οι HMG μπορούν να υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις<sup>[29]</sup> όπως συμβαίνει και στις ιστόνες, που δεν μπορούν να είναι παρούσες σε υλικό εκφρασμένο και απομονωμένο από βακτήρια. Παρόλα αυτά, η περιοχή των chromodomain της dMi-2 είναι κριτικής σημασίας για την πρόσδεση DNA, έτσι ώστε χωρίς αυτήν να μην μπορεί να λάβει χώρα αυτή η αλληλεπίδραση, ενώ υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για απ' ευθείας αλληλεπίδραση του δεύτερου chromodomain της dMi-2 (c2) με δίκλωνο DNA χωρίς προαπαιτούμενη συνθήκη συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας<sup>[23]</sup>.

### 1.7 Διαφοροποιήσεις των chromodomain της dMi-2 σε σχέση με αυτά των HP1 και Pc στη βάση της πρωτοταγούς δομής

Όπως μπορεί να αντιληφθεί κανείς ήδη από την κατακόρυφη σύγκριση καταλοίπων σε στοίχιση πρωτοταγών αλληλουχιών των chromodomain της dMi-2 και αυτών των πρωτεϊνών HP1 και Pc (Σχ.1.16), και τα δύο chromodomain της dMi-2 διαφοροποιούνται σε θέσεις-κλειδιά για την κοινή λειτουργικότητα αυτών που προέρχονται από τις HP1 και Pc. Το τρίτο –στη γραμμική αλληλουχία αμινοξέων– αρωματικό κατάλοιπο του κλωβού των HP1 και Pc (Y48 και W50 αντίστοιχα<sup>[20,22]</sup>) απουσιάζει από την αντίστοιχη θέση, τόσο στην περίπτωση του πρώτου (c1), όσο και σε αυτή του δεύτερου (c2) chromodomain της dMi-2. Τα άλλα δύο πάντως εμφανίζονται συντηρημένα στο πλαίσιο του c2 ενώ μόνο το ένα στην περίπτωση του c1. Αξίζει ίσως να αναφερθεί ότι από δυο έως τέσσερις θέσεις στην αμινοξική αλληλουχία μετά το αντίστοιχο του απουσιάζοντος αρωματικού κατάλοιπο στις περιπτώσεις των δυο



chromodomain της dMi-2 βρίσκονται κατάλοιπα τυροσίνης, τρυπτοφάνης και ιστιδίνης, για το ρόλο των οποίων πάντως δεν μπορεί να γίνει καμία ασφαλής υπόθεση στη βάση της στοίχισης αμινοξικών αλληλουχιών. Επί πλέον, το c1 παρουσιάζει μια εμφανή ιδιαιτερότητα. Μεταξύ των δύο πρώτων αναμενόμενων β-κλώνων βρίσκεται μια μη στοιχίσιμη με τα άλλα chromodomain ακολουθία αμινοξέων γνωστή ως *ένθεση (insertion)*. Τέτοιες ενθέσεις αμινοξέων στην αμινοξική αλληλουχία συντηρημένων, αυτόνομα δομημένων περιοχών (domains) παρουσιάζουν ενδιαφέρον γενικά, μιας και η ύπαρξή τους σε πολλές περιπτώσεις καθορίζει μια επιπρόσθετη λειτουργικότητα της φέρουσας περιοχής.

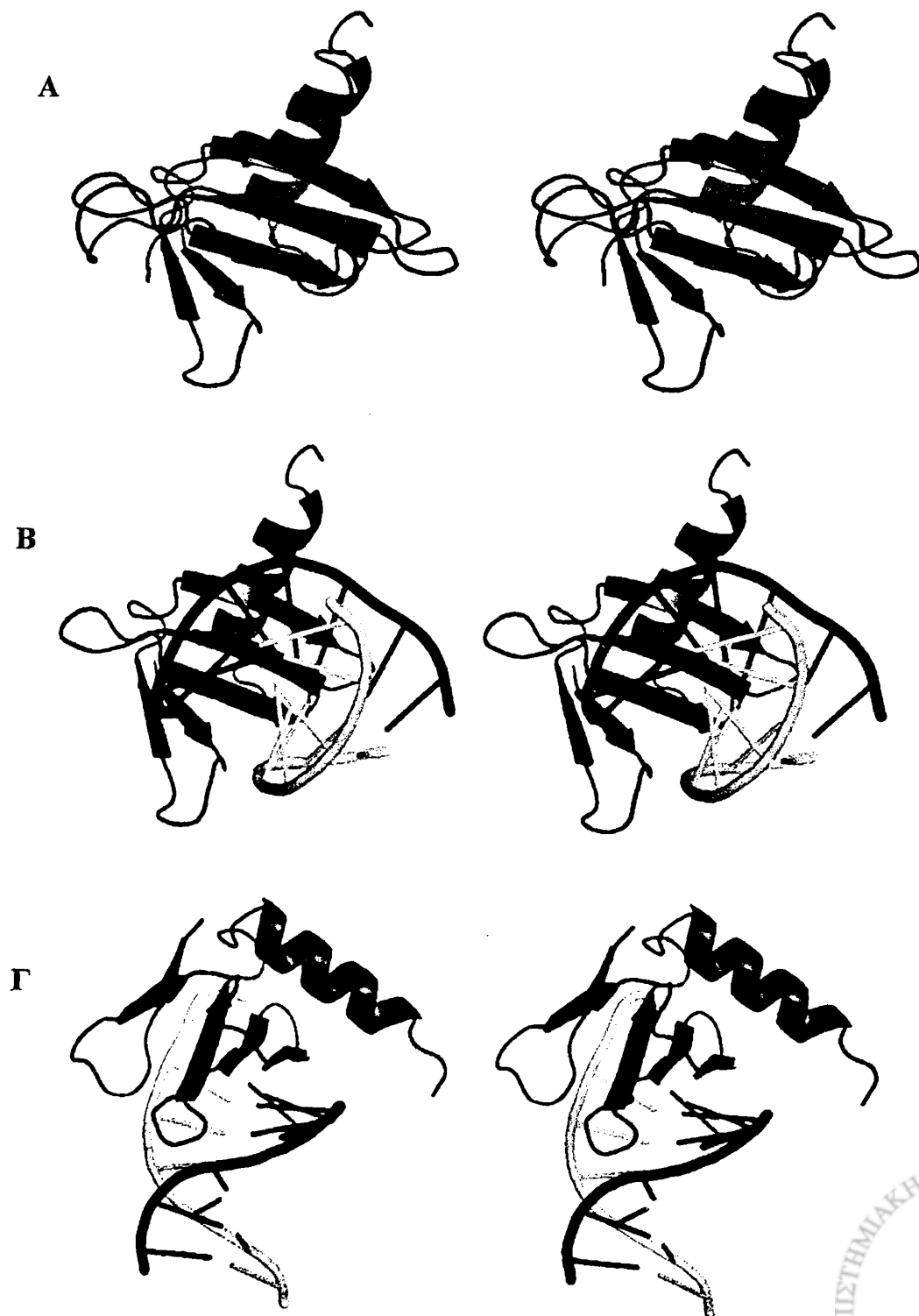


Σχήμα 1.16 Στοίχιση πρωτοταγούς αλληλουχίας των chromodomain της dMi-2 με αυτά των HP1 και Pc για τα οποία υπάρχει δομική πληροφορία σε ατομική λεπτομέρεια. Συντηρημένα κατάλοιπα σε τουλάχιστον τρία chromodomain εμφανίζονται σκιασμένα, ενώ οι μαύροι κύκλοι επισημαίνουν τα κατάλοιπα που σχηματίζουν τον αρωματικό κλωβό στις HP1 και Pc<sup>[23]</sup>. Οι θέσεις και η έκταση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής αντιστοιχούν στο chromodomain της HP1<sup>[15]</sup>.

## 1.8 Ενδεχόμενη λειτουργική συσχέτιση μεταξύ chromodomain και Sac7d/ Sso7d βάσει δομικής ομολογίας- DALI

Συνδυάζοντας λοιπόν τη διαθέσιμη δομική πληροφορία σε ατομική λεπτομέρεια και μια προσεκτική ανάλυση της στοίχισης αμινοξικών αλληλουχιών φαίνεται “λογική” ή και αναμενόμενη η λειτουργική διαφοροποίηση των chromodomain της dMi-2. Και αν για το c1 δεν διαμορφώνεται ξεκάθαρη εικόνα, για το c2 υπάρχουν –όπως άλλωστε προαναφέρθηκε– ισχυρές ενδείξεις ως προς την ικανότητά του να δεσμεύει DNA<sup>[23]</sup>. Τις ενδείξεις αυτές ισχυροποιεί και μία ακόμα πληροφορία που μπορεί να εξαχθεί από σύγκριση τριτοταγών, αυτή τη φορά, διαμορφώσεων. Από το 1997 ήδη<sup>[15]</sup> με χρήση του λογισμικού DALI<sup>[33-35]</sup> το chromodomain της M31 (HP1 ποντικού) συσχετίστηκε με τις πρωτεΐνες *Sac7d* και *Sso7d* των υπερθερμόφιλων αρχαιοβακτηρίων *Sulfolobus acidocaldarius* και *Sulfolobus solfataricus* αντίστοιχα οι οποίες προσδένουν DNA<sup>[30-32]</sup> (Σχ.1.17). Ο αλγόριθμος του DALI συγκρίνει την τριτοταγή διάταξη των στοιχείων δευτεροταγούς δομής (fold) μιας πρωτεΐνης ή πρωτεϊνικής περιοχής με το σύνολο των επιλυμένων πρωτεϊνικών δομών κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων PDB (*Protein Data Bank-Πρωτεϊνική τράπεζα δεδομένων*). Έτσι ως πιο

“συναφείς” με την προς σύγκριση πρωτεΐνη εμφανίζονται οι *δομικά ομόλογες* της, χωρίς να βαθμολογείται η ομολογία των αμινοξικών αλληλουχιών. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η “αλίευση” από τη βάση δεδομένων όμοιων αναδιπλώσεων που μπορούν υπό προϋποθέσεις να υποδεικνύουν κοινή λειτουργία. Η διαφοροποίηση αμινοξέων που εμφανίζει το c2 σε συντηρημένες θέσεις με τα μη εμπλεκόμενα σε πρόσδεση DNA chromodomain, θα μπορούσε να στοιχειοθετεί μία τέτοια προϋπόθεση.



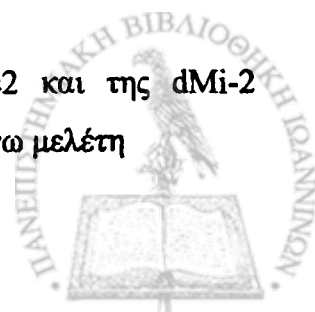
**Σχήμα 1.17** Στερεοδιαγράμματα όπου φαίνεται (Α) η αλληλεπικάλυψη των στοιχείων δευτεροταγούς δομής των Sac7d<sup>130I</sup> (μαύρο) και chromodomain της M31<sup>115I</sup> (κόκκινο), (Β) (Γ) το σύμπλοκο Sac7d-DNA<sup>130I</sup> υπό δύο διαφορετικές γωνίες θέασης. Η πρωτεΐνη Sac7d στρεβλώνει τοπικά τη διπλή έλικα DNA χρησιμοποιώντας πλευρικές αλυσίδες με θετικό φορτίο και άλλες με αρωματικούς δακτυλίους κατάλληλα τοποθετημένες στην πλευρά της β-πτυχωτής επιφάνειας που “κοιτάζει” προς το DNA.

Την ίδια στιγμή όμως, αντίθετα με ό,τι θα περίμενε κανείς για μια πρωτεϊνική περιοχή που μπορεί να δεσμεύει DNA μη ειδικά (χωρίς προαπαιτούμενη συνθήκη συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας), το c2 εμφανίζεται κυρίως αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH (pI=5.3). Βέβαια η σημαντική για μια τέτοια αλληλεπίδραση παράμετρος είναι το εκτεθειμένο στην επιφάνεια του μορίου τοπικό φορτίο και όχι το θεωρητικό ολικό φορτίο που αντικατοπτρίζεται από το ισοηλεκτρικό σημείο ενός μορίου. Στη γραμμική αλληλουχία του c2 δεν διακρίνεται κανός αριθμός γειτονικών αμινοξέων με θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες που θα μπορούσε να φορτίζει θετικά ένα τμήμα του μορίου. Όμως, πλευρικές (αλλά και ανήκουσες στην κύρια αλυσίδα) δραστικές ομάδες που απέχουν σημαντικά κατά μήκος της γραμμικής αμινοξικής αλληλουχίας μπορούν να γειτνιάζουν σαν συνέπεια της αναδίπλωσης της πεπτιδικής αλυσίδας και υιοθέτησης της βέλτιστης ενεργειακά τριτοταγούς δομής. Η διαδικασία αυτή, εκτός από τη θέση φορτίων, καθορίζει και τη σχετική χωροταξία όγκων και άρα την έκθεση των πρώτων στην επιφάνεια του μορίου. Τέτοια όμως χαρακτηριστικά μπορούν να διευκρινισθούν και να αξιολογηθούν, μόνο αν είναι γνωστή η τριτοταγής δομή ενός μορίου.

## 1.9 Σκοπός της διατριβής

*Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι:*

- Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του δεύτερου chromodomain της dMi-2 (c2) με νουκλεοσωμικά συστατικά (DNA, ιστόνες)
- Ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής του c2 σε ατομική λεπτομέρεια με χρήση φασματοσκοπίας NMR
- Ο εντοπισμός των θεμελιωδών, αναπόσπαστων για την αλληλεπίδραση με τη χρωματίνη, δομικών χαρακτηριστικών του c2 (structural determinants)
- Η σύγκριση της σχέσης δομής/λειτουργίας του c2 με αυτήν των άλλων μελών της οικογένειας των chromodomain
- Η συμβολή στη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του c2 και της dMi-2 γενικότερα, βάσει των στοιχείων που προκύπτουν από την παραπάνω μελέτη



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

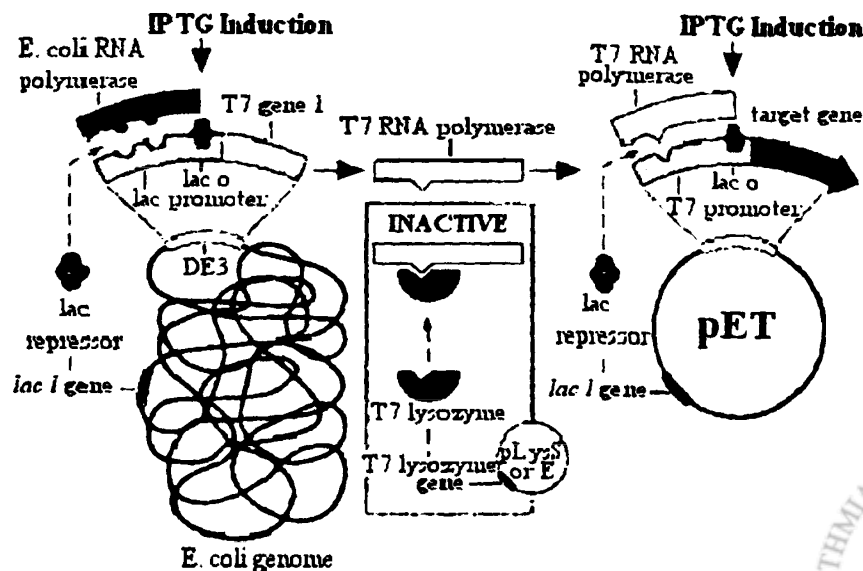
### ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 Βακτηριακά στελέχη –πλασμιδιακοί φορείς

Πολυπεπτίδια απομονώθηκαν από BL21 (DE3) και BL21 (DE3) μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο plysS. Το τροποποιημένο αυτό στέλεχος E.coli, από το οποίο έχουν γενετικά αφαιρεθεί οι πρωτεάσες lon και ompT, αποτελεί ευρέως διαδεδομένη επιλογή για την υπερέκφραση γονιδίων. Στους φορείς που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, τα γονίδια των προς έκφραση πολυπεπτιδίων βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή (*promoter*) T7 και του καταστολέα της λακτόζης (Σχ.2.1). Η χρωμοσωμική ένθεση του τμήματος DE3 βακτηριοφάγου περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση, το οποίο επίσης ελέγχεται από τον καταστολέα της λακτόζης. Η έκφραση του εκάστοτε πολυπεπτιδίου επιτελείται λοιπόν κατ' αποκλειστικότητα από την T7 RNA πολυμεράση, κατόπιν ρύθμισης με προσθήκη IPTG<sup>[102]</sup>. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η πρόωρη έκφραση και επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση. Προκειμένου περί τοξικών για το κύτταρο, ή εχουσών την τάση για συσσωμάτωση πρωτεϊνών, εισάγεται ένα δεύτερο σημείο ελέγχου της μεταγραφής ώστε να αντιμετωπίζεται ενδεχόμενη άκαιρη έκφραση (*leaky expression*). Το πλασμίδιο plysS κωδικοποιεί την λυσοζύμη T7, η οποία καθιστά την T7 RNA πολυμεράση ανενεργή προσδένοντάς την. Η επαγωγή (*induction*) της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη IPTG, οδηγεί σε πλεόνασμα της πολυμεράσης σε ενεργή μορφή.

Ο πολλαπλασιασμός και απομόνωση πλασμιδιακού DNA έγινε με χρήση των στελεχών E.coli DH5a και XL1Blue που είναι καταλληλότερα από τα BL21 για εφαρμογές DNA λόγω έλλειψης κάποιων ανασυνδυασών και χαμηλότερου επιπέδου επιμόλυνσης με

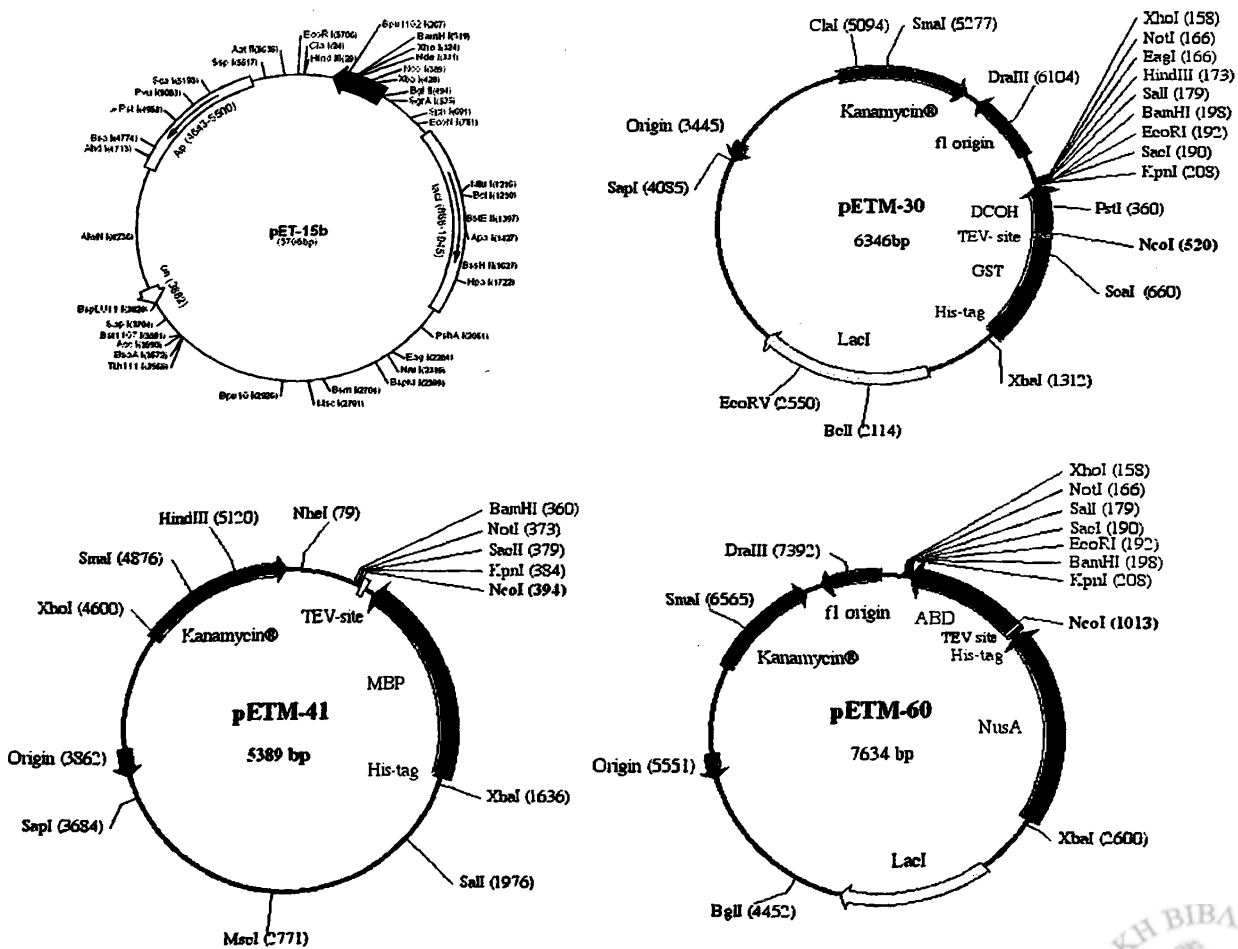


Σχήμα 2.1 Έλεγχος της υπερέκφρασης γονιδίου στο στέλεχος BL21(DE3).



υδατάνθρακες.

Για την υπερέκφραση των κατασκευών της dMi-2 επιστρατεύτηκαν πλασμιδιακοί φορείς που εκμεταλλεύονται τους κυτταρικούς μηχανισμούς ώστε να διατηρούν υψηλό αριθμό αντιτύπων στο κυτταρόπλασμα (Σχ.2.2). Πρόνοια έχει ληφθεί και για τη διευκόλυνση της πρωτεϊνικής απομόνωσης με την αμινοτελική συνέκφραση μίας ή περισσοτέρων επισημάνσεων (*tags*). Χρησιμοποιώντας το φορέα pET15b, ειδική θέση αναγνώρισης θρομβίνης μεσολαβεί μεταξύ εξαϊστιδινικής ουράς και του επιθυμητού πολυπεπτιδίου. Οι τροποποιημένοι φορείς pETM30, pETM41 και pETM60<sup>[39,101]</sup> –εκτός από την ιστιδινική ουρά– προσφέρουν τη δυνατότητα συνέκφρασης με τις πρωτεΐνες GST, MBP, και NusA αντίστοιχα, ενώ η δυνατότητα αποκοπής τους διατηρείται με την ύπαρξη θέσης αναγνώρισης της πρωτεάσης TEV. Οι προαναφερθέντες φορείς προσδίδουν στο κύτταρο ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, με την εξαίρεση του pET15b που χαρίζει ανθεκτικότητα στην αμικυλλίνη.



Σχήμα 2.2 Χάρτες των πλασμιδίων pET15b, pETM30, pETM41 και pETM60



## 2.2 Κλωνοποίηση –πλασμιδιακές κατασκευές

### 2.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση των φορέων από βακτήρια έγινε κατά κανόνα με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης, σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα<sup>[98]</sup>. Η επαναδιάλυση του ιζήματος DNA έγινε σε νερό και η συγκέντρωσή του μετρήθηκε φασματοσκοπικά. Η εκτίμηση της καθαρότητας έγινε φασματοσκοπικά και ηλεκτροφορητικά σε gel αγαρόζης συγκέντρωσης 0.8% έως 1.2%.

### 2.2.2 Παρασκευή των κωδικοποιών τμημάτων DNA των πολυπεπτιδίων του chromodomain c2 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Ως εκμαγείο για την εκκίνηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή της περιοχής των δύο chromodomain της dMi-2, c1+2 που μας παραχωρήθηκε από τον A. Brehm (University of Marburg, Γερμανία). Οι εκκινητές (primers) περιείχαν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NcoI* και *NotI*, ώστε τα προϊόντα μίας PCR να μπορούν να εισαχθούν στους τρεις pETM φορείς (Πιν.2.1). Στον αντίστροφο εκκινητή (reverse primer) σχεδιάστηκαν δύο διαδοχικά κωδικόνια τερματισμού της μεταγραφής, καθώς και η μετάλλαξη καρβοξυτελικού καταλοίπου κυστεΐνης σε σερίνη (C73S στην περίπτωση του EED-c2).

| Όνομα                        | Αλληλουχία (5'-3')                         |
|------------------------------|--|
| <i>Ευθείς (forward)</i>      |  |
| B                            | CATGCCATGGAGAAGAATGGCGTCAAGCCAGAG          |
| C                            | CATGCCATGGAGGAGCGGTTCTACAAGAA              |
| D                            | CATGCCATGGAGGAGCGGGACGACAAGAATG            |
| AAA                          | CATGCCATGGAGGAGGAGGACGACGAGGATGGC          |
| A <sub>new</sub>             | CATGCCATGGTTCAGCGCGTAATCAACCA              |
| B <sub>new</sub>             | CATGCCATGGGCAAGGCTGAGAAGATCATCA            |
| C <sub>new</sub>             | CATGCCATGGAGTGGCTCATTGTTTCAGCGGGTA         |
| <i>Αντίστροφοι (reverse)</i> |  |
| A                            | ATAAGAATGCGGCCGCTTACTACTCCGAGGTGGAAACCGCAC |
| E                            | ATAAGAATGCGGCCGCTTACTAACC CGCACGCAGATCCTGA |
| F                            | ATAAGAATGCGGCCGCTTACTAGTCGTA CTGCGCTGG     |

Πίνακας 2.1 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις κατασκευές των πολυπεπτιδίων c2. Με έντονους χαρακτήρες διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NcoI* και *NotI*.

Για τις PCR, χρησιμοποιήθηκαν οι DNA πολυμεράσες platinum pfx (invitrogen) και Taq (NEB), σε διαλύματα όγκου 50μL η σύνθεση των οποίων ήταν σύμφωνη με τα συνοδευτικά πρωτόκολλα. 50μL λαδιού PCR προστέθηκαν σε κάθε erppendorf προς αποφυγή



μείωσης του όγκου της αντίδρασης λόγω εξάτμισης. Τυπικά, το πρόγραμμα διαδοχικών εναλλαγών θερμοκρασίας είχε ως εξής:

|          |   |             |
|----------|---|-------------|
| 5 λεπτά  | 94°C (αποδιάταξη DNA)                         |             |
| 1 λεπτό  | 94°C  | } 30 κύκλοι |
| 1 λεπτό  | 60-65°C (επαναδιάταξη)                        |             |
| 1 λεπτό  | 68 ή 72°C (επιμήκυνση)                        |             |
| 10 λεπτά | 68 ή 72°C (τελική –συμπληρωματική επιμήκυνση) |             |
|          | 4°C (φύλαξη προϊόντων)                        |             |

Η απόδοση των αντιδράσεων και η καθαρότητα των προϊόντων ελέγχθηκε ηλεκτροφορητικά σε gel αγαρόζης.

| Όνομα   | Χρησιμοποιούμενοι Εκκινητές |
|---------|-----------------------------|
| KNG-c2  | B, A                        |
| ERF-c2  | C, A                        |
| ERD-c2  | D, A                        |
| EED-c2  | AAA, A                      |
| KNGs-c2 | B, E                        |
| ERFs-c2 | C, E                        |
| ERDs-c2 | D, E                        |
| EEDs-c2 | AAA, E                      |
| VQRs-c2 | A <sub>new</sub> , E        |
| EWLs-c2 | C <sub>new</sub> , E        |
| c1      | B <sub>new</sub> , F        |
| c1+2s   | B <sub>new</sub> , E        |

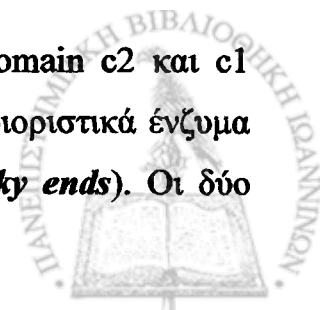
Πίνακας 2.2 Αντιστοιχία πολυπεπτιδίων c2 και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των πλασμιδίων έκφρασης.

### 2.2.3 Ηλεκτροφόρηση gel αγαρόζης

Η εκτίμηση της καθαρότητας, αλλά και η απομόνωση DNA από τα παραπροϊόντα αντιδράσεων έγινε ηλεκτροφορητικά. Για προϊόντα PCR χρησιμοποιήθηκαν πυκνότερα gel αγαρόζης (1-1.5%) από αυτά στα οποία διαχωρίστηκαν πλασμίδια (0.7-1.2%). Χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη χαμηλού σημείου ζέσεως και οι ηλεκτροφορήσεις έλαβαν χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE ή 1xTBE.

### 2.2.4 Ενζυμικές πέψεις- κατεργασία πλασμιδιακών φορέων

Προκειμένου να εισαχθούν τα γονίδια των πολυπεπτιδίων των chromodomain c2 και c1 (Πιν.2.2) στους pETM φορείς, πραγματοποιήθηκαν διπλές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και NotI ώστε να δημιουργηθούν αλληλεπικαλυπτόμενα άκρα (*sticky ends*). Οι δύο



αντιδράσεις έγιναν διαδοχικά. Για την πρώτη, χρησιμοποιήθηκε μία μονάδα NcoI (FERMENTAS) ανά  $\mu\text{g}$  φορέα και η αντίδραση αφέθηκε να ολοκληρωθεί στους  $37^{\circ}\text{C}$  για μία ώρα. Ακολούθησε η δεύτερη πέψη με μία μονάδα NotI (FERMENTAS) ανά  $\mu\text{g}$  φορέα στους  $37^{\circ}\text{C}$  για μιάμιση ώρα. Τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με αλκαλική φωσφατάση (FERMENTAS) για 45 λεπτά στους  $37^{\circ}\text{C}$  ώστε να αποκοπεί η φωσφορική ομάδα από το 3'- άκρο. Η απενεργοποίηση του ενζύμου στους  $65^{\circ}\text{C}$  για 45 λεπτά ακολουθήθηκε από ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, προκειμένου να διαχωριστούν οι γραμμικοί pETM φορείς. Η επανάκτηση του DNA από το gel έγινε με τη μέθοδο της πρόσδεσης σε γυάλινα σφαιρίδια<sup>[100]</sup>. Αρχικά το τμήμα του gel που περιείχε τη ζώνη του ενδιαφέροντός μας αποχωρίστηκε και θερμάνθηκε μέχρι να λιώσει. Κατόπιν προστέθηκε αιώρημα γυάλινων σφαιριδίων (FERMENTAS) και ακολουθήθηκαν οι συνοδευτικές οδηγίες. Η έκλουση του DNA έγινε σε νερό.

### 2.2.5 Ενζυμικές πέψεις- κατεργασία ενθεμάτων (*inserts*)

Για την προετοιμασία των κωδικοποιών τμημάτων DNA των chromodomain ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε για τους πλασμδιακούς φορείς με δύο διαφοροποιήσεις: Το DNA δεν υπέστη κατεργασία με αλκαλική φωσφατάση, ενώ δύο μονάδες ανά  $\mu\text{g}$  DNA από τα περιοριστικά ένζυμα αφέθηκαν να πέσουν τα ενθέματα για 12-14 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.6 Κατάλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών από την T4 λιγάση

Οι γραμμικοί φορείς και τα ενθέματα, σε αναλογία 1:3.5, αφέθηκαν για 12-14 ώρες στους  $14^{\circ}\text{C}$  κατόπιν προσθήκης μισής μονάδας T4 λιγάσης (FERMENTAS) προκειμένου να ολοκληρωθούν οι κατασκευές. Η απενεργοποίηση του ενζύμου έγινε με θέρμανση στους  $56^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα.

### 2.2.7 Μετασχηματισμός επιδεκτικών (*competent*) βακτηρίων

#### 2.2.7.1 Παρασκευή επιδεκτικών *E. coli*

Καλλιέργειες βακτηρίων *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3) *plysS*, DH5a, XL1Blue φυγοκεντρήθηκαν και το βακτηριακό ίζημα υπέστη κατεργασία με διαλύματα  $\text{CaCl}_2$  και



RbCl<sup>[99]</sup>. Βακτηριακά εναιωρήματα χωρίστηκαν σε όγκους 100 και 50μL, και αποθηκεύθηκαν στους -80°C.

### 2.2.7.2 Μετασηματισμός επιδεκτικών E.coli με τις πλασμιδιακές κατασκευές<sup>[99]</sup>

Σε 50 ή 100 μL εναιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 5-10μL από το διάλυμα των αντιδράσεων λιγάζης ή νερό. Το μίγμα αφέθηκε για 20 λεπτά στον πάγο και κατόπιν υπέστη θερμικό shock στους 42°C για 90sec. Ακολούθησε προσθήκη θρεπτικού διαλύματος SOC και τοποθέτηση στους 37°C για 90 λεπτά. Διάφοροι όγκοι από το αιώρημα των κυττάρων απλώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και επωάστηκαν στους 37°C για 12-14 ώρες. Η επιλογή των θετικών αποικιών έγινε με χρήση του αντιβιοτικού καναμυκίνη. Η ύπαρξη του ενθέματος στις κατασκευές επιβεβαιώθηκε με PCR ή/ και περιοριστικές πέψεις των εξαγχθέντων πλασμιδίων και νουκλεοτιδική αλληλούχιση (*sequencing*). Ποσότητα τόσο από τις πλασμιδιακές κατασκευές όσο και από τα μετασηματισμένα βακτήρια αποθηκεύτηκε στους -20°C ή τους -80°C σε stock γλυκερόλης.

## 2.3 Υπερέκφραση πολυπεπτιδίων

### 2.3.1 Υπερέκφραση ισοτοπικά μη σημασμένων πολυπεπτιδίων<sup>[102]</sup>

Υγρή καλλιέργεια LB όγκου 100mL, που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό, επιμολύνθηκε με βακτήρια BL21(DE3) μετασηματισμένα με το επιθυμητό πλασμίδιο προερχόμενα από μονή αποικία τρυβλίου. Κατόπιν παρόδου 12-14 ωρών στους 37°C, νέες καλλιέργειες όγκου 500-1000mL επιμολύνθηκαν με αραιώση 1:100 από την αρχική. Η επαγωγή της έκφρασης του επιθυμητού πολυπεπτιδίου με χρήση IPTG έγινε όταν η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών στα 600nm ανήλθε στο 0.5-0.6. Τυπικά, οι καλλιέργειες αφέθηκαν στους 37°C για τρεις ώρες παρουσία 0.4mM IPTG ώστε να επαχθεί η παραγωγή του πολυπεπτιδίου. Προκειμένου περί πρωτεϊνών που εμφάνιζαν έντονη τάση για συσσωμάτωση, η ενδοκυττάρια διαλυτότητα αυξήθηκε επάγοντας την έκφρασή τους στους 18-20°C για 12-14 ώρες παρουσία 0.05mM IPTG. Πρακτικά, μόνο τα ομοιοπολικά συνδεδεμένα με MBP πολυπεπτιδία ήταν αποδοτικό να επάγονται στους 37°C. Μετά το πέρας της επαγωγής, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα των κυττάρων φυλάχθηκε στους -80°C.



### 2.3.2 Υπερέκφραση ισοτοπικά σημασμένων πολυπεπτιδίων

Για την υπερέκφραση εμπλουτισμένων σε χρήσιμα για το NMR ισότοπα ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) πρωτεϊνών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφοροποίηση της σύστασης του θρεπτικού μέσου. Στην ουσία, ελήφθη πρόνοια ώστε η μόνη πηγή αζώτου ή άνθρακα να είναι εμπλουτισμένη στο επιθυμητό ισότοπο. Η ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν σημαντικά επιβραδυνόμενη, όμως η τελική απόδοση διαλυτής πρωτεΐνης δεν υπολείπεται πολύ της αντίστοιχης μη σημασμένης. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού είχε ως εξής:

|  |         |                   |
|--|---------|-------------------|
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | 14gr/L  | } Άλατα Spitzizen |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                           | 6gr/L   |                   |
| Κιτρικό Na   | 1gr/L   |                   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          | 0.2gr/L |                   |
| $^{15}\text{N}$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$     | 1gr/L   |                   |
| $^{13}\text{C}$ - D-γλυκόζη                        | 3gr/L   |                   |
| D- βιοτίνη   | 1mgr/L  |                   |
| Υδροχλωρική θειαμίνη                               | 10μM    |                   |

Για την απομόνωση  $^{15}\text{N}$ - επισημασμένων πρωτεϊνών η  $^{13}\text{C}$ - D-γλυκόζη αντικαταστάθηκε με  $^{12}\text{C}$ - D-γλυκόζη.

## 2.4 Απομόνωση πολυπεπτιδίων

### 2.4.1 Λύση των βακτηρίων

Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης φωσφορικών pH=7 που περιείχε 500mM NaCl, 2mM β- μερκαπτοεθανόλη, 10mM ιμιδαζόλιο, 0.2mM PMSF, 0.01% IGEPAL. Η λύση των κυττάρων επετεύχθη είτε με προσθήκη λυσοζύμης και επώαση στον πάγο για μία ώρα, είτε με χρήση συσκευής υπερήχων ή πρέσας French. Τα κυτταρικά υπολείμματα, καθώς και τα ακέραια κύτταρα διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα λύσης ίσου όγκου με το υπερκείμενο διάλυμα και λήφθηκαν δείγματα για ηλεκτροφορητική ανάλυση.

Η απομόνωση των πολυπεπτιδίων του ενδιαφέροντός μας έγινε από το υπερκείμενο διάλυμα. Όπου αυτό δεν ήταν δυνατό, εξ αιτίας πολύ περιορισμένης διαλυτότητας, το ίζημα επαναδιαλύθηκε με χρήση 8M ουρίας ή 6M υδροχλωρικής γουανιδίνης και το προκύπτον διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση.



## 2.4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

### 2.4.2.1 Χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου

Το υπερκείμενο διάλυμα υπεβλήθη στη διαδικασία που συστήνει ο προμηθευτής των σφαιριδίων συμπλοκοποιημένων ιόντων νικελίου (QIAGEN)<sup>[99]</sup>. Τυπικά, στήλη σφαιριδίων ιόντων νικελίου χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ακινητοποιηθούν τα επισημασμένα με εξαϊστιδινική ουρά πεπτίδια σε χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου αυξήθηκε κατά τις εκλύσεις της στήλης έως 50mM, ενώ η έκλυση έγινε σε 150mM, αφού δοκιμάστηκε βαθμίδωση συγκέντρωσης ιμιδαζολίου.

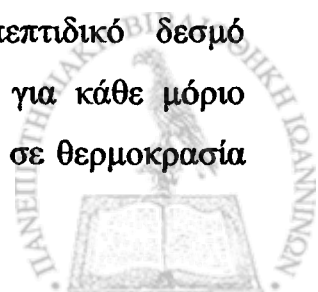
Η διαδικασία απομόνωσης σε αποδιατακτικές συνθήκες δεν διαφοροποιείται από την προαναφερθείσα παρά μόνο στην ύπαρξη 8M ουρίας ή 6M υδροχλωρικού γουανιδινίου σε όλα τα διαλύματα. Πριν υποβληθούν τα προκύπτοντα πρωτεϊνικά διαλύματα σε ενζυμική πέψη ή άλλη διαδικασία, ο αποδιατακτικός παράγοντας απομακρύνθηκε με διαπίδυση, χρησιμοποιώντας διαλύματα βαθμιαία μειούμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα αυτού.

### 2.4.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας αμυλόζης

Τα επισημασμένα με MBP πολυπεπτίδια προσδέθηκαν σε σφαιρίδια ακινητοποιημένης αμυλόζης (NEB) προκειμένου να απομονωθούν είτε από τα υπόλοιπα πρωτεϊνικά συστατικά του κυτταροπλάσματος των *E.coli*, είτε από συναπομονωμένες πρωτεΐνες κατά το πρώτο στάδιο καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου. Η έκλυση έγινε με 50mM μαλτόζης. Η χρωματογραφία συγγένειας αμυλόζης δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες.

## 2.4.3 Αποκοπή πρόσθετων –επικουρικών κατά την απομόνωση– πεπτιδικών τμημάτων με χρήση της πρωτεάσης TEV

Τα chromodomain που έφεραν αμινοτελικά συνεκφραζόμενα πεπτιδικά τμήματα που επικουρούν στη διαλυτότητα ή την απομόνωση υποβλήθηκαν σε ενζυμική πέψη με την πρωτεάση TEV. Το ένζυμο αναγνωρίζει το oligopeptidό ENLYFQG που προηγείται της αλληλουχίας των πολυπεπτιδίων chromodomain, και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό γλουταμίνης- γλυκίνης. Για την πέψη χρησιμοποιήθηκε ένα μόριο TEV για κάθε μόριο υποστρώματος, ενώ η αντίδραση έλαβε χώρα στους 4<sup>0</sup>C για 14-18 ώρες ή σε θερμοκρασία



δωματίου για τρεις ώρες. Η απόδοση της πέψης ήταν τυπικά στο 70% με εξαίρεση τις πρωτεΐνες που έφεραν αμινοτελικά MBP, για τις οποίες 90% των μορίων αποκόπτονταν μετά το πέρας των τριών ωρών. Η πρωτεάση TEV που χρησιμοποιήθηκε φέρει εξαϊστιδινική ουρά, ώστε να απομακρύνεται μαζί με τα παραπροϊόντα της πέψης και τα ακέραια μόρια με ένα ακόλουθο χρωματογραφικό στάδιο συγγένειας ιόντων νικελίου.

#### 2.4.4 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε gel SDS-πολυακρυλαμιδίου συστήματος διαλυμάτων Tris- γλυκίνης

Οι διαδικασίες υπερέκφρασης και απομόνωσης των chromodomain ελέγχονταν ηλεκτροφορητικά. Δείγματα φυλάσσονταν σε όλα τα στάδια προκειμένου το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο να διαχωριστεί σε gel περιεκτικότητας 10-15% σε ακρυλαμίδη. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε σύστημα mini protean II (BIO-RAD), στα 200mVt. Οι ζώνες των πρωτεϊνών βάφονταν με coomassie brilliant blue R-250.

#### 2.4.5 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε gel SDS-πολυακρυλαμιδίου συστήματος διαλυμάτων Tris- Tricine<sup>[103]</sup>

Το σύστημα διαλυμάτων Tris -Tricine (N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine) χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού πρωτεϊνικών ζωνών σχετικά μικρού μοριακού βάρους. Η παραλλαγή αυτή της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών φάνηκε ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό πολυπεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, μοριακής μάζας 7-9kDa. Οι διαφοροποιήσεις εστιάζονται στη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 0.2M Tris pH=8.9 ως διάλυμα ανόδου και 0.1M Tris, 0.1M tricine, 0.1% SDS καθόδου, αλλά και στη χρήση 10% γλυκερόλης στο gel διαχωρισμού (separating). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 150Vt και η εμφάνιση των ζωνών με βαφή coomassie brilliant blue R-250.

#### 2.4.6 Διαπίδυση

Η τεχνική της διαπίδυσης χρησιμοποιήθηκε για την αλλαγή μέρους ή όλων των συστατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων από πρωτεϊνικά δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες (SPECTRAPOR, SIGMA, PIERCE) με όρια αποκλεισμού από 3 έως 12kDa ανάλογα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου.



Ειδικότερα, για την απομάκρυνση αποδιατακτικών παραγόντων (ουρία, υδροχλωρική γουανιδίνη) από πρωτεϊνικά δείγματα, προοδευτικά αραιότερα διαλύματα των ενώσεων αυτών χρησιμοποιήθηκαν σταδιακά, με σκοπό την ομαλή πρωτεϊνική αναδιάταξη. Έτσι, προκειμένου να απομακρυνθεί ουρία συγκέντρωσης 8M, διαλύματα συγκέντρωσης 6M, 4M, 2M, 1M, 0M σε ουρία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαπίδυση, με κάθε στάδιο να διαρκεί από έξι έως δώδεκα ώρες.

#### **2.4.7 Συμπύκνωση δειγμάτων NMR**

Τυπικά, η συγκέντρωση των διαλυμάτων των απομονωμένων chromodomain c2 μετά τη χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου, την πέψη με TEV και την απομάκρυνση των παραπροϊόντων, ήταν της τάξης των 0.1mg/ml ή 10μM. Από δείγματα τέτοιων συγκεντρώσεων ήταν αδύνατη η λήψη φασμάτων NMR που μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό τριτοταγούς δομής. Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν 40 έως 60 φορές, κάτω από πίεση αερίου αζώτου με τη χρήση της συσκευής συμπύκνωσης amicon (MILLIPORE) και ηθμών ορίου αποκλεισμού 3 ή 10kDa.

### **2.5 Εκτίμηση του βαθμού ολιγομερισμού του chromodomain c2**

#### **2.5.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης**

Δείγματα πολυπεπτιδίων φορτώθηκαν σε στήλη superdex 200 (PHARMACIA) προσαρμοσμένη σε FPLC acta purifier (PHARMACIA) (NIMR-London), με ενέσεις όγκου 50-100μL. Η ταχύτητα ροής του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 20mM, NaCl 150mM, NaN<sub>3</sub> 1.5mM, 2mM β-ME ήταν 0.5mL/min ενώ η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 280nm. Ο όγκος κατακράτησης των πολυπεπτιδίων c2 συγκρίθηκε με αυτόν που καταγράφηκε για βιομόρια – δείκτες μοριακών βαρών (Αλβουμίνη 67kDa- 13.89mL, Οβαλβουμίνη 43kDa-14.86mL, Χυμοτροψινογόνο A 25kDa- 16.65mL, Ριβονουκλεάση A 13.7kDa- 17.21mL) προκειμένου να εκτιμηθεί το μοριακό μέγεθος των πολυπεπτιδίων του chromodomain. Η διαδικασία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **2.5.2 Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση**



Διαλύματα απομονωμένων πολυπεπτιδίων c2 συγκέντρωσης 40μM τοποθετήθηκαν στην ειδική κυψελίδα σε διαμερίσματα πίσω από αυτά που περιείχαν το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (τυφλό). Η φυγόκεντρος ισοσταθμίστηκε και ξεκίνησε η λειτουργία της αντλίας κενού. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 20°C. Οι μετρήσεις σε ισορροπία (sedimentation equilibrium) έγιναν σε 35000rpm, ενώ τα δεδομένα συλλέχθηκαν μετά την επίτευξη αυτής, όπως κρίθηκε ύστερα από λήψη διαδοχικών αλληλεπικαλυπτόμενων καμπυλών. Η καταγραφή των δεδομένων κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων ταχύτητας καταβύθισης (sedimentation velocity) έγινε χωρίς καθυστέρηση κατά τη φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα. Χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Beckman Optima XL-A και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το ειδικό add-on module στο λογισμικό Origin<sup>175</sup>. Η διεξαγωγή των πειραμάτων αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σε συνεργασία με τον John Eccleston (NIMR- London).

## 2.6 Φασματοσκοπικές τεχνικές

### 2.6.1 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού εκμεταλλεύεται τη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ των δύο φορών κυκλικά πολωμένου φωτός από μόρια που περιέχουν ασύμμετρα κέντρα. Η μεταβολή της διαφοράς απορρόφησης του αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός από το δεξιόστροφα ( $\Delta A = A_L - A_R$ ) σε σχέση με το μήκος κύματος είναι πλούσια σε πληροφορία σχετικά με τη δευτεροταγή δομή πρωτεϊνών στην περιοχή του απώτερου υπεριώδους (far-UV). Από φάσματα CD μπορεί να πιστοποιηθεί η αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης, αλλά και να εκτιμηθεί το ποσοστό συμμετοχής κάθε επιμέρους τύπου δευτεροταγούς δομής στη συνολική. Δείγματα πολυπεπτιδίων c2 συγκέντρωσης 20-50μM χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού ( $\Delta A$  vs.  $\lambda$ ) και θερμικής αποδιάταξης ( $\Delta A^\lambda$  vs. T). Η περιοχή του φάσματος που σαρώθηκε αντιστοιχούσε στα 190-250nm. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες quartz-suprasil (HELLMA) οπτικών διαδρομών 0.2-0.5cm. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε φασματοπολωσίμετρα Jasco J-810 (NIMR-London, ΕΚΕΦΕ “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”) συνδεδεμένα με συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας τύπου Peltier. Η προτυποποίηση (standardization) και η συντήρηση των οργάνων έγινε με χρήση διαλυμάτων καμφοροσουλφονικού οξέος.



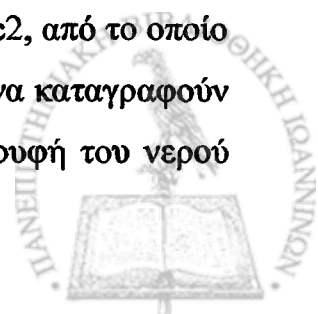


### 2.6.2 Φασματοσκοπία φθορισμού πρωτεϊνών

Το φαινόμενο του φθορισμού βασίζεται στην εκπομπή ακτινοβολίας κατά την επιτρεπτή μετάπτωση ηλεκτρονίων από απλή (singlet) διεγερμένη στη βασική κατάσταση, κατόπιν διέγερσης από απορρόφηση ενέργειας με τη μορφή ακτινοβολίας. Οι αρωματικοί δακτύλιοι κυρίως δύο εκ των τριών φυσικών πρωτεϊνικών χρωμοφόρων (W, Y) συνεισφέρουν στο φθορισμό αυτών των βιομορίων. Η εκπομπή φωτός κατά το φθορισμό είναι πολύ ευαίσθητη σε αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος του χρωμοφόρου, καθιστώντας έτσι την τεχνική ενδεδειγμένη για τη μελέτη της δομικής σταθερότητας ενός πολυπεπτιδίου, το βαθμό έκθεσης των χρωμοφόρων στο διαλύτη ή την ανίχνευση δομικών αλλαγών που συνοδεύουν βιολογικές αλληλεπιδράσεις. Η διέγερση δειγμάτων c2 συγκέντρωσης 0.2-1μM έγινε σε μήκη κύματος 285-292nm και η καταγραφή των φασμάτων έγινε στους 20<sup>0</sup>C χρησιμοποιώντας κυψελίδες quartz-suprasil (HELLMA). Για την καταγραφή φασμάτων θερμοκτικής αποδιάταξης καλύφθηκε εύρος θερμοκρασιών από 20 έως 90<sup>0</sup>C, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί μεταβολή του μέγιστου της έντασης φθορισμού από τα 337 στα 345nm. Η τιμή της θερμοκρασίας καταγράφηκε με τη χρήση ευαίσθητου θερμομέτρου προσαρμοσμένου στην κυψελίδα. Χρησιμοποιήθηκε φθορισμόμετρο Hitachi F2500. Η επιλογή της θερμοκρασίας έγινε με χρήση υδατόλουτρου ψύξης- θέρμανσης (NESLAB) συνδεδεμένου με το θάλαμο υποδοχής της κυψελίδας.

### 2.6.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καταγράφηκαν σε φασματόμετρα 500 και 600 MHz (VARIAN, BRUKER) (Πιν.2.3) κατάλληλα εξοπλισμένα για διεξαγωγή πειραμάτων τριπλού συντονισμού (δοκιμαστής συχνοτήτων (probe) τριπλού συντονισμού, σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας με προσαρμοσμένο θάλαμο δείγματος (jacket) εντός του μαγνήτη). Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα chromodomain c2 συγκέντρωσης 0.1 έως 0.7mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0 έως 150mM NaCl και 0.01% NaN<sub>3</sub>. 10% D<sub>2</sub>O προσετέθη σε κάθε δείγμα ώστε να καθίσταται δυνατός ο έλεγχος της σταθερότητας της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B<sub>0</sub> (locking). Σε 100% D<sub>2</sub>O επαναδιαλύθηκε δείγμα EED-c2, από το οποίο ο διαλύτης (H<sub>2</sub>O) είχε υποστεί διπλή εξάχνωση (freeze-drying), προκειμένου να καταγραφούν φάσματα <sup>13</sup>C-HSQC και <sup>13</sup>C-edited NOESY. Σε όλες τις περιπτώσεις η κορυφή του νερού



([H<sub>2</sub>O]=50M σε δείγματα που έχει προστεθεί 10%D<sub>2</sub>O) κατεστάλη (*water suppression*) με χρήση κατάλληλων παλμικών αλληλουχιών. Η καταγραφή όλων των φασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επίλυση της τριτοταγούς δομής έγινε στους 17<sup>0</sup>C.

Τα ολιγονουκλεοτίδια παλινδρομικής αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα πρόσδεσης στο EED-c2 ήταν τα: 5'-GCG ATC GC-3', 5'-GTA ATT AC-3', 5'-CTA GCG CGC TAG-3' (SIGMA-GENOSYS). Η καταγραφή των φασμάτων NMR έγινε με την πολύτιμη συμβολή των Geoff Kelly, Tom Frenkiel, Annalisa Pastore και Andres Ramos (NIMR-London).

| Τύπος φάσματος                                 | διαστάσεις | Ισοτοπική επισήμανση             | διαλύτης         | Mixing time | Χρόνος καταγραφής |
|--|------------|----------------------------------|------------------|-------------|-------------------|
| 1D   | 1          | -                                | H <sub>2</sub> O |             | 1-10min           |
| 1D   |            | -                                | D <sub>2</sub> O |             | 1-10min           |
| <sup>15</sup> N-labeled 1D                     |            | <sup>15</sup> N                  | H <sub>2</sub> O |             | 1-10min           |
| <sup>13</sup> C-labeled 1D                     |            | <sup>13</sup> C                  | H <sub>2</sub> O |             | 1-10min           |
| <sup>13</sup> C-labeled 1D decoupled           |            | <sup>13</sup> C                  | H <sub>2</sub> O |             | 1-10min           |
| 2D TOCSY                                       | 2          | -                                | H <sub>2</sub> O | 60-80msec   | 10-15h            |
| 2D NOESY                                       |            | -                                | H <sub>2</sub> O | 100-150msec | 10-15h            |
| <sup>15</sup> N-HSQC                           |            | <sup>15</sup> N                  | H <sub>2</sub> O |             | 20-40min          |
| <sup>15</sup> N-HSQC- NH <sub>2</sub> filtered |            | <sup>15</sup> N                  | H <sub>2</sub> O |             | 30min             |
| <sup>13</sup> C-HSQC                           |            | <sup>13</sup> C                  | H <sub>2</sub> O |             | 20-40min          |
| <sup>13</sup> C-HSQC                           |            | <sup>13</sup> C                  | D <sub>2</sub> O |             | 20-40min          |
| CbHd   |            | <sup>13</sup> C                  | D <sub>2</sub> O |             | 6h                |
| CbHe   |            | <sup>13</sup> C                  | D <sub>2</sub> O |             | 6h                |
| T <sub>1</sub>                                 | 3(2)       | <sup>15</sup> N                  | H <sub>2</sub> O |             | 12h               |
| T <sub>2</sub>                                 |            | <sup>15</sup> N                  | H <sub>2</sub> O |             | 12h               |
| <sup>15</sup> N- <sup>1</sup> H-NOE            |            | <sup>15</sup> N                  | H <sub>2</sub> O |             | 15h               |
| 3D- <sup>15</sup> N-NOESY HSQC                 | 3          | <sup>15</sup> N                  | H <sub>2</sub> O | 120msec     | 50-60h            |
| 3D- <sup>13</sup> C-NOESY HSQC                 |            | <sup>13</sup> C                  | H <sub>2</sub> O | 120msec     | 50-60h            |
| 3D- <sup>13</sup> C-NOESY HSQC                 |            | <sup>13</sup> C                  | D <sub>2</sub> O | 120msec     | 50-60h            |
| HNCa   |            | <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C | H <sub>2</sub> O |             | 50h               |
| HNCaCb   |            | <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C | H <sub>2</sub> O |             | 50h               |
| HCCH-TOCSY aliphatic                           |            | <sup>13</sup> C                  | H <sub>2</sub> O | 18msec      | 50h               |
| H(CC)CONH-TOCSY                                |            | <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C | H <sub>2</sub> O |             | 40h               |

Πίνακας 2.3 Συγκεντρωτική καταγραφή των φασμάτων NMR που καταγράφηκαν σε αυτή τη διατριβή σε φασματομέτρα 500 και 600MHz.

## 2.7 Ανίχνευση μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας

Τα πειράματα ανίχνευσης της μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (*gel-shift assays*) βασίστηκαν στην ιδέα ότι μόρια DNA προσδεδεμένα σε πολυπεπίδια μεταναστεύουν με μικρότερη ταχύτητα από ελεύθερα κατά την ηλεκτροφόρηση<sup>[23]</sup>. Χρησιμοποιήθηκαν gel αгарόζης 0.7 έως 1.5% σε 1xTAE<sup>[98]</sup>. Η ανίχνευση του DNA έγινε με χρήση EtBr μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης προς αποφυγή αναστολής της πρόσδεσης chromodomain-DNA.



## 2.8 Ανίχνευση αλληλεπιδράσεων ακινητοποιημένου chromodomain με πειράματα συγκατακρήμνισης (pull-down assay)

Διαλύματα πιθανών προσδετών του chromodomain c2 πέρασαν από στήλη στην οποία είχε ακινητοποιηθεί MBP-EED-c2 ή MBP-KNG-c2. Δείγματα από τα κλάσματα που απέτυχαν να προσδεθούν (flow-through) καθώς και το έκλουσμα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε gel SDS- πολυακρυλαμίδης.

Για την ανίχνευση της πρόσδεσης DNA (5'-CAT TCT TGT CGT CCC GCT CCT CCA TGG CAT G-3', 3'-GTA AGA ACA GCA GGG CGA GGA GGT ACC GTA C-5') χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια συγγένειας ιόντων νικελίου και η διαδικασία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7. Η έκλουση της στήλης έγινε με χρήση διαλύματος ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 150mM.

Η πρόσδεση ιστονών από θύμο αδένα μοσχαριού δοκιμάστηκε σε 300 έως 1000mM NaCl σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7 και σφαιρίδια αμυλόζης. Η έκλουση της στήλης έγινε με διάλυμα μαλτόζης συγκέντρωσης 50mM.

## 2.9 Πειράματα φασματοσκοπίας μαζών (MALDI-TOF και tandem MS/MS)

Δείγματα ιστόνης H3, εκλούσματος και flow-through που προέκυψαν από τα πειράματα συγκατακρήμνισης με ιστόνη H3 και αποκόπηκαν από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου υποβλήθηκαν σε πρωτεολυτική πέψη με θρυψίνη και ειδική για Arg πρωτεάση (R-specific protease) και το μείγμα των πρωτεολυτικών πεπτιδίων αναλύθηκε με MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of Flight) και tandem MS/MS φασματοσκοπία μαζών. Τα πειράματα αυτά καθώς και η ανάλυση των αποτελεσμάτων διεξήχθησαν καθ' ολοκληρίαν από την Zsuzana Darula (Ουγγρική Ακαδημία Επιστημών).



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**  
**ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ**  
**ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΟΥ NMR**



### 3.1 Εισαγωγή στην αρχή λειτουργίας του NMR

Επειδή στην παρούσα διατριβή έχει γίνει εκτενής χρήση NMR, τόσο για την επίλυση της δομής του c2, όσο και για το βιοφυσικό χαρακτηρισμό του, κρίνεται σκόπιμο να προηγηθεί της περιγραφής των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων, μια πολύ συνοπτική παρουσίαση της αρχής και της “χρησιμότητας” της φασματοσκοπίας NMR για τη μελέτη πρωτεϊνών.

#### 3.1.1 Αλληλεπίδραση πυρήνων- μαγνητικού πεδίου

Η τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) εκμεταλλεύεται τη μαγνητική ιδιότητα της **ιδιοστροφορμής I (spin)** συγκεκριμένων πυρήνων. Κάθε ένα από τα πυρηνικά σωματίδια έχει την ιδιότητα αυτή, ενώ το συνολικό spin ενός πυρήνα εξαρτάται από τις συζεύξεις τους. Οι πυρήνες με  $I \neq 0$  είναι **μαγνητικά ενεργοί**. Η μελέτη πολυπεπτιδίων, βασίζεται, κατά κύριο λόγο, στις μαγνητικές πυρηνικές ιδιότητες των ισοτόπων  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ . Με την εφαρμογή **εξωτερικού μαγνητικού πεδίου έντασης  $B_0$** , η πυρηνική **μαγνητική ροπή** ευθυγραμμίζεται με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου και αποκτά φορά **παράλληλη** ή **αντιπαράλληλη** με αυτό. Η διαφορά ενέργειας των δύο σταθμών είναι μικρή και εξαρτάται από την ένταση του εξωτερικού πεδίου  $B_0$  και τη φυσική σταθερά που καλείται **γυρομαγνητικός λόγος  $\gamma$**  του πυρήνα (εξ.Α).

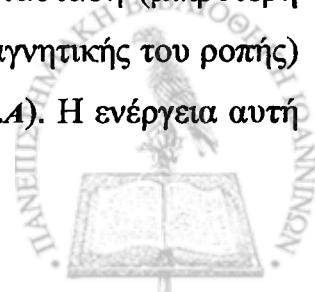
$$\Delta E = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi} \quad (\text{A})$$

Μικρότερης ενέργειας, και άρα πιο πιθανή, είναι η κατάσταση στην οποία η πυρηνική μαγνητική ροπή είναι παράλληλη προς το άνυσμα της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Ο λόγος του αριθμού των μορίων με αντιπαράλληλη προς το εξωτερικό πεδίο μαγνητική ροπή ( $N^-$ ) προς αυτόν με παράλληλη ( $N^+$ ) προβλέπεται από τη στατιστική Boltzman (εξ.Β):

$$\frac{N^-}{N^+} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (\text{B})$$

#### 3.1.2 Διέγερση και παραγωγή σήματος στο NMR

Η **διέγερση** ενός πυρήνα ώστε αυτός να μεταπέσει από τη βασική κατάσταση (μικρότερη ενέργεια- παράλληλη προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο διάταξη της μαγνητικής του ροπής) στη διηγευμένη, είναι εφικτή με την πρόσληψη ποσού ενέργειας  $\Delta E$  (εξ.Α). Η ενέργεια αυτή



προσδίδεται με τη μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF), χρησιμοποιώντας ένα πηνίο εκπομπής (*transmitter coil*). Η πρόσληψη ποσού ενέργειας με αποτέλεσμα τη μετάπτωση από μια βασική ενεργειακή στάθμη σε διηγεμένη ονομάζεται **συντονισμός** (*resonance*).

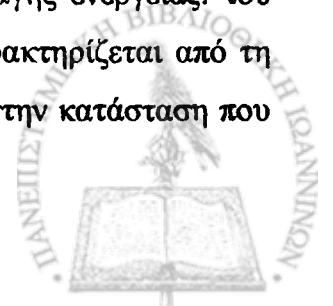
Η συνισταμένη όλων των μαγνητικών ροπών των επιμέρους πυρήνων ενός μορίου ονομάζεται **μαγνήτιση** (*magnetization*). Προκύπτει από τη συμβολή όλων των περιστρεφόμενων υπό γωνία  $\theta$  σε σχέση με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου (για το πρωτόνιο  $54.4^\circ$ ) ανυσμάτων μαγνητικών ροπών. Από τη διαχείριση αυτού του ανύσματος προέρχεται το σήμα στο NMR. Με τη χρήση του εξωτερικού πεδίου η μαγνητική αυτή συνισταμένη αποκτά μέγιστη ένταση κατά την **κατεύθυνση** (διεύθυνση και φορά) του εξωτερικού πεδίου. Αν καρτεσιανό σύστημα αναφοράς οριστεί ώστε ο άξονας των  $z$  να ταυτίζεται με τη διεύθυνση του  $B_0$ , τότε η εκπομπή ραδιοσυχνοτήτων γίνεται κατά τον άξονα των  $x$  και ισοδυναμεί με δημιουργία ενός νέου μαγνητικού πεδίου έντασης  $B_1$ , μικρότερης της  $B_0$ , κατά τον άξονα αυτό. Το μαγνητικό πεδίο  $B_1$  εκτρέπει τη συνισταμένη των μαγνητικών ροπών (μαγνήτιση) από τον άξονα των  $z$  συντονίζοντας τους πυρήνες και καθιστώντας τους **συμφασικούς**. Εξισώνει δηλαδή τη φάση περιστροφής όλων των πυρήνων που περιστρέφονται με τη συχνότητα Larmor (εξ.Γ):

$$\nu_0 = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (\Gamma)$$

Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται συνιστώσα μαγνήτισης στο επίπεδο  $xy$  που καλείται  $M_{xy}$ . Η περιστροφή της γύρω από τον άξονα των  $z$  εγείρει ηλεκτρικό ρεύμα (επαγωγή Faraday) στο πηνίο-δέκτη (*receiver coil*), το οποίο αποτελεί ουσιαστικά τη μετρούμενη ποσότητα στο NMR.

### 3.1.3 Αποδιέγερση

Η ανταλλαγή ενέργειας κατά την καταγραφή του σήματος οδηγεί στην **αποδιέγερση** (*relaxation*) των πυρήνων και την επιστροφή της μαγνήτισης στη θέση ισορροπίας με διεύθυνση παράλληλη προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (άξονας  $z$ ). Το φαινόμενο της αποδιέγερσης λαμβάνει χώρα ως αποτέλεσμα δύο μηχανισμών ανταλλαγής ενέργειας: του **διαμήκη** (*longitudinal*) και του **εγκάρσιου** (*transverse*). Ο πρώτος χαρακτηρίζεται από τη χρονική σταθερά  $T_1$  (εξ.Α) και περιγράφει την επιστροφή των πυρήνων στην κατάσταση που



προβλέπεται από τη στατιστική Boltzman (εξ.Β), και ο δεύτερος από τη χρονική σταθερά  $T_2$  (εξ.Ε) και αναφέρεται στην απώλεια της συμφωνίας φάσεων περιστροφής στο επίπεδο  $xy$ , λόγω αλληλεπίδρασης ζευγών πυρηνικών spin.

$$M_t = M_0 [1 - e^{-t/T_1}] \quad (\Delta)$$

$$M_t = M_0' e^{-t/T_2} \quad (E)$$

Με  $M_0$  συμβολίζεται η μαγνήτιση σε άπειρο χρόνο μετά τη διέγερση, όταν θεωρητικά έχει επιστρέψει στη θέση ισορροπίας και  $M_0'$  η μαγνήτιση αμέσως μετά τη διέγερση, όταν και έχει τη μέγιστη τιμή της. Γρήγορη αποδιέγερση (μικρές τιμές των χρονικών σταθερών) οδηγεί σε γρήγορη απώλεια σήματος, κάτι που δυσχεραίνει τη μελέτη συστημάτων με NMR. Σε μακρομόρια, η χρονική σταθερά  $T_2$  είναι σημαντικά μικρότερη από την  $T_1$  καθιστώντας την εγκάρσια αποδιέγερση τον κύριο μηχανισμό απώλειας σήματος με την πάροδο του χρόνου. Καθοριστική παράμετρος για το χρόνο αποδιέγερσης είναι ο χρόνος ιδιοσυσχετισμού (*correlation time*)  $\tau_c$  που αντανακλά το μοριακό μέγεθος. Όσο μεγαλύτερο είναι ένα μακρομόριο, τόσο πιο αργά κινείται στο διάλυμα με συνέπεια να εμφανίζει μεγάλο χρόνο ιδιοσυσχετισμού. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ιδιοσυσχετισμού, τόσο μικρότερη η χρονική σταθερά αποδιέγερσης  $T_2$  και άρα γρηγορότερη η απώλεια του σήματος.

### 3.1.4 Μαγνητική διαφοροποίηση- Χημική μετατόπιση

Το ηλεκτρονιακό νέφος γύρω από κάθε πυρήνα δημιουργεί ένα τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίθετης έντασης προς το εξωτερικό. Έτσι, όσο πυκνότερο είναι το ηλεκτρονιακό νέφος γύρω από έναν πυρήνα, τόσο μικρότερη η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου που αυτός "αισθάνεται". Το φαινόμενο αυτό καλείται **προάσπιση (shielding)**. Συνάγεται λοιπόν ότι η ενέργεια (και άρα η ραδιοσυχνότητα) που απαιτείται για το συντονισμό δεν είναι ίδια για όλους τους πυρήνες ίδιου τύπου ατόμου ενός μορίου. Η συχνότητα στην οποία συντονίζεται κάθε πυρήνας ενός δείγματος στο NMR συνήθως εκφράζεται σε κλασματικές μονάδες (ppm)  $\delta$  σε σχέση με τη συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα αναφοράς και καλείται **χημική μετατόπιση (chemical shift)** του πυρήνα αυτού (εξ.ΣΤ).

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_0} 10^6 \text{ ppm} \quad (\Sigma\Gamma)$$

Με  $\nu_{ref}$  συμβολίζεται η συχνότητα συντονισμού πυρήνα ένωσης αναφοράς, όπως το τετραμέθυλ-σιλάνιο (TMS).



Για ένα πολυπεπίδιο, εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι πυρήνες του ίδιου ατόμου που διαφοροποιούνται χημικά (συμμετέχουν σε σχηματισμό διαφορετικών χημικών δεσμών), επιδεικνύουν και διαφορετική χημική μετατόπιση στο NMR. Διαφοροποίηση στη χημική μετατόπιση όμως επάγει και η τριτοταγής δομή, μιας και επηρεάζει την ηλεκτρονιακή κατανομή γύρω από κάθε πυρήνα. Σε αυτό το γεγονός τελικά βασίζεται και ο δομικός χαρακτηρισμός ενός βιομορίου με NMR.

### 3.1.5 Μαγνητικές συζεύξεις

Πυρηνικά spin είναι δυνατό να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Τέτοιες **συζεύξεις (couplings)** παρατηρούνται όταν οι αντίστοιχοι πυρήνες είναι **μαγνητικά μη ισοδύναμοι** και αποτελούν πηγή πολύτιμης πληροφορίας. **Μαγνητικά ισοδύναμοι** ονομάζονται οι χημικά ισοδύναμοι πυρήνες που μπορούν να ανταλλάσσουν θέσεις λόγω συμμετρίας. Οι πυρήνες αυτοί επιδεικνύουν την ίδια χημική μετατόπιση.

### 3.2 Χρήσεις του βιομοριακού NMR

Αντίθετα με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές η φασματοσκοπία NMR δύναται να χρησιμοποιηθεί για καταγραφή φασμάτων ανόμοιων μεταξύ τους ως προς τη μορφή αλλά και το είδος της πληροφορίας που περιέχουν. Η “απάντηση” που εμπεριέχεται σε κάθε τύπο φάσματος εξαρτάται από την “ερώτηση” που θα τεθεί, κάτι που γίνεται χρησιμοποιώντας τη “γλώσσα” του NMR. Έτσι μια διαδοχή παλμών ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μήκη κύματος ραδιοσυχνοτήτων και παύσεων, γνωστή ως **παλμική ακολουθία (pulse sequence)**, καθορίζει τα πυρηνικά spin των οποίων οι **μαγνητικές συζεύξεις (magnetic couplings)** θα χρησιμοποιηθούν στην καταγραφή του φάσματος. Η σύνταξη παλμικών ακολουθιών κατάλληλων για την καταγραφή δεδομένης πληροφορίας είναι πολύπλοκο έργο και στις μέρες μας το κύριο επίπεδο εισαγωγής καινοτομιών και τεχνολογικών βελτιώσεων στο πεδίο

Με την καταγραφή κατάλληλων φασμάτων NMR, είναι δυνατό να εξαχθεί ποικίλου τύπου πληροφορία. Στις επόμενες παραγράφους γίνεται μια σύντομη παράθεση των εφαρμογών της φασματοσκοπίας NMR σε βιολογικά συστήματα με έμφαση στον τύπο της πληροφορίας που μπορεί να αντληθεί από την καθεμία και το **βιολογικό ερώτημα** που μπορεί να απαντηθεί. Λεπτομερής ανάλυση των συγκεκριμένων φασματοσκοπικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή και των συμπερασμάτων που

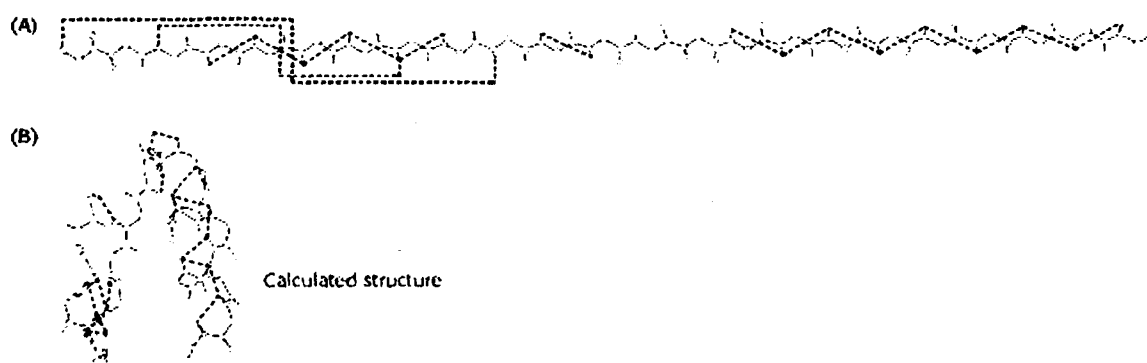




προέκυψαν, κρίθηκε σκόπιμο να συμπεριληφθεί στην παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής, ώστε ο μη εξοικειωμένος με την τεχνική του NMR αναγνώστης να βοηθηθεί στο έργο της κατανόησης.

### 3.2.1 Χρήση του NMR για τον προσδιορισμό τριτοταγών δομών βιομορίων

Η πιο γνωστή χρήση της φασματοσκοπίας NMR σε βιολογικά συστήματα είναι η επίλυση τριτοταγών δομών βιομορίων σε ατομική λεπτομέρεια. Γεγονός είναι πάντως ότι η μεγάλη πλειοψηφία των γνωστών σήμερα δομών έχει επιλυθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X είναι προγενέστερη τεχνική και σχεδόν πλήρως αυτοματοποιημένη και, αν και απαιτεί την αβέβαιης έκβασης διαδικασία της κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης, είναι τελικά πιο εύχρηστη. Από την άλλη μεριά η φύση της μεθόδου του NMR και κυρίως η έλλειψη ικανοποιητικού βαθμού αυτοματοποίησής της την καθιστά περισσότερο χρονοβόρα παρά τα πρόσφατα τεχνικά και τεχνολογικά άλματα στο πεδίο. Πάντως, το NMR είναι η μέθοδος επιλογής στις περιπτώσεις πρωτεϊνών που κρυσταλλώνονται δύσκολα ή/ και είναι ιδιαίτερα ευκίνητες.



**Σχήμα 3.1** Υπολογισμός τριτοταγών δομών σε ατομική λεπτομέρεια χρησιμοποιώντας περιορισμούς που εξάγονται από φάσματα NMR. (A) Σήματα NOESY φανερώνουν τα πρωτόνια (ενωμένα με στικτές γραμμές) που απέχουν μικρή απόσταση μεταξύ τους στο χώρο ( $< 5 \text{ \AA}$ ). (B) Μια τρισδιάστατη δομή υπολογισμένη έτσι ώστε να ικανοποιούνται οι περιορισμοί NMR σχετικά με την απόσταση μεταξύ αυτών των ζευγών πρωτονίων<sup>[51]</sup>.

Τυπικά, για την επιτυχή έκβαση της διαδικασίας επίλυσης τριτοταγούς δομής με NMR απαιτείται η καταγραφή ποικίλων και πολύπλοκων φασμάτων βιομοριακών δειγμάτων υψηλών απαιτήσεων σε συγκέντρωση και καθαρότητα. Η σύνθεση των πληροφοριών που προκύπτουν από τον κάθε τύπο φάσματος οδηγεί στην κατάρτιση μίας λίστας περιορισμών διατομικών αποστάσεων και γωνιών, η ικανοποίηση των οποίων οδηγεί στην επίλυση της δομής. Στην περίπτωση πολυπεπτιδίων, η πλειονότητα των προαναφερθεισών περιοριστικών

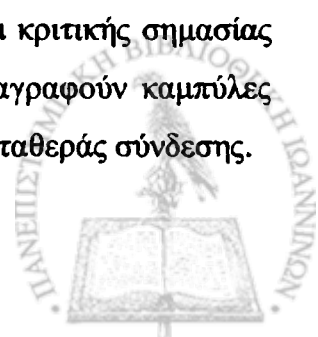
συνθηκών αφορούν αποστάσεις ζευγών πρωτονίων (Σχ.3.1), ενώ διέδρες γωνίες στην κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα που σχηματίζουν τα ανύσματα διπόλων H-N με τον κύριο άξονα του μορίου, συμπληρώνουν τη λίστα βελτιώνοντας την ακρίβεια (*precision*) της υπολογιζόμενης δομής. Το πλήθος των σημάτων στα φάσματα NMR αλλά και η διασπορά τους είναι παράγοντες καθοριστικοί για τη συλλογή ικανού αριθμού αξιόπιστων περιοριστικών συνθηκών και την επιτυχή τελικά έκβαση του εγχειρήματος. Ο χρόνος ανάλυσης των φασματοσκοπικών δεδομένων ώστε να αποκρυπτογραφηθεί η περιεχόμενη πληροφορία, συναρτάται ισχυρά από το μέγεθος και τη σταθερότητα του βιομορίου. Σχετικώς μικρά, μονομερή, θερμοδυναμικά σταθερά βιομόρια ή μικρά σύμπλοκα είναι συνεπώς τα πιο κατάλληλα συστήματα για να μελετηθούν με NMR..

### **3.2.2 Χρήση του NMR για το χαρακτηρισμό της δυναμικής φύσης βιομορίων**

Η φασματοσκοπία NMR είναι πολύτιμο και **αναντικατάστατο** εργαλείο για το χαρακτηρισμό της κίνησης σε μοριακό, ακόμα και υπομοριακό επίπεδο. Είναι δηλαδή δυνατό να μελετηθεί ο δυναμικός χαρακτήρας επιμέρους τμημάτων ενός βιομορίου σε επίπεδο ατόμων και να εξαχθούν συμπεράσματα για τη σημασία της ευελιξίας δραστικών ομάδων στη συνολική βιολογική δραστηριότητα του μορίου. Στις περιπτώσεις πολυπεπτιδίων, τα πειράματα χαρακτηρισμού της δυναμικής συμπεριφοράς αποσκοπούν στον υπολογισμό παραμέτρων όπως οι χρονικές σταθερές αποδιέγερσης  $T_1$  και  $T_2$  για κάθε πυρήνα  $^1\text{H}$  αμιδικής ομάδας του πολυπεπτιδικού σκελετού, και συνεπώς σε έμμεση εκτίμηση της ευελιξίας τους.

### **3.2.3 Χρήση του NMR για το χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων**

Το ατομικό επίπεδο λεπτομέρειας, σύμφυτο με τη φασματοσκοπία NMR, αποδεικνύεται χαρακτηριστικό κεφαλαιώδους σημασίας και στη μελέτη αλληλεπιδράσεων σε βιολογικά συστήματα. Σχετικά απλά και μετρίως απαιτητικά ως προς τη συγκέντρωση δείγματος, φάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να προσδιοριστούν οι συμμετέχουσες στην αλληλεπίδραση περιοχές του μορίου. Καταγράφοντας φάσματα πριν και μετά την προσθήκη προσδέτη μπορούν να προσδιοριστούν οι πυρήνες των οποίων το χημικό μικροπεριβάλλον αλλάζει λόγω της πρόσδεσης. Είναι δυνατό έτσι να **χαρτογραφηθούν** οι κριτικής σημασίας για την αλληλεπίδραση ομάδες στην επιφάνεια του μορίου και να καταγραφούν καμπύλες πρόσδεσης επί τη βάσει των οποίων μπορεί να προσδιοριστεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης.

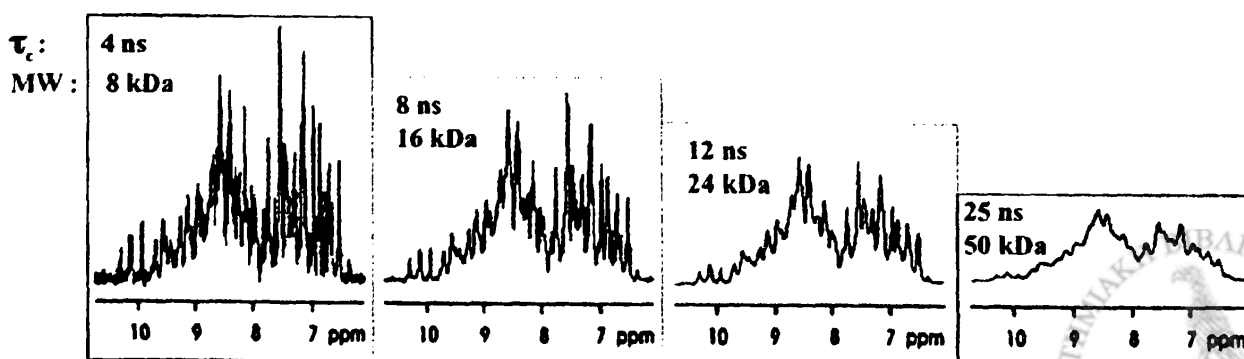


### 3.2.4 Χρήση του NMR για το βιοχημικό χαρακτηρισμό πολυπεπτιδίων- Μοριακό μέγεθος και NMR

Η επαγωγή της διαφοροποίησης των χημικών μετατοπίσεων λόγω τριτοταγούς δομής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πιστοποιηθεί η σωστή αναδίπλωση ενός πολυπεπτιδίου. Η ευρεία διασπορά των σημάτων NMR στους άξονες των φασμάτων οφείλεται στην ύπαρξη ποικίλων χημικών μικροπεριβαλλόντων που επάγουν μαγνητικές διαφοροποιήσεις σε χημικά όμοιους πυρήνες. Αυτή η κάλυψη ευρέως φάσματος συντεταγμένων αποτελεί συνεπώς στοιχείο ενδεικτικό της ύπαρξης δομής και το αντίστροφο. Η πληροφορία αυτή εμπεριέχεται σε κάθε τύπο φάσματος NMR, από το απλούστερο ως το πιο πολύπλοκο. Η καταγραφή διαδοχικών φασμάτων του ίδιου δείγματος είναι σε θέση να αποκαλύψει αποδιάταξη, πρωτεόλυση ή διαμορφωσιακή αλλαγή του πολυπεπτιδίου.

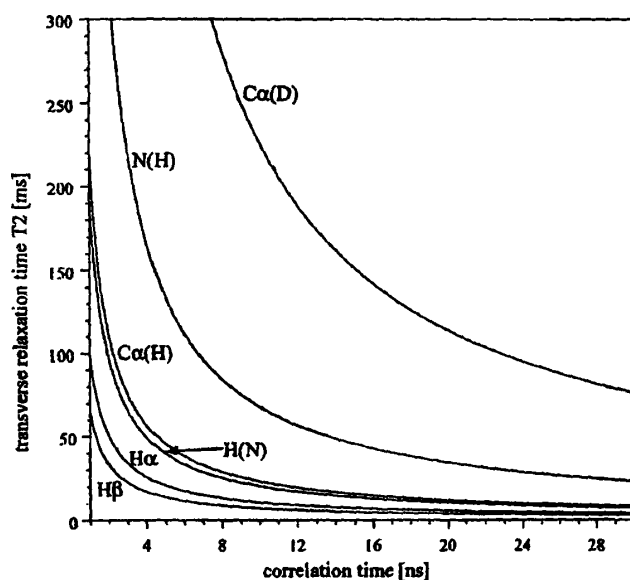
Εκτός από τον υψηλό βαθμό διασποράς των κορυφών ενός φάσματος NMR, πληροφορία περιέχει και η μορφή κάθε κορυφής και, πιο συγκεκριμένα, το εύρος μιας κορυφής στο μέσο του ύψους της. Η παράμετρος αυτή σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Το μοριακό μέγεθος αποτελεί σημαντική παράμετρο στη βιομοριακή φασματοσκοπία NMR. Μάλιστα, με τα διαθέσιμα σήμερα μαγνητικά πεδία, το όριο μοριακού βάρους κάτω από το οποίο η επίλυση της δομής μιας σφαιρικής πρωτεΐνης είναι εφικτή χρησιμοποιώντας τα συνήθη πρωτόκολλα της φασματοσκοπίας NMR είναι 30kDa. Βέβαια, τελευταία έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένες στρατηγικές προκειμένου να αυξηθεί αυτό το όριο<sup>[46-49]</sup> με αρκετή επιτυχία μάλιστα σε επιμέρους περιπτώσεις<sup>[44,45]</sup>, όμως το εγχείρημα εξακολουθεί να είναι αμφίβολης έκβασης ακόμα κι έτσι.

Πού οφείλεται όμως αυτός ο περιορισμός; Με απλά λόγια, στη φασματοσκοπία NMR, κανείς εξάγει συμπεράσματα από τη θέσεις και τις εντάσεις κορυφών. Τόσο πιο εύκολα



Σχήμα 3.2 Οι περιοχές συντονισμού των αρωματικών και αμιδικών πρωτονίων μονοδιάστατων φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  πολυπεπτιδίων αυξανόμενου μοριακού μεγέθους<sup>[43]</sup>.

μπορεί κανείς να μετρήσει αυτή την ένταση, όσο μεγαλύτερη είναι, αλλά και όσες λιγότερες αλληλεπικαλύψεις κορυφών υπάρχουν σε ένα φάσμα. Φυσικά, από όσο περισσότερα αμινοξέα αποτελείται μια πρωτεΐνη, τόσο περισσότερα σήματα αναμένονται, και συνακόλουθα περισσότερες αλληλεπικαλύψεις. Όμως, αυτό δεν αποτελεί το μοναδικό αίτιο του προαναφερθέντος περιορισμού, και ίσως όχι και το πιο βασικό. Γιατί, όσο ογκωδέστερο είναι ένα μόριο τόσο μεγαλύτερου εύρους και χαμηλότερης έντασης είναι οι κορυφές που καταγράφονται στα φάσματα δειγμάτων του. Έτσι, αν το μόριο είναι αρκετά μεγάλο, είναι δυνατό όχι απλά να δυσχεραίνονται η ακριβής μέτρηση της έντασης και ο ακριβής προσδιορισμός της θέσης κορυφών, αλλά να καθίστανται αδύνατοι. Μια “αίσθηση” για τη σχέση μεγέθους πρωτεΐνης – ευκρίνειας κορυφών παίρνει κανείς συγκρίνοντας το τμήμα της αρωματικής και αμιδικής περιοχής μονοδιάστατων φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  πολυπεπτιδίων διαφόρων μεγεθών (Σχ.3.2).

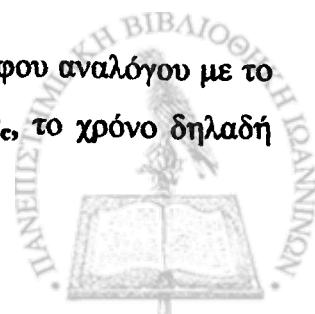


Σχήμα 3.3 Γραφικές παραστάσεις της εξάρτησης του χρόνου αποδιέγερσης  $T_2$  έξι χρησιμοποιούμενων στο NMR πυρηνικών spin από το χρόνο ιδιοσυσχετισμού (correlation time)<sup>[43]</sup>.

Το εύρος των κορυφών NMR στο μισό του ύψους τους είναι αντιστρόφως ανάλογο του χρόνου αποδιέγερσης  $T_2$ :

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi \cdot T_2}$$

Ο χρόνος αποδιέγερσης  $T_2$  εμφανίζει επίσης υπερβολική σχέση αντίστροφου αναλόγου με το χρόνο περιστροφικού ιδιοσυσχετισμού (*rotational correlation time*)  $\tau_c$ , το χρόνο δηλαδή



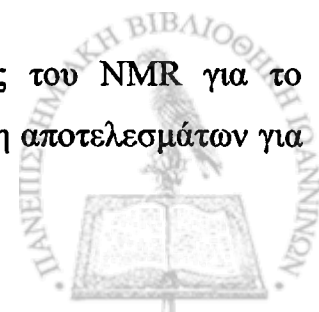
που απαιτείται ώστε το μόριο να ολοκληρώσει μια περιστροφή γύρω από τον κύριο άξονά του (*tumbling*) λόγω κίνησης Brown, όπως αποκαλύπτουν τα σχετικά γραφήματα για κάποιους από τους χρησιμοποιούμενους πυρήνες στο NMR (Σχ.3.3). Εξάγεται λοιπόν ότι το εύρος των κορυφών ενός φάσματος NMR είναι ευθέως ανάλογο με το χρόνο ιδιοσυσχετισμού του μορίου που μελετάται, και βέβαια αυτό είναι αλήθεια είτε πρόκειται για κάποιο βιομόριο (πρωτεΐνη, DNA, RNA, πολυσακχαρίτης κ.ά) είτε για κάποια οργανική ένωση. Εύκολα καταλαβαίνει κανείς ότι ο τρόπος που περιστρέφεται ένα μόριο σε διάλυμα και άρα και η ταχύτητα με την οποία το επιτυγχάνει εξαρτάται και από το σχήμα του. Προκειμένου πάντως περί πρωτεϊνών που μπορούν με καλή προσέγγιση να θεωρηθούν σφαιρικές η εξίσωση Stokes-Einstein προβλέπει ότι ο χρόνος ιδιοσυσχετισμού είναι ανάλογος του όγκου της συμπαγούς σφαίρας:

$$\tau_c = \frac{\eta}{kT} \cdot \frac{4\pi}{3} r^3,$$

όπου  $\eta$  το ιξώδες του διαλύματος,  $k$  η σταθερά Boltzman,  $T$  η θερμοκρασία και  $r$  η ακτίνα της σφαίρας. Καταδεικνύεται δηλαδή αυτό που ίσως αναμένει κανείς εξ αρχής: πρωτεΐνες που καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο είναι πιο βραδυκίνητες. Ας σημειωθεί εδώ ότι ο όγκος μιας πρωτεΐνης δεν περιορίζεται σε αυτόν που καταλαμβάνουν τα συστατικά της αμινοξέα, αλλά σε αυτόν προστίθεται και ένας εξωτερικός “φλοιός” μορίων νερού που ενυδατώνουν δραστικές ομάδες στην επιφάνεια του βιομορίου. Όσο μεγαλύτερη είναι μια πρωτεΐνη, τόσο μεγαλύτερος και ο φλοιός που την πλαισιώνει.

Ο παραπάνω συλλογισμός εξηγεί γιατί φάσματα NMR ογκωδέστερων πρωτεϊνών περιέχουν ευρείες και μικρότερης έντασης κορυφές και συνακόλουθα δικαιολογεί την υπεραντιπροσώπευση μικρών πρωτεϊνών στην κατανομή μοριακών βαρών των επιλυμένων με NMR δομών, όμως δεν είναι περιοριστικός ως προς τη συστατική μάζα της “πρωτεϊνικής σφαίρας”. Εκτός λοιπόν από πρωτεΐνες που αποτελούνται από μεγάλο αριθμό αμινοξέων (ενδεικτικά, πάνω από 300) εξίσου “μεγάλες για NMR” μπορεί να αποδεικνύονται κατά περίπτωση και μικρότερες πρωτεΐνες. Τέτοιες περιπτώσεις είναι αυτές πρωτεϊνών προσδεδωμένων σε κάποιο ογκώδη υποκαταστάτη, εισηγμένων σε μικκύλια, ή πρωτεϊνών που έχουν την τάση να ομο- ή ετερο- πολυμερίζονται.

Όπως προαναφέρθηκε, αναλυτικότερη περιγραφή της χρήσης του NMR για το βιοχημικό χαρακτηρισμό πολυπεπτιδίων συνοδεύει τη σχετική παράθεση αποτελεσμάτων για το εξεταζόμενο σε αυτή τη διατριβή πολυπεπτιδίδιο, το chromodomain c2.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**  
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



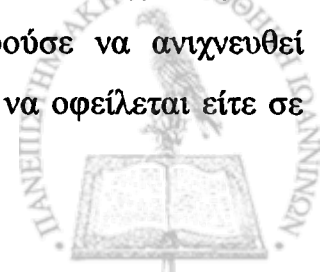
#### 4.1 Απομόνωση- αρχικός βιοφυσικός χαρακτηρισμός πολυπεπτιδίων

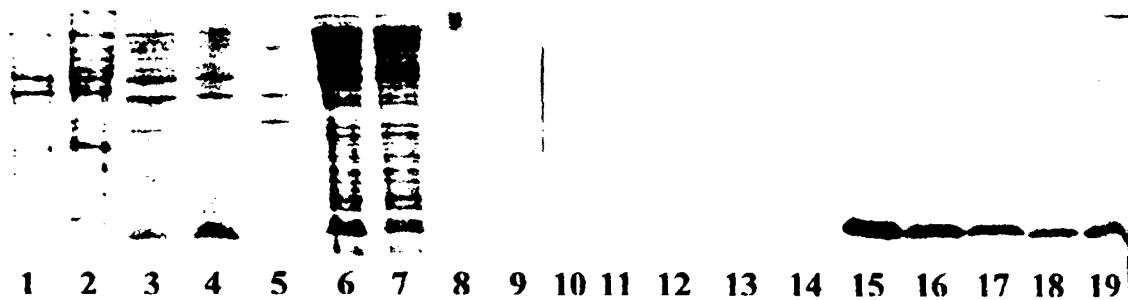
##### 4.1.1 Στρατηγική απομόνωσης πρωτεϊνών για δομικές μελέτες

Προκειμένου να επιλυθεί η τριτοταγής δομή βιομορίων σε ατομική λεπτομέρεια με τις διαθέσιμες σήμερα τεχνικές (κρυσταλλογραφία ακτίνων X, NMR), πρέπει να προηγηθεί απομόνωσή τους και μάλιστα σε ποσότητες σημαντικά μεγαλύτερες από τις απαιτούμενες για τα περισσότερα πειράματα που αποσκοπούν στον προσδιορισμό της λειτουργικότητας ενός τέτοιου βιομορίου. Έτσι, για το λόγο αυτό, βιοτεχνολογικά τροποποιημένα βακτήρια *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου το chromodomain της dMi-2 να παραχθεί και να ακολουθήσει απομόνωσή του από τα υπόλοιπα κυτταροπλασματικά συστατικά. Η έκφραση (*expression*) ενός γονιδίου –προερχόμενου από οποιονδήποτε οργανισμό– σε βακτηριακά συστήματα, χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή πρωτεϊνών για ερευνητικούς αλλά και εμπορικούς σκοπούς. Η αποδοτικότητα (παραγωγή ικανών πρωτεϊνικών ποσοτήτων για τις περισσότερες εφαρμογές με σχετικά χαμηλό κόστος) είναι ίσως η πρώτη απάντηση που έρχεται στο μυαλό όταν κανείς καλείται να δικαιολογήσει την επιλογή ενός τέτοιου συστήματος. Δεν είναι όμως η μόνη ή η πιο σημαντική. Εξ αιτίας της βιολογίας τους αλλά και της πολύχρονης πια χρήσης βακτηριακών συστημάτων έκφρασης, υπάρχει διαθέσιμη ποικιλία δοκιμασμένων-βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων που καλύπτουν ακόμα και εξειδικευμένες ανάγκες. Στον τομέα του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η παραγωγή βιομορίων εμπλουτισμένων με **σταθερά ισότοπα** (*stable isotopes*) που βρίσκονται σε πολύ χαμηλά ποσοστά στη φύση όπως αυτά του  $^{15}\text{N}$  και του  $^{13}\text{C}$ . Πρακτικά, η επίτευξη του παραπάνω στόχου με χρήση βακτηριακού συστήματος έκφρασης δεν συνεπάγεται επιπλέον επιπλοκές ή ιδιαίτερες τροποποιήσεις με εξαίρεση αυτή του οικονομικού προγραμματισμού.

##### 4.1.2 Αρχικές προσπάθειες απομόνωσης του c2- αρχικά προβλήματα

Οι αρχικές προσπάθειες έκφρασης και απομόνωσης του c2 περιελάμβαναν μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* (στελεχών BL21(DE3) και BL21(DE3) plysS) με πλασμίδιο pET15b στο οποίο είχε εισαχθεί το cDNA του c2<sup>[23]</sup>. Κατόπιν επαγωγής (*induction*) της έκφρασης, στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων *E.coli* BL21(DE3) plysS δεν μπορούσε να ανιχνευθεί ηλεκτροφορητικά το c2 (Σχ.4.1,1-2). Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε





**Σχήμα 4.1** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από τις διαδικασίες έκφρασης και καθαρισμού του c2 σε gel ακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 15% με χρήση συστήματος ρυθμιστικών διαλυμάτων Tris- Tricine. Διαδρομές: 1., 2. ίσος αριθμός βακτηρίων του στελέχους BL21(DE3) plysS αντίστοιχα πριν και μετά την επαγωγή της έκφρασης με χρήση IPTG. 3., 4. τα ίδια δείγματα απουσία του πλασμιδίου plysS. 5. διάλυμα πρωτεϊνών-δεικτών (*marker solution*) μοριακών βαρών 66, 45, 36, 29, 24, 20, 14.2, 6.5kDa κατά σειρά. 6. βακτηριακό διάλυμα μετά τη λύση των κυττάρων. 7. το ίδιο υλικό μετά το πέρασμα από στήλη ιόντων Ni. 8., 9., 10. εκπλύσεις με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 5mM. 11., 12. 10mM. 13., 14. 20mM. 15.-18. τμηματικές εκλούσεις με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 150mM. 19. συνολική έκλουση.

χαμηλά επίπεδα έκφρασης, είτε σε έντονη ενδοκυττάρια πρωτεόλυση χωρίς το ένα ενδεχόμενο να αποκλείει το άλλο. Πιθανότερη όμως εκδοχή κρίνεται η πρώτη αφού χρησιμοποιώντας το ίδιο στέλεχος χωρίς το πλασμίδιο plysS διακρίνεται πια έκφραση του c2 (Σχ.4.1,3-4). Βέβαια, εκτός από τα επίπεδα έκφρασης, σε μια διαδικασία παραγωγής και απομόνωσης μιας πρωτεΐνης εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει και η διαλυτότητά της. Μειωμένη διαλυτότητα συνεπάγεται συσσωμάτωση μορίων της και κατακρήμνισή τους μαζί με τα μη υδατοδιαλυτά μέρη του κυττάρου, όπως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, υπολείμματα μεμβρανών μετά τη διαδικασία της λύσης. Τα ενδοκυττάρια αυτά συσσωματώματα γνωστά ως **σωμάτια εγκλεισμού (*inclusion bodies*)**, περιείχαν περίπου το 80% της συνολικής εκφραζόμενης ποσότητας στην περίπτωση του c2, περιορίζοντας έτσι το ποσοστό της πρωτεΐνης που μπορεί να απομονωθεί από το κυτταροδιάλυμα. Εξίσου όμως περιορισμένη ήταν και η επιτυχία που γνώρισε η προσπάθεια απομόνωσης της διαλυτής ποσότητας της πρωτεΐνης με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων νικελίου. Παρ' ότι στην πλασμιδιακή κατασκευή υπήρξε πρόνοια ώστε το c2 να συνεκφράζεται μαζί με μια μικρή αμινοτελική ουρά έξι καταλοίπων ιστιδίνης, προκειμένου να διευκολυνθεί η απομόνωσή του με χρήση της προαναφερθείσας τεχνικής, το ηλεκτροφορητικό προφίλ της εκλουόμενης πρωτεΐνης δεν ήταν "καθαρό" (Σχ.4.1,15-19). Εκτός από την αναμενόμενη κύρια ζώνη που αντιστοιχούσε στο c2 και παρά τις επίμονες πλύσεις της στήλης (Σχ.4.1,9-14), στο έκλουσμα εμφανίζονταν και άλλες πρωτεϊνικές ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Την εικόνα αυτή θα εξηγούσαν μια σειρά από ενδεχόμενα, όπως προβληματικός τερματισμός της μεταγραφής, ανθεκτικά στις αποδιατακτικές συνθήκες της ηλεκτροφόρησης συσσωματώματα μορίων c2, ή ύπαρξη



βακτηριακών πρωτεϊνών που συνεκλούνται με το c2 είτε λόγω μη ειδικής συσσωμάτωσης μαζί του είτε λόγω πλημμελούς καθαρισμού. Οι παραπάνω εξηγήσεις είναι αμοιβαία μη αλληλοαποκλειόμενες και όποιος συνδυασμός τους και αν αληθεύει το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα παρέμενε μη ικανοποιητικό ως προς την καθαρότητα και περιορισμένο ως προς την ποσότητα. Το πιο αποκαρδιωτικό χαρακτηριστικό της παρασκευής όμως ήταν η καταβύθιση της πρωτεΐνης με το πέρας του χρόνου (ήδη από τις πρώτες δώδεκα ώρες) ακόμα και σε συγκεντρώσεις δέκα φορές αραιότερες από αυτές που απαιτούνται για τη λήψη απαραίτητων για την επίλυση δομής φασμάτων NMR. Η συμπεριφορά αυτή δεν άλλαξε ακόμα και έπειτα από εισαγωγή ενός δεύτερου χρωματογραφικού σταδίου (ιοντοανταλλαγή) στη διαδικασία καθαρισμού που απάλλαξε το c2 από κάποιες από τις φαινομενικά συνεκλούμενες πρωτεΐνες. Εξ άλλου, καμία ουσιαστική διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε κατόπιν δοκιμής μεγάλης ποικιλίας ρυθμιστικών διαλυμάτων και ιονικής ισχύος.

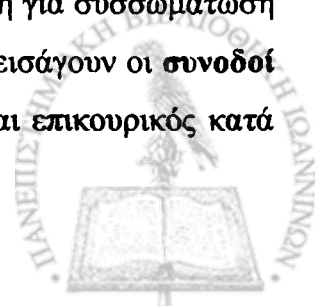
#### 4.1.3 Πιθανές αιτίες που καθιστούσαν δυσχερή την απομόνωση δείγματος NMR

Μερικές φορές η αιτία που εξηγεί “συμπτώματα” όπως αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω κατά τη διαδικασία έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτηριακά συστήματα (περιορισμένη διαλυτότητα, “επίμονα ακάθαρτο” ηλεκτροφορητικό προφίλ), είναι η **λανθασμένη αναδίπλωση (misfolding)**. Είναι πιθανό δηλαδή, το νεοσυντιθέμενο κατά τη μετάφραση εντός του βακτηρίου μόριο, να μην υιοθετεί τη σταθερή, βέλτιστη θερμοδυναμικά, τριτοταγή δομή αλλά αυτή να “στρεβλώνεται” σε κάποιο βαθμό. Υπονομεύεται έτσι η σταθερότητα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, αυτή να υφίσταται κατά περίπτωση είτε συσσωμάτωση και καταβύθιση, είτε πρωτεόλυση (η τελευταία συνήθως σχετίζεται με την έκφραση ολικώς ή μερικώς **αποδιπλωμένων (unfolded)** πρωτεϊνών). Ποιές όμως οι αιτίες που οδηγούν πρωτεΐνες σε εσφαλμένη αναδίπλωση σε τέτοια συστήματα έκφρασης και τι –αν υπάρχει κάτι– μπορούμε να κάνουμε για να τις άρουμε;

Ο κακός σχεδιασμός της πλασμιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιείται για την έκφραση είναι συχνά ο λόγος που η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι εσφαλμένα αναδιπλωμένη ή και τελείως αποδιπλωμένη, ειδικότερα σε περιπτώσεις πρωτεϊνικών περιοχών (domain), όπως είναι το c2, και όχι τόσο συχνά σε αυτές ακέραιων πρωτεϊνών. Και αυτό γιατί, όταν η δομή δεν είναι γνωστή, υπάρχει ο κίνδυνος του εσφαλμένου καθορισμού των ορίων τέτοιων περιοχών, του “πού ξεκινάει” δηλαδή και “που τελειώνει” το παραγόμενο βιοπολυμερές<sup>[111]</sup>

<sup>119]</sup>. Έτσι, αν αυτό είναι “πιο κοντό” ή εκτενέστερο από “όσο πρέπει” ενδέχεται κάποιο στοιχείο δευτεροταγούς δομής να διακόπτεται –να “κόβεται στη μέση”– διαταράσσοντας έτσι όχι μόνο δευτεροταγείς τοπικές αλληλεπιδράσεις αλλά πιθανά και τριτοταγείς, αποσταθεροποιώντας το βιομόριο. Πώς όμως ξεφεύγει κανείς από το φαύλο κύκλο που διαγράφεται; Προκειμένου να επιλυθεί η δομή του c2, πρέπει ουσιαστικά αυτή να είναι γνωστή ώστε να κατασκευαστεί ο κατάλληλος φορέας έκφρασης... Η αλήθεια είναι ότι η γνώση που “προαπαιτείται” είναι αυτή της δευτεροταγούς δομής, ενώ πρακτικά αρκεί μια “ζυγισμένη εκτίμηση” σχετικά με τα όρια των επιμέρους στοιχείων της. Μια ιδέα λοιπόν μπορεί κανείς να πάρει, προτού μπει στη διαδικασία κατασκευής του πλασμιδίου που θα εκφράζει το απομονωμένο domain, από περιορισμένη πρωτεόλυση (*limited proteolysis*) της πρωτεΐνης από την οποία προέρχεται. Η τεχνική αυτή πάντως δεν μπορεί παρά να οδηγεί σε επισφαλή συμπεράσματα, μιας και αυτό που ξεχωρίζει είναι τα συμπαγή δομημένα domain από τις χαλαρές θηλιές (loops) που συνήθως τα συνδέουν. Τέτοια όμως πιο χαλαρά δομημένα τμήματα μπορούν να εμπεριέχονται σε ένα domain είτε ως θηλιές που συνδέουν τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής είτε και ως τμήματα τυχόν ενθέσεων (insertions). Και βέβαια, κανείς πρέπει να δεχθεί μια λίγο-πολύ ισόρροπη κατανομή των αμινοξέων που αναγνωρίζουν τέτοιες χρησιμοποιούμενες πρωτεάσες (συνήθως αυτά με θετικά φορτισμένη πλαϊνή αλυσίδα) στο σύνολο του μορίου, παραδοχή μάλλον χονδροειδής. Υπό προϋποθέσεις, ένα πιο “απλοϊκό” εργαλείο μπορεί να δώσει περισσότερο αξιόπιστη πληροφορία. Όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του c2, όταν υπάρχει διαθέσιμη δομική πληροφορία σε συνδυασμό με υψηλό βαθμό ομολογίας, η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών δύο domain μπορεί να οδηγήσει σε μία “ελεγχόμενα ασφαλή” εκτίμηση σχετικά με τις θέσεις των επιμέρους στοιχείων δευτεροταγούς δομής. Έτσι, η στοίχιση του chromodomain της dMi-2 που μας ενδιαφέρει, με τα γνωστής τριτοταγούς διαμόρφωσης (άρα και δευτεροταγούς) αντίστοιχα των Polycomb και HP1 δεν αποκαλύπτει κάποιο χονδροειδές λάθος στο σχεδιασμό της διαθέσιμης κατασκευής που θα εξηγούσε τη “δύστροπη συμπεριφορά” του παραγόμενου πολυπεπτιδίου<sup>[23]</sup>.

Εκτός όμως από τον εσφαλμένο καθορισμό του domain, πιο “βιολογικές” και συνάμα πιο δύσκολα αντιμετωπίσιμες αιτίες είναι σε θέση να εξηγήσουν την τάση για συσσωμάτωση του προς μελέτη βιομορίου. Μια παράμετρο προς αυτή την κατεύθυνση εισάγουν οι συνοδοί πρωτεΐνες ή σαπερόνες (*chaperones*). Ο ρόλος των μορίων αυτών είναι επικουρικός κατά

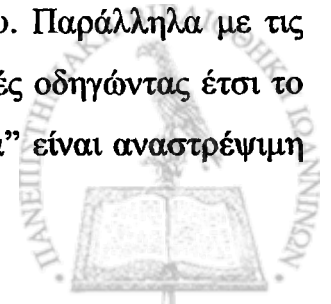


την αναδίπλωση πρωτεϊνών. Δεν υποδεικνύουν τη δομή που οφείλει να υιοθετήσει μια πρωτεϊνική αλληλουχία, αλλά είναι σε θέση να “συντομεύσουν την ενεργειακή διαδρομή” που πρέπει αυτή να ακολουθήσει ώστε να αναδιπλωθεί<sup>[5]</sup>. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα, η εναλλακτική αυτή διαδρομή είναι που αποτρέπει την εσφαλμένη αναδίπλωση, και έτσι η αντίστοιχη σαπερόνη καθίσταται απαραίτητη για τη σωστή αναδίπλωση. Σε περιπτώσεις – όπως είναι και αυτή του c2– που το προς μελέτη πολυπεπτίδιο προέρχεται από διαφορετικό οργανισμό από αυτόν στον οποίο εκφράζεται και αποτελεί τμήμα μόνο της αλληλουχίας της πρωτεΐνης από την οποία προέρχεται, ενδέχεται να μη δρα η αντίστοιχη σαπερόνη. Ο ρυθμός δε, αλλά και το ποσοστό της **υπερέκφρασης (overexpression)**, μπορεί να είναι τόσο υψηλά που τυχόν υπάρχουσες και συμβατές βακτηριακές σαπερόνες να μην προλαβαίνουν να ανταποκριθούν.

#### **4.1.4 Προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν ώστε να καταστεί δυνατή η απομόνωση δείγματος c2 συμβατού με τις απαιτήσεις προσδιορισμού τριτοταγούς δομής με NMR**

##### **4.1.4.1 Χρήση αποδιατακτικών παραγόντων**

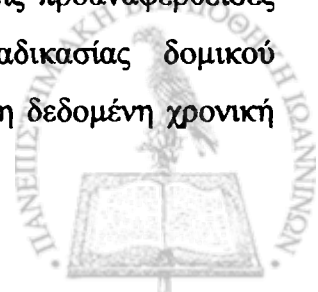
Μία από τις συνήθεις πρακτικές που ακολουθεί κανείς όταν αντιμετωπίζονται προβλήματα διαλυτότητας κατά την έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια και πριν καταφύγει σε πιο εξειδικευμένες και περίπλοκες προσεγγίσεις, είναι η προσπάθεια απομόνωσης του αδιάλυτου πληθυσμού. Άλλωστε αν, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του c2 για παράδειγμα, για κάθε 2 mg που βρίσκονται στο κυτταροδιάλυμα υπάρχουν άλλα 8 ή και περισσότερα στα σωματία εγκλεισμού γιατί αυτή η ποσότητα να αφήνεται ανεκμετάλλευτη; Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο διαλυτοποίησης των αδιάλυτων υπολειμμάτων μετά την κυτταρική λύση –στα οποία βρίσκονται τα σωματία εγκλεισμού– ενώ κατά τα άλλα δεν διαφοροποιείται από πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν το κυτταρικό διάλυμα ως αρχικό υλικό για την απομόνωση. Η διαλυτοποίηση επιτυγχάνεται με χρήση ουρίας ή υδροχλωρικής γουανιδίνης. Τα αντιδραστήρια αυτά διαταράσσουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων της ίδιας, αλλά και διαφορετικών πρωτεϊνών, διασπώντας έτσι τα συσσωματώματα και βελτιστοποιώντας την καθαρότητα του προς απομόνωση βιομορίου. Παράλληλα με τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις όμως, διαταράσσονται και οι ενδομοριακές οδηγώντας έτσι το πολυπεπτίδιο σε αποδιάταξη. Και ενώ στη θεωρία αυτή η “παρενέργεια” είναι αναστρέψιμη



με την απομάκρυνση του αποδιατακτικού παράγοντα, στην πράξη η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών μπορεί να αποδειχθεί έως και αδύνατη για δεδομένη χρονική επένδυση.

Στην περίπτωση του c2 η διάσπαση των σωματίων εγκλεισμού με χρήση ουρίας ή υδροχλωρικής γουανιδίνης και η απομόνωσή του από αυτό το αρχικό υλικό με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων νικελίου οδήγησε σε διαλύματα πολύ υψηλής καθαρότητας, ενώ παράλληλα βελτιώθηκε και η ποσοτική απόδοση της διαδικασίας σε σχέση με τις προηγούμενες προσπάθειες απομόνωσης από το κυτταροδιάλυμα. Και ενώ η χρήση αποδιατακτικών παραγόντων τεκμηρίωσε τη συσσωμάτωση (μεταξύ μορίων c2 ή c2 και άλλων βακτηριακών πρωτεϊνών) ως την αιτία του πρότερου “ακάθαρτου” ηλεκτροφορητικού προφίλ δεν έμελλε να οδηγήσει σε απτά οφέλη. Προκειμένου να επιτευχθεί επαναδιάταξη (*refolding*) του c2 εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα σταδιακής απομάκρυνσης του αποδιατακτικού παράγοντα κατά τη διάρκεια διαπίδωσης (*dialysis*) ή ενώ το πολυπεπίδιο βρισκόταν ακινητοποιημένο σε στήλη  $Ni^{2+}$ . Η διαδικασία επαναλήφθηκε με διαφοροποιήσεις στο ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης του αποδιατακτικού παράγοντα, τη θερμοκρασία, τα συστατικά των ρυθμιστικών διαλυμάτων αλλά και τις συγκεντρώσεις αυτών, την παρουσία μικρών ποσοτήτων μη ιονικών απορρυπαντικών, με αδιαφοροποίητο όμως το τελικό αποτέλεσμα: την εντυπωσιακή, εμφανή δια γυμνού οφθαλμού, και σχεδόν ποσοτική, όπως αποκαλύφθηκε ηλεκτροφορητικά, καταβύθιση της πρωτεΐνης.

Όπως γίνεται λοιπόν εύκολα αντιληπτό από τα προαναφερθέντα, οι προσπάθειες απομόνωσης του c2 κατόπιν έκφρασής του σε βακτήρια χρησιμοποιώντας την αρχική πλασμιδιακή κατασκευή δεν καρποφόρησαν. Στην καλύτερη περίπτωση μπορούσε να εξαχθεί ανεπαρκής ποσότητα ( $\approx 0.4\text{mg}$  για κάθε ένα λίτρο υγρής καλλιέργειας), μέτριας καθαρότητας, περιορισμένης διαλυτότητας σε σχετικά μικρή μάλιστα συγκέντρωση ( $\approx 0.1\text{mg/ml}$ ), ακολουθώντας μια διαδικασία χαμηλής απόδοσης. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι προκειμένου να καταστεί δυνατή η επίλυση της τριτοταγούς δομής μιας μικρής πρωτεΐνης του μοριακού βάρους του c2 με χρήση φασματοσκοπίας NMR, απαιτούνται κατ' ελάχιστο και κατά προσέγγιση  $2.5\text{mg}$ , σε συγκέντρωση  $5\text{mg/ml}$  υψηλής καθαρότητας δείγματος για κάθε πείραμα που οδηγεί στη λήψη ενός μόνο φάσματος από το σύνολο των απαιτούμενων. Η αδυναμία τήρησης μίας μόνο από τις προαναφερθείσες ελάχιστες συνθήκες εμποδίζει και την έναρξη ακόμα της διαδικασίας δομικού χαρακτηρισμού, τη στιγμή που το δείγμα που μπορούσε να παραχθεί τη δεδομένη χρονική



στιγμή παραβίαζε ταυτόχρονα και τις τρεις. Αν σε αυτό προσθέσει κανείς τη σταθερότητα της φυσικοχημικής κατάστασης του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή και υψηλότερη για διάστημα τριών ημερών κατ' ελάχιστο που επιβάλλεται από τεχνικούς φασματοσκοπικούς λόγους, καταλαβαίνει πόσο απείχε από το να καταστεί *οριακά χρήσιμο* για την επίλυση της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια το δεδομένο πρωτεϊνικό παρασκεύασμα.

Για κάποιες πρωτεΐνες/ πρωτεϊνικές περιοχές η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών ώστε να καταστεί δυνατός ο δομικός τους χαρακτηρισμός αποδεικνύεται “*πρακτικά ανέφικτη*”. Σε αυτή την κατηγορία για παράδειγμα, ανήκει η πλειοψηφία των διαμεμβρανικών ή των περιφερειακά σχετιζόμενων με τη μεμβράνη πρωτεϊνών. Αυτό άλλωστε καταδεικνύεται και από τον μικρό αριθμό επιλυμένων δομών τέτοιων πρωτεϊνών. Οι περιπτώσεις κάποιων άλλων φανερώνουν ότι αρχικά προβλήματα περιορισμένης έκφρασης, πρωτεόλυσης, αποδιάταξης ή περιορισμένης διαλυτότητας μπορεί να έχουν την αιτία τους όχι στα χαρακτηριστικά αυτού καθεαυτού του βιομορίου, αλλά σε προσαπτόμενα ή υπολειπόμενα κατά την έκφραση ή την απομόνωση. Έτσι εκτός από τις σχετικά εύκολα τροποποιήσιμες επιμέρους παραμέτρους που αφορούν στις διαδικασίες της έκφρασης ή της απομόνωσης, σημαντικό ρόλο παίζουν ο φορέας έκφρασης, αλλά και τα όρια του εκφραζόμενου βιομορίου προκειμένου περί δομικής περιοχής (domain).

#### 4.1.4.2 Τροποποίηση παραμέτρων κατά την επαγωγή και την απομόνωση

Η περιορισμένη διαλυτότητα, αιτία για την αδυναμία παρασκευής δείγματος ικανοποιητικής καθαρότητας, ποσότητας και συγκέντρωσης, που παρατηρήθηκε για το c2 ήταν λοιπόν γνώρισμα του domain αυτού καθεαυτού ή της δεδομένης παρασκευής; Ποικιλία ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφόρων ιονικών ισχύων, εναλλακτικοί τρόποι απομόνωσης και τροποποίηση άλλων επιμέρους παραμέτρων των πρωτοκόλλων απομόνωσης εξετάστηκαν χωρίς όμως να βελτιστοποιήσουν τη συμπεριφορά του δείγματος. Αντίστοιχης έκβασης αποδείχθηκαν και οι τροποποιήσεις παραμέτρων που επιχειρήθηκαν κατά την επαγωγή ή την κυτταρική λύση, όπως είναι η οπτική πυκνότητα της βακτηριακής καλλιέργειας τη στιγμή της επαγωγής, η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου επαγωγής (IPTG) ή η παρουσία μη ιονικών απορρυπαντικών κατά τη λύση. Ας σημειωθεί βέβαια εδώ ότι για λόγους που έχουν να κάνουν με τη λήψη φασμάτων NMR η αγωγιμότητα (και άρα η ιονική ισχύς) του διαλύματος πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό χαμηλότερη<sup>[36-38]</sup>, και να αποφεύγεται η παρουσία

μικρών οργανικών μορίων (όπως η γλυκερόλη ή τα απορρυπαντικά). Σε αντίθετη περίπτωση ό,τι κανείς κερδίζει σε επιπλέον διαλυτότητα με χρήση τέτοιων αντιδραστηρίων ενδέχεται να μην μεταφράζεται τελικά σε ουσιαστικό κέρδος, δηλαδή σε σήμα NMR, ενώ παράλληλα να υποβαθμίζεται η ποιότητα των φασμάτων. Με αυτούς τους περιορισμούς λοιπόν ένα ευρύ φάσμα παραμέτρων και συνθηκών που μπορούσαν να μεταβληθούν ώστε να βελτιστοποιηθεί η συμπεριφορά του πολυπεπτιδίου που προέκυπτε από τη δεδομένη κατασκευή είχε ήδη καλυφθεί. Έτσι αυτό που έμενε να εξεταστεί ήταν ο αντίκτυπος που θα μπορούσαν να έχουν στη συμπεριφορά του πολυπεπτιδίου διαφορετικοί πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης, αλλά και διαφορετικά ενθέματα.

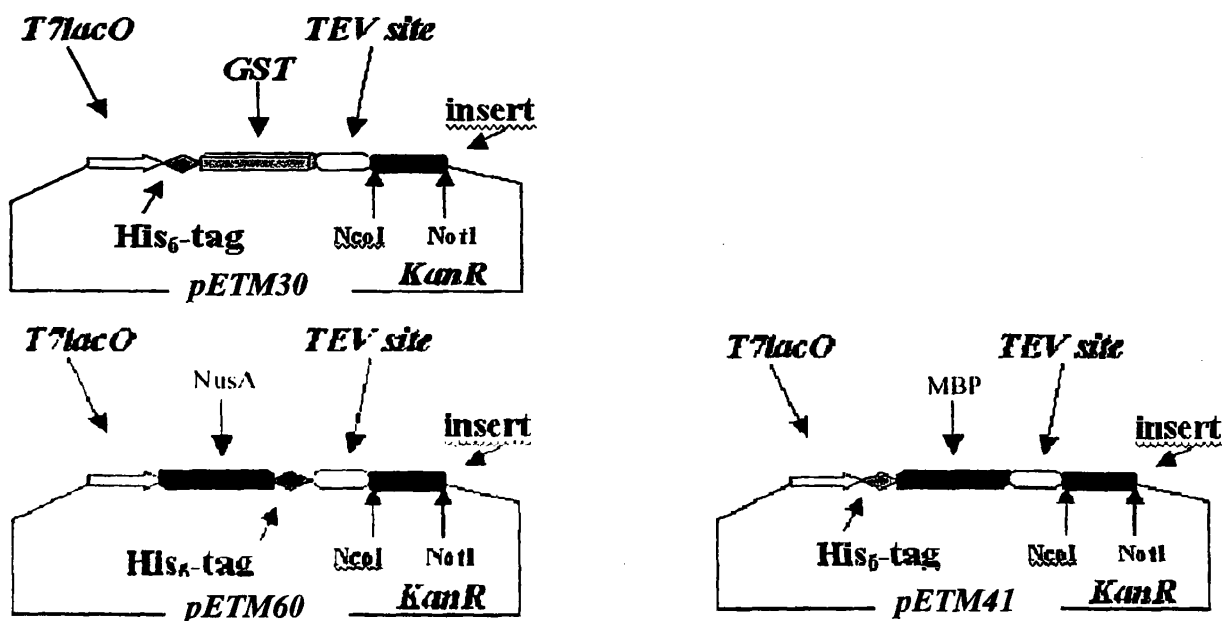
#### 4.1.4.3 Χρήση εναλλακτικών φορέων έκφρασης

Η επιλογή των πλασμιδίων που θα χρησιμοποιούνταν στις νέες κατασκευές έγινε βάσει συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που εν δυνάμει τα καθιστούσαν καταλληλότερα του έως τώρα χρησιμοποιούμενου pET15b. Κατ' αρχήν οι τρεις πλασμιδιακοί φορείς στους οποίους εντέθηκε το cDNA του c2 είναι pET, τροποποιημένοι έτσι ώστε το c2 να συνεκφράζεται αμινοτελικά με μια ουρά έξι καταλοίπων ιστιδίνης και μία πρωτεΐνη (Σχ.4.2). Έτσι κατόπιν έκφρασης παράγεται ένα βιομόριο του οποίου μόνο η αμινοξική αλληλουχία του καρβοξυτελικού μέρους αντιστοιχεί στο c2. Αμινοτελικά κωδικοποιούνται στον pETM41 ο προσδέτης της μαλτόζης (*Maltose Binding Protein-MBP*), στον pETM30 η S-μεταφοράση της γλουταθειόνης (*Glutathione S- Transferase-GST*) και στον pETM60 η πρωτεΐνη επιμήκυνσης της μεταγραφής NusA (*Transcription elongation protein* ή *N- utilization substance A-NusA*). Στα πλεονεκτήματα της χρήσης αυτών των φορέων συγκαταλέγονται:

- i) η ευελιξία μιας και το ίδιο ένθεμα μπορεί να εισαχθεί εύκολα σε καθέναν από αυτούς (αλλά και μια σειρά άλλων) χρησιμοποιώντας τα ίδια περιοριστικά ένζυμα,
- ii) η δυνατότητα εισαγωγής ενός ακόμα σταδίου απομόνωσης, εκτός της χρωματογραφίας συγγένειας  $Ni^{2+}$ , με χρήση στηλών χρωματογραφίας συγγένειας αμυλόζης ή γλουταθειόνης στις οποίες προσδένεται ο MBP ή η GST αντίστοιχα,
- iii) η δυνατότητα αποκοπής του αμινοτελικού, συνεκφραζόμενου με το c2, τμήματος με τη χρήση μιας εξειδικευμένης πρωτεάσης (*TEV*) προκειμένου να καταστεί δυνατή η απομόνωση του c2.



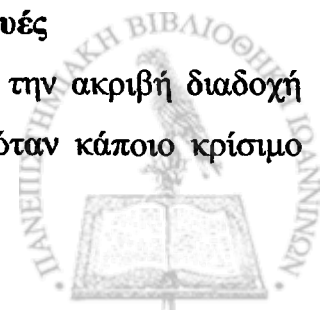
Το σημαντικότερο όμως εκτιμώμενο/ προσδοκώμενο όφελος –και ο κύριος λόγος για την επιλογή αυτών των φορέων για την έκφραση του c2– είναι η αύξηση της διαλυτότητας του παραγόμενου βιομορίου. Κάτι τέτοιο αναμένεται αφού η ύπαρξη μιας ογκώδους πρωτεΐνης δίπλα σε κάθε μόριο c2 δεν μπορεί παρά, στερικά και μόνο, να εμποδίζει σε κάποιο βαθμό τη συσσωμάτωση πολλών μορίων που οδηγεί σε καταβύθιση. Επιπλέον, σε περίπτωση που μόρια της πρωτεϊνικής περιοχής του ενδιαφέροντός μας οδηγούνται σε συσσωμάτωση εξ αιτίας εσφαλμένης αναδίπλωσης (misfolding), η ύπαρξη μιας καλά αναδιπλωμένης, σταθερής πρωτεΐνης μπορεί ίσως να σταθεροποιήσει κάποιο ενεργειακό ενδιάμεσο απαραίτητο για τη σωστή αναδίπλωση του c2. Μεγαλύτερης όμως βαρύτητας από οποιοδήποτε επιχείρημα μπορεί κανείς να επικαλεστεί προκειμένου να υποστηρίξει την καταλληλότητα των συγκεκριμένων εργαλείων έκφρασης, είναι ίσως το γεγονός ότι η χρήση τους έχει φανεί ευεργετική σε παρόμοιες περιπτώσεις στην πράξη<sup>[39-42]</sup>. Βέβαια, κάτι τέτοιο δεν μπορεί να εκλαμβάνεται ως α priori εγγύηση παρόμοιου ευεργετικού αποτελέσματος στην υπερέκφραση κάθε πρωτεΐνης, αλλά μάλλον σαν μια υποσχόμενη προσέγγιση προς διερεύνηση.



Σχήμα 4.2 Απλοποιημένη αναπαράσταση των pETM φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Με κόκκινο φαίνεται το ένθεμα του ενδιαφέροντός μας μεταξύ των θέσεων που ορίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και NotI.

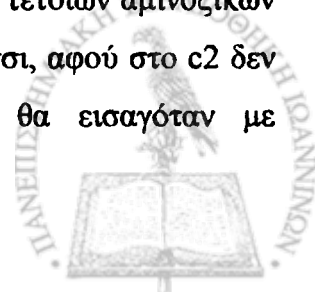
#### 4.1.4.4 Χρήση εναλλακτικών ενθεμάτων- νέες πλασμιδιακές κατασκευές

Όσο αφορά το ένθεμα, το οποίο άλλωστε θα καθορίσει το μήκος και την ακριβή διαδοχή αμινοξέων του εκφραζόμενου c2, όπως ήδη αναφέρθηκε δεν διαφαινόταν κάποιο κρίσιμο



λάθος στο σχεδιασμό του υπάρχοντος στο έως πρότινος χρησιμοποιούμενο πλασμίδιο που θα δικαιολογούσε προβληματική συμπεριφορά. Έτσι, δεν υπήρχε και επιτακτική ανάγκη ανασχεδιασμού του. Παρόλα αυτά η διαλυτότητα της προκύπτουσας πρωτεΐνης παρέμενε εμφατικά χαμηλή, ενώ το γεγονός ότι, ακόμα και με τη χρήση των νέων φορέων μετά την αποκοπή του αμινοτελικού συνεκφραζόμενου τμήματος, το cDNA του c2 θα ήταν αυτό που θα καθόριζε τη συμπεριφορά του πολυπεπτιδίου, καθιστούσε την επιλογή του ενθέματος κεντρικής σημασίας. Με δεδομένη λοιπόν την επικείμενη ανακατασκευή των φορέων έκφρασης, αποφασίστηκε να προχωρήσει παράλληλα η ένθεση περισσότερων του ενός cDNA που τελικά θα κωδικοποιούσαν ελαφρώς διαφοροποιημένες εκδοχές του c2, ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη εξ αυτών, αν φυσικά υπήρχε κάποια που πληρούσε τις προαναφερθείσες ελάχιστες προϋποθέσεις. Η κατασκευή αυτών των τμημάτων DNA έγινε *in vitro* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) ενώ ο σχεδιασμός τους βασίστηκε στις εξής αρχές και επιμέρους σκεπτικά:

- i) Το κεντρικό τμήμα του c2 που υιοθετούσε τη χαρακτηριστική αναδίπλωση (fold) των chromodomain, ευνότητα, δεν θα αλλοιωνόταν καθ' οιονδήποτε τρόπο.
- ii) Εκατέρωθεν αυτού του κεντρικού “πυρήνα” –η θέση και η έκταση του οποίου μπορούσε να προβλεφθεί με αρκετή ασφάλεια δεδομένης της υψηλής ομολογίας του c2 με chromodomain γνωστής δομής– θα επιλεγόταν ένας συνδυασμός αμινο- και καρβοξυ-τελικών ορίων του εκφραζόμενου πολυπεπτιδίου, ώστε να προσδιοριστεί ο αντίκτυπος της ύπαρξης “ουρών” στη διαλυτότητα του μορίου.
- iii) Στις περιπτώσεις των chromodomain της HP1 από *Drosophila* και ποντικό ειδικότερα, η αμινοτελική αυτή “ουρά” εμφανίζεται στις χρησιμοποιούμενες για την επίλυση της δομής κατασκευές έντονα αρνητικά φορτισμένη αφού υπάρχουν έξι κατάλοιπα γλουταμικού σε διαδοχή. Το τμήμα αυτό αποδεικνύεται από τα διαθέσιμα μοντέλα σε ατομική λεπτομέρεια (1AP0.pdb, 1GUW.pdb, 1KNA.pdb) ότι δεν επηρεάζει τη δομή του domain. Ενδέχεται το συγκεντρωμένο αυτό αρνητικό φορτίο, να απωθεί ομώνυμα με αυτό φορτία αποτρέποντας έτσι τη συσσωμάτωση και δεδομένου και του σαφώς υδρόφιλου χαρακτήρα του να επιφέρει αύξηση της διαλυτότητας αυτών των βιομορίων. Άλλωστε έχει ήδη δοκιμασθεί με επιτυχία η εισαγωγή τέτοιων αμινοξικών τμημάτων στο αμινοτελικό άκρο δυσδιάλυτων πρωτεϊνών<sup>[134]</sup>. Έτσι, αφού στο c2 δεν παρατηρείται αντίστοιχη ομαδοποίηση αρνητικών φορτίων, θα εισαγόταν με





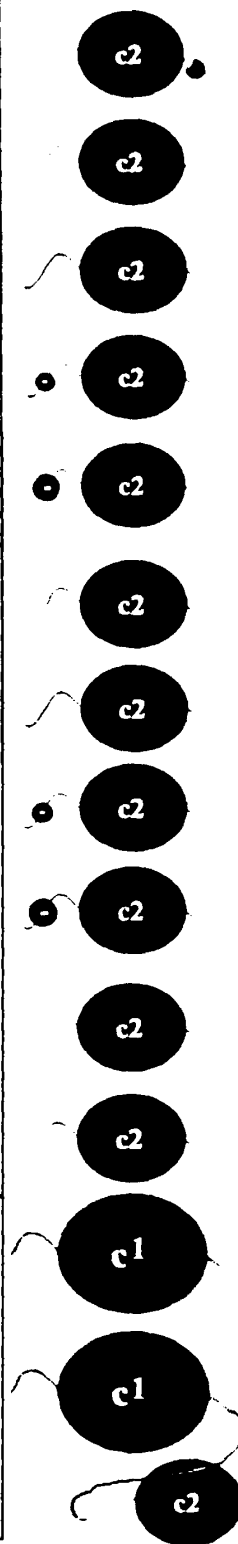
μεταλλάξεις προς γλουταμικό ή ασπαρτικό στο πλαίσιο της αμινοτελικής “ουράς” με την προσδοκία της βελτίωσης της διαλυτότητας κατ’ αντιστοιχία με τις προαναφερθείσες περιπτώσεις παρόμοιων απαιτήσεων διαλυτότητας.

- iv) Στην καρβοξυτελική “ουρά” του c2 βρίσκεται ένα μη συντηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης, το οποίο είναι άλλωστε και το μοναδικό στο πολυπεπτίδιο. Ο σχηματισμός ενός άστοχου διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού είναι συχνά το αίτιο που πυροδοτεί τα πρώτα στάδια συσσωμάτωσης, μιας διαδικασίας που μπορεί τελικά να οδηγήσει στην καταβύθιση μιας πρωτεΐνης. Έτσι, και αφού η συγκεκριμένη κυστεΐνη δεν μπορεί προφανώς να συμμετέχει σε σχηματισμό δισουλφιδίου ενδομοριακά που τυχόν θα σταθεροποιούσε τη δομή του domain, είτε θα μεταλλασσόταν σε σερίνη, είτε θα περιοριζόταν η καρβοξυτελική “ουρά” κατά πέντε αμινοξέα ώστε αυτή να μην περιέχεται πλέον στο εκφραζόμενο πολυπεπτίδιο.

Συνολικά λοιπόν, και σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής, 11 διαφορετικά τμήματα DNA που κωδικοποιούσαν και από μια εκδοχή του δεύτερου chromodomain της dMi-2 (Πιν.4.1) εισήχθησαν σε κάθε έναν από τους 3 προαναφερθέντες pETM φορείς συνιστώντας έτσι 33 πλασμιδιακές κατασκευές προκειμένου να καταστεί δυνατή η απομόνωση επαρκούς –ποιοτικά και ποσοτικά– δείγματος για την επίλυση της τριτοταγούς δομής του σε ατομική λεπτομέρεια. Επιπροσθέτως, σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν 6 πλασμίδια που θα διευκόλυναν την έκφραση και απομόνωση του πρώτου chromodomain της dMi-2 αλλά και της περιοχής που ορίζει και τα δύο μαζί με το ενδιάμεσο συνδετικό τμήμα (Πιν.4.1) προκειμένου να μελετηθεί η λειτουργία του c1 αλλά και ο τρόπος με τον οποίο τα δύο συνεργάζονται –αν κάτι τέτοιο συμβαίνει.



| Όνομασία       | Μήκος | MB (kDa) | pI   | Αλληλουχία   |
|----------------|-------|----------|------|--|
| <i>c2</i>      | 70    | 8.19     | 4.97 | GAMGKPEWLIVQRVINHRTARDGSTM<br>YLVKWRELTPYDKSTWEEEGDDIQGLRQ<br>AIDYYQDLRAVCTSETT  |
| <i>KNG-c2</i>  | 72    | 8.44     | 5.09 | GAMKNGVKPEWLIVQRVINHRTARD<br>GSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEGDDIQ<br>GLRQAIDYYQDLRAVSTSE  |
| <i>ERF-c2</i>  | 76    | 9.04     | 5.13 | GAMERFYKNGVKPEWLIVQRVINHRT<br>ARDGSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEG<br>DDIQGLRQAIDYYQDLRAVSTSE  |
| <i>ERD-c2</i>  | 76    | 8.96     | 4.81 | GAMERDDKNGVKPEWLIVQRVINHRT<br>ARDGSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEG<br>DDIQGLRQAIDYYQDLRAVSTSE  |
| <i>EED-c2</i>  | 76    | 8.93     | 4.37 | GAMEEEDDEDGKPEWLIVQRVINHRT<br>ARDGSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEG<br>DDIQGLRQAIDYYQDLRAVSTSE  |
| <i>KNGs-c2</i> | 67    | 7.94     | 5.26 | GAMKNGVKPEWLIVQRVINHRTARD<br>GSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEGDDIQ<br>GLRQAIDYYQDLRA   |
| <i>ERFs-c2</i> | 71    | 8.54     | 5.31 | GAMERFYKNGVKPEWLIVQRVINHRT<br>ARDGSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEG<br>DDIQGLRQAIDYYQDLRA   |
| <i>ERDs-c2</i> | 71    | 8.46     | 4.86 | GAMERDDKNGVKPEWLIVQRVINHRT<br>ARDGSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEG<br>DDIQGLRQAIDYYQDLRA   |
| <i>EEDs-c2</i> | 71    | 8.43     | 4.36 | GAMEEEDDEDGKPEWLIVQRVINHRT<br>ARDGSTMVYLVKWRELTPYDKSTWEEEG<br>DDIQGLRQAIDYYQDLRA   |
| <i>VQRs-c2</i> | 56    | 6.65     | 5.15 | GAMVQRVINHRTARDGSTMVYLVKWE<br>LTPYDKSTWEEEGDDIQGLRQAIDYYQD<br>LRA  |
| <i>EWLs-c2</i> | 60    | 7.19     | 4.90 | GAMEWLIVQRVINHRTARDGSTMVYLV<br>KWRELTPYDKSTWEEEGDDIQGLRQAID<br>YYQDLRA   |
| <i>c1</i>      | 75    | 9.01     | 9.52 | GAMGKAEKIITWRWAQRSNDDGPSTSK<br>GSKNSNSRVREYFIKWHNMSYWHCEW<br>VPEVQLDVHHPLMIRSFQRKYD  |
| <i>c1+2s</i>   | 182   | 21.87    | 6.67 | GAMGKAEKIITWRWAQRSNDDGPSTSK<br>GSKNSNSRVREYFIKWHNMSYWHCEW<br>VPEVQLDVHHPLMIRSFQRKYDMEEPP<br>KFEESLDEADTRYKRIQRHKDKVGMKA<br>NDDAEVLEERFYKNGVKPEWLIVQRVI<br>NHRTARDGSTMVYLVKWRELTPYDKSTW<br>EEEGDDIQGLRQAIDYYQDLRA |



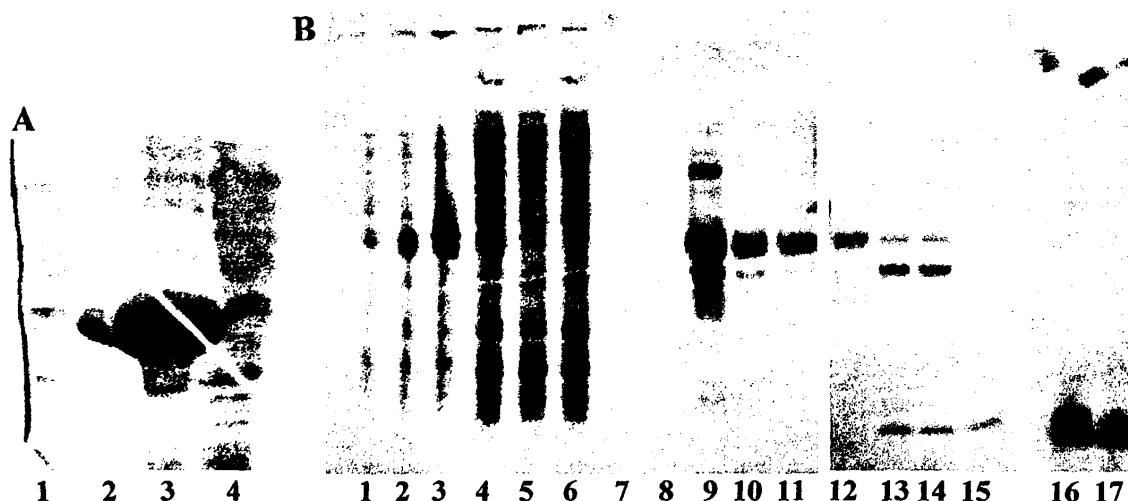
Πίνακας 4.1 Συγκεντρωτική παράθεση των πολυπεπτιδίων που κατασκευάστηκαν και απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη. Σε κίτρινο φόντο εμφανίζονται τα μεταλλαγμένα αμινοξέα εντός του domain, ενώ αυτά που εισάγονται από το φορέα κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης περιγράφονται.



#### 4.1.5 Έκφραση, απομόνωση και αρχικός χαρακτηρισμός του chromodomain c2

##### 4.1.5.1.1 Απομόνωση c2 από His-GST-c2

Η πρώτη προσπάθεια να απομονωθεί το c2 χρησιμοποιώντας κάποια από τις νέες κατασκευές, ήταν ως συνεκφραζόμενο αμινοτελικά με ουρά έξι ιστιδινών και την πρωτεΐνη GST (αυτή η πλασμιδιακή κατασκευή έγινε από το Salvatore Adinolfi, NIMR – Λονδίνο). Η χρήση αυτού του πλασμιδίου αποδείχθηκε ελάχιστα επωφελής γιατί, αντίθετα με τις προσδοκίες, το παραγόμενο πολυπεπτίδιο εμφάνιζε μικρότερη διαλυτότητα από αυτό που προοριζόταν να αντικαταστήσει. Μάλιστα, κατόπιν τριώρης επαγωγής σε 37°C και λύσης των κυττάρων, το GST-c2 βρισκόταν σχεδόν εξ ολοκλήρου στα αδιάλυτα κυτταρικά υπολείμματα (Σχ.4.3A). Παρόλα αυτά, δείγμα πρωτεΐνης πολύ ικανοποιητικής καθαρότητας κατέστη δυνατό να παρασκευαστεί έπειτα από επαγωγή δεκατέσσερων ωρών σε 18°C (20-30% του GST-c2 διαλυτό), απομόνωση του GST-c2 με χρήση χρωματογραφίας ιόντων νικελίου από το κυτταρόπλασμα, αποκοπή του c2 από το συνεκφραζόμενο GST χρησιμοποιώντας την

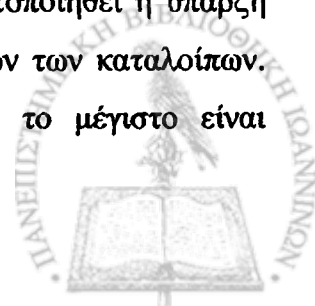


**Σχήμα 4.3** (A) Επαγωγή του GST-c2 σε 37°C για τρεις ώρες και (B) σε 18°C για δεκατέσσερις και συνακόλουθος καθαρισμός. Διαδρομές: 1., 2. ίσος αριθμός βακτηρίων του στελέχους BL21(DE3) πριν και μετά την επαγωγή της έκφρασης με χρήση IPTG αντίστοιχα. 3. αδιάλυτα κυτταρικά υπολείμματα μετά τη λύση των βακτηρίων επαναδιαλυτοποιημένα σε ίσο όγκο με το προκύπτον κυτταροδιάλυμα. 4. βακτηριακό κυτταρόπλασμα. 5., 6. το ίδιο διάλυμα κατόπιν διέλευσης από στήλη ιόντων νικελίου μία και δύο φορές αντίστοιχα. 7., 8. εκπλύσεις της στήλης με 10 και 20mM ιμιδαζολίου αντίστοιχα. 9., 10., 11. τα 4<sup>ο</sup>, 10<sup>ο</sup> και 16<sup>ο</sup> μέρη της τμηματικής έκλουσης με 150mM ιμιδαζολίου. 12. το προκύπτον συνολικό διάλυμα έκλουσης κατόπιν σύνθεσης των μερών 10<sup>ο</sup> και εξής. 13., 14. το ίδιο διάλυμα κατόπιν προσθήκης της πρωτεάσης TEV σε αναλογία ενός μορίου για κάθε εκατό μόρια GST-c2 και πάροδο 12 ή 18 ωρών αντίστοιχα. 15. το τελευταίο διάλυμα μετά από διέλευση από στήλη ιόντων νικελίου και αφού είχε προηγηθεί διαπίδυση προς απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. 16., 17. 16 και 8μg αντίστοιχα του δείγματος της διαδρομής 15 συμπυκνωμένου σε συγκέντρωση 0.2mM ή 1.6mg/ml.

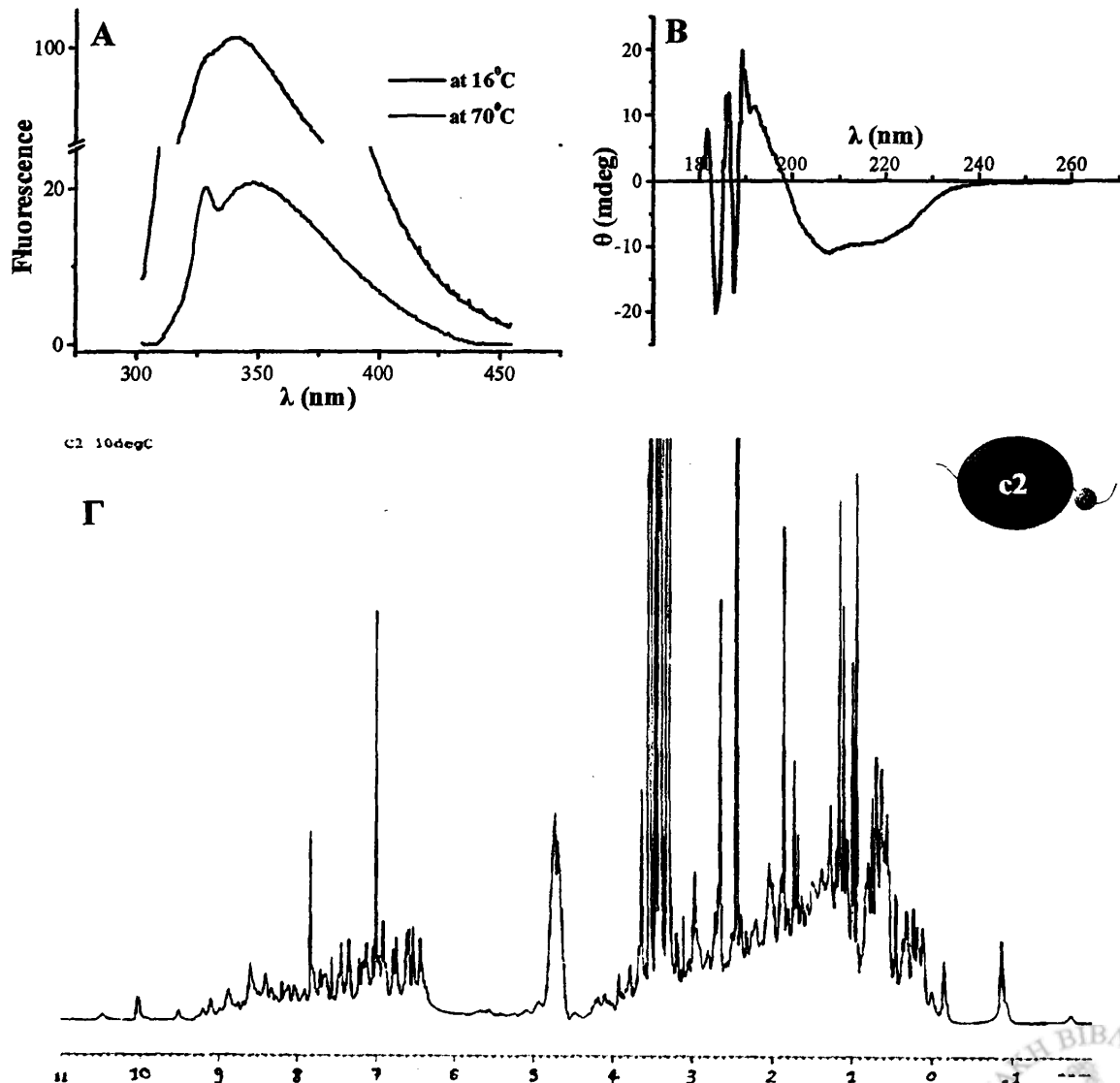
πρωτεάση TEV, και τελικά καθαρισμό του c2 επιστρατεύοντας για δεύτερη φορά τη στήλη ιόντων νικελίου (Σχ.4.3B). Η συμπεριφορά του δείγματος με την πάροδο του χρόνου ήταν... μακροσκοπικά σταθερή –δεν καθίζανε ορατά όπως πριν– σε συγκέντρωση έως 0.2mM (1.6mg/ml). Υπολειπόταν σε συγκέντρωση κατά περίπου 2.5 φορές από το οριακά αποδεκτό για επίλυση δομής με NMR δείγμα και η απόδοση της διαδικασίας παρασκευής ήταν μικρή (1mg από 1Lt καλλιέργειας βακτηρίων). Ανησυχητικό παρέμενε το γεγονός της καταβύθισης των ορατών συσσωματωμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0.2mM αλλά πλέον υπήρχε ένα δείγμα του πολυπεπτιδίου του οποίου ο αρχικός τουλάχιστον βιοφυσικός χαρακτηρισμός μπορούσε να υλοποιηθεί.

#### 4.1.5.1.2 Φασματοσκοπικός έλεγχος της δομικής ακεραιότητας του c2

Μία από τις ανησυχίες που συνοδεύουν τη διαδικασία υπερέκφρασης μιας πρωτεΐνης είναι η πιθανή απουσία της δομικής της ακεραιότητας. Όταν μάλιστα πρόκειται για πρωτεϊνικό domain ή η προέλευση του βιομορίου δεν είναι βακτηριακή –όπως συμβαίνει συνήθως– το ενδεχόμενο απομόνωσης ενός αποδιατεταγμένου, μη λειτουργικού πολυπεπτιδίου δεν είναι απίθανο. Προτού λοιπόν επενδύσει κανείς επιπλέον χρόνο και πόρους είναι λογικό να τεκμηριώσει τη δομική ακεραιότητα του πολυπεπτιδίου που απομόνωσε. Σε κάποιες περιπτώσεις –όπως για παράδειγμα ενζύμων που καταλύουν κάποια οργανική αντίδραση– αυτό γίνεται έμμεσα, επιβεβαιώνοντας τη λειτουργικότητα του βιομορίου. Σε αυτή τη διατριβή πιστοποιήθηκε η δομική ακεραιότητα των χρησιμοποιούμενων πολυπεπτιδίων απ' ευθείας με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών. Ο έλεγχος αυτός μάλιστα έγινε στη βάση τριών διαφορετικών προσεγγίσεων σύμφωνα με τις βασικές αρχές και το επίπεδο διακριτικής ικανότητας των χρησιμοποιούμενων τεχνικών. Έτσι, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού<sup>[110]</sup>, τεκμηριώθηκε η αναδίπλωση του μορίου σε επίπεδο δευτεροταγούς δομής, αλλά και η συνεισφορά σε αυτή –όπως άλλωστε αναμενόταν βάσει της υψηλής ομολογίας με chromodomain ήδη γνωστής δομής– και των δύο κύριων ειδών δευτεροταγούς δομής: της α- έλικας και της β- πτυχωτής επιφάνειας (Σχ.4.4B). Η φασματοσκοπία φθορισμού, και πιο συγκεκριμένα η εκπομπή του ινδολικού δακτυλίου της πλευρικής ομάδας τρυπτοφανών, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πιστοποιηθεί η ύπαρξη τριτοταγών αλληλεπιδράσεων στο άμεσο –“γειτονικό” περιβάλλον αυτών των καταλοίπων. Το μήκος κύματος στο οποίο η καμπύλη της εκπομπής εμφανίζει το μέγιστο είναι



παράμετρος ενδεικτική του μέτρου της έκθεσης του ινδολικού δακτυλίου στο διαλύτη<sup>[109]</sup>. Η υδροφοβικότητα τέτοιων ομάδων είναι, κατά θερμοδυναμική επιταγή, και ο λόγος για τον οποίο η εκτεθειμένη στο νερό επιφάνειά τους είναι συνήθως περιορισμένη κατά το μάλλον ή ήττον στις πρωτεΐνες. Με τον τρόπο αυτό ελαττώνεται η ενέργεια του συστήματος και σταθεροποιείται η τριτοταγής δομή του μορίου<sup>[104,105]</sup>. Το c2 περιέχει τρία κατάλοιπα τρυπτοφάνης, ενώ η συμβολή των αντίστοιχων τριών καμπυλών εμφανίζει μέγιστο έντασης στα 342nm (Σχ.4.4A), σαφής ένδειξη ότι κάποια ή κάποιες από τις τρεις πλευρικές αλυσίδες αυτών των καταλοίπων είναι μερικώς “θαμμένες”, γεγονός μη αναμενόμενο για πρωτεΐνη αποδιατεταγμένη. Θερμαίνοντας στους 70<sup>0</sup>C και ευνοώντας έτσι τη διατάραξη τριτοταγών και δευτεροταγών αλληλεπιδράσεων, το μέγιστο της έντασης του φθορισμού του c2



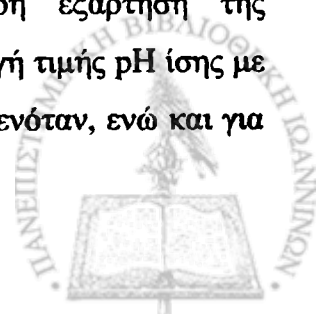
Σχήμα 4.4 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του c2 μετά την αποκοπή και το διαχωρισμό του από το GST. (A) Φάσμα εκπομπής φθορισμού τρυπτοφανών κατόπιν διέγερσης στα 287nm στους 16 (μαύρη γραμμή) και στους 70<sup>0</sup>C (κόκκινη γραμμή). (B) Φάσμα κυκλικού διχρωισμού στους 15<sup>0</sup>C. (Γ) Μονοδιάστατο φάσμα NMR στους 10<sup>0</sup>C, σε φασματόμετρο 600MHz, σε pH=8.

μετακινείται στα 348nm.

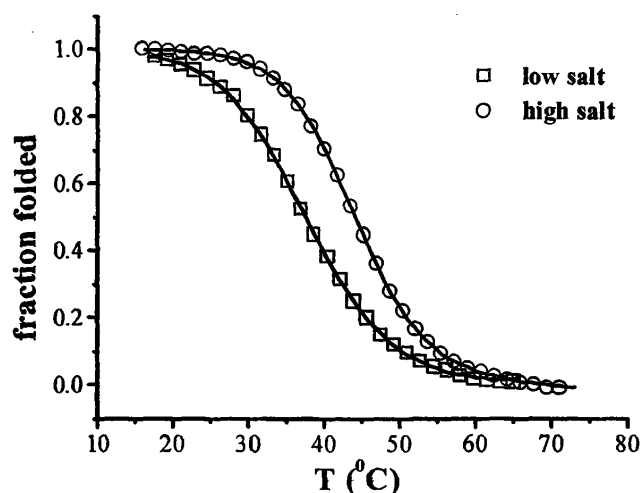
Έχοντας λοιπόν κατοχυρώσει τη δομική ακεραιότητα του απομονωμένου πολυπεπτιδίου με τεχνικές “χαμηλής ευκρίνειας”, ο δρόμος είχε πια ανοίξει για την παρασκευή του πρώτου δείγματος που θα ελεγχόταν με NMR. Όπως προαναφέρθηκε, η συγκέντρωση που επετεύχθη απείχε από αυτή που απαιτείται για λήψη φασμάτων χρήσιμων για τον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής του βιομορίου σε ατομική λεπτομέρεια, όμως τα προκαταρκτικά φάσματα που ήταν δυνατό να καταγραφούν τη δεδομένη στιγμή οδήγησαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων που συνέβαλαν στο χαρακτηρισμό της συμπεριφοράς του c2. Η καταγραφή του πρώτου κιάλας μονοδιάστατου (1D) φάσματος NMR μπορούσε να επιβεβαιώσει την αναδίπλωση του c2. Βασικό κριτήριο αποτέλεσε η εκτενής διασπορά των κορυφών του φάσματος (Σχ.4.4Γ). Τέτοια διασπορά προκύπτει από διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα των πυρήνων που μπορούν να επαχθούν μόνο από την ύπαρξη συγκεκριμένης τριτοταγούς δομής.

#### 4.1.5.1.3 Προσδιορισμός βέλτιστων βιοχημικών συνθηκών για την καταγραφή πολυδιάστατων φασμάτων NMR δειγμάτων c2

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την καταγραφή πολυδιάστατων φασμάτων NMR, καταγράφηκε η μεταβολή του φθορισμού για μια σειρά θερμικών αποδιατάξεων του c2 σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Τόσο σταθερότερο θερμοδυναμικά είναι το πολυπεπτίδιο όσο περισσότερη ενέργεια απαιτείται ώστε να αποδιαταχθεί. Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία η ενεργειακή στάθμη του συστήματος ανεβαίνει με εξωγενή προσθήκη θερμικής ενέργειας καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται με σταθερό ρυθμό. Η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων επιλέχθηκε με γνώμονα την καταλληλότητα τους σχετικά με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Έτσι, και σύμφωνα με τους σχετικούς περιορισμούς που ήδη αναφέρθηκαν, εκτιμήθηκε ότι η ιονική ισχύς δεν θα έπρεπε να υπερβαίνει τα 200mM, ενώ αναφορικά με το pH, προτιμάται να ρυθμίζεται σε όξινα επίπεδα προκειμένου να περιορίζονται διαστάσεις πρωτονίων και συνεπακόλουθη απώλεια σημάτων. Στην πράξη, ουδέτερο pH με απόκλιση μισής μονάδας αποδεικνύεται λειτουργικό. Για το c2 δεν παρατηρήθηκε ισχυρή εξάρτηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας από το pH για τιμές κοντά στο 7. Η επιλογή τιμής pH ίσης με το ισοηλεκτρικό του σημείο (5) θα ήταν εσφαλμένη όπως άλλωστε αναμενόταν, ενώ και για



τιμές pH χαμηλότερες από 5 η πρωτεΐνη αποδεικνύεται ασταθέστερη (Πιν.4.2). Αντίθετα η ιονική ισχύς αποδείχθηκε βαρύνουσα σημασίας παράμετρος για τη σταθερότητα του μορίου αυξάνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης έως και κατά 5°C (Σχ.4.5-Πιν.4.2). Η χρήση Na<sup>+</sup> ή K<sup>+</sup> ως αντισταθμιστικό του χλωριόντος κατιόν δεν διαφοροποιούσε το αποτέλεσμα.



Σχήμα 4.5 Γραφική παράσταση της αποδιάταξης του c2 σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία σε διαλύματα χαμηλής (μαύρα τετράγωνα) και υψηλότερης ιονικής ισχύος (κόκκινοι κύκλοι). Οι συνεχόμενες γραμμές αναπαριστούν τις θεωρητικές καμπύλες που περιγράφουν το φαινόμενο της αποδιάταξης σε ένα στάδιο και συμφωνούν καλύτερα με τα πειραματικά δεδομένα.

| Buffer  | C (mM) | pH  | NaCl (mM) | KCl (mM)      | T <sub>m</sub> (°C) | slope       |
|---------|--------|-----|-----------|---------------|---------------------|-------------|
| acetate | 18     | 3.7 | 5         |               | 37.9 ± 0.0          | 0.10 ± 0.00 |
|         | 50     |     | 200       |               | 35.3 ± 0.4          | 0.08 ± 0.00 |
|         | 18     | 5.7 | 5         |               | -28-30              |             |
|         | 50     |     | 200       |               | 42.0 ± 0.0          | 0.12 ± 0.00 |
| phosK   | 18     | 6.5 | 5         |               | 37.6 ± 0.1          | 0.10 ± 0.00 |
|         |        |     | 185       |               | 41.9 ± 0.0          | 0.10 ± 0.00 |
|         | 50     | 7.2 | 200       |               | 43.6 ± 0.0          | 0.12 ± 0.00 |
|         | 18     |     | 5         |               | 40.4 ± 0.0          | 0.11 ± 0.00 |
|         | 20     | 8.0 | 227       |               | 44.0 ± 0.0          | 0.13 ± 0.00 |
|         | 50     |     | 200       |               | 44.9 ± 0.0          | 0.14 ± 0.00 |
|         |        |     | 200       | 43.5 ± 0.0*** | 0.15 ± 0.00         |             |
| Tris    | 50     | 8.0 | 50        |               | 40.6 ± 0.1          | 0.09 ± 0.00 |
|         |        |     | 185       |               | ~43-44              |             |

Πίνακας 4.2 Συγκεντρωτική παράθεση των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να επιλεγούν οι καταλληλότερες συνθήκες ώστε να αυξηθεί η θερμοδυναμική σταθερότητα του c2 και οι τιμές που προέκυψαν για το σημείο τήξης και την κλίση της καμπύλης κατά την αποδιάταξη.

#### 4.1.5.1.4 Αρχικές ενδείξεις ολιγομερισμού του c2

Ο σχηματισμός πολυμερών στο διάλυμα ενός βιομορίου δυσχεραίνει το έργο του φασματοσκόπου για τους λόγους που περιγράφηκαν (Κεφ 2). Ανάλογα δε, με το βαθμό του πολυμερισμού και το μέγεθος του μονομερούς, η φασματοσκοπία NMR μπορεί να ανάγεται

σε ακατάλληλη μέθοδο για τον προσδιορισμό της δομής του εν λόγω μορίου. Πρακτικά και προκειμένου περί ενός πολυπεπτιδίου με σφαιρική κατά προσέγγιση συμμετρία του οποίου το μοριακό βάρος υπολείπεται κατά τι των 10kDa, το μεγαλύτερο ολιγομερές που μπορεί να μελετηθεί με τις παρούσες δυνατότητες NMR, είναι το διμερές ή ίσως το τριμερές. Η διαφορά της επένδυσης σε κόπο και χρόνο μάλιστα, για την επεξεργασία των φασμάτων μεταξύ των δύο αυτών βαθμών ολιγομερισμού είναι σημαντική. Ιδιαίτερα προβληματική για τη δυνατότητα μελέτης ενός τέτοιου συστήματος θα ήταν και η ύπαρξη περισσοτέρων του ενός είδους ολιγομερών σε δυναμική ισορροπία μεταξύ τους, μια και αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την παρατήρηση περισσοτέρων της μίας κορυφών για κάθε έναν από πολλούς πυρήνες, αυξάνοντας τις αλληλεπικαλύψεις και μειώνοντας περαιτέρω το λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N).

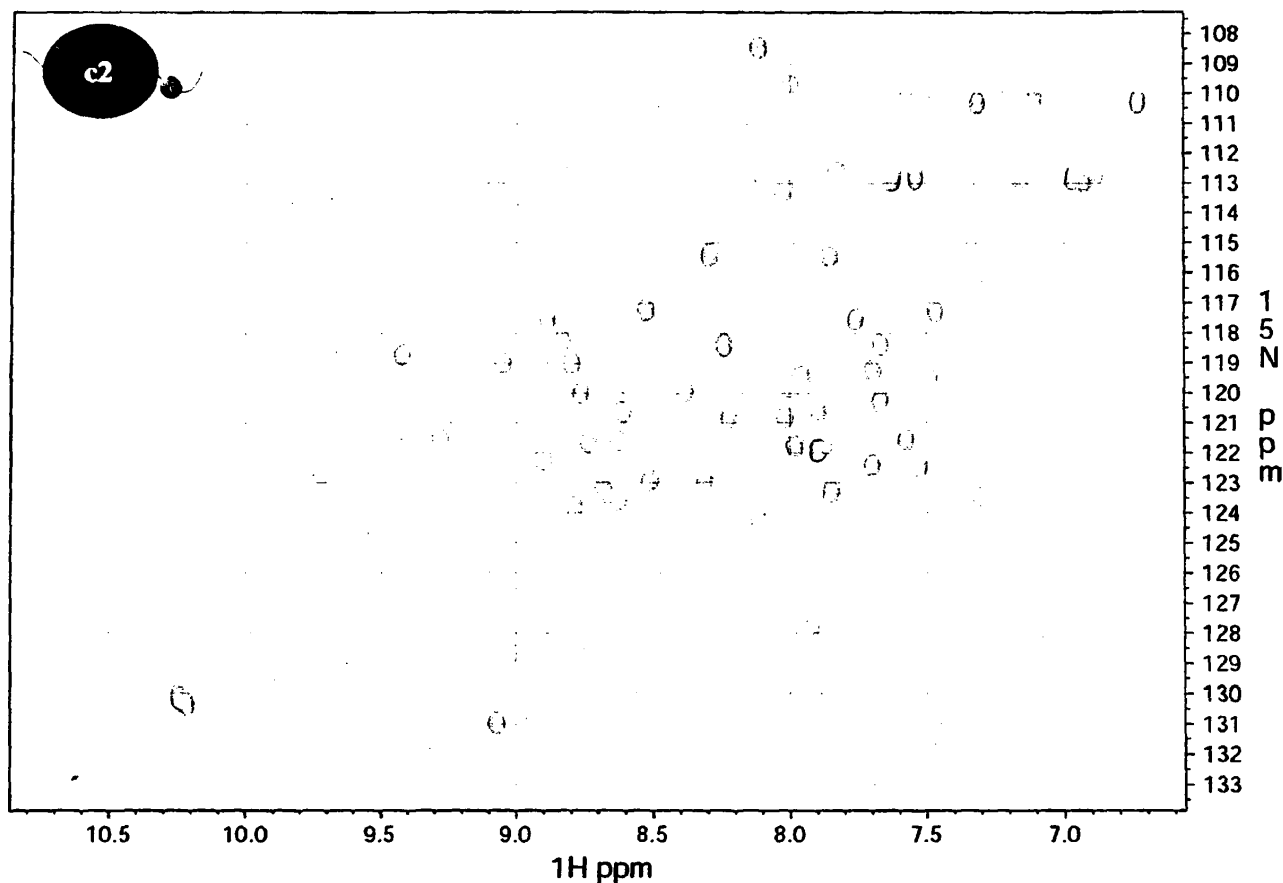
Η βιομοριακή φασματοσκοπία NMR δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακριβή μέτρηση του αριθμού των μορίων από τα οποία απαρτίζεται ένα πρωτεϊνικό ομοπολυμερές σε διάλυμα. Η συγκρατημένη ερμηνεία των φασμάτων όμως μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλείς εκτιμήσεις. Στην περίπτωση του c2, από το μονοδιάστατο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , προέκυπταν ενδείξεις ότι τα παρατηρούμενα σήματα πιθανότατα δεν προέρχονταν από το μονομερές πολυπεπίδιο των 8kDa, ούτε όμως και από ένα συσσωμάτωμα πολλών μορίων του chromodomain. Μάλιστα, το μεγαλύτερο των πιθανών ολιγομερών για το οποίο παρατηρούνταν σήματα θα έπρεπε να είναι μικρότερο από 30kDa βάσει της εικόνας του φάσματος.

Αν και εκτός προγραμματισμού, ο σχηματισμός ολιγομερούς από δύο ή τρία μόρια c2 δεν ήταν από μόνος του απαγορευτικός για την επίλυση της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια. Μάλιστα, το πρώτο ετεροπυρηνικό φάσμα NMR  $^{15}\text{N-HSQC}$  (*Heteroatom Single Quantum Coherence*) του c2 σε συγκέντρωση 0.2mM ήταν πολύ ενθαρρυντικό (Σχ.4.6). Το φάσμα αυτό αποτελεί το “χάρτη” των αμιδικών και αμινικών πρωτονίων. Είναι η βάση πάνω στην οποία “χτίζονται” πιο πολύπλοκα –και χρησιμότερα– τρισδιάστα φάσματα, ενώ η εξοικείωση που αποκτά τελικά με τη μορφή του ο φασματοσκόπος είναι τέτοια που το καθιστά τόσο χαρακτηριστικό για το μόριο όσο και το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής. Η καλή διασπορά των συντεταγμένων των κορυφών (όπως και σε όλα τα φάσματα NMR), ο μικρός αριθμός αλληλεπικαλύψεων, και η εμφάνιση του αναμενόμενου αριθμού σημάτων





(περίπου όσα και τα αμινοξέα) είναι επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός  $^{15}\text{N}$ -HSQC φάσματος, ενδεικτικά ενός δείγματος στο οποίο μπορεί να επενδυθεί περισσότερος χρόνος.



Σχήμα 4.6 Ετεροπυρηνικό  $^{15}\text{N}$ -HSQC δείγματος c2 εμπλουτισμένου στο ισότοπο  $^{15}\text{N}$  συγκέντρωσης 0.2mM στα 600MHz και σε ρυθμιστικό διάλυμα μονόξινου/ δισόξινου φωσφορικών αλάτων καλίου pH:8.0 και 150mM NaCl.

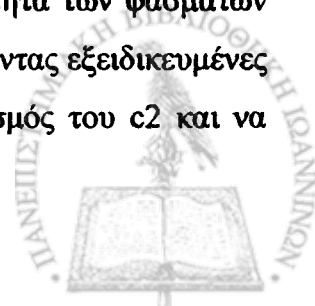
#### 4.1.5.1.5 Δραστική επίπτωση του ολιγομερισμού δειγμάτων c2 στην ικανότητα μαγνητικών συζεύξεων “μέσω δεσμών”- φασματοσκοπία TOCSY

Στη φασματοσκοπία NMR κανείς εκμεταλλεύεται τη μαγνητική σύζευξη πυρήνων είτε συνδεδεμένων ομοιοπολικά –απ’ ευθείας ή μέσω τρίτων– είτε γειτνιαζόντων σε απόσταση έως 5Å. Εξειδικευμένα πειράματα χρησιμοποιούνται ώστε να εξαχθούν δύο ειδών πληροφορίες: ποιοί πυρήνες συνδέονται μέσω δικτύου ομοιοπολικών δεσμών (πρακτικά έως πέντε) και ποιοί γειτνιάζουν στο χώρο χωρίς να είναι απαραίτητα “γραμμικά” γειτονικοί, δηλαδή κατά μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας. Απολύτως απαραίτητοι για την επίλυση της τριτοταγούς δομής ενός βιομορίου είναι και οι δύο τύποι πληροφορίας για τη συντριπτική πλειοψηφία των πυρήνων. Η ποιότητα των φασμάτων και των δύο υποκατηγοριών επηρεάζεται αρνητικά από τη γρήγορη αποδιέγερση (μικρό  $T_2$ ), όπως ήδη εξηγήθηκε.

Παρόλα αυτά, όσο περισσότεροι είναι οι πυρήνες που διαμεσολαβούν μέχρι την καταγραφή του σήματος, τόσο περισσότερος χρόνος απαιτείται, με αποτέλεσμα ακόμα και την ολική εξάλειψη του σήματος στην περίπτωση γρήγορα αποδιεγέρσιμων πυρήνων. Κατά την ανίχνευση των μαγνητικά συζευγμένων μέσω δεσμών πυρήνων, αντίθετα με τους συζευγμένους λόγω απόστασης, η υπεύθυνη για το σήμα παράμετρος –η μαγνήτιση (*magnetization*)– μεταφέρεται από κάποιον αρχικό πυρήνα στους επόμενους ώσπου τελικά να αποσβεστεί. Ο αριθμός των δεσμών λοιπόν που θα καταφέρει να διανύσει (και άρα αυτός των πυρήνων που μπορούν να συσχετιστούν μεταξύ τους) εξαρτάται δραματικά από το χρόνο αποδιέγερσης  $T_2$  αυτών των πυρηνικών spin, και κατ' επέκταση από το βαθμό πολυμερισμού του βιομορίου. Ο τελευταίος μάλιστα μπορεί να καθορίσει όχι μόνο αν θα μπορέσουν να συσχετιστούν από ομοπυρηνικό φάσμα πρωτονίου πυρήνες που τους χωρίζει απόσταση πέντε δεσμών (συνήθως το μέγιστο), αλλά ακόμα και αν θα υπάρχουν κορυφές πέραν αυτών της διαγωνίου.

Το ομοπυρηνικό πρωτονιακό δισδιάστατο φάσμα **TOCSY** (*Total Correlation Spectroscopy*) που θα ανίχνευε μαγνητικές συζεύξεις μέσω δεσμών για το c2, αποδείχθηκε εξαιρετικά φτωχό σε σήματα. Για κάποιους από τους πυρήνες που πιθανόν ανήκαν σε ευκίνητες περιοχές του μορίου (αμινο- καρβοξυ- τελικές ουρές, συνδετικές θηλιές) μπορούσαν να διακριθούν συζεύξεις μέσω τριών ή και πέντε δεσμών, αλλά για την πλειοψηφία –δεδομένης και της αναγκαστικά χαμηλής συγκέντρωσης του δείγματος– δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν τέτοιες συζεύξεις. Με χρήση αυτών των σημάτων καθίσταται δυνατή η *απόδοση* (*assignment*) των κορυφών στους πυρήνες που χαρακτηρίζουν, ενώ η αδυναμία αντιστοίχισης συντεταγμένων σημάτων σε χημικές μετατοπίσεις πυρήνων μεταφράζεται τελικά και σε αδυναμία επίλυσης της δομής.

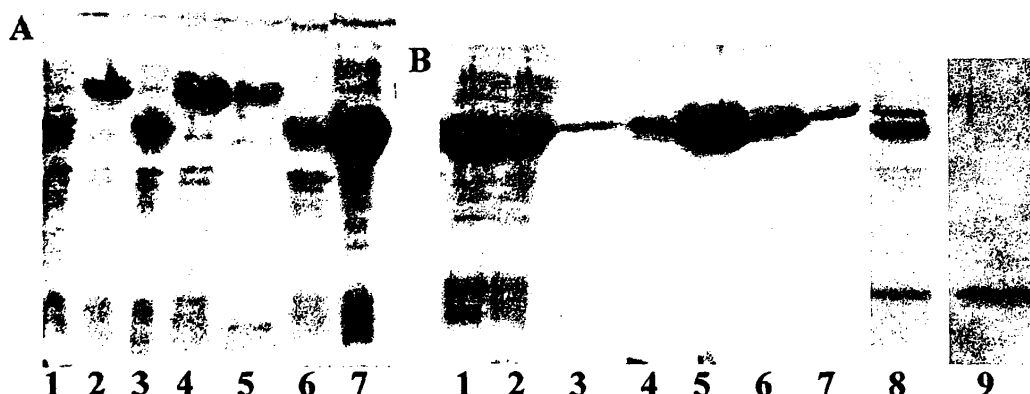
Με στόχο λοιπόν να βελτιωθεί η διαλυτότητα του πολυπεπτιδίου ώστε να καταστεί δυνατή η παρασκευή δείγματος μεγαλύτερης συγκέντρωσης, αλλά και να αρθεί αν αυτό ήταν δυνατό ο πολυμερισμός, το chromodomain εκφράστηκε χρησιμοποιώντας εναλλακτικές κατασκευές για τις οποίες έγινε ήδη λόγος (Πιν.4.1) και απομονώθηκε. Ο βαθμός πολυμερισμού –και άρα η καταλληλότητα του κάθε δείγματος όσο αφορά τη φασματοσκοπία NMR– θα εξαγόταν εμμέσως από το βαθμό διαλυτότητας και την ποιότητα των φασμάτων NMR (που είναι και το τελικό ζητούμενο), αλλά και αμέσως χρησιμοποιώντας εξειδικευμένες τεχνικές. Αποφασίστηκε δηλαδή να μελετηθεί απ' ευθείας ο πολυμερισμός του c2 και να



χαρακτηριστεί με χρήση τεχνικών που εστιάζουν στο μοριακό μέγεθος, όπως η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (*gel filtration chromatography*) και η αναλυτική υπερφυγοκέντρωση. Εξάλλου και κατά περίπτωση, λήφθηκαν φωτογραφίες μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου προκειμένου να διερευνηθεί το επίπεδο οργάνωσης των πιθανών πολυμερών που θα προδιόταν από το σχήμα όσων ήταν αρκετά μεγάλα ώστε να διακριθούν.

#### 4.1.5.2.1 Έκφραση His-NusA-c2, His-MBP-c2 και απομόνωση c2

Οι πρώτες κατασκευές που δοκιμάστηκαν ήταν αυτές που διαφοροποιούνταν όχι ως προς το domain αυτό καθαυτό, αλλά ως προς την αμινοτελικά συνεκφραζόμενη πρωτεΐνη. Η αντικατάσταση του GST από τις πρωτεΐνες MBP ή NusA είχε άμεσο αντίκτυπο στη διαλυτότητα. Κατόπιν τριώρης επαγωγής στους 37°C το 20% με 30%, κατ' εκτίμηση, του συνολικά εκφραζόμενου ποσού NusA-c2 μπορούσε να βρεθεί στο διάλυμα μετά την κυτταρική λύση (Σχ.4.7A,4-5) σε αντίθεση με την περίπτωση του GST-c2 όπου το αντίστοιχο ποσοστό ήταν μηδενικό ή ελάχιστο (Σχ.4.3A,3-4). Είναι αξιοσημείωτο ότι το NusA-c2 παρουσίαζε παρόμοια διαλυτότητα με το His-c2, την πρώτη δηλαδή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη διατριβή, παρατήρηση που εγείρει υπόνοιες σχετικά με τη συνεισφορά του GST στην τάση σχηματισμού σωματίων εγκλεισμού που εμφάνιζε το GST-



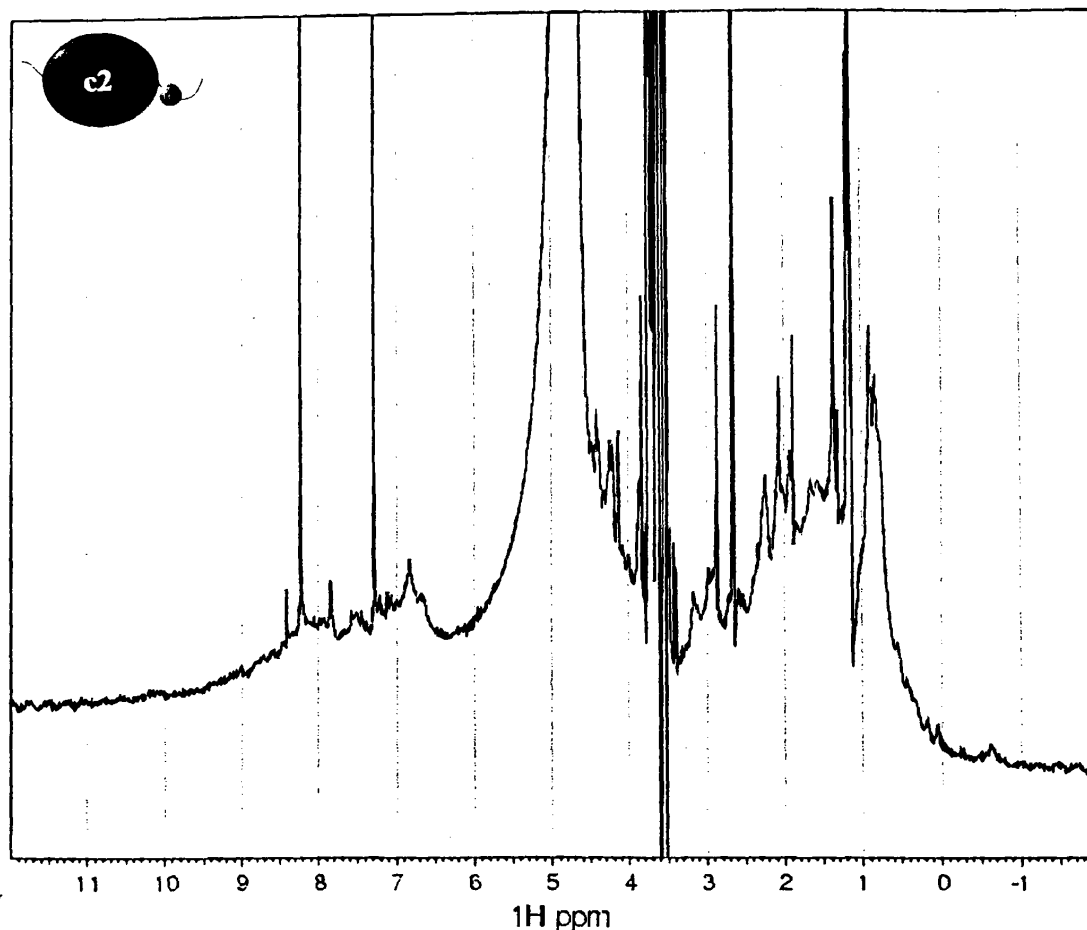
Σχήμα 4.7 (A) Έκφραση και διαλυτότητα των NusA-c2 και MBP-c2. Διαδρομές: 1. δείγμα καλλιέργειας BL21(DE3) πριν την επαγωγή με IPTG 2, 3. δείγμα αντίστοιχου αριθμού βακτηρίων με αυτόν της διαδρομής 1 φέροντα το πλασμίδιο για την έκφραση του NusA-c2 και του MBP-c2 αντίστοιχα, τρεις ώρες κατόπιν προσθήκης IPTG σε 37°C. 4, 5. επαναδιαλυμένο στερεό υπόλειμμα και κυτταρόπλασμα αντίστοιχα μετά τη λύση των κυττάρων στα οποία εκφράστηκε το NusA-c2. 6, 7. αντίστοιχα δείγματα για το MBP-c2. (B) Διαδοχική απομόνωση των MBP-c2 και c2. Διαδρομές: 1, 2. Δείγματα από το υλικό της διαδρομής 7 πριν και μετά το πέρασμά του από στήλη ιόντων νικελίου αντίστοιχα. 3, 4. δείγματα εκκλύσεων της στήλης με ρυθμιστικά διαλύματα που περιείχαν 10 και 30mM ιμιδαζολίου αντίστοιχα. 5, 6, 7. δείγματα διαδοχικών εκκλύσεων χρησιμοποιώντας 150mM ιμιδαζολίου. 8. Οι τμηματικές εκκλύσεις MBP-c2 των διαδρομών 5 6 και 7 συμπυκνωμένες και κατόπιν προσθήκης TEV. 9. Απομονωμένο c2 μετά το πέρασμα του υλικού της διαδρομής 8 από στήλη ιόντων νικελίου.

c2. Η σημαντική αυτή βελτίωση της διαλυτότητας του αρχικού υλικού από το οποίο θα παρασκευαζόταν το δείγμα του c2, με ό,τι αυτό πιθανά συνεπάγεται για το βαθμό ή το ποσοστό πολυμερισμού του απομονωμένου chromodomain, ήταν πολύ ενθαρρυντική αλλά έμελλε να στερηθεί πρακτικής σημασίας. Ο λόγος ήταν η εντυπωσιακά καλύτερη “επίδοση” του MBP-c2 του οποίου το 70%-80% της βιοσυντιθέμενης ποσότητας μπορούσε να βρεθεί στο διάλυμα μετά τη λύση των κυττάρων (Σχ.4.7A,6-7). Το ποσό του c2 που μπορούσε πλέον να απομονωθεί ήταν 7-10mgf από κάθε λίτρο υγρής καλλιέργειας. Το δείγμα του chromodomain που προέκυψε από την απομόνωση του MBP-c2 ακολουθούμενη από την αποκοπή και το διαχωρισμό του MBP (Σχ.4.7B), κατέστη δυνατό να συμπυκνωθεί έως 1.1mM αν και κατά τη διάρκεια της συμπύκνωσης σχηματίζονταν ορατά καθιζήματα, γεγονός όχι ασυνήθιστο πάντως για οποιαδήποτε παρασκευή c2.

#### **4.1.5.2.2 Αρχικός χαρακτηρισμός δείγματος c2 που απομονώθηκε από His-MBP-c2 με χρήση φασματοσκοπίας NMR**

Χωρίς αμφιβολία αυτό ήταν το περισσότερα υποσχόμενο δείγμα του c2 που είχε παρασκευαστεί μέχρι τότε και το μόνο που πληρούσε τη συνθήκη του επιθυμητού ύψους συγκέντρωσης για καταγραφή φασμάτων NMR. Όμως, ήδη από το μονοδιάστατο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR (Σχ.4.8), το δείγμα μπορούσε να χαρακτηριστεί ακατάλληλο για περαιτέρω δομικό χαρακτηρισμό. Η πρωτεΐνη διατηρούσε τη δομή της όπως φανέρωνε η ύπαρξη της κορυφής στα -0.7ppm (πιθανότατα κάποιο μεθύλιο μετατοπισμένου συντονισμού λόγω του σχετικού προσανατολισμού του με κάποιο κοντινό αρωματικό δακτύλιο) και του “ωμίσκου” κοντά στα 9ppm (συντονισμοί αμιδικών πρωτονίων όπως φαίνεται από το <sup>15</sup>N-HSQC), όμως η ποιότητα του φάσματος είχε σημαντικά υποβαθμιστεί. Αν και πέντε φορές πυκνότερο σε σχέση με προηγούμενα δείγματα NMR, ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο είχε μειωθεί, ενώ το εύρος των κορυφών της πρωτεΐνης είχε αυξηθεί (Σχ.4.4Γ – Σχ.4.8). Γινόταν κατανοητό λοιπόν πως η ισορροπία των πληθυσμών των όποιων πολυμερών σχηματίζονταν από το c2 στο διάλυμα είχε μετατοπιστεί ευνοώντας το σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων. Το c2 είχε “μεγαλώσει” με όρους NMR. Ενδεχομένως η συγκέντρωση της τάξης του 1mM να ήταν υπερβολικά φιλόδοξη, ή η συνέκφραση με το MBP να είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση εν διαλύσει ογκωδών πολυμερών που με τη χρήση του GST καθίζαναν απαλλάσσοντας έτσι το δείγμα από αυτούς τους πληθυσμούς.



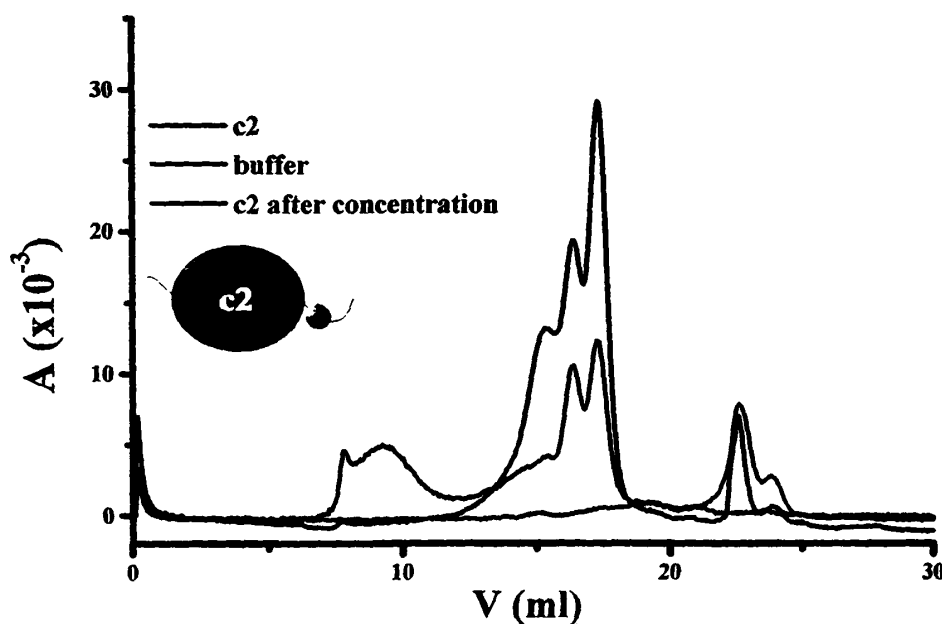


Σχήμα 4.8 Μονοδιάστατο φάσμα του c2 όπως προέκυψε κατόπιν αποκοπής του συνεκφρασμένου MBP με χρήση της πρωτεάσης TEV. Το φάσμα λήφθηκε στους 17°C, σε φασματόμετρο 500MHz σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων του καλίου pH=8 και 150mM NaCl.

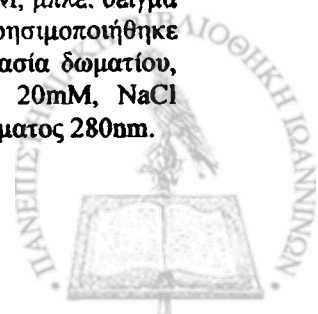
#### 4.1.5.2.3 Εκτίμηση του βαθμού ολιγομερισμού του c2 με χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης- εξάρτηση από τη συγκέντρωση

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης αποκάλυψε, πράγματι, εξάρτηση του προφίλ του c2 από τη συγκέντρωση (Σχ.4.9). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούσαν να διακριθούν τουλάχιστο τρεις υποπληθυσμοί, με τη σχετική ένταση των κορυφών που τους αντιπροσώπευαν να μεταβάλλεται και παράλληλα να εμφανίζονται νέες κορυφές χαρακτηριστικές μεγαλύτερων πολυμερών κατόπιν συμπύκνωσης του δείγματος σε “επίπεδα NMR”. Η κατασκευή καμπύλης συσχετισμού του όγκου κατακράτησης (*retention volume*  $V_R$ ) με το μοριακό βάρος προτύπων πρωτεϊνών επέτρεψε την εκτίμηση του μεγέθους των ολιγομερών του c2 που αντιστοιχούσαν στις τρεις κορυφές. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς λοιπόν οι τρεις υποπληθυσμοί ήταν βαρύτεροι του μονομερούς κατά 1.9, 3.6 και 5.5 φορές. Με άλλα λόγια η πρώτη κορυφή συσχετιζόταν καλά με το διμερές, ενώ στο εμβαδόν κάτω από τη δεύτερη και την τρίτη συνεισέφεραν πιθανά ολιγομερή από το τριμερές έως το

εξαμερές. Ο αρχικός ώμος που παρατηρείται, ίσως να οφείλεται και σε ελαφρώς μεγαλύτερα ολιγομερή. Για μια τεχνική που μπορεί να διαχωρίζει βιομόρια βάσει διαφορών στον όγκο και τη συμμετρία (μέγεθος και σχήμα), οι εκτιμήσεις των μοριακών βαρών των ολιγομερών κρίνονται ποιοτικά καλές αν και απέχουν κατά τι από το ακριβές υπολογιζόμενο μοριακό βάρος των επιμέρους ολιγομερών. Εξάλλου είναι σε συμφωνία με τη “γενική εικόνα” του μορίου και εξηγούν την ποιότητα των φασμάτων NMR. Το μέγεθος των μεγαλύτερων πολυμερών που εμφανίζονται ως συνέπεια της αύξησης της συγκέντρωσης δεν μπορεί να εκτιμηθεί μιας και πέφτει έξω από τα όρια των μοριακών βαρών της πρότυπης καμπύλης. Αυτό που μπορεί να εξαχθεί πάντως είναι ότι είναι μεγαλύτερα από 67kDa (το βαρύτερο βιομόριο που συμμετέχει στην καμπύλη εκλύεται αργότερα), δηλαδή μεγαλύτερα του οκταμερούς c2, ενώ υπάρχουν και πολυμερή που δεν διαχωρίζονται από τη στήλη (εκλύονται στο νεκρό όγκο  $V_0$ ) μιας και όπως φαίνεται είναι μεγαλύτερα από το όριο αποκλεισμού (*exclusion limit*) 1.3MDa. Ο κύριος “τροφοδότης” της μάζας τους φαίνεται να είναι το υποθετικό τετραμερές/ πενταμερές μιας και η κορυφή του δείχνει να μειώνεται προς όφελος των μεγαλύτερων σωματιδίων με αύξηση της συγκέντρωσης.



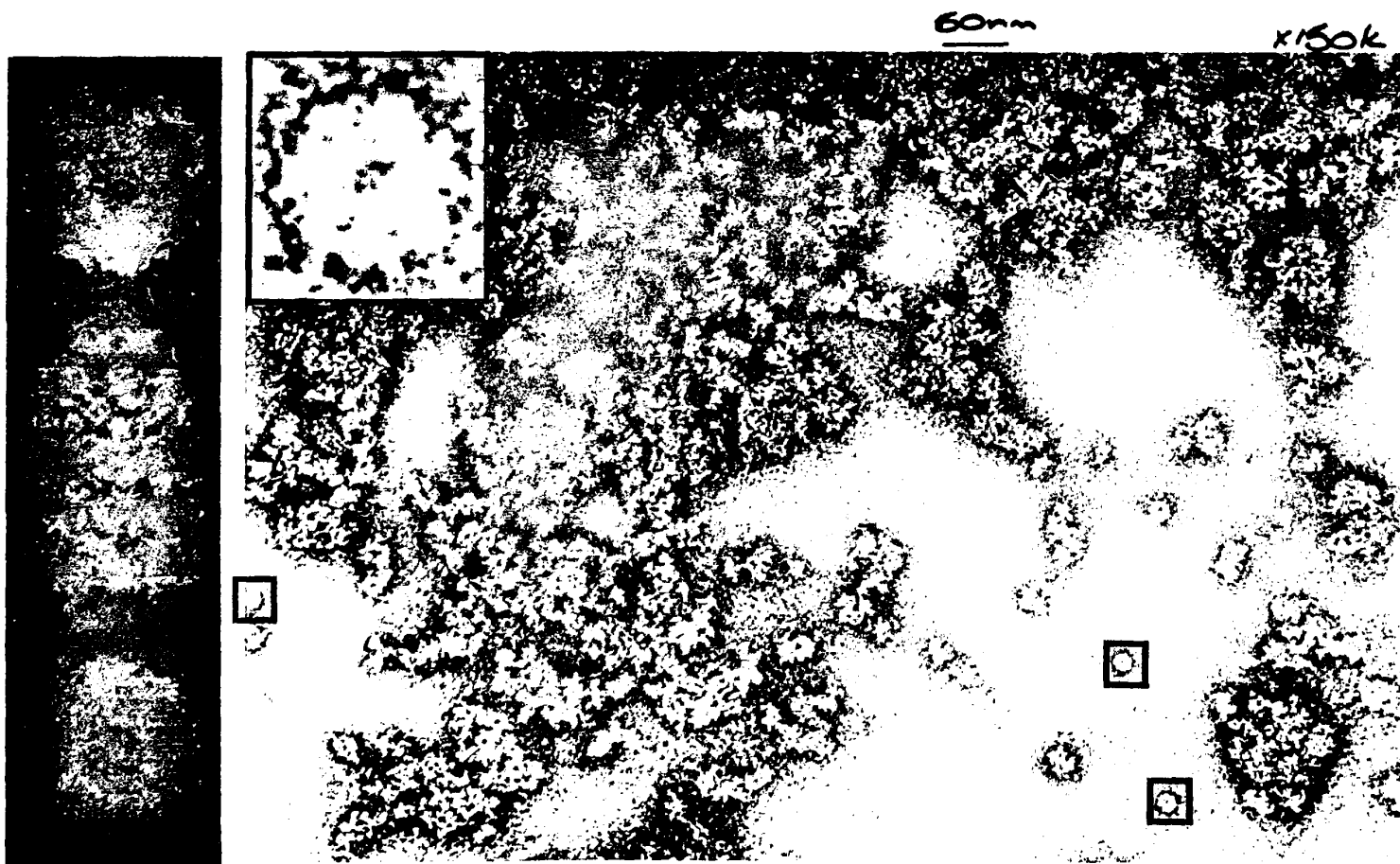
**Σχήμα 4.9** Διαχωρισμός των πολυμερών c2 με χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Μαύρη γραμμή: c2 σε συγκέντρωση 40μM, κόκκινη: c2 σε συγκέντρωση 40μM κατόπιν αραιώσης 10min πριν την ένεση στη στήλη από συμπυκνωμένο διάλυμα 500μM, μπλε: δείγμα του ρυθμιστικού διαλύματος που κρατήθηκε κατά τη συμπύκνωση του c2. Χρησιμοποιήθηκε στήλη Superdex 200 της Amersham. Η διαδικασία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ταχύτητα 0.5ml/min, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 20mM, NaCl 150mM,  $\text{NaN}_3$  1.5mM, 2mM  $\beta$ -ME και η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 280nm.



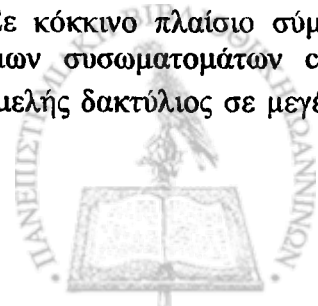
#### 4.1.5.3 Διερεύνηση της διάταξης πολυμερών c2- ηλεκτρονική μικροσκοπία

Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Lesley Calder- NIMR-Λονδίνο) λήφθηκαν φωτογραφίες δείγματος c2 στις οποίες τα μεγαλύτερα πολυμερή είναι εμφανή (Σχ.4.10). Στις φωτογραφίες δεν παρατηρείται ο σχηματισμός κάποιας αυστηρά διατεταγμένης υπερμοριακής δομής. Μάλιστα, η ύπαρξη του συμπλόκου GroEL/ES στο δείγμα –αρκετά μεγάλο ώστε να μπορεί να διακριθεί– ενισχύει την ιδέα της μη ειδικής συσσωμάτωσης του chromodomain.

Και ενώ αυτή η ανάλυση έδινε απαντήσεις σχετικά με την τάση προς πολυμερισμό που εμφάνιζε το c2 εξηγώντας την βιοχημική αλλά και βιοφυσική του συμπεριφορά, το γεγονός της απουσίας κατάλληλου για δομική δουλειά δείγματος του chromodomain παρέμενε. Προς αναζήτηση ενός τέτοιου δείγματος λοιπόν, το ενδιαφέρον μετατοπίστηκε προς την κατεύθυνση του μαζικότερου χαρακτηρισμού και άλλων κατασκευών του c2, κάτι που –σε κάποιο βαθμό– συνέβαινε ήδη.



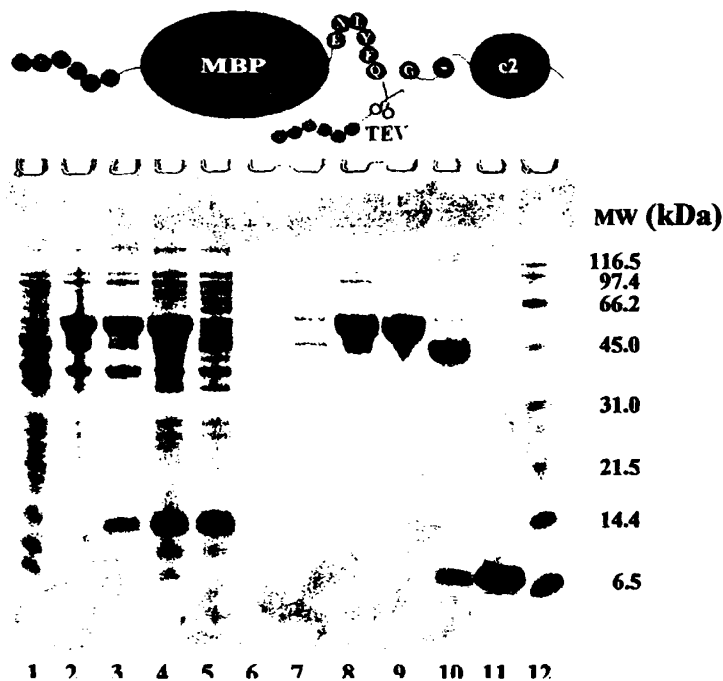
Σχήμα 4.10 Φωτογραφία δείγματος c2 μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Σε κόκκινο πλαίσιο σύμπλοκα GroEL/ES που συναπομονώθηκαν, γεγονός ενδεικτικό της ύπαρξης πρώιμων συσσωματωμάτων c2 στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Στην ένθετη φωτογραφία ο χαρακτηριστικός επιταμελής δακτύλιος σε μεγέθυνση και αριστερά η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου-σαπερόνης προς σύγκριση



#### 4.1.5.4 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ολιγομερών εναλλακτικών κατασκευών c2

##### 4.1.5.4.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Μια σειρά από ελαφρώς διαφοροποιημένα ως προς την αμινοξική αλληλουχία c2 chromodomain εκφράστηκαν ομοιοπολικά συνδεδεμένα στο MBP και απομονώθηκαν (Σχ.4.11). Οι αποδόσεις των διαδικασιών έκφρασης και καθαρισμού ήταν παρεμφερείς, της τάξης των 7-10mgr chromodomain για κάθε λίτρο υγρής καλλιέργειας LB. Εξαιρεση αποτελεί η περίπτωση της απομόνωσης του EED-c2 η απόδοση της οποίας ήταν ελαφρά υψηλότερη. Η συμπύκνωση σε συγκεντρώσεις έως 0.6mM απεδείχθη επιτεύξιμη για όλα τα δείγματα που δοκιμάστηκαν. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων μοριακής διήθησης έδειξε ότι αντίθετα με το c2, τα KNG-c2, ERF-c2, ERD-c2 και EED-c2 σχηματίζουν, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (40μM), έναν μόνο τύπο ολιγομερούς (Σχ.4.12A). Μάλιστα, κατόπιν συμπύκνωσης σε συγκεντρώσεις κατά 2.5 ή 3 φορές υψηλότερες από τη μέγιστη επιτεύξιμη για το c2, δεν παρατηρείται ο αντίστοιχος σχηματισμός ογκωδών πολυμερών. Ο



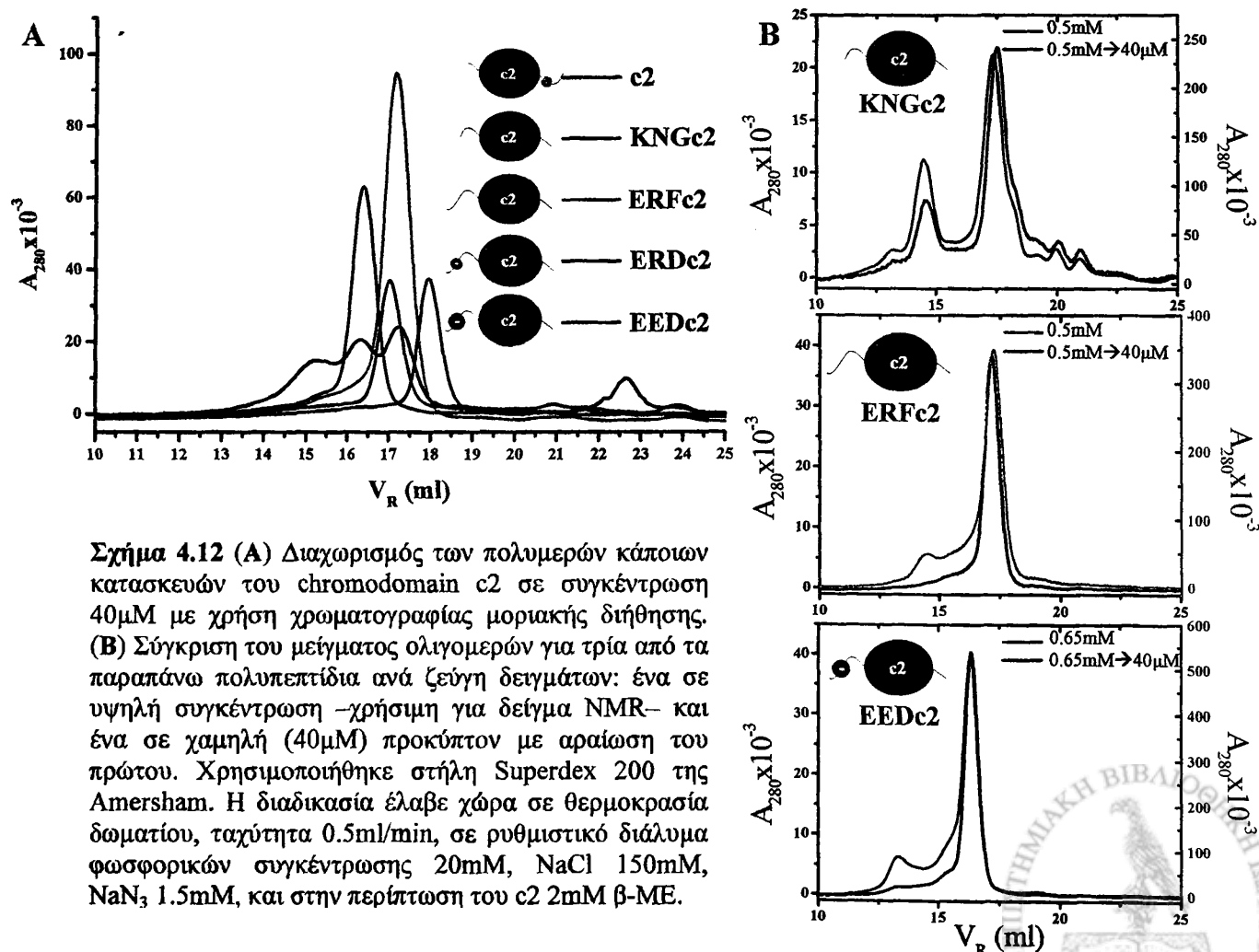
Σχήμα 4.11 Έκφραση του MBP-EED-c2 και απομόνωση του EED-c2 με χρήση της πρωτεάσης TEV. Διαδρομές: 1, 2. δείγμα βακτηρίων πριν και μετά την επαγωγή με IPTG για τρεις ώρες στους 37°C. 3, 4. επαναδιαλυμένο στερεό υπόλειμμα και κυτταροδιάλυμα αντίστοιχα, μετά τη λύση των βακτηρίων. 5. τα πρωτεϊνικά συστατικά του δείγματος της διαδρομής 4 που δεν συγκρατήθηκαν σε στήλη σφαιριδίων συγγένειας νικελίου. 6, 7, 8. τρεις διαδοχικές εκπλύσεις της στήλης με διαλύματα υμιδαζολίου συγκέντρωσης 10, 30 και 50mM αντίστοιχα. 9. έκλυση της στήλης με διάλυμα υμιδαζολίου συγκέντρωσης 150mM. 10. το δείγμα της διαδρομής 9 μετά από ολονύκτια επώαση με TEV. 11. EED-c2 συμπυκνωμένο σε συγκέντρωση 0.65mM. 12. διάλυμα πρωτεϊνών-δεικτών μοριακού βάρους.





υπερδεκαπλασιασμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων ευνοεί τη σταθεροποίηση ολιγομερών υψηλότερης τάξης, διαδικασία αναστρέψιμη κατά το μάλλον ή ήττον για τα νέα πολυπεπίδια (Σχ.4.12B) τηρουμένων δύο συνθηκών: i) αποφυγή μακροχρόνιας φύλαξης σε υψηλές συγκεντρώσεις, και ii) διατήρηση της ιονικής ισχύος.

Ο προσδιορισμός των μεγεθών των ολιγομερών με σύγκριση των χρόνων κατακράτησης των πολυπεπτιδίων c2 και αυτών των προτύπων πρωτεϊνών - δεικτών, δεν οδήγησε σε εξίσου ξεκάθαρα συμπεράσματα. Τα εκτιμώμενα μοριακά βάρη εμφάνιζαν μη συστηματικές αποκλίσεις από τα κοντινότερα ακέραια πολλαπλάσια του μοριακού βάρους του μονομερούς (Πιν.4.3). Τέτοιες αποκλίσεις είναι εν πολλοίς αναμενόμενες λόγω της ίδιας της "φύσης" της τεχνικής και των βασικών αρχών στις οποίες στηρίζεται, όπως της εξάρτησης του διαχωρισμού βάσει του σχήματος και του όγκου και όχι της μάζας, αλλά και της σύγκρισης με πρότυπα (*calibration*) που δεν είναι κατ' ανάγκη απόλυτα σφαιρικά ούτε επιδεικνύουν ανάλογο βαθμό ενυδάτωσης.

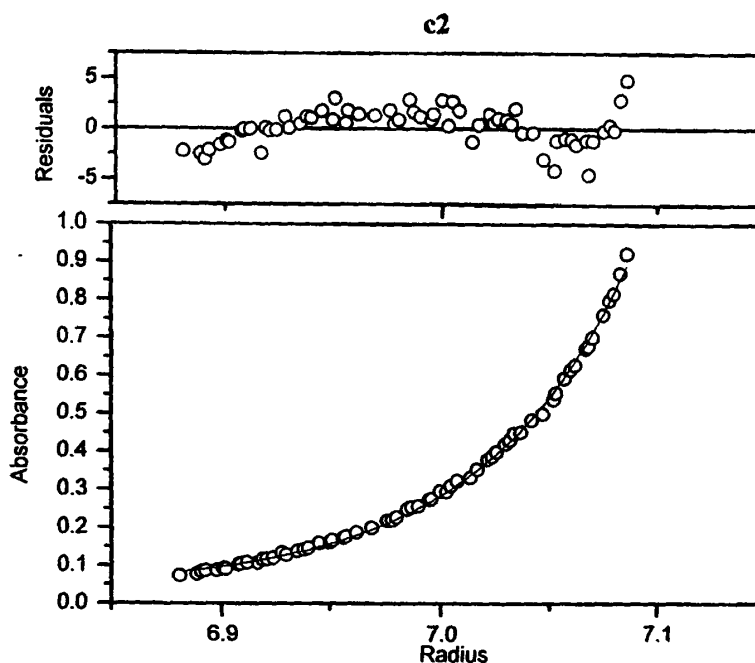


Σχήμα 4.12 (A) Διαχωρισμός των πολυμερών κάποιων κατασκευών του chromodomain c2 σε συγκέντρωση 40µM με χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. (B) Σύγκριση του μείγματος ολιγομερών για τρία από τα παραπάνω πολυπεπίδια ανά ζεύγη δειγμάτων: ένα σε υψηλή συγκέντρωση -χρήσιμη για δείγμα NMR- και ένα σε χαμηλή (40µM) προκύπτουν με αραιώση του πρώτου. Χρησιμοποιήθηκε στήλη Superdex 200 της Amersham. Η διαδικασία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ταχύτητα 0.5ml/min, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 20mM, NaCl 150mM,  $\text{NaN}_3$  1.5mM, και στην περίπτωση του c2 2mM β-ME.

#### 4.1.5.4.2 Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση

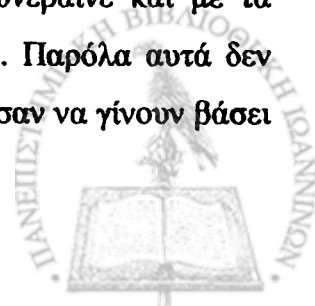
##### 4.1.5.4.2.1 Ισορροπία φυγοκέντρου- άνωσης- τριβής

Σε μια προσπάθεια βελτίωσης της εκτίμησης του βαθμού πολυμερισμού των πολυπεπτιδίων c2 χρησιμοποιήθηκαν δύο παραλλαγές της τεχνικής της αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης. Η πρώτη παραλλαγή στηρίζεται στη φασματοσκοπική ανάλυση της ισορροπίας δυνάμεων (φυγοκέντρου, άνωσης και τριβής) που ασκούνται στο μόριο κατά την υπερφυγοκέντρωση. Για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους δεν απαιτείται καμπύλη προτύπων όπως συμβαίνει με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, ωστόσο και σε αυτή την τεχνική ο όγκος και το σχήμα χαρακτηρίζουν τη συμπεριφορά των βιομορίων και όχι απλά το μοριακό τους βάρος.



Σχήμα 4.13 Κατανομή του c2 στον άξονα της γραμμικής κίνησης κατά την ισορροπία φυγοκέντρου – άνωσης – τριβής (*sedimentation equilibrium*). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 280nm μετά από φυγοκέντρωση στις 35000rpm για 41 ώρες σε 20°C σε Beckman Optima XL-A.

Τα μοριακά βάρη που υπολογίστηκαν για τα πολυπεπτιδία c2 με αυτή την τεχνική (Σχ.4.13) και υποθέτοντας ότι στα διαλύματά τους μπορεί να βρεθεί ένα μόνο είδος σωματιδίου (μονομερές, ολιγομερές, ή πολυμερές) (Πιν.4.4), απείχαν από το κοντινότερο ακέραιο πολλαπλάσιο του μοριακού βάρους του μονομερούς όπως συνέβαινε και με τα υπολογισθέντα από τα χρωματογραφήματα μοριακής διήθησης (Πιν.4.3). Παρόλα αυτά δεν υπήρχε σύγκλιση στις εκτιμήσεις του βαθμού πολυμερισμού που μπορούσαν να γίνουν βάσει



της ανάλυσης των δεδομένων από τις δύο τεχνικές. Έτσι, σύμφωνα με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τα KNG-c2, ERF-c2, ERD-c2, και EED-c2 δεν επιδείκνυαν τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού. Το αντίθετο μπορεί κανείς να ισχυριστεί αναλύοντας τα πειραματικά δεδομένα των υπερφυγοκεντρήσεων, τα οποία υποδεικνύουν μια σχετικά μικρή συστηματική απόκλιση από το μοριακό βάρος του εκάστοτε μονομερούς. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης μπορούσε να συνηγορήσει υπέρ της ύπαρξης του μονομερούς μόνο στην περίπτωση του KNG-c2. Αν και όχι στα υπολογιζόμενα μεγέθη, συμφωνία πάντως μεταξύ των δύο τεχνικών υπάρχει στην περίπτωση του c2, το οποίο δείχνει “συνολικά μεγαλύτερο” από τα υπόλοιπα πολυπεπίδια.

| Concentration      | c2            | KNG-c2        | ERF-c2        | ERD-c2        | EED-c2        |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Low (40μM)         | 15.249 (1.9x) | 6.525 (0.8x)  | 17.934 (2.0x) | 19.947 (2.2x) | 27.776 (3.1x) |
|                    | 29.789 (3.6x) |               |               |               |               |
|                    | 45.001 (5.5x) |               |               |               |               |
| High (0.5- 0.65mM) | -             | 15.697 (1.9x) | 17.950 (2.0x) | -             | 29.342 (3.3x) |
|                    |               | 56.633 (6.7x) | 57.975 (6.4x) |               | 72.068 (8.1x) |

Πίνακας 4.3 Μοριακά βάρη (σε kDa) των διαφόρων ολιγομερών που σχηματίζουν πολυπεπίδια του c2 chromodomain σε διάλυμα, όπως εκτιμώνται από χρωματογραφήματα μοριακής διήθησης.

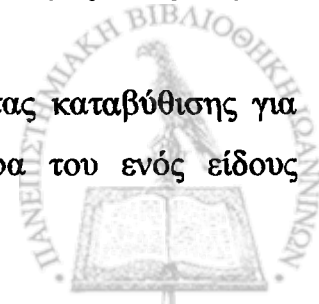
| Concentration | c2           | KNG-c2       | ERF-c2       | ERD-c2       | EED-c2       |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Low (40μM)    | 13.88 (1.7x) | 11.17 (1.3x) | 11.29 (1.2x) | 10.80 (1.2x) | 10.97 (1.2x) |

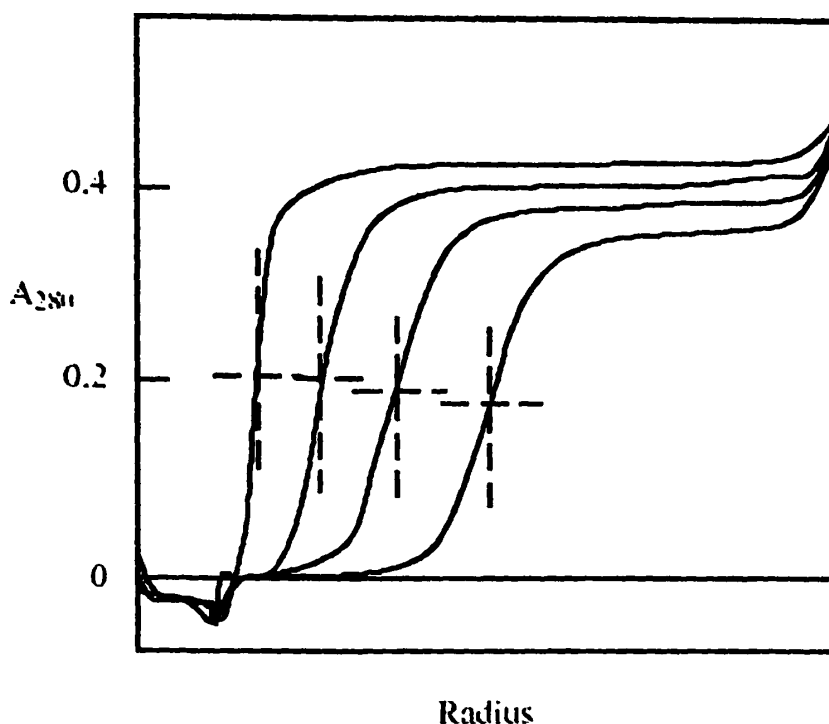
Πίνακας 4.4 Μοριακά βάρη (σε kDa) των διαφόρων ολιγομερών που σχηματίζουν πολυπεπίδια του c2 chromodomain σε διάλυμα, όπως εκτιμώνται με χρήση αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης.

#### 4.1.5.4.2 Ταχύτητα καταβύθισης

Καταφεύγοντας σε μια διαφορετική ανάλυση, η τεχνική της αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους ενός σωματιδίου, αλλά για αυτόν της κατανομής των διαφόρων ολιγομερών ενός βιομορίου ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε διάλυμα. Αυτή η παραλλαγή της τεχνικής ονομάζεται **ταχύτητα καταβύθισης (sedimentation velocity)** και δεν θεωρείται το ίδιο ακριβής, αλλά προσφέρει επιπλέον πληροφορία στις περιπτώσεις ανομοιογενών δειγμάτων όπως φαίνεται να είναι αυτή του chromodomain c2. Η ανάλυση στηρίζεται στην καταγραφή του προφίλ της απορρόφησης σε σχέση με την απόσταση επί της ακτίνας περιστροφής, όχι όμως μετά την επίτευξη ισορροπίας, αλλά κατά τη διάρκεια της βύθισης των διαλυτών σωματιδίων προς το εξωτερικό μέρος της κυψελίδας κατά την υπερφυγοκέντρωση (Σχ.4.14).

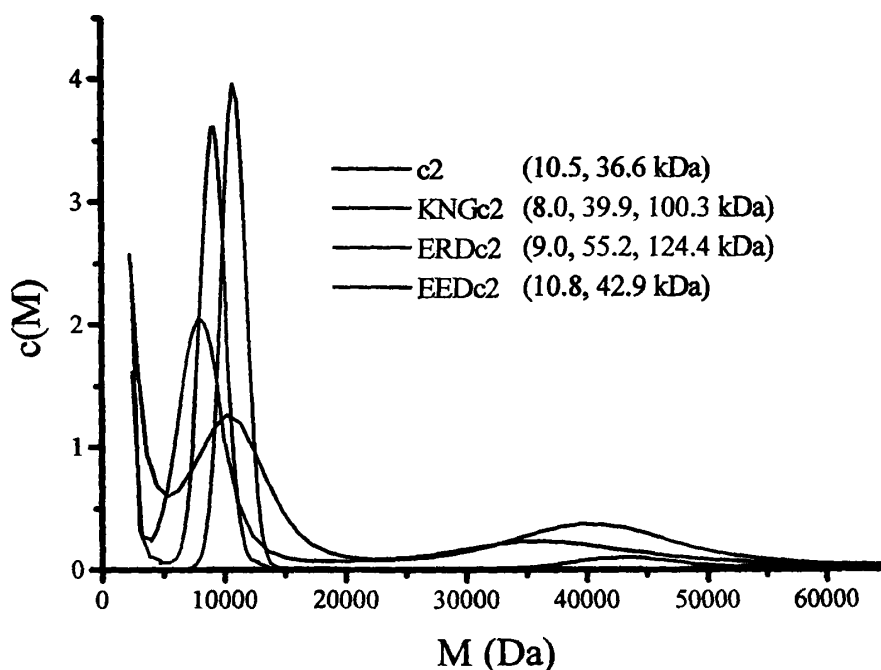
Τα γραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση της ταχύτητας καταβύθισης για κάποια από τα πολυπεπίδια c2 (Σχ.4.15) αποκαλύπτουν περισσότερα του ενός είδους





Σχήμα 4.14 Μετακίνηση και παράλληλη διεύρυνση ως προς την απόσταση από τον άξονα περιστροφής, του ορίου μεταξύ του διαλύτη και του διαλύματος κατά την βύθιση βιομορίου προς τον πάτο της κυψελίδας εξ' αιτίας της φυγοκέντρου δύναμης. Η θέση του ορίου σημειώνεται με σταυρό<sup>[50]</sup>.

σωματίδια ανά πολυπεπίδιο. Με την εξαίρεση του c2, για το οποίο η κύρια κορυφή επικεντρώνεται στα 10.5kDa αλλά είναι πολύ ευρεία για να οφείλεται σε έναν μόνο τύπο



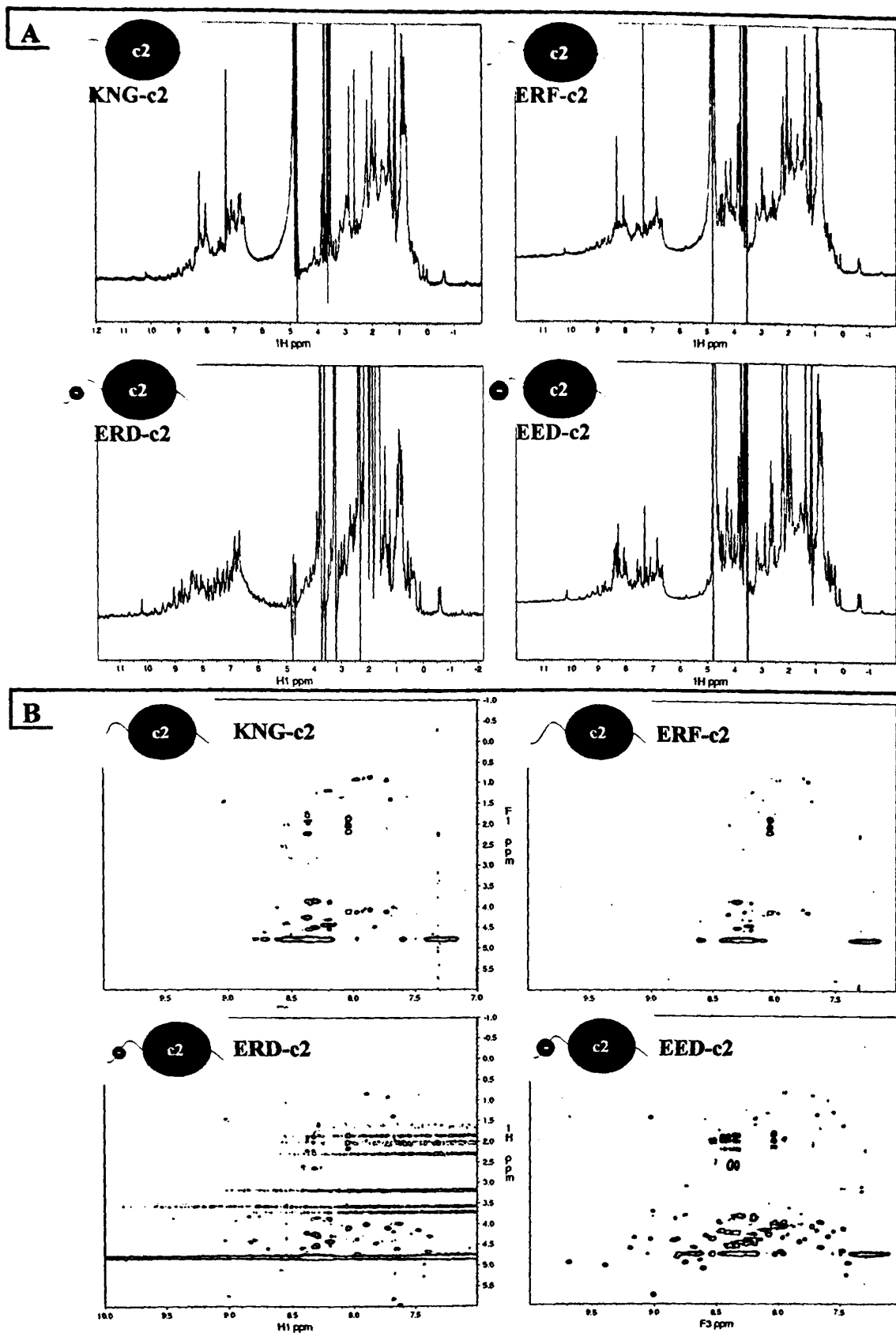
Σχήμα 4.15 Διαχωρισμός των πολυμερών πολυπεπτιδίων του chromodomain c2 σε συγκέντρωση 40μM βάσει της διαφορετικής ταχύτητας καταβύθισης (sedimentation velocity) στους 20°C. Τα μοριακά βάρη που αντιστοιχούν στα μέγιστα των κορυφών αναγράφονται εντός παρενθέσεων.

ολιγομερούς, το κύριο είδος σωματιδίου για τα υπόλοιπα πολυπεπίδια σε χαμηλές συγκεντρώσεις (40 $\mu$ M) δείχνει να είναι το μονομερές. Στα ίδια δείγματα ανιχνεύεται με καλή αριθμητική αντιστοιχία πληθυσμός κάποιου μικρού ολιγομερούς (πενταμερές για το KNG-c2, τετραμερές για το EED-c2). Τα ευρήματα αυτά είναι σε καλή ποιοτική συμφωνία με τα προκύπτοντα από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, όσον αφορά την ύπαρξη πληθυσμών με διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού, αν κανείς σκεφτεί και το ρόλο που ενδέχεται να παίζουν στην κινητικότητα οι μη δομημένες και κατά περίπτωση φορτισμένες ουρές των κατασκευασμένων πολυπεπτιδίων. Οι ποσοτικές εκτιμήσεις αναφορικά με το βαθμό πολυμερισμού όμως δεν συμπίπτουν απολύτως.

#### 4.1.5.4.3 Φασματοσκοπία NMR

Η ύπαρξη σημαντικού πληθυσμού κάποιου από τα πολυπεπίδια σε μονομερή μορφή δεν φαίνεται πιθανή από την εικόνα των φασμάτων NMR (Σχ.4.16). Όμως, η συνολική εικόνα των φασμάτων NMR ήταν εν μέρει αναντίστοιχη και με τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη μοριακή διήθηση. Και αυτό γιατί τα φάσματα των τεσσάρων πολυπεπτιδίων c2 (KNG-c2, ERF-c2, ERD-c2, EED-c2) δεν εμφάνιζαν σημαντικές ποιοτικές διαφορές που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού, αλλά μάλλον επιμέρους, εξ' αιτίας αποκλίσεων παραμέτρων κατά την καταγραφή των φασμάτων ή την παρασκευή των τεσσάρων δειγμάτων (π.χ: συγκέντρωση).

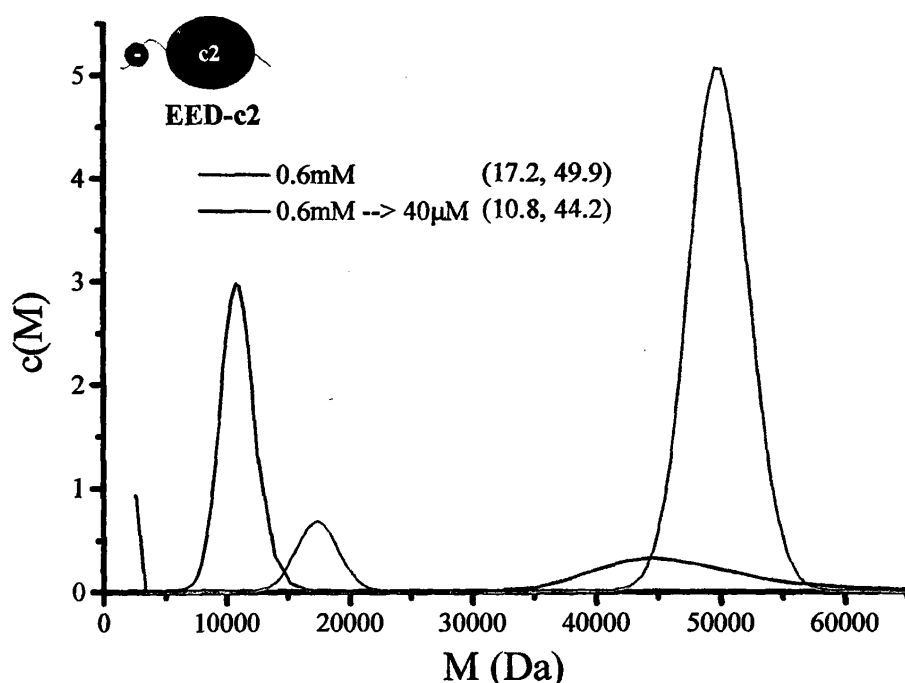




Σχήμα 4.16 (A) Μονοδιάστατα και (B) δισδιάστατα ομοπυρηνικά TOCSY φάσματα NMR πολυπετιδίων του chromodomain c2 στους 17<sup>o</sup>C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου pH=7, 150mM NaCl, 0.01%NaN<sub>3</sub>. Για τη λήψη των φασμάτων των KNG-c2, ERF-c2 και EED-c2 χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο 600MHz και mixing time 90msec, ενώ για του ERD-c2 500MHz και 80msec. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είχαν ως εξής: [KNG-c2]=0.54mM, [ERF-c2]=0.47mM, [ERD-c2]=0.40mM, [EED-c2]=0.61mM

#### 4.1.5.5 Αντίκτυπος της συγκέντρωσης δειγμάτων chromodomain c2 στο βαθμό πολυμερισμού- συμπεράσματα

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η συγκέντρωση των δειγμάτων του c2 chromodomain είναι καθοριστικός παράγοντας για το σχηματισμό πολυμερών. Έτσι, η εξήγηση για τις διαφοροποιήσεις στις εκτιμήσεις του βαθμού πολυμερισμού του c2 ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη τεχνική προέκυψε από ένα πείραμα ταχύτητας καταβύθισης στην αναλυτική υπερφυγόκεντρο σε δείγμα EED-c2 συγκέντρωσης της τάξης δείγματος NMR (Σχ.4.17). Στη συγκέντρωση αυτή δεν ανιχνεύεται πλέον μονομερές, ενώ η αποκατασταθείσα ισορροπία αναδεικνύει το διμερές ως το μικρότερο ανιχνευόμενο ολιγομερές, εύρημα απόλυτα σύμφωνο με τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR. Ο διμερισμός του EED-c2 είναι αναστρέψιμος με την αραιώση του δείγματος κατά 15 φορές, γεγονός ελάχιστης πρακτικής σημασίας αναφορικά με τη φασματοσκοπία NMR.



Σχήμα 4.17 Διαχωρισμός των ολιγομερών του EED-c2 σε συγκεντρώσεις 0.6mM (κυανή γραμμή) και 40μM κατόπιν αραιώσης από 0.6mM (πορτοκαλί γραμμή), βάσει της διαφορετικής ταχύτητας καταβύθισης (*sedimentation velocity*) στους 20°C. Τα μοριακά βάρη που αντιστοιχούν στα μέγιστα των κορυφών αναγράφονται εντός παρενθέσεων.

Συνοπτικά, η παρασκευή αποκλειστικά μονομερούς μορφής του c2 δεν κατέστη εφικτή με μεταβολή των παραμέτρων παρασκευής του δείγματος ή καταφεύγοντας στη βιοτεχνολογία προκειμένου να διαφοροποιηθεί το προς μελέτη πολυπεπίδιο. Παρόλα αυτά κατέστη δυνατή η παρασκευή δείγματος με τη διμερή μορφή να συνεισφέρει στα φάσματα NMR. Αν και μη ιδεατή περίπτωση, ο σχηματισμός διμερούς για πολυπεπίδιο του μοριακού

βάρους του c2 δεν καθίσταται απαγορευτικός για την επίλυση της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια με χρήση φασματοσκοπίας NMR.

Προκειμένου να καταγραφούν τα απαιτούμενα και πιο σύνθετα φάσματα, έπρεπε να επιλεγεί μία από τις διαθέσιμες πολυπεπτιδικές εκδοχές του c2 chromodomain. Η ανάλυση που προηγήθηκε προσδιορίζει με σαφήνεια το c2 ως το λιγότερο κατάλληλο πολυπεπτίδιο, αλλά μεταξύ των KNG-c2, ERF-c2, ERD-c2 και EED-c2 δεν καταδεικνύει σημαντική διαφοροποίηση. Έτσι η επιλογή έγινε βάσει της συνολικής βιοχημικής και φασματοσκοπικής εικόνας των βιομορίων εστιάζοντας στις όποιες επιμέρους διαφορές μεταξύ τους. Με αυτό το σκεπτικό επελέγη το EED-c2 λόγω

- i). υψηλότερης απόδοσης κατά την παρασκευή δειγμάτων NMR
- ii) οριακά υψηλότερης διαλυτότητας (πυκνότερα δείγματα εφικτά χωρίς να παρατηρείται καθίζηση)
- iii) και –πιθανότατα εξ αιτίας των δύο προαναφερθέντων συγκριτικών πλεονεκτημάτων– πλουσιότερων σε σήματα φασμάτων TOCSY.





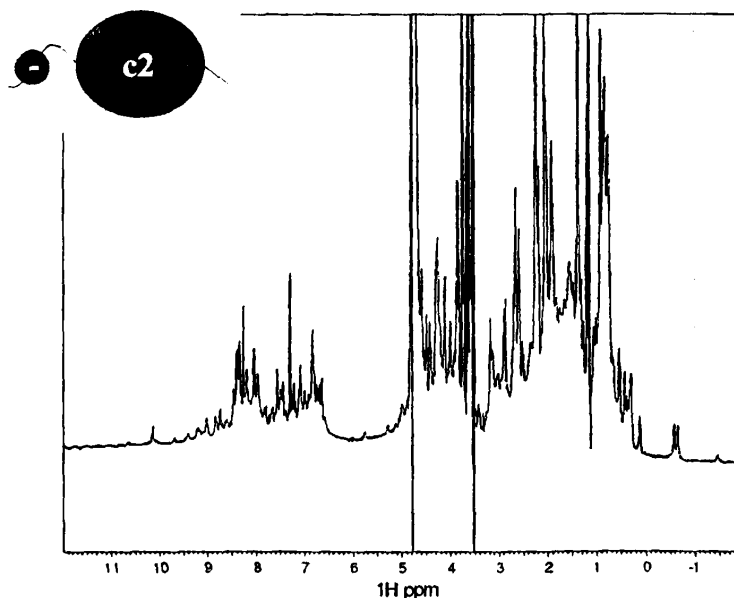
## 4.2 Πειραματική στρατηγική για τον υπολογισμό της τριτοταγούς του EED-c2- Παρουσίαση και επεξήγηση φασμάτων NMR- Ανάλυση των επιλυμένων δομών

### 4.2.1 Επιλογή παρουσιαζόμενων φασμάτων

Τα φάσματα NMR μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ποικιλοτρόπως. Το κριτήριο της ομαδοποίησης μπορεί να είναι ο αριθμός των συσχετιζόμενων πυρήνων (μονο- δις- τρις- τετρα- διάστατα φάσματα) ή η καταγραφή μαγνητικών συσχετισμών μεταξύ ενός ή περισσοτέρων ειδών πυρήνων (ομοπυρηνικά, ετεροπυρηνικά φάσματα). Η παρούσα εισαγωγή επικεντρώνεται στην περιγραφή των φασμάτων που καταγράφηκαν και αναλύθηκαν προκειμένου να γίνει ο αρχικός χαρακτηρισμός και να επιλυθεί η δομή του chromodomain c2, με έμφαση στο είδος της πληροφορίας που μπορεί να αντληθεί από το καθένα και όχι στον τρόπο με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται.

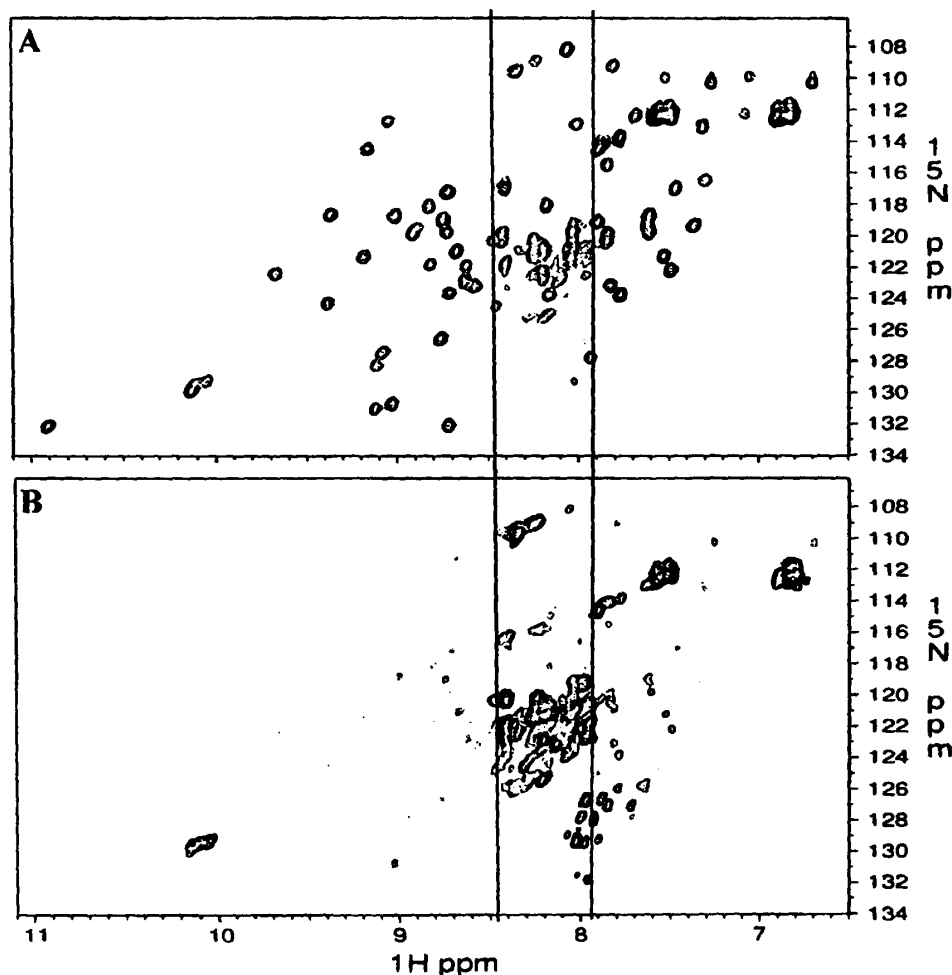
### 4.2.2 Πιστοποίηση αναδίπλωσης με NMR

Η καλή διασπορά των σημάτων NMR στους άξονες των φασμάτων αποτελεί –όπως ήδη σχολιάστηκε– στοιχείο ενδεικτικό αναδίπλωσης και το αντίστροφο. Όντας χαρακτηριστικός για το ίδιο το βιομόριο, ο βαθμός διασποράς είναι ανεξάρτητος του τύπου του φάσματος που καταγράφεται και άρα σταθερός από το απλούστερο μονοδιάστατο έως τους “κύβους”. Η

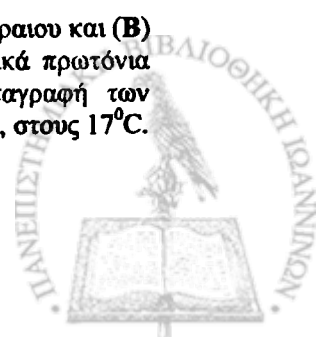


Σχήμα 4.18 Μονοδιάστατο φάσμα NMR πολυπεπτιδίων του chromodomain EED-c2 στους 17°C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου pH=7, 150mM NaCl, 0.01%NaN<sub>3</sub> σε φασματόμετρο 600MHz.

καλύτερη όμως απεικόνιση για να τον εκτιμήσει κανείς είναι σε δύο διαστάσεις. Προκειμένου περί πολυπεπτιδίων, για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ετεροπυρηνικό, δισδιάστατο φάσμα-φωτογραφία του μορίου  $^{15}\text{N}$ -HSQC, όπου ανιχνεύονται τα αμιδικά και αμινικά σήματα. Κάθε κορυφή, που διακρίνεται στο φάσμα με τη μορφή κλειστών ισοψών γραμμών, αντιπροσωπεύει το μαγνητικό συσχετισμό των πυρηνικών spin δύο ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων: ενός  $^{15}\text{N}$  και ενός  $^1\text{H}$ . Στην περίπτωση του chromodomain c2 η πλειοψηφία των σημάτων, τόσο στο μονοδιάστατο (Σχ.4.18), όσο και σε διδιάστατο  $^{15}\text{N}$ -HSQC φάσμα (Σχ.4.19) ανιχνεύεται εκτός της περιοχής όπου αναμένονται οι συντονισμοί πυρήνων που ανήκουν σε μη δομημένα τμήματα του πολυπεπτιδίου. Μάλιστα, η διασπορά των σημάτων στον άξονα των συντονισμών των πρωτονίων είναι περίπου 5 φορές μεγαλύτερη εξ αιτίας της τριτοταγούς δομής.



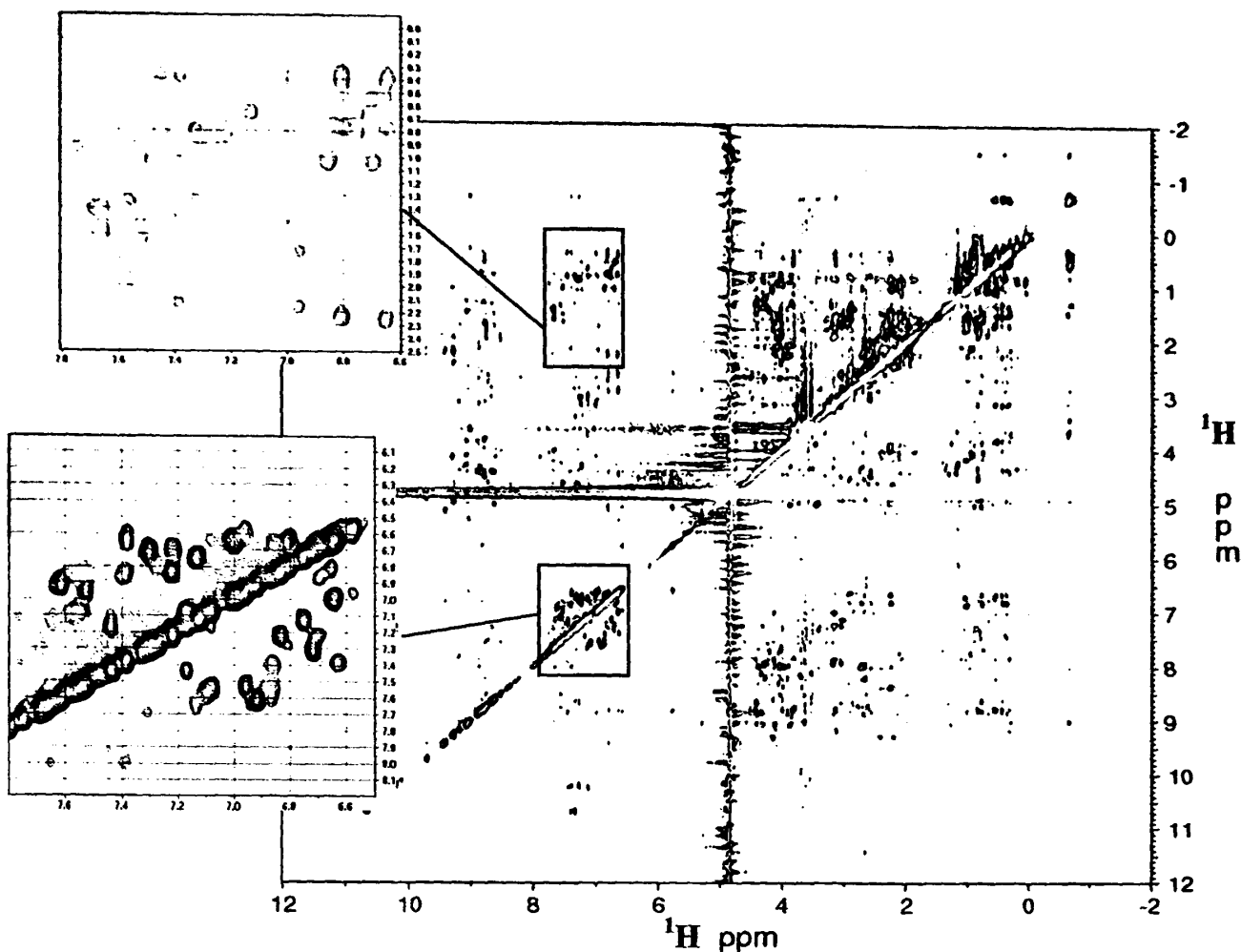
Σχήμα 4.19 Φάσματα HSQC επισημασμένου με  $^{15}\text{N}$  δείγματος VQRs-c2 (A) ακέραιου και (B) έντονα πρωτεολυμένου. Η περιοχή του φάσματος όπου αναμένονται τα αμιδικά πρωτόνια τμημάτων τυχαίου σπειράματος οριοθετείται με κόκκινες γραμμές. Η καταγραφή των φασμάτων έγινε στα 600MHz, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20mM pH=7, στους 17°C. Η συγκέντρωση του chromodomain ήταν 0.5mM.



#### 4.2.3 Καταγραφή τρισδιάστατων φασμάτων με σκοπό την άρση αλληλεπικαλύψεων- Φάσματα NOE αποκαλύπτουν μαγνητικές συζεύξεις μέσω χώρου

Προκειμένου να συνταχθεί η λίστα των περιοριστικών συνθηκών που μεταφράζονται σε αποστάσεις μεταξύ πυρήνων, επιστρατεύονται –εν είδει “μοριακού χάρακα”– φάσματα NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). Το φαινόμενο NOE αναφέρεται στη μαγνητική αλληλεπίδραση ενός πυρήνα με άλλους με την προϋπόθεση της εγγύτητας στο χώρο. Το ολοκλήρωμα της κορυφής που προκύπτει από αυτό το μαγνητικό συσχετισμό δύο πυρήνων είναι αντιστρόφως ανάλογο της έκτης δύναμης της μεταξύ τους απόστασης. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι αποστάσεις μεγαλύτερες από περίπου 5Å είναι απαγορευτικές για την παρατήρηση σημάτων NOE, γεγονός που όμως δεν αποτελεί τροχοπέδη εξ αιτίας της φυσικής διασποράς πρωτονίων σε όλη τη μάζα του πολυπεπτιδίου. Έτσι, με την πληροφορία που μπορεί να εξαχθεί από φάσματα NOESY μπορεί να κατασκευασθεί ένα δίκτυο περιοριστικών συνθηκών που να καλύπτει το σύνολο του όγκου μιας πρωτεΐνης.

Η ακρίβεια στον προσδιορισμό του ολοκληρώματος κορυφών NOE είναι καίριας σημασίας αφού μεταφράζεται σε δίκτυο περιορισμών αποστάσεων και σταδιακά σε τρισδιάστατη δομή. Συνακόλουθα, εξίσου βασικής σημασίας είναι και το ποσοστό των αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών σε ένα φάσμα NOESY, μιας και ο υπολογισμός του όγκου τους ή και ο προσδιορισμός της θέσης τους πολλές φορές καθίσταται από ανακριβής έως αδύνατος. Στις περιπτώσεις ολιγοπεπτιδίων, η καταγραφή ομοπυρηνικών δισδιάστατων φασμάτων NOESY αρκεί για την κατάρτιση της λίστας περιορισμών, σε αυτές πρωτεϊνών όμως, όπου ο αριθμός των σημάτων μοιραία μεγαλώνει, τέτοια φάσματα είναι κατά κανόνα ακατάλληλα ή ανεπαρκή (Σχ.4.20). Η άρση αλληλεπικαλύψεων καθίσταται λοιπόν αναγκαία ώστε να είναι εφικτή η επίλυση της τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης, ακόμα και ενός μικρού domain, όπως είναι το c2. Αυτό είναι εφικτό –πρακτικά για την πλειοψηφία των αλληλεπικαλύψεων σε μια μικρή πρωτεΐνη– κάνοντας χρήση του διαφορετικού μαγνητικού συντονισμού των πυρήνων ατόμων που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με αυτά που εμπλέκονται στις αλληλεπικαλύψεις. Η καταγραφή και η επεξεργασία των φασμάτων γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε οι μαγνητικοί συντονισμοί που εισάγουν την επιθυμητή επιπλέον διαφοροποίηση των σημάτων να παρατίθενται κατά μήκος ενός τρίτου άξονα κάθετου στο επίπεδο των άλλων δύο, ανεβάζοντας έτσι τον αριθμό των φασματικών διαστάσεων κατά



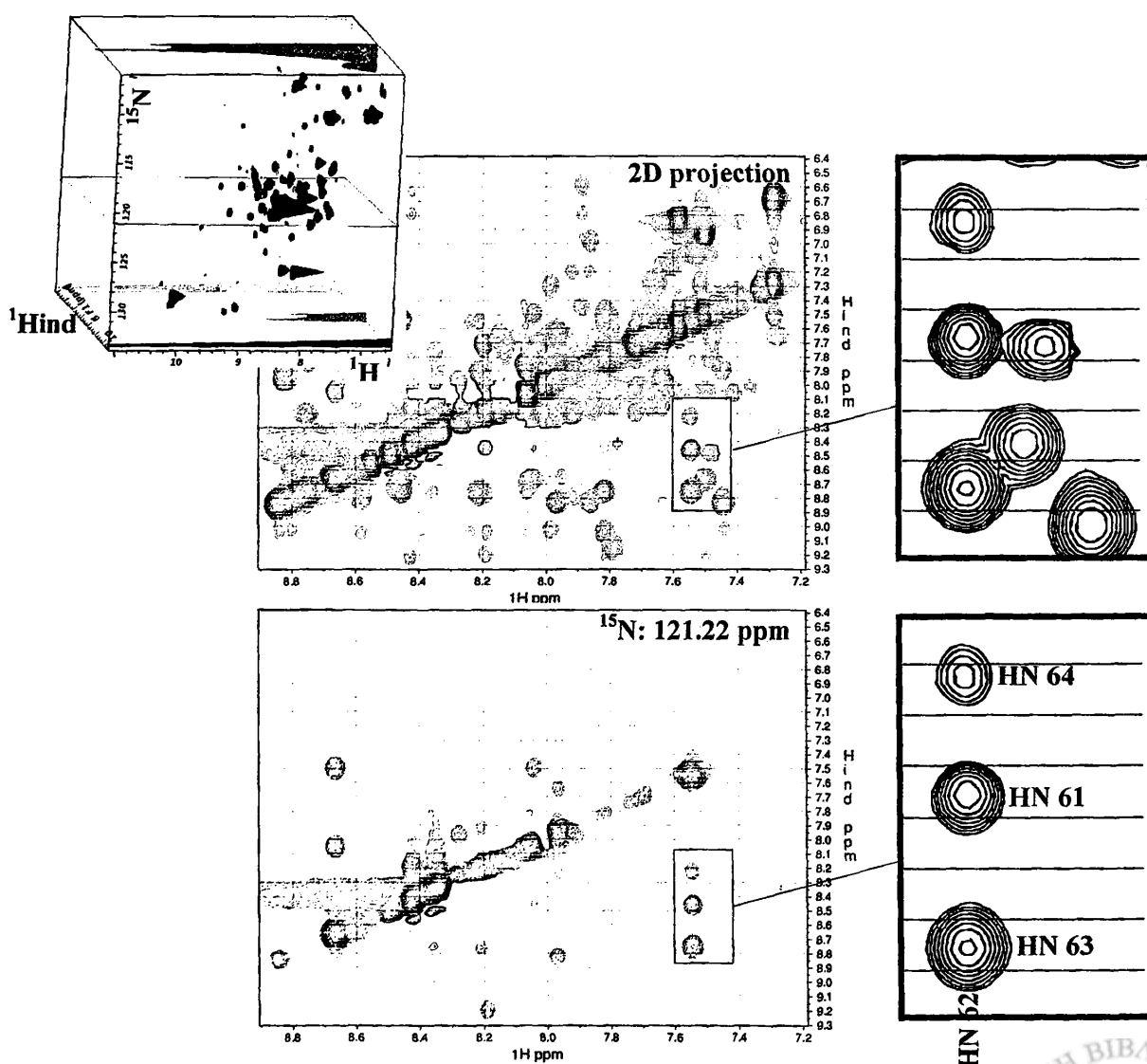
Σχήμα 4.20 Ομοπυρηνικό δισδιάστατο φάσμα NOESY του c2. Η καταγραφή έγινε χρησιμοποιώντας δείγμα συγκέντρωσης 0.2mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου συγκέντρωσης 20mM pH=8, 150mM NaCl, στους 17°C σε μαγνήτη 600MHz.

ένα<sup>[54]</sup>. Αν και η ανάλυση σε κάθε διάσταση δεν είναι απαραίτητα ίδια αυτού του είδους τα φάσματα ονομάζονται “κύβοι” και όχι “ορθογώνια παραλληλεπίπεδα” όπως θα ήταν γεωμετρικά σωστό.

Οι ετεροπυρήνες που χρησιμοποιούνται για την καταγραφή κύβων αξιοποιήσιμων για τον προσδιορισμό της δομής πρωτεϊνών είναι αυτοί των ισοτόπων του  $^{15}\text{N}$  και του  $^{13}\text{C}$ . Έτσι τα προκύπτοντα τρισδιάστατα φάσματα είναι διαχωρισμένα είτε κατά  $^{15}\text{N}$  είτε κατά  $^{13}\text{C}$  ( $^{15}\text{N}$ -separated,  $^{13}\text{C}$ -separated) με βασική κοινή “συντεταγμένη” τους τους μαγνητικούς συντονισμούς πρωτονίων. Η καταγραφή και η ανάλυση των δύο τύπων φασμάτων συνεισφέρει διαφορετική πληροφορία. Για τον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής του EED-c2 χρησιμοποιήθηκαν τρεις τέτοιοι κύβοι:  $^{15}\text{N}$ -NOESY HSQC (Σχ.4.21), και  $^{13}\text{C}$ -NOESY HSQC στην αλειφατική και την αρωματική περιοχή. Από τον πρώτο εξαγονται τα σήματα των πυρήνων υδρογόνου που γειτνιάζουν με πρωτόνια ομοιοπολικά συνδεδεμένα με



άτομο  $^{15}\text{N}$ . Από το δεύτερο και τον τρίτο, τα σήματα που οφείλονται σε γειτνίαση πρωτονίων το ένα εκ των οποίων είναι συνδεδεμένο σε αλειφατικό ή αρωματικό άνθρακα αντίστοιχα. Συνδυάζοντας την πληροφορία από τους τρεις αυτούς κύβους NOESY μπορούν να καθοριστούν οι κορυφές που οφείλονται στα γειτονικά πρωτόνια των αμιδικών και αμινικών πρωτονίων, των αλειφατικών και των αρωματικών πρωτονίων, αλλά και να εξαχθούν οι αποστάσεις μεταξύ τους. Είναι προφανές ότι κάποιο ποσοστό της συνολικής “πληροφορίας αποστάσεων” αποτελεί κοινό περιεχόμενο στους τρεις κύβους ανά ζεύγη, γεγονός που λειτουργεί είτε ως επιβεβαίωση, είτε ως διατήρηση μέρους πληροφορίας που για τεχνικούς λόγους (π.χ αλληλεπικάλυψη) σε αντίθετη περίπτωση θα χανόταν.



**Σχήμα 4.21** Εστιάζοντας στην τρίτη διάσταση. Η καταγραφή τρισδιάστατων φασμάτων (κύβων) NMR αίρει σημαντικό ποσοστό αλληλεπικαλύψεων αν και τελικά αυτές που αναλύονται είναι οι επίπεδες τομές τέτοιων κύβων. Εδώ η προβολή του  $^{15}\text{N}$ -NOESY HSQC του EED-c2 στο επίπεδο  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  και το επίπεδο σε “ύψος” 122.21ppm όπου συντονίζεται ο πυρήνας  $^{15}\text{N}$  της α-αμινομάδας της αλανίνης 62.

#### 4.2.4 Αντιστοίχιση κορυφών σε πυρήνες- Μαγνητικές συζεύξεις μέσω δικτύου ομοιοπολικών δεσμών

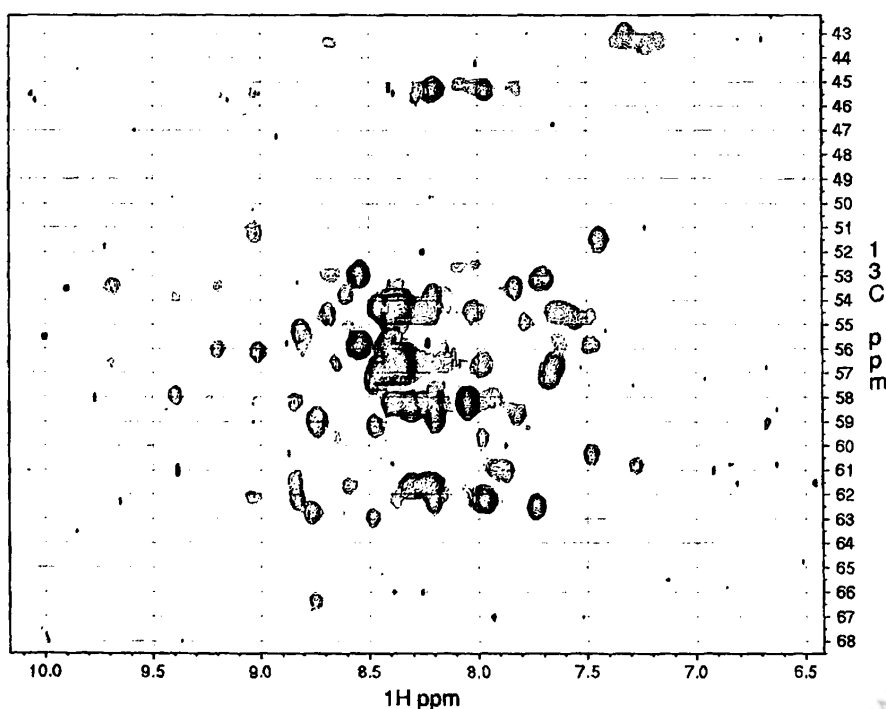
Η εξαγωγή όμως καρτεσιανών περιορισμών αποστάσεων ατόμων ανά ζεύγη, δεν είναι άμεσα εφικτή έχοντας ως μοναδική πηγή φάσματα NOESY. Προτού κάτι τέτοιο καταστεί δυνατό, οι κορυφές των φασμάτων NMR πρέπει να αντιστοιχηθούν – αποδοθούν– σε συγκεκριμένους πυρήνες του μορίου (*peak assignment*). Το πρόβλημα τελικά ανάγεται στην αντιστοίχιση χημικών μετατοπίσεων πυρήνων σε συντεταγμένες κορυφών. Η ανάλυση των φασμάτων NOESY λοιπόν, αν και κατέχει κεντρικό ρόλο, προϋποθέτει λιγότερο ίσως από το ένα τρίτο του συνολικού “όγκου δουλειάς” προκειμένου να επιλυθεί μια δομή με NMR, ενώ δεν μπορεί παρά να έπεται της διαδικασίας εύρεσης των χημικών μετατοπίσεων του συνόλου των πυρήνων του βιομορίου. Μια αμυδρή ιδέα του μεγέθους της επένδυσης σε κόπο και χρόνο που απαιτείται μπορεί κανείς να σχηματίσει μεταφράζοντας από τη “γλώσσα των αριθμών”: Το EED-c2, ένα μάλλον μικρό πολυπεπίδιο, αποτελείται από 595 άτομα H, 107 άτομα N, και 388 άτομα C. Περίπου 1200 κορυφές περιέχονται στο  $^{15}\text{N}$ -NOESY HSQC, 2000 στο αλειφατικό  $^{13}\text{C}$ -NOESY HSQC, και 100 στο αρωματικό. Με δεδομένες τις χημικές μετατοπίσεις της συντριπτικής πλειοψηφίας των πυρήνων, η διαδικασία της απόδοσης των σημάτων NOE σήμερα πλέον είναι σε κάποιο βαθμό αυτοματοποιημένη<sup>[55-58]</sup>, όμως, όπως συνήθως, έτσι και στην περίπτωση του EED-c2, ο επανέλεγχος των αποδόσεων του συνόλου των σημάτων μίας προς μία, περισσότερες μάλιστα από μία φορές, απεδείχθη αναπόφευκτος.

Ο προσδιορισμός του μεγάλου ποσοστού των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  –απαραίτητων για την επίλυση της δομής– γίνεται επιστρατεύοντας την πληροφορία που μπορεί να αντληθεί από τις μαγνητικές συζεύξεις πυρήνων **ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων ανεξάρτητα από την μεταξύ τους απόσταση**. Επιτυγχάνεται έτσι συσχέτιση των συντεταγμένων ομάδων πυρήνων, ώστε η ταυτοποίηση μίας να αποκαλύψει και τις υπόλοιπες της ομάδας. Η στρατηγική, που ακολουθήθηκε στην περίπτωση του EED-c2 περιλαμβάνει πρώτα απ’ όλα το διαχωρισμό του συνόλου των πυρήνων του πολυπεπίδιου σε δύο υποσύνολα. Στο πρώτο περιέχονται οι πυρήνες των ατόμων που απαρτίζουν την κύρια αλυσίδα πλην του α-ατόμου H, και στο δεύτερο οι υπόλοιποι, δηλαδή αυτοί των οποίων τα άτομα ανήκουν στις πλευρικές αλυσίδες και το  $\text{H}_\alpha$ .



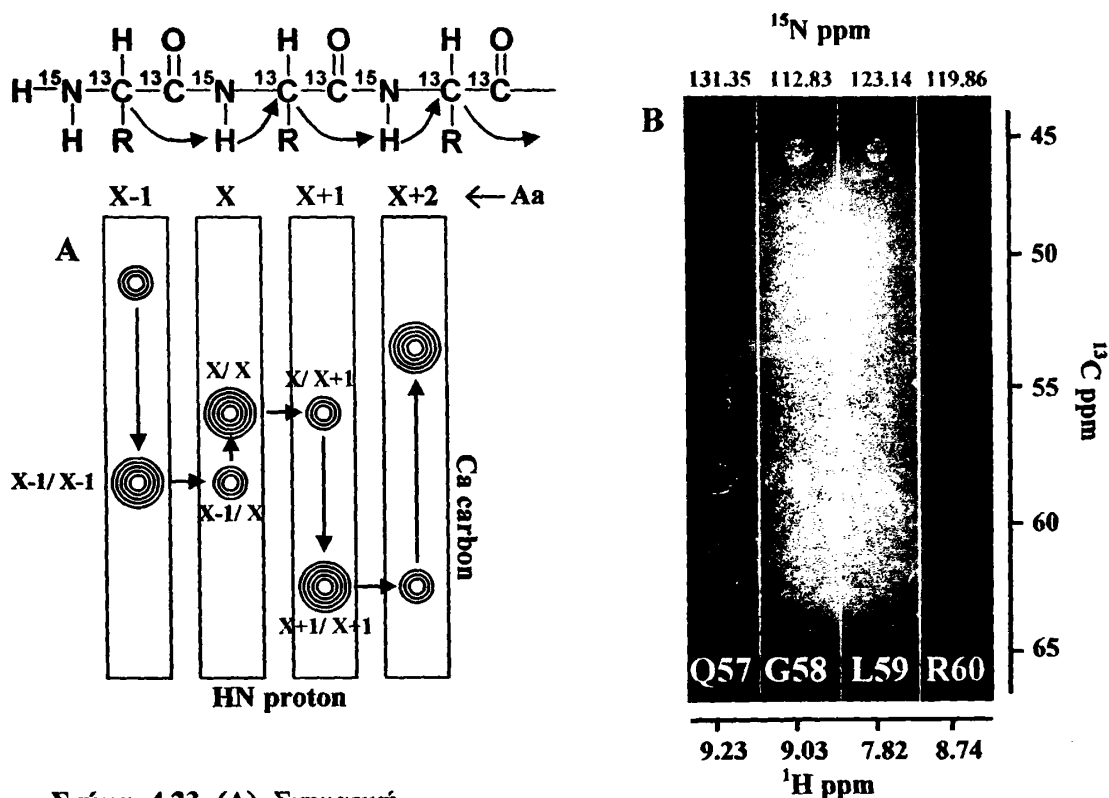
#### 4.2.4.1 Απόδοση κορυφών σε πυρήνες της κύριας πολυπεπτιδικής αλυσίδας πλην του H<sub>α</sub>- Φάσματα HNCa, HNCaCb

Η πιστοποίηση των συντονισμών των πυρήνων της κύριας αλυσίδας βασίστηκε στο πρωτόκολλο της διαδοχικής απόδοσης (*sequential assignment*<sup>[54]</sup>) αξιοποιώντας τα φάσματα HNCa<sup>[59]</sup> (Σχ.4.22), HNCaCb<sup>[60]</sup>. Στον πρώτο από τους δύο αυτούς ετεροπυρηνικούς κύβους τριπλού συντονισμού (*triple resonance, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C*) καταγράφονται οι μαγνητικές συζεύξεις του αμιδικού πρωτονίου της α- αμινομάδας ενός αμινοξέος με τα α- άτομα C του ίδιου και του προηγούμενου στη γραμμική αλληλουχία αμινοξέος, ενώ στον δεύτερο περιλαμβάνονται και οι συζεύξεις με τα β- άτομα C. Είναι προφανές ότι οι συντονισμοί καθενός από τους πυρήνες άνθρακα εμφανίζονται δύο φορές στον κύβο: μία σε σύζευξη με το πρωτόνιο του ίδιου καταλοίπου και μία με αυτό του επομένου στη γραμμική αλληλουχία. Έτσι, το φάσμα μπορεί να τμηθεί σε λωρίδες στο επίπεδο <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C που στη συνέχεια διατάσσονται (και μαζί με αυτές και οι πυρήνες στους οποίους οφείλονται τα σήματα) κατά τη σειρά της αμινοξικής αλληλουχίας (Σχ.4.23A). Το έργο αυτό διευκολύνεται από την “κατευθυντικότητα” που ενυπάρχει σε κάθε λωρίδα μιας και η ενδο-αμινοξική σύζευξη (και άρα και η ένταση της αντίστοιχης κορυφής) είναι ισχυρότερη από τη δια-αμινοξική. Στο τελευταίο στάδιο της επεξεργασίας του HNCa ένας ή περισσότεροι χαρακτηριστικοί



Σχήμα 4.22 Ο κύβος HNCa για το EED-c2 προβεβλημένος στο επίπεδο <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C. Η καταγραφή έγινε χρησιμοποιώντας δείγμα συγκέντρωσης 0.5mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου συγκέντρωσης 20mM pH=7, 150mM NaCl, στους 17°C σε μαγνήτη 600MHz.

συντονισμοί  $C_\alpha$  –συνήθως γλυκίνης, ισολευκίνης, προλίνης, θρεονίνης ή βαλίνης– πυροδοτούν την εξαγωγή της τιμής των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων  $^1H$ ,  $^{15}N_\alpha$  και  $^{13}C_\alpha$  των διαδοχικών αμινοξέων (Σχ.4.23Γ). Στην πράξη, η διασπορά των συντονισμών των περισσότερων  $C_\alpha$  δεν είναι τέτοια ώστε να επαρκεί το HNCa για την εύρεση των χημικών μετατοπίσεων όλων των πυρήνων της κύριας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ακόμα και για ένα μικρό domain όπως το c2, η συνδρομή των πυρήνων  $C_\beta$  ήταν απαραίτητη για να ξεπεραστούν τα εμπόδια που έθεταν οι αλληλεπικαλύψεις των συντονισμών των  $C_\alpha$  (Σχ.4.24). Εξ άλλου, η επεξεργασία του HNCaCb αποδίδει τις χημικές μετατοπίσεις και των ατόμων  $C_\beta$ .

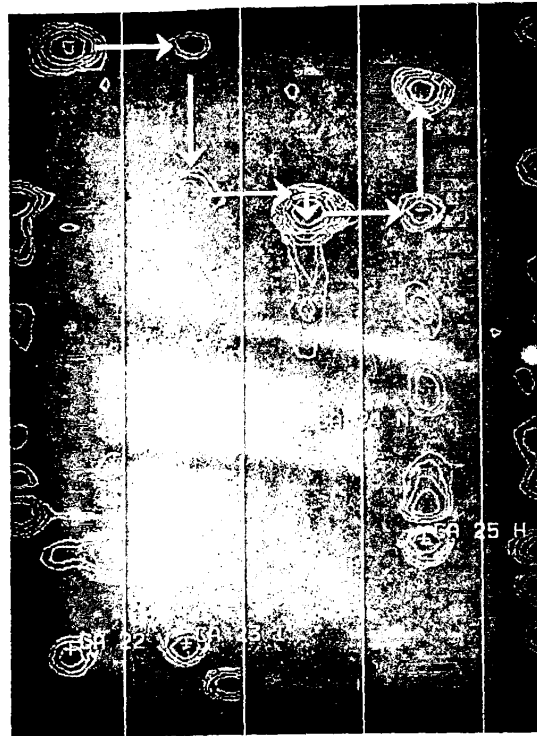


Σχήμα 4.23 (Α) Σχηματική παράσταση της ανάλυσης του HNCa. (Β) Διευθετημένες λωρίδες από το HNCa του EED-c2 για τα αμινοξέα 57-60 του πολυπεπτιδίου. (Γ) Οι συντονισμοί των πυρήνων HN, N και Ca των αμινοξέων 57-60 όπως προσδιορίστηκαν με χρήση των κύβων HNCa και HNCaCb.

|    | I56    | Q57    | G58    | L59    | R60   |
|----|--------|--------|--------|--------|-------|
| HN | 9.23   | 9.03   | 7.82   | 8.74   |       |
| N  | 131.35 | 112.83 | 123.14 | 119.86 |       |
| Ca | 61.48  | 58.54  | 45.53  | 58.93  | 59.19 |





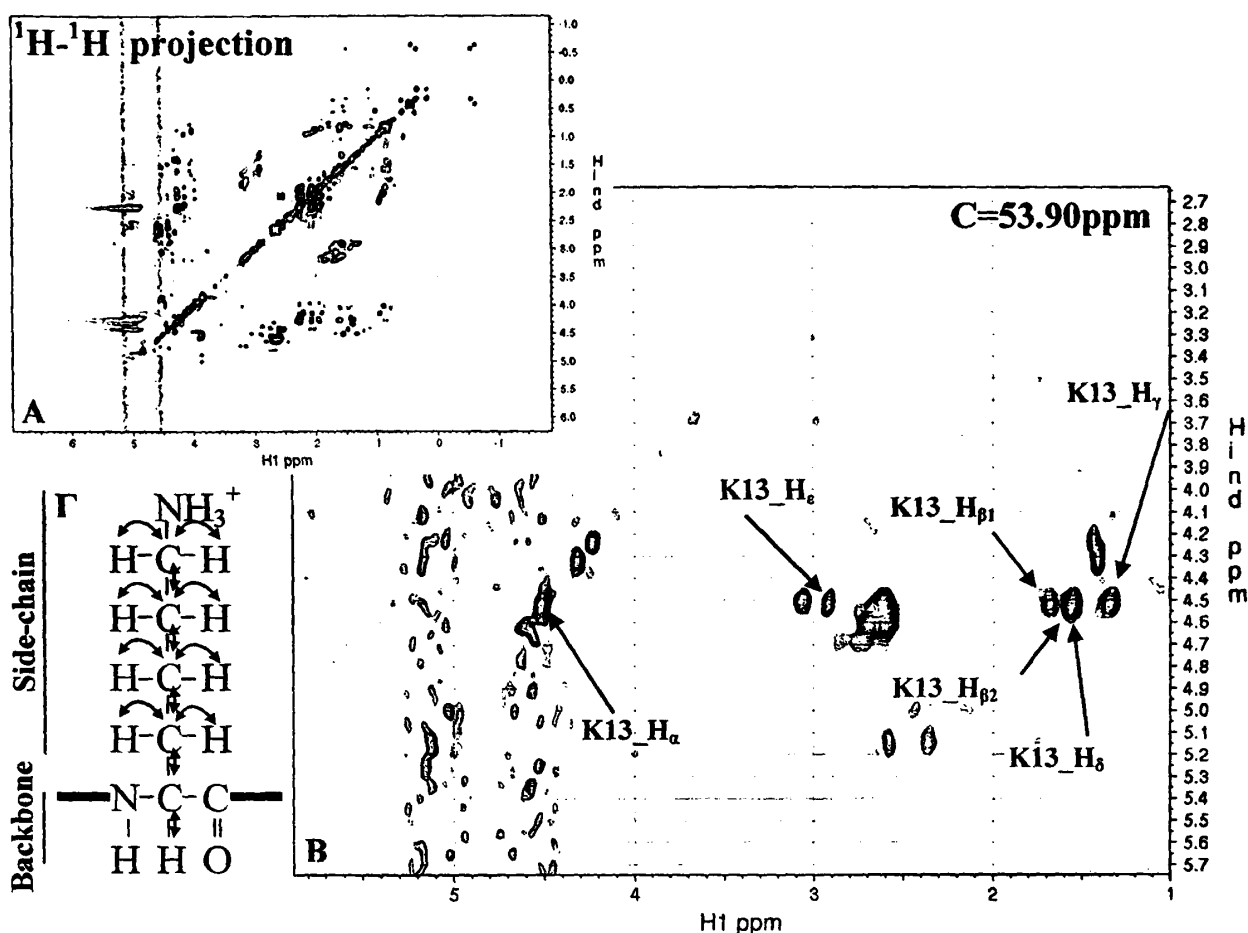


Σχήμα 4.24 Φάσμα HNCaCb δείγματος EED-c2. Η πορεία του συσχετισμού των αμινοξέων V<sub>22</sub>-H<sub>25</sub> διακρίνεται με λευκά βέλη.

#### 4.2.4.2 Απόδοση κορυφών σε πυρήνες αλειφατικών πλευρικών ομάδων και τον H<sub>α</sub> Φάσμα HCCH-TOSCY

Με δεδομένες τις χημικές μετατοπίσεις του πολυπεπτιδικού σκελετού του μορίου, από τον πλήρη κατάλογο των συντονισμών των πυρήνων H, N, C υπολείπονται πλέον αυτές των πυρήνων των πλευρικών αλυσίδων. Η γνώση των χημικών μετατοπίσεων του καρβονυλικού άνθρακα των πεπτιδικών δεσμών δεν είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής, ενώ οι συντονισμοί των H<sub>α</sub> προσδιορίζονται κατά κύριο λόγο παράλληλα με αυτούς των πρωτονίων των αλειφατικών πλευρικών ομάδων από την επεξεργασία του HCCH-TOSCY<sup>[62,63]</sup> στην αλειφατική περιοχή. Πρόκειται για ετεροπυρηνικό κύβο <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C με τον οποίο ανιχνεύονται οι μαγνητικές συζεύξεις πρωτονίων συνδεδεμένων μεταξύ τους μέσω δικτύου ομοιοπολικά δεσμευμένων πρωτοταγών, δευτεροταγών ή τριτοταγών ατόμων άνθρακα. Η παλμική ακολουθία επιτρέπει την καταγραφή σημάτων σε συνάρτηση με το πρωτόνιο εκκίνησης της μαγνήτισης επί της πλευρικής αλυσίδας (Σχ.4.25Γ). Η καταχώριση γίνεται σε διαφορετικά επίπεδα του κύβου των οποίων η συντεταγμένη στον άξονα <sup>13</sup>C ισούται με τη χημική μετατόπιση του πυρήνα άνθρακα εκκίνησης. Έτσι, η πληροφορία που εμπεριέχεται στον κύβο είναι δυνατό να επαναλαμβάνεται για κάθε αμινοξύ τόσες φορές όσοι είναι και οι μαγνητικά μη ισοδύναμοι πυρήνες <sup>1</sup>H σε κάθε πλευρική αλυσίδα. Σε

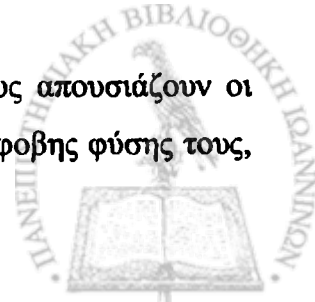
αντιστοιχία με τα HNC $\alpha$  και HNC $\alpha$ C $\beta$ , η ανάλυση του HCCH-TOCSY βασίζεται στην ομαδοποίηση όλων των ενδοαμινοξικών πυρηνικών spin υδρογόνου- άνθρακα και εν συνεχεία στον προσδιορισμό των χημικών τους μετατοπίσεων δεδομένου ότι αυτές των C $\alpha$  και C $\beta$  είναι ήδη γνωστές. Η επεξεργασία του φάσματος γίνεται κατά ομοπυρηνικά επίπεδα  $^1\text{H}$  με την τιμή της χημικής μετατόπισης της τρίτης διάστασης να αντιστοιχεί σε έναν αλειφατικό μη- τεταρτοταγή άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας ή τον C $\alpha$  (Σχ.4.25B).



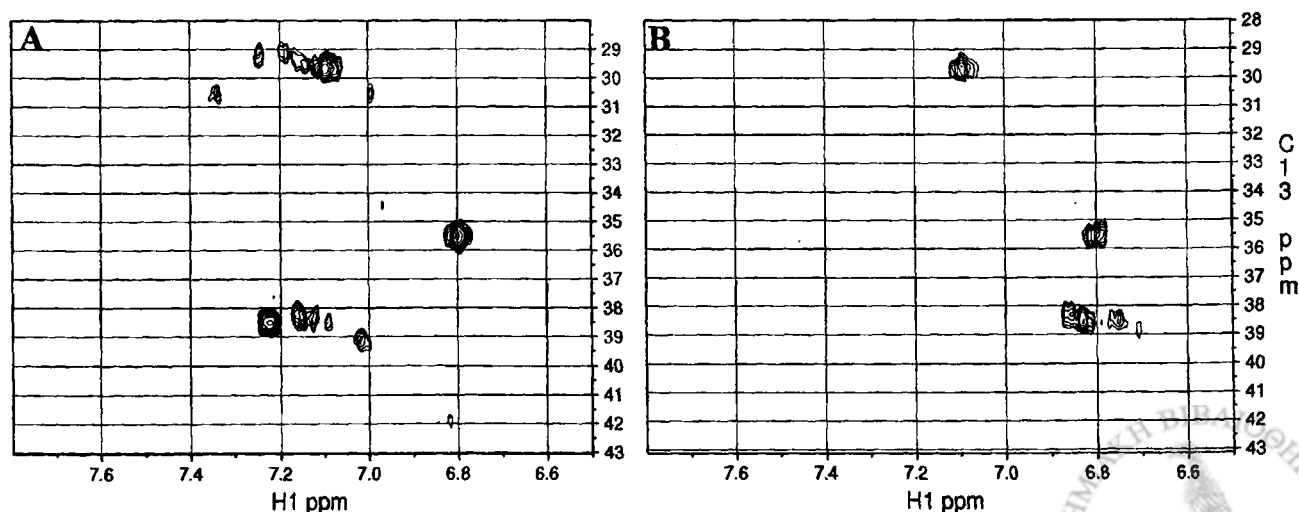
Σχήμα 4.25 HCCH-TOCSY στην περιοχή συντονισμού των αλειφατικών πρωτονίων του EED-c2 σε διάλυμα φωσφορικών pH=7, 0.01% (w/v) NaN $_3$ , στους 17°C και τα 500MHz. (A) Η προβολή του κύβου στο επίπεδο  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$ . (B) Το επίπεδο άνθρακα όπου συντονίζεται ο πυρήνας του  $\alpha$ - ατόμου άνθρακα της λυσίνης 13. Με μοβ επισημαίνονται οι πυρήνες που έχουν αποδοθεί στις αντίστοιχες κορυφές. (Γ) Σχηματική παράσταση των μαγνητικών συζεύξεων που δύνανται να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας την παλμική ακολουθία HCCH-TOCSY. Επισημαίνεται ότι στο φάσμα καταγράφονται ταυτόχρονα οι συζεύξεις που υφίστανται με τη μαγνήτιση να εκκινεί από οποιοδήποτε πρωτόνιο της πλευρικής αλυσίδας ή το H $\alpha$ .

#### 4.2.7.3 Απόδοση κορυφών σε πυρήνες αρωματικών πλευρικών ομάδων- Φάσματα CbH $\delta$ , CbH $\epsilon$

Από τα φάσματα που συζητήθηκαν στις δύο προηγούμενες παραγράφους απουσιάζουν οι συντονισμοί των αρωματικών πρωτονίων. Συνήθως δε, εξ αιτίας της υδρόφοβης φύσης τους,



οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες βρίσκονται σε κάποιο βαθμό “θαμμένες” στο σώμα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα τα αντίστοιχα πρωτόνια να γειτνιάζουν με πληθώρα άλλων πρωτονίων και να είναι έτσι συνυπεύθυνα για την έγερση πολλαπλών σημάτων NOE. Τα σήματα αυτά αναδεικνύονται συνεπώς ιδιαίτερα χρήσιμα στον προσδιορισμό της δομής. Εκτός αυτού, η βιοχημική σημασία των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων είναι μεγάλη μιας και πολύ συχνά τους αποδίδεται λειτουργικός ρόλος σε ποικιλία διαδικασιών. Ο προσδιορισμός της ακριβούς θέσης τους, του προσανατολισμού και της έκθεσής τους στον υδρόφιλο διαλύτη λοιπόν δεν μπορεί να στερείται ενδιαφέροντος. Για τους παραπάνω λόγους, αλλά και για τους προφανείς λόγους πληρότητας, γίνεται η καταγραφή και επεξεργασία εξειδικευμένων φασμάτων για να προσδιορισθούν οι χημικές μετατοπίσεις τους. Στην περίπτωση του EED-c2 επιλέχθηκε το ζεύγος των δισδιάστατων ετεροπυρηνικών  $CbHd^{[64]}$  και  $CbHe^{[64]}$ . Η παλμική ακολουθία του πρώτου συνδέει τα δ- πρωτόνια των δακτυλίων με τον πυρήνα του β- ατόμου άνθρακα του ίδιου αμινοξέος, ενώ αυτή του δεύτερου επιτρέπει την ανίχνευση κορυφών που οφείλονται στη σύζευξη  $C_{\beta}-H_{\epsilon}$ . Στην πράξη στο  $CbHe$  καταγράφονται και μικρότερης έντασης κορυφές οφειλόμενες στη σύζευξη  $C_{\beta}-H_{\delta}$  δικαιολογώντας έτσι την αναφορά σε αυτό και ως  $CbHdHe$ . Τα δύο αυτά φάσματα που καταγράφηκαν για το EED-c2 εμφάνισαν μικρό λόγο σήματος προς θόρυβο (Σχ.4.26) με αποτέλεσμα οι αρωματικοί συντονισμοί των τεσσάρων καταλοίπων τυροσίνης και των τριών τρυπτοφάνης να προσδιοριστούν από το ομοπυρηνικό TOCSY του πολυπεπτιδίου c2 και να επιβεβαιωθούν εμμέσως από τα NOESY του EED-c2. Από τα  $CbHd$  και  $CbHe$  εξήχθη μικρό ποσοστό των συντονισμών των αρωματικών πρωτονίων όπως αυτός του  $H_{\delta}$  της ιστιδίνης 25.



Σχήμα 4.26 Φάσματα NMR  $CbHd$  και  $CbHe$  στα οποία καταγράφονται οι μαγνητικοί συσχετισμοί των πυρήνων  $C_{\beta}$  αρωματικών καταλοίπων με τα αρωματικά πρωτόνια  $H_{\delta}$  (A) και  $H_{\epsilon}$  (B) αντίστοιχα.

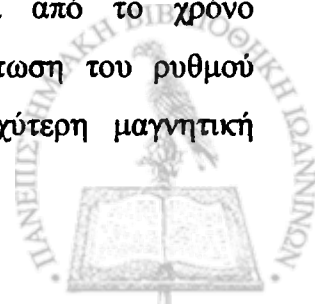
#### 4.2.7.4 Πληρότητα αντιστοίχισης χημικών μετατοπίσεων σε πυρήνες- Πρόσθετη πληροφορία

Η διαδικασία που προαναφέρθηκε ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των χημικών μετατοπίσεων της συντριπτικής πλειοψηφίας των πυρήνων  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  και  $^{15}\text{N}$  του EED-c2. Οι ελλείψεις στον πλήρη κατάλογο συντονισμών του βιομορίου που προέκυψαν από την προαναφερθείσα διαδικασία ανάλυσης καλύφθηκαν στην περίπτωση του EED-c2 χρησιμοποιώντας πληροφορία από “παραγκωνισμένα” στα αρχικά στάδια της επεξεργασίας φάσματα, όπως το ομοπυρηνικό TOCSY, το  $^{13}\text{C}$ -TOCSY HSQC, και τελικά φάσματα NOESY. Συνολικά, εξαιρώντας τους πυρήνες της μεταλλαγμένης αμινοτελικής ουράς (aa: 1-10) και αυτούς των καρβονυλικών ανθράκων, κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός του 96.5% των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  και  $^{13}\text{C}$ , ποσοστό που απεδείχθη επαρκέστατο για την επίλυση της τριτοταγούς δομής του c2 σε ατομική λεπτομέρεια και είναι αρκετά υψηλό σε σύγκριση με αυτό που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία σε περιπτώσεις άλλων πρωτεϊνών.

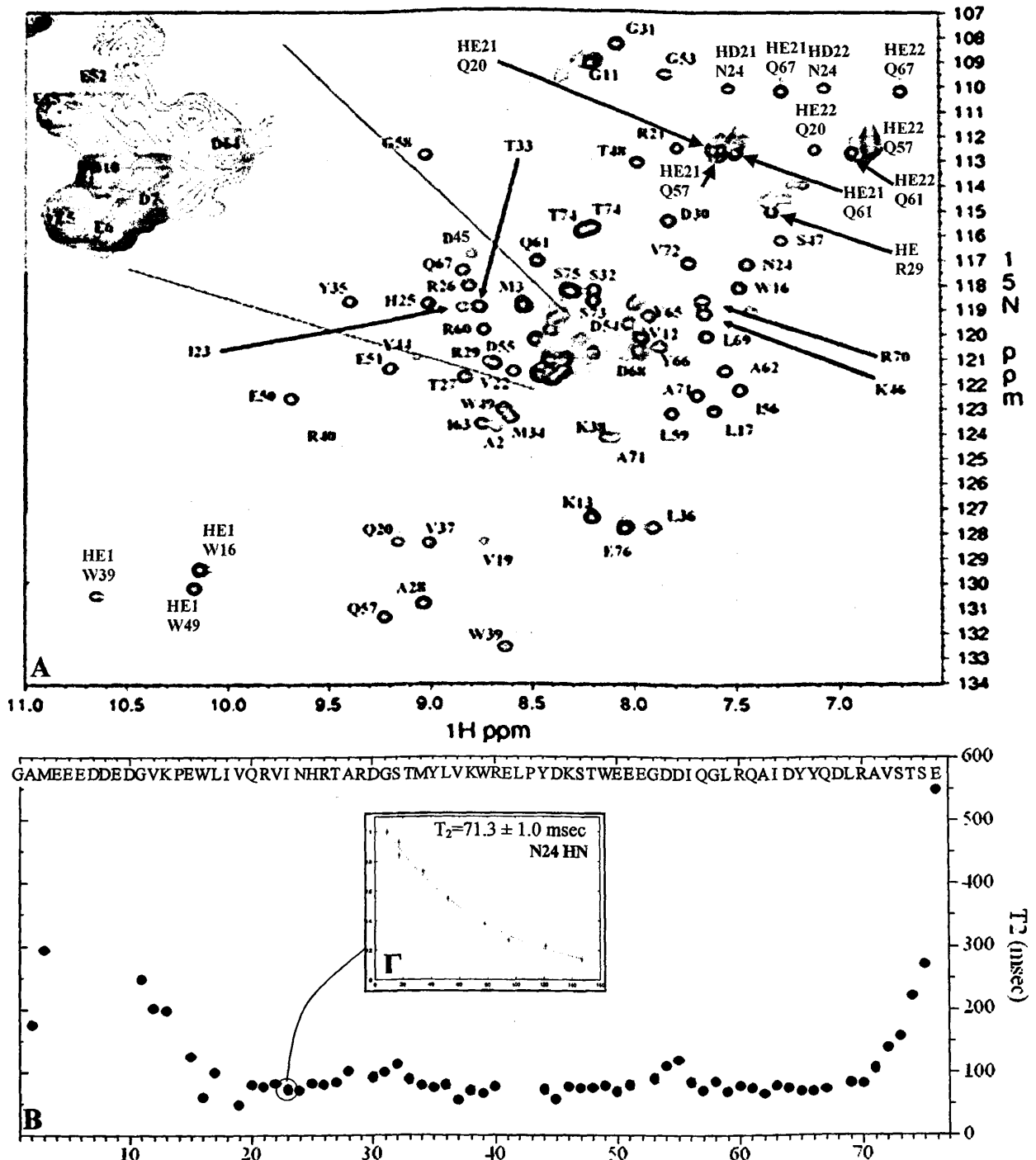
Ήδη, με την ολοκλήρωση της απόδοσης των κορυφών που οφείλονται στις αμιδικές ομάδες της κύριας αλυσίδας ενός πολυπεπτιδίου (Σχ.4.27A) και πριν προσδιορισθεί οποιοδήποτε στοιχείο τριτοταγούς δομής, είναι δυνατό να εξαχθούν τόσο δομικά όσο και δυναμικά συμπεράσματα. Μάλιστα, ο χαρακτηρισμός της δυναμικής τμημάτων της κύριας αλυσίδας ενός βιομορίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη αλληλεπιδράσεων. Η επόμενη παράγραφος, παρόλο που φαίνεται εμβόλιμη στην αναφορά της πορείας επίλυσης της τριτοταγούς δομής, αντιστοιχεί στη χρονική σειρά με την οποία συνήθως γίνεται η ανάλυση και περιγράφει τη μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς του πολυπεπτιδικού σκελετού του EED-c2 καθώς και τα συμπεράσματα και τις ενδείξεις που μπορούσαν ήδη να εξαχθούν στο στάδιο αυτό.

#### 4.2.8 Δυναμική συμπεριφορά κατά μήκος της κύριας πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Όπως προαναφέρθηκε (Κεφ. 2), ο μέσος χρόνος αποδιέγερσης  $T_2$  των σημάτων NMR ενός βιομορίου σχετίζεται με τη μοριακή κινητικότητα και εξαρτάται από το χρόνο ιδιοσυσχετισμού  $\tau_c$  (correlation time). Αύξηση του τελευταίου (ελάττωση του ρυθμού περιστροφής του μορίου) συνεπάγεται μείωση του  $T_2$ , δηλαδή ταχύτερη μαγνητική



αποδιέγερση. Με τον ίδιο τρόπο η τοπική ευελιξία επηρεάζει τους χρόνους  $T_2$  των επιμέρους πυρήνων. Καταγράφοντας λοιπόν διαδοχικά HSQC με προοδευτικά μεγαλύτερες χρονικές αναμονές μετά τη διέγερση, είναι δυνατό να υπολογισθούν οι χρόνοι  $T_2$  για κάθε αμίδιο της



Σχήμα 4.27 (Α)  $^{15}\text{N}$ -HSQC του EED-c2 συγκέντρωσης 0.5mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=8 και 150mM NaCl σε 600MHz. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι κορυφές που έχουν αποδοθεί σε αμίδια της κύριας αλυσίδας ενώ με πράσινο σε αμίδια ή αμίνες των πλευρικών. Για δύο αμίδια της ραχοκοκαλιάς του μορίου ανιχνεύεται και δευτερεύον σήμα που τους αποδίδεται με μπλε. (Β) Διάγραμμα του χρόνου αποδιέγερσης  $T_2$  σε συνάρτηση με τα αμιδικά πρωτόνια της κύριας αλυσίδας του EED-c2 συγκέντρωσης 0.5mM, σε 17°C, pH=8, 150mM NaCl, στα 500MHz. (Γ) Η καμπύλη έντασης κορυφής σε συνάρτηση με το χρόνο καταγραφής, απ' όπου εξάγεται ο χρόνος  $T_2$  για το HN της ασπαραγίνης 24 προσαρμόζοντας μαθηματικά (fitting) την εν λόγω μεταβλητή της εξίσωσης  $I = e^{-t/T_2}$  στα δεδομένα<sup>[65]</sup>.

κύριας αλυσίδας (Σχ.4.27Γ). Προκύπτει έτσι ένα διάγραμμα του  $T_2$  σε συνάρτηση με τη γραμμική αλληλουχία (Σχ.4.27Β), ενδεικτικό της τοπικής ευελιξίας της κύριας αλυσίδας. Αυτή η γραφική παράσταση καταδεικνύει τη δυναμική του βιομορίου και μπορεί να περιέχει επιπλέον πληροφορία. Στην περίπτωση του EED-c2 λοιπόν, με γνωστούς μόνο τους συντονισμούς των αμιδίων της κύριας αλυσίδας, μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

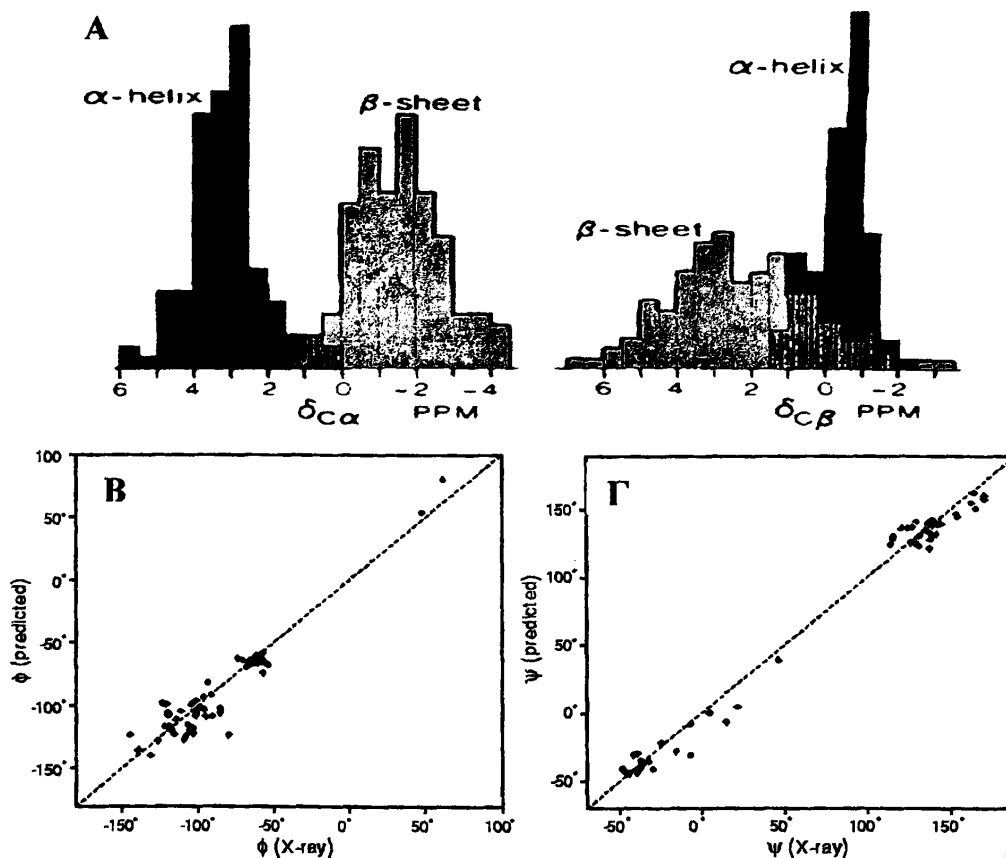
- i) Τα δύο άκρα του πολυπεπτιδίου (1-14 και 72-76) κινούνται ανεξάρτητα από το υπόλοιπο μόριο, κάτι που αναμένεται αφού στη χαρακτηριστική αναδίπλωση του domain προβλέπεται να συμμετέχουν τα αμινοξέα 19-71 βάσει αντιστοίχισης των πρωτοταγών αλληλουχιών του c2 με τα chromodomain γνωστής τριτοταγούς δομής όπως αυτό της HP1. Η αυξημένη κινητικότητα που εμφανίζουν τα άκρα είναι εξίσου αναμενόμενη αφού δεν προβλέπεται να υιοθετούν δομή διαφορετική από αυτή του τυχαίου σπειράματος.
- ii) Η θέση των θηλιών (28-32, 53-55) που συνδέουν τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής προδίδεται από την ευελιξία των αμιδίων της κύριας αλυσίδας. Ο  $T_2$  για τα αμινοξέα 41-43 απουσιάζει από το γράφημα είτε λόγω έλλειψης αμιδικού πρωτονίου (P43), είτε γιατί δεν κατέστη δυνατό να παρατηρηθούν και να ταυτοποιηθούν τα σήματα των αμιδικών πρωτονίων (E41, L42). Κάτι τέτοιο μπορεί να εξηγηθεί είτε από ελλιπή απόδοση των κορυφών αυτών είτε από τη γρήγορη ανταλλαγή αυτών των πρωτονίων με αυτά του διαλύτη. Το φαινόμενο αυτό είναι συνηθέστατο για εκτεθειμένα αμιδικά πρωτόνια σε θηλιές. Συνοπτικά λοιπόν, οι θέσεις και των τριών προβλεπόμενων θηλιών είναι σε συμφωνία με τις αναμενόμενες από τη στοίχιση γραμμικών αλληλουχιών.
- iii) Ταυτόχρονα, σκιαγραφείται στο διάγραμμα και η θέση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής (19-27, 34-39, 44-51, 56-70). Τα ακριβή όρια των δομημένων και μη τμημάτων μπορούν να προκύψουν μόνο με επίλυση της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια, εν τούτοις τα αναφερόμενα συμπίπτουν με την θεωρητικά προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή.
- iv) Παρατηρείται ότι ο χρόνος  $T_2$  για το σύνολο των αμινοξέων που δείχνουν να αποτελούν τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής είναι παρόμοιος (περίπου 70msec). Το στοιχείο αυτό είναι ισχυρά ενδεικτικό της ύπαρξης τριτοταγών αλληλεπιδράσεων που ενώνουν τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής ώστε να κινούνται ως ένα σώμα.



ν) Τέλος, αν και οι χρόνοι αποδιέγερσης  $T_2$  και ιδιοσυσχετισμού  $\tau_c$  δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υπολογισθεί το μοριακό βάρος ενός βιομορίου, ο μέσος χρόνος  $T_2$  του domain που εμπεριέχεται στο πολυπεπτιδίο EED-c2 είναι μικρότερος από τον αναμενόμενο για μια σφαιρική πρωτεΐνη 9kDa, ενώ θα αντιστοιχούσε περισσότερο σε διμερές.

#### 4.2.9 Περιορισμοί διέδρων γωνιών- TALOS

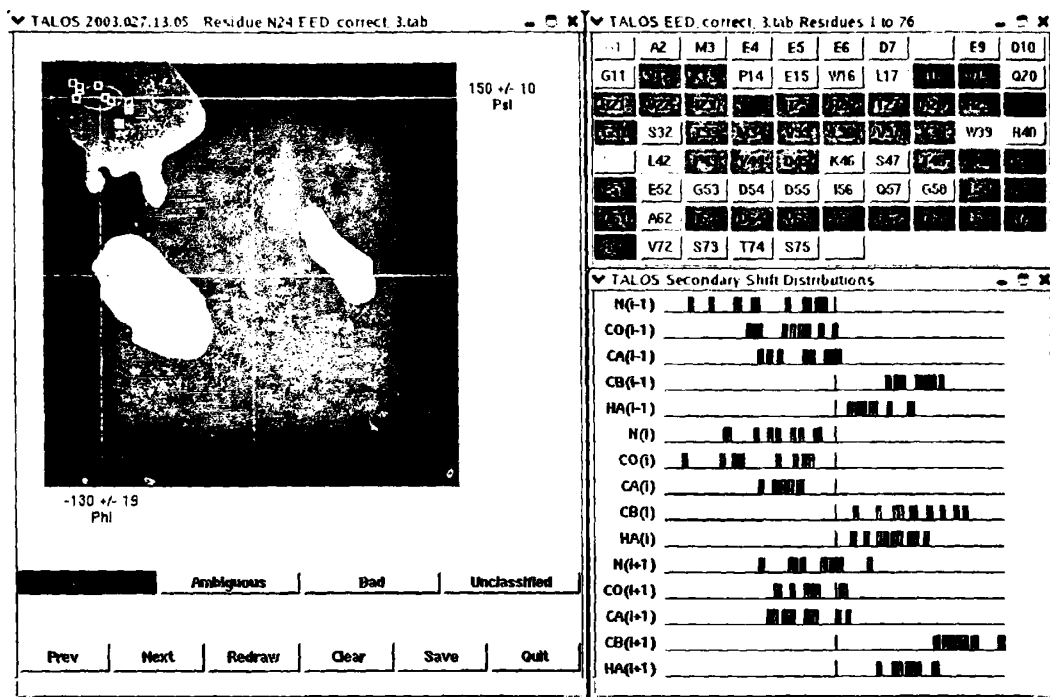
Έχοντας προσδιορίσει τη μεγάλη πλειοψηφία των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  του EED-c2, είναι πλέον εφικτή η απόδοση των κορυφών των τρισδιάστατων φασμάτων NOESY στα αντίστοιχα ζεύγη πυρήνων. Αυτή η πληροφορία, σε συνδυασμό με την ολοκλήρωση<sup>[66]</sup> των σημάτων σε δύο διαστάσεις στο επίπεδο της μέγιστης έντασής τους, αποτελεί τη βάση της σύνταξης λίστας περιορισμών ως προς τη μέγιστη απόσταση που είναι δυνατό να χωρίζει καθένα από τα ζεύγη των συζευγμένων πυρήνων. Εκτός από τις συνθήκες αποστάσεων –απαραίτητες για τον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής– στους



Σχήμα 4.28 (Α) Εξάρτηση των χημικών μετατοπίσεων των  $C_\alpha$  και  $C_\beta$  από τη δευτεροταγή δομή. (Β), (Γ) Διαγράμματα των προβλέψεων που έγιναν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TALOS με βάση χημικές μετατοπίσεις σε σχέση με τις μετρούμενες τιμές των  $\hat{\phi}$  και  $\hat{\psi}$  αντίστοιχα της κρυσταλλικής δομής της ομπικουτίνης.



περιορισμούς συχνά συμπεριλαμβάνονται και αυτές γωνιών. Αν και η εισαγωγή στη διαδικασία επίλυσης της τριτοταγούς δομής δεδομένων για τις  $\phi$  και  $\psi$  δεν είναι απαραίτητη, εν τούτοις επιταχύνει τη διαδικασία και τελικά βελτώνει την ποιότητα της δομής, γεγονός αναμενόμενο δεδομένου ότι οι δύο διέδρες γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  είναι οι μόνες παράμετροι που καθορίζουν τη δευτεροταγή δομή.



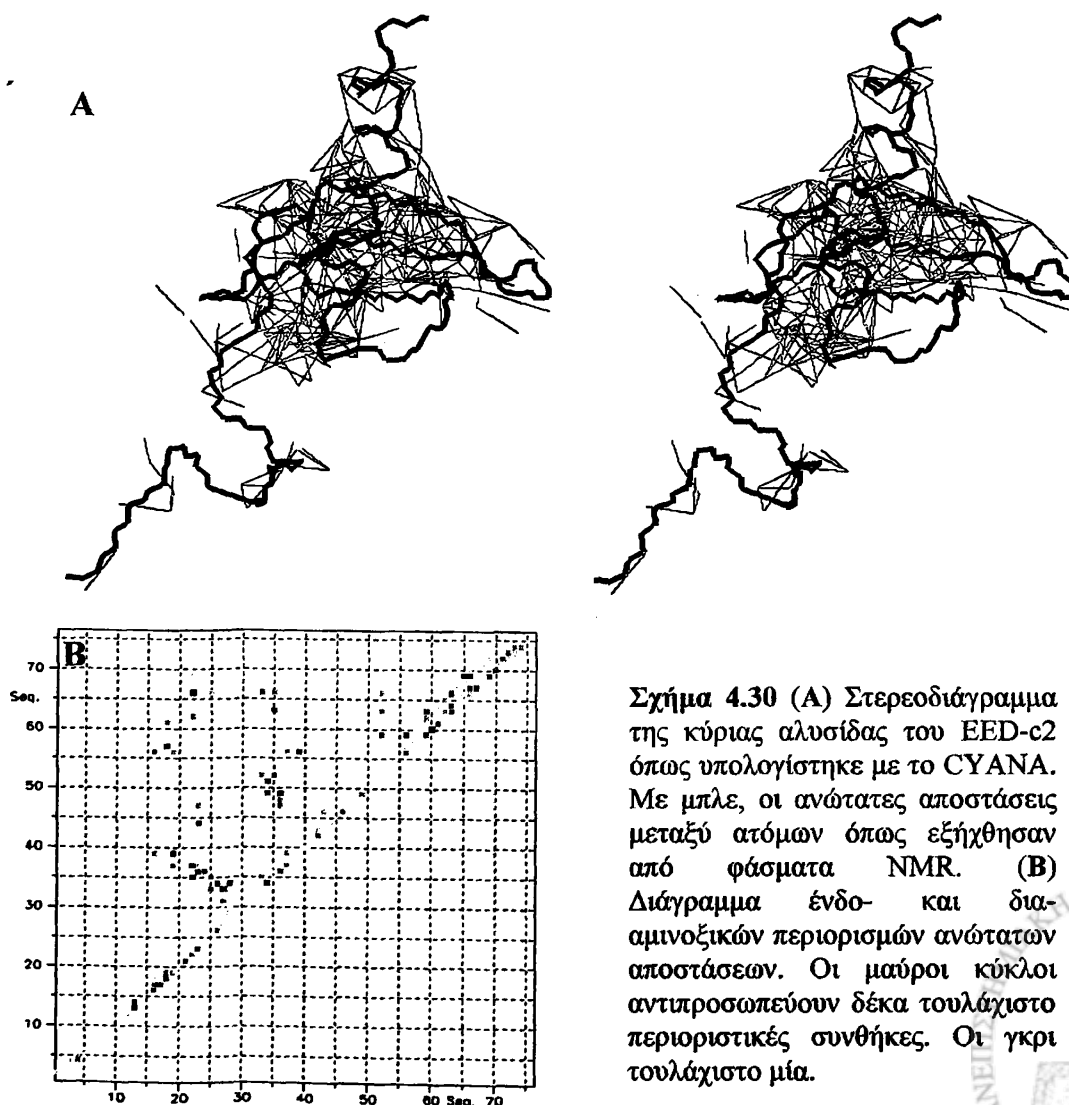
Σχήμα 4.29 Οι προβλέψεις του TALOS για το EED-c2. Σε πράσινο φόντο τα αμινοξέα για τα οποία οι προβλέψεις για τις  $\hat{\phi}$  και  $\hat{\psi}$  εκτιμήθηκαν ως αξιόπιστες. Σε γκρι αυτά για τα οποία δεν έγινε πρόβλεψη, σε κίτρινο αυτά για τα οποία οι προβλέψεις του προγράμματος κρίθηκαν αναξιόπιστες. Στο διάγραμμα Ramachandran οι συντεταγμένες των διεδρων γωνιών για το κεντρικό κατάλοιπο των τριάδων που αντιστοιχήθηκαν με την  $I_{23}N_{24}H_{25}$  του EED-c2.

Η εξαγωγή εκτιμήσεων των τιμών μέρους των διεδρων γωνιών του EED-c2 από τις χημικές μετατοπίσεις πυρήνων της κύριας αλυσίδας του μορίου έγινε με τρόπο ημιεμπειρικό. Η απόκλιση της χημικής μετατόπισης ενός πυρήνα της κύριας αλυσίδας μιας πρωτεΐνης από την τιμή που αυτή θα είχε αν το αντίστοιχο άτομο ανήκε σε περιοχή τυχαίου σπειράματος συσχετίζεται με τη δευτεροταγή δομή (και άρα τις  $\hat{\phi}$  και  $\hat{\psi}$ ) στην οποία ανήκει (Σχ.4.28Α). Παρόμοιες παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν και για πυρήνες ανήκοντες σε πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων ( $C_{\beta}$ ), με το συσχετισμό να φθίνει όσο περισσότερο απέχουν από το  $C_{\alpha}$ . Το πρόγραμμα TALOS<sup>[67]</sup> (*Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity*) εκμεταλλεύεται αυτή την παρατήρηση για να κάνει προβλέψεις σχετικά με τις τιμές των  $\hat{\phi}$  και  $\hat{\psi}$ . Τα αμινοξέα ομαδοποιούνται σε αλληλεπικαλυπτόμενες τριάδες που



συγκρίνονται με αντίστοιχες τριάδες μιας βάσης δεδομένων 78 επιλυμένων με κρυσταλλογραφία δομών. Γνώμονα αποτελεί τόσο η ομολογία της αλληλουχίας όσο και η χημική μετατόπιση των πυρήνων N, H<sub>α</sub>, CO, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub> των αμινοξέων της τριάδας. Επιλέγονται οι 10 πιο συμβατές τριάδες και οι διεδρες γωνίες του κεντρικού αμινοξέος όπως μετρούνται από την αντίστοιχη κρυσταλλική δομή καταγράφονται σε διάγραμμα Ramachandran. Ανάλογα με το βαθμό συμφωνίας των 10 αυτών σημείων για κάθε αμινοξύ, κρίνεται και η αξιοπιστία της πρόβλεψης (Σχ.4.29). Δεδομένου ότι αποφεύγεται η κατάχρηση, το ποσοστό ορθών προβλέψεων του TALOS είναι 97%. Τυχόν εσφαλμένη πρόβλεψη μπορεί να εντοπισθεί κατά τον υπολογισμό της δομής αφού θα έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα από NOE. Η πρακτική εμπειρία έχει καθιερώσει το πρόγραμμα ως πολύ χρήσιμο και γενικά αξιόπιστο (Σχ.4.28B,Γ).

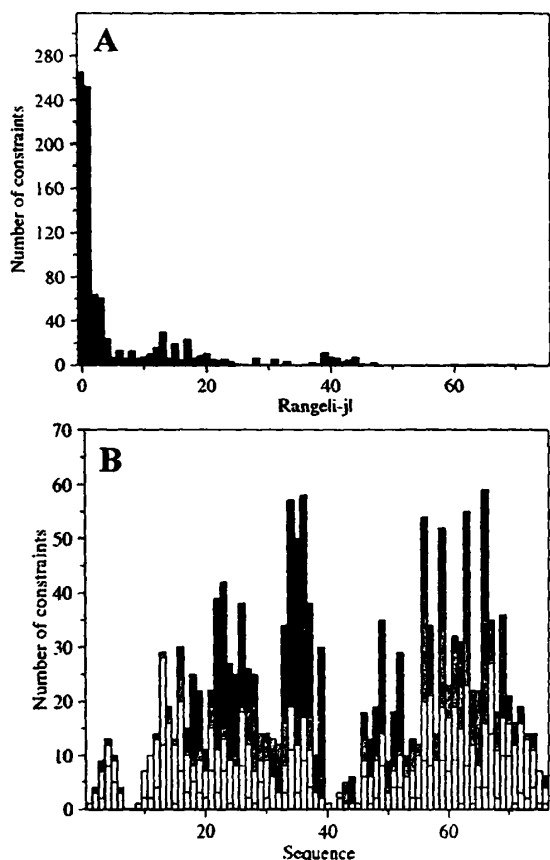
#### 4.2.10 Μετάβαση από περιοριστικές συνθήκες στην τριτοταγή δομή



Σχήμα 4.30 (Α) Στερεοδιάγραμμα της κύριας αλυσίδας του EED-c2 όπως υπολογίστηκε με το CYANA. Με μπλε, οι ανώτατες αποστάσεις μεταξύ ατόμων όπως εξήχθησαν από φάσματα NMR. (Β) Διάγραμμα ένδο- και δια-αμινοξικών περιορισμών ανώτατων αποστάσεων. Οι μαύροι κύκλοι αντιπροσωπεύουν δέκα τουλάχιστο περιοριστικές συνθήκες. Οι γκρι τουλάχιστο μία.



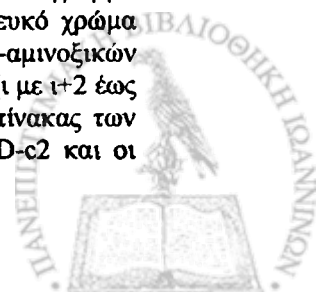
Ο προσδιορισμός της δομής ενός βιομορίου από τη λίστα περιορισμών που εξήχθησαν από φάσματα NMR γίνεται με τρόπο υπολογιστικό. Πρακτικά, οι διαδικασίες της απόδοσης των κορυφών NOE και του υπολογισμού της τρισδιάστατης δομής λαμβάνουν χώρα σε κάποιο βαθμό παράλληλα. Σε πολλές περιπτώσεις, οι χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων που ταιριάζουν με μία από τις συντεταγμένες ενός σήματος NOE είναι περισσότερες από μία. Εκτελώντας υπολογισμούς δομών, συμπεριλαμβάνοντας περιορισμούς προκύπτοντες από πιθανά ενδεχόμενα αποδόσεων σημάτων, τα χρησιμοποιούμενα υπολογιστικά προγράμματα<sup>[55-58]</sup> υποδεικνύουν τα ενδεχόμενα εκείνα που είναι συμβατά με το κύριο σώμα των περιορισμών που καθορίζει την υπολογιζόμενη δομή. Τα προγράμματα αυτά εκτελούν διαδοχικούς κύκλους υπολογισμών μειώνοντας σταδιακά την ανεκτικότητα των αποκλίσεων των υπολογιζόμενων δια-ατομικών αποστάσεων από αυτές στη λίστα περιορισμών. Μετά το



| Σήματα NOE                      |             |
|---------------------------------|-------------|
| <sup>15</sup> N-HSQC            | 836         |
| Αλειφατικό <sup>13</sup> C-HSQC | 1371        |
| Αρωματικό <sup>13</sup> C-HSQC  | 84          |
| <b>Σύνολο</b>                   | <b>2291</b> |
| Περιορισμοί ανώτατων αποστάσεων |             |
| Ενδοαμινοξικές                  | 265         |
| Διαδοχικές (i+1)                | 252         |
| Μέσες (i+2-i+4)                 | 149         |
| Μακρινές (>i+4)                 | 260         |
| <b>Σύνολο</b>                   | <b>926</b>  |
| Περιορισμοί διεδρων γωνιών      |             |
| $\hat{\phi}$                    | 39          |
| $\hat{\psi}$                    | 39          |
| <b>Σύνολο</b>                   | <b>78</b>   |

| Παραβιάσεις NOE                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| >0.40Å                            | 0           |
| 0.31-0.40Å                        | 13          |
| 0.21-0.30Å                        | 31          |
| 0.11-0.20Å                        | 13          |
| <b>Σύνολο</b>                     | <b>57</b>   |
| <b>Μέσος όρος παραβιάσεων (Å)</b> | <b>0.25</b> |

**Σχήμα 4.31** Δομικά χαρακτηριστικά σχετικά με τα σήματα NOE και τους περιορισμούς που χρησιμοποιήθηκαν για την επίλυση της τριτοταγούς δομής του chromodomain c2 καθώς και τις παραβιάσεις αυτών. (Α) Διάγραμμα περιορισμών μέγιστων αποστάσεων μεταξύ δύο πυρήνων σε σχέση με την απόστασή τους στη γραμμική αλληλουχία. (Β) Διάγραμμα περιορισμών μέγιστων αποστάσεων για τους πυρήνες κάθε αμινοξέος. Με λευκό χρώμα εμφανίζονται οι κολώνες που αντιπροσωπεύουν στο σύνολο των ενδο-αμινοξικών περιορισμών, με γκρι των διαδοχικών, με σκούρο γκρι των μέσων αποστάσεων (i με i+2 έως i+4), με μαύρο των μακρινών αποστάσεων (i με >i+4). (Γ) Συγκεντρωτικός πίνακας των πειραματικών περιορισμών βάσει των οποίων υπολογίστηκε η δομή του EED-c2 και οι παραβιάσεις αυτών.

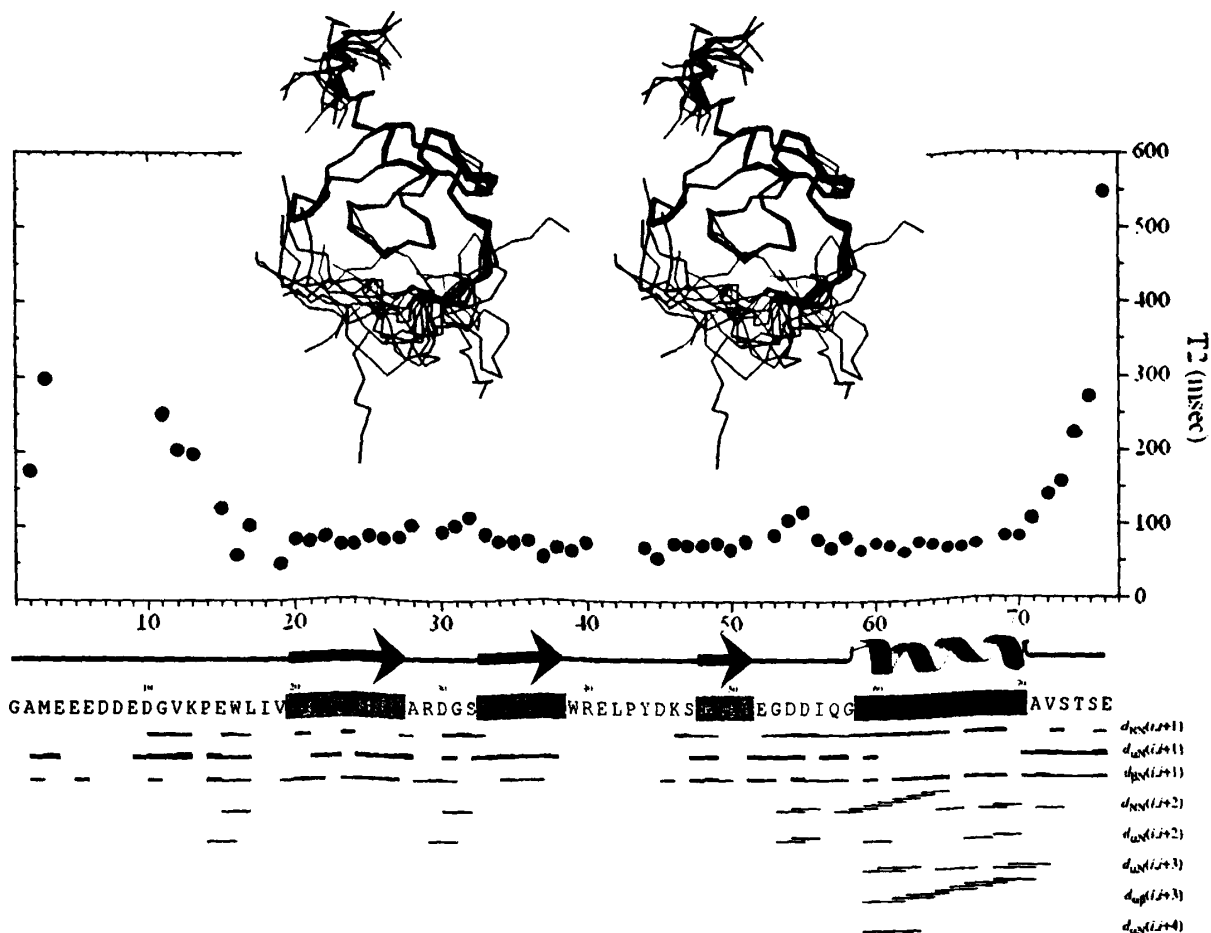


πέρας της δέσμης υπολογισμών εκτός από τις υποδείξεις αποδόσεων καταγράφονται σε αρχεία πιθανά εσφαλμένες αποδόσεις με τη μορφή παραβιάσεων περιορισμών. Η μέθοδος πρακτικά συγκλίνει σε δομές που δεν παραβιάζουν περιορισμούς χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση, με την προϋπόθεση της ύπαρξης μοναδικών υποψηφίων πυρήνων στους οποίους να αποδοθεί κρίσιμος αριθμός κορυφών στον αρχικό κύκλο υπολογισμών.

Στην περίπτωση του EED-c2 οι μικροδιακυμάνσεις των χημικών μετατοπίσεων πυρήνων εξ αιτίας της καταγραφής φασμάτων διαφορετικών δειγμάτων σε διαφορετικά όργανα και το αυξημένο σε σχέση με το αναμενόμενο ποσοστό αλληλεπικαλύψεων κορυφών λόγω του εκτιμώμενου ολιγομερισμού, περιόρισαν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της αυτοματοποιημένης διαδικασίας. Έτσι, η διαδικασία της παράλληλης απόδοσης σημάτων NOE έγινε μη αυτοματοποιημένα με το αντίστοιχο κόστος σε κόπο και χρόνο.

#### 4.2.10.1 Υπολογισμός τριτοταγούς δομής

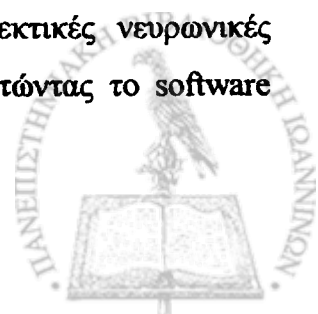
Ο υπολογισμός των πιθανών δομών βασίστηκε στη μέθοδο της *προσομοιωμένης αναδιάταξης (simulated annealing)* στο κενό. Σύμφωνα με αυτή, με μόνο δεδομένο τις γεωμετρικές σχέσεις των ατόμων που προκύπτουν από την αμινοξική αλληλουχία, γεννάται μια δομή τυχαίου σπειράματος, θεωρητικά αυτή που θα μπορούσε να υιοθετεί το μόριο ευρισκόμενο σε πολύ υψηλή ενεργειακή στάθμη. Ως μέτρο της ενέργειας του μορίου χρησιμοποιείται η θερμοκρασία στην οποία θεωρητικά βρίσκεται. Με αυτή την εκτεταμένης διαμόρφωσης δομή ως αρχική, η θεωρητική θερμοκρασία σταδιακά μειώνεται ανάγοντας έτσι ως ολόένα και περισσότερο καθοριστικό παράγοντα για την διαμόρφωση τοπικών γεωμετριών τις σχέσεις αποστάσεων και γωνιών όπως προσδιορίστηκαν από τα δεδομένα NMR. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με διαφορετικές τυχαίες δομές υψηλής ενέργειας οι οποίες αναδιατάσσονται σε τριτοταγείς δομές που ικανοποιούν τις περιοριστικές πειραματικές συνθήκες (Σχ.4.30). Ένα μέρος (συνήθως το  $1/5$  με  $1/10$ ) αυτών επιλέγεται με γνώμονα την ελαχιστοποίηση μιας συνάρτησης λάθους, τη μαθηματική δηλαδή έκφραση της απόκλισης των γεωμετρικών χαρακτηριστικών της υπολογισμένης δομής από αυτά των πειραματικών περιορισμών. Κατά την παράλληλη απόδοση κορυφών NOE, επαναλαμβάνονται τέτοιοι κύκλοι υπολογισμών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται περιορισμοί “υπό δοκιμή”. Οι τιμές των συναρτήσεων λάθους υποδεικνύουν αν αυτοί οι περιορισμοί (και άρα οι αποδόσεις κορυφών από τις οποίες προέκυψαν) αντιτίθενται στα



Σχήμα 4.32 Παράλληλη παράθεση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής επί της γραμμικής αλληλουχίας, και στερεοδιαγράμματος της ραχοκοκαλιάς των 20 τριτοταγών δομών χαμηλότερης ενέργειας του EED-c2. Με μπλε παριστώνται τα β- πτυχωτά φύλλα, με κόκκινο η α- άλικά. Η ευελιξία της κύριας αλυσίδας όπως ανιχνεύεται από τη δυναμική του μορίου ( $T_2$ ) αντικατοπτρίζεται και στην τριτοταγή στερεοδιάταξη, ενώ σε συμφωνία βρίσκονται και οι περιορισμοί αποστάσεων από NOE όπως φαίνεται στο διάγραμμα μερικών χαρακτηριστικών για τη δευτεροταγή δομή αποστάσεων.

δεδομένα από τις αξιόπιστες (μη αμφισβητούμενες) αποδόσεις κορυφών. Με την ολοκλήρωση του προκαθορισμένου αριθμού κύκλων, αναφέρονται εκτός από τη δέσμη υπολογιζόμενων δομών, οι πειραματικές συνθήκες που πληρούνται, αυτές που παραβιάζονται, και προτεινόμενες από το software αποδόσεις σημάτων NOE συμβατές με το σύνολο των λοιπών περιορισμών (Σχ.4.31).

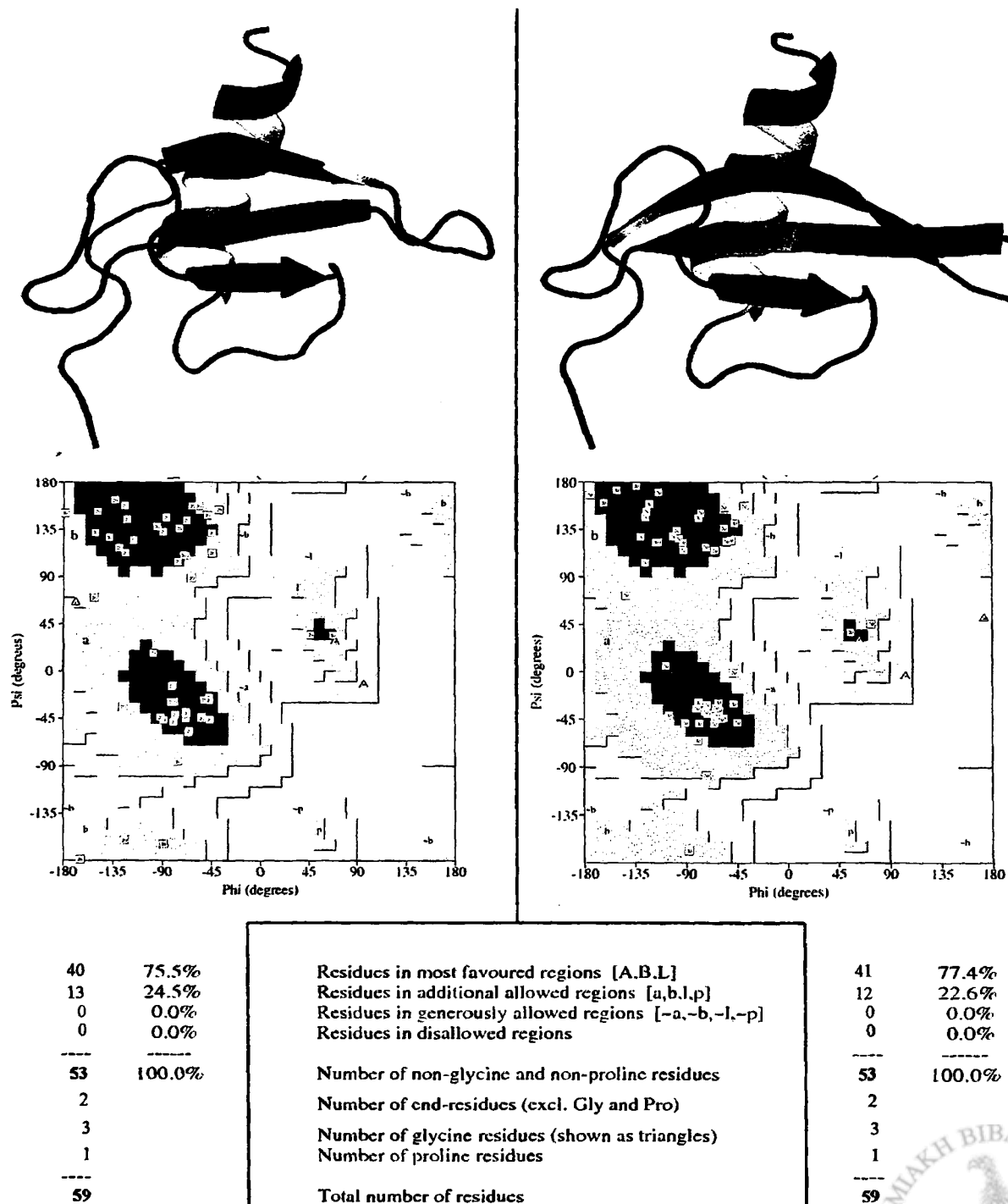
Για τον υπολογισμό της τρισδιάστατης δομής του EED-c2 σε ατομική λεπτομέρεια επελέγη το υπολογιστικό πακέτο CYANA<sup>[55,56]</sup>. Αν και δεν ήταν το μόνο που δοκιμάστηκε<sup>[57,68-70]</sup>, αποδείχθηκε το πιο εύχρηστο αφού το “νοικοκυρεμένο” και ευνόητο interface του δεν προϋπέθετε μακρόχρονη εξοικείωση με το πρόγραμμα, υψηλή εξειδίκευση σε υπολογισμούς μοριακής δυναμικής, ή ιώβειο υπομονή και ανθεκτικές νευρωνικές συνάψεις. Το ίδιο νοικοκυρεμένος κρίνεται και ο κώδικας του, καθιστώντας το software



απόλυτα σταθερό, και συμβάλλοντας ενδεχομένως στην αύξηση της ταχύτητας διεκπεραίωσης των υπολογισμών.

#### 4.2.10.2 Μοριακή δυναμική- Εξευγενισμός σε νερό

Όπως αναφέρθηκε, το μέσο στο οποίο εκτελείται η προσομοιωμένη αναδιάταξη (simulated annealing) είναι το κενό. Αν και τα δεδομένα από τη φασματοσκοπία NMR έχουν ληφθεί σε

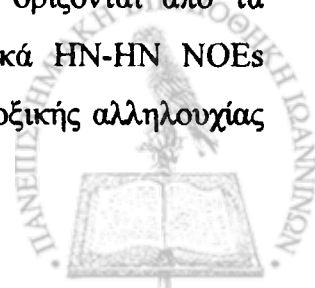


Σχήμα 4.33 Σύγκριση των μέσων δομών του EED-c2 (αμινοξέα 15-73) πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη διαδικασία εξευγενισμού σε νερό (*refinement in explicit water*), καθώς και των αντίστοιχων διαγραμμάτων Ramachandran.

διάλυμα, η επίδραση του πεδίου δυνάμεων (force field) ηλεκτροστατικής φύσης λόγω της παρουσίας ιόντων και δίπολων ιόντων-νερού στη δομή δεν λαμβάνεται υπ' όψη παρά μόνο έμμεσα. Η ενσωμάτωση συναρτήσεων που θα περιέγραφαν πιο πιστά αυτή την πραγματικότητα στο πρωτόκολλο υπολογισμού δομών πρωτεϊνών, καθιστά τη διαδικασία υπολογιστικά απαιτητική και πρακτικά χρονοβόρα ή και ανέφικτη. Άντ' αυτής ακολουθείται μια διαδικασία γνωστή ως εξευγενισμός σε νερό (*water refinement*), κατά την οποία υπολογίζεται η επίδραση τέτοιων πεδίων δυνάμεων στη δομή που υπολογίστηκε σε κενό. Δύο ιδέες –και αντίστοιχες μέθοδοι– έχουν διατυπωθεί και χρησιμοποιούνται προκειμένου να ληφθεί υπ' όψη η παρουσία του νερού στον υπολογισμό δομών βιομορίων<sup>[76]</sup>. Σύμφωνα με την πρώτη, το βιομόριο βυθίζεται σε δοχείο (box) γεμάτο με μόρια του διαλύτη έτσι ώστε το εγγύτερο του σημείο από τις επιφάνειες του δοχείου να απέχει τουλάχιστο 10Å. Για τη δεύτερη, αρκούν τόσα μόρια διαλύτη ώστε να σχηματιστεί ένας φλοιός που να καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια του βιομορίου. Περισσότερο πολύπλοκη και χρονοβόρα είναι η πρώτη μέθοδος, θεωρείται όμως ακριβέστερη και γι' αυτό ονομάζεται *refinement in explicit water* σε αντίθεση με τη δεύτερη, για την οποία χρησιμοποιείται ο χαρακτηρισμός *refinement in implicit water*. Ο εξευγενισμός σε νερό τείνει να καθιερωθεί σήμερα ως αναπόσπαστο κομμάτι του προσδιορισμού δομών και οδηγεί σε βελτίωση των φυσικοχημικών και στερεοχημικών κριτηρίων ποιότητας των υπολογιζόμενων δομών. Ο εξευγενισμός των τελικών δομών του EED-c2 έγινε σε “σαφές” (explicit) νερό<sup>[68,77]</sup>.

#### 4.2.11 Τριτοταγής δομή του EED-c2 σε ατομική λεπτομέρεια

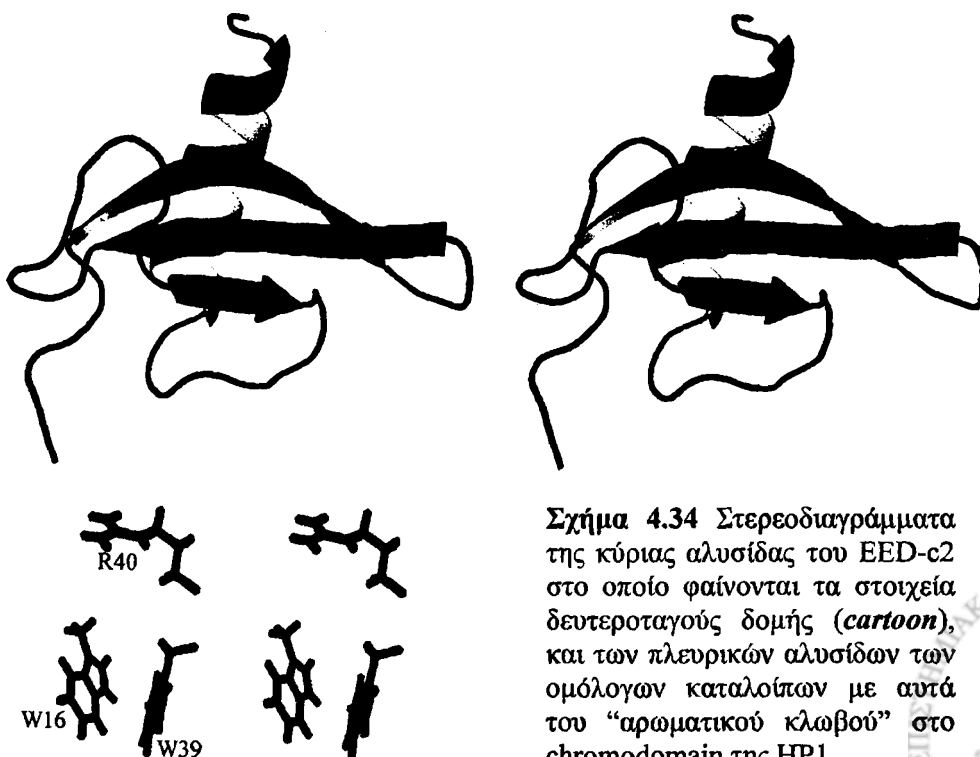
Ο υπολογισμός της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια έδειξε ότι το EED-c2 είναι μια συμπαγής, καλά αναδιπλωμένη πρωτεΐνη (Σχ.4.32,4.33). Τρεις αντιπαράλληλοι κλώνοι σχηματίζουν β- πτυχωτή επιφάνεια, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλευρικών ομάδων καταλοίπων της και αντίστοιχων ομάδων μιας καρβοξυτελικής α- έλικας “κλειδώνουν” τους κύριους άξονες των φύλλων και της έλικας σε σχεδόν κάθετη μεταξύ τους διάταξη στο επίπεδο που ορίζει το β- πτυχωτό φύλλο. Το ένα άκρο της β- πτυχωτής επιφάνειας αποκλίνει από την επιπεδότητα “αγκαλιάζοντας” την α- έλικα, και σε αυτό συμβάλουν οι δύο β- διογκώσεις (*β- bulges*) που παρατηρούνται στον πρώτο κλώνο και ορίζονται από τα αμινοξέα Q<sub>20</sub>-R<sub>21</sub> και I<sub>23</sub>-N<sub>24</sub> όπως προδίδεται από τα χαρακτηριστικά HN-HN NOEs (Σχ.4.32). Οι θέσεις των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής επί της αμινοξικής αλληλουχίας



δεν διαφέρουν από τις προβλεπόμενες από στοίχιση πρωτοταγών αλληλουχιών με τα chromodomain γνωστής τριτοταγούς δομής<sup>[15,20-22]</sup>, ενώ η σχετική τους διάταξη στο χώρο σχηματίζει τη χαρακτηριστική α+β αναδίπλωση των chromodomain (*α+β chromodomain fold*<sup>[15]</sup>).

#### 4.2.11.1 “Αρωματικός κλωβός”

Η αλληλεπίδραση των chromodomain με τα μεθυλιωμένα ιστονικά πεπτιδία<sup>[20-22]</sup>, ανήγαγε ως σήμα κατατεθέν των chromodomain τον “αρωματικό κλωβό”. Πρόκειται για τη διάταξη που σχηματίζουν οι πλευρικές αλυσίδες τριών αρωματικών καταλοίπων εντός της οποίας αναφέρεται ο εγκλεισμός της τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς μέθυλ-αμινομάδας των πλευρικών αλυσίδων καταλοίπων λυσίνης<sup>[20,22]</sup>. Σε αυτή την υδρόφοβη αλληλεπίδραση αποδίδεται η αυξημένη συγγένεια των chromodomain προς τις ουρές ιστονών οι οποίες φέρουν μετα-μεταφραστικά μεθυλιωμένες πλευρικές αλυσίδες λυσινών<sup>[20]</sup>. Ήδη από τη στοίχιση πρωτοταγών αλληλουχιών διαπιστώνεται η διαφοροποίηση του c2 ως προς τα αμινοξέα του κλωβού. Αν και το c2 βρήθει αρωματικών καταλοίπων, την αντίστοιχη θέση του τρίτου αμινοξέος του κλωβού (τυροσίνη στην HP1 ή τρυπτοφάνη στην Pc) καταλαμβάνει λευκίνη (Σχ.1.16). Παρόλα αυτά, δύο κατάλοιπα τρυπτοφανών του EED-c2 (W<sub>16</sub>, W<sub>39</sub>) που στοιχίζονται με τα δύο πρώτα αρωματικά αμινοξέα των κλωβών των chromodomain των HP1



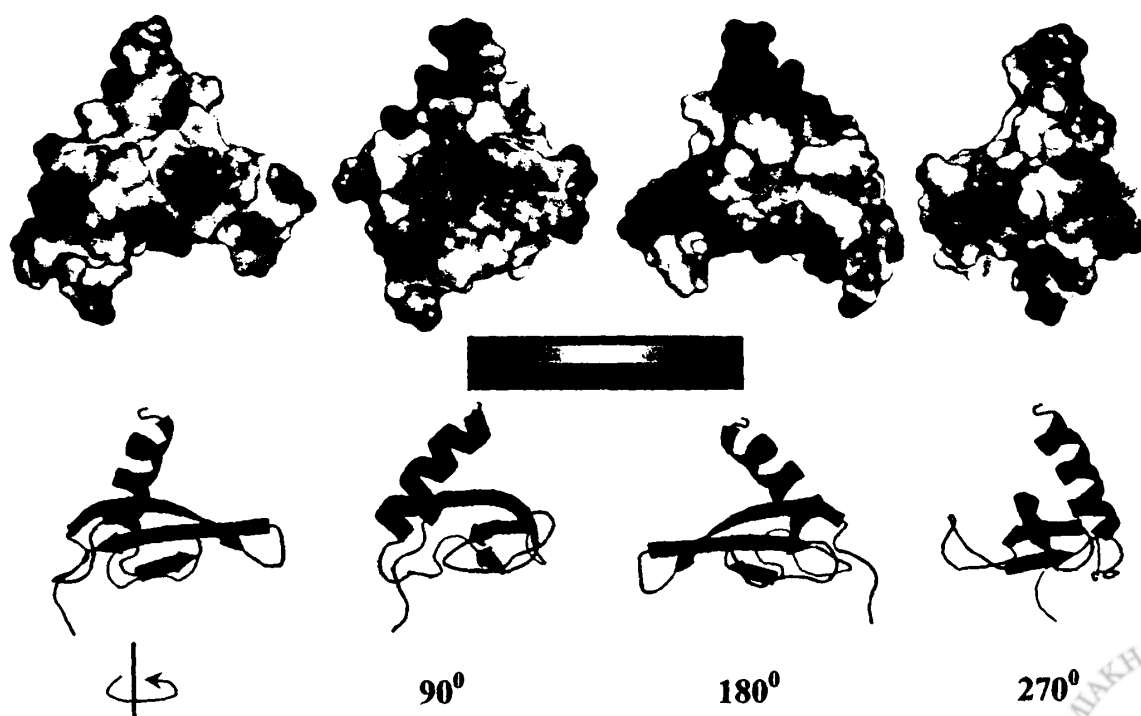
Σχήμα 4.34 Στεροδιαγράμματα της κύριας αλυσίδας του EED-c2 στο οποίο φαίνονται τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής (*cartoon*), και των πλευρικών αλυσίδων των ομόλογων καταλοίπων με αυτά του “αρωματικού κλωβού” στο chromodomain της HP1.



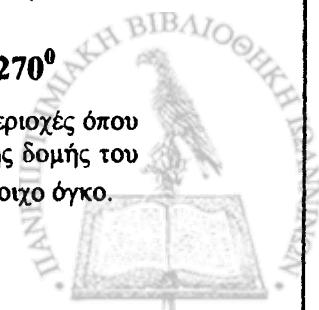
και Pc, βρίσκονται προσανατολισμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζονται οι δύο από τις τρεις πλευρές του κλωβού. Επιπροσθέτως, η πλευρική αλυσίδα της αργινίνης 40 διατάσσεται με τρόπο που θα μπορούσε πιθανά να καλύπτει μερικώς την έλλειψη του τρίτου αρωματικού αμινοξέος (Σχ.4.34).

#### 4.2.11.2 Ηλεκτροχημικό δυναμικό στην επιφάνεια του EED-c2- Διάταξη δραστικών ομάδων πλευρικών αλυσίδων

Η λειτουργική διαφοροποίηση του δεύτερου από τα δύο chromodomain της πρωτεΐνης dMi-2 σε σχέση με τους περισσότερους αντιπροσώπους αυτού του είδους domain οι οποίοι εμπλέκονται στην αναγνώριση του ιστονικού κώδικα, ήταν εξ αρχής το σημείο που το καθιστούσε ενδιαφέρον. Δομικά, η αναδίπλωση της κύριας αλυσίδας του μορίου δεν αναμενόταν να διαφέρει σημαντικά από τη χαρακτηριστική για τα chromodomain, όπως και δε συμβαίνει άλλωστε. Παρόλα αυτά η ευρεία διαφοροποίηση των μορίων με τα οποία φέρονται να αλληλεπιδρούν το c2 και τα chromodomain των HP1, Pc, δεν μπορεί παρά να συνεπάγεται και δομική διαφοροποίηση. Άλλωστε, “η λειτουργία είναι συχνά ο αντικατοπτρισμός της δομής<sup>[82]</sup>”. Τη διαφοροποίηση αυτή αποκαλύπτει η αναπαράσταση του ηλεκτροχημικού δυναμικού<sup>[83-84]</sup> στην επιφάνεια του βιομορίου (Σχ.4.35). Η ανομοιόμορφη



**Σχήμα 4.35** Το ηλεκτροστατικό δυναμικό στην επιφάνεια του EED-c2. Με κόκκινο οι περιοχές όπου εντοπίζεται ηλεκτρονιακό πλεόνασμα και με μπλε έλλειμμα. Η κύρια αλυσίδα της μέσης δομής του μορίου παρατίθεται κατακόρυφα στην ίδια μεγέθυνση και προσανατολισμό με τον αντίστοιχο όγκο.





κατανομή των φορτίων στην επιφάνεια του c2 επιτρέπει τον τοπικό εντοπισμό θετικού φορτίου, παρόλο που το θεωρητικό pI για τα εικονιζόμενα αμινοξέα 15-73 υπολογίζεται σε 4.90. Η ύπαρξη θετικών επιφανειών στην επιφάνεια του c2 συνάδει με την αναγνώριση και πρόσδεση DNA χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων ως προαπαιτούμενο. Τέτοιου τύπου μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-DNA στηρίζονται στη συμπληρωματικότητα των επιφανειακών φορτίων, σε αντίθεση με τις ειδικές για δεδομένη αλληλουχία βάσεων όπου συγκεκριμένα –συνήθως αρωματικά– κατάλοιπα της πρωτεΐνης αναγνωρίζουν συγκεκριμένες βάσεις στο εσωτερικό της ράβδου του DNA. Ο ρόλος των chromodomains εστιάζεται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης, δομή στην οποία συμμετέχει το σύνολο του ευκαρυωτικού DNA και όχι τμήματά του με δεδομένη αλληλουχία βάσεων. Οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στην επιφάνεια της ράβδου του DNA, αποτελούν ηλεκτρονιακά συμπληρωματική επιφάνεια προς αυτή μιας πλευράς του c2, αιτιολογώντας έτσι –μερικά ίσως– την αλληλεπίδραση.

Η ανομοιόμορφη κατανομή θετικού φορτίου στην επιφάνεια του chromodomain c2 οφείλεται κυρίως στην τοπική συγκέντρωση θετικά φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων, μερικώς λόγω γραμμικής αλληλουχίας και μερικώς λόγω της **τριτοταγούς αναδίπλωσης** του βιομορίου (Σχ.4.36). Κατάλληλα προσανατολισμένα, εκτεθειμένα στο διαλύτη αμύδια πεπτιδικών δεσμών, όπως αυτά των λευκινών 17 και 42, συμβάλλουν στη τοπική διαμόρφωση επιφάνειας συνεχούς θετικού προσήμου. Μη προφανή, αλλά ουσιαστικό ρόλο στον εντοπισμό του θετικού φορτίου παίζει και η κύρια αλυσίδα του πρώτου κλώνου (20-27) της β πτυχωτής επιφάνειας του c2. Αν και δεν συνεισφέρει άμεσα στο φορτίο με κάποιο εκτεθειμένο αμύδιο, η μια β-διόγκωση που σχηματίζει (Q20-R21) εξασφαλίζει ότι αμφότερες οι πλευρικές αλυσίδες των γειτονικών Q<sub>20</sub> και R<sub>21</sub> θα προσανατολίζονται προς την εξωτερική πλευρά του β- φύλλου, ενώ η άλλη (I23-N24) ότι προς αυτή την πλευρά θα διευθύνονται και οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων N<sub>24</sub> R<sub>26</sub> και R<sub>29</sub> που ακολουθούν. Εξάλλου, η κάμψη του καρβοξυτελικού τμήματος του πρώτου κλώνου ώστε να τοποθετείται σχεδόν μπροστά από την εξωτερική επιφάνεια του β- φύλλου επιτρέπει στις γουανιδινομάδες των πλευρικών αλυσίδων των R<sub>26</sub> και R<sub>29</sub> να προσεγγίσουν το μέρος του μορίου όπου εντοπίζεται το θετικό φορτίο, δηλαδή την αρχή του πρώτου κλώνου, το τέλος του δεύτερου και την ενδιάμεση θηλιά.

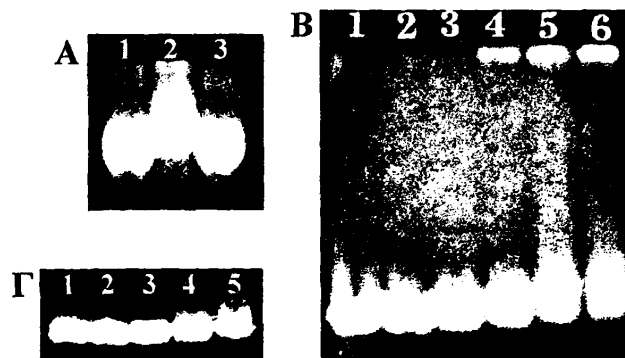




## 4.3 Αλληλεπιδράσεις c2

## 4.3.1.1 Πρόσδεση δίκλωνων μορίων DNA στο c2- Πειράματα ανίχνευσης μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (band- shift assays)

Πριν ακόμα επιλυθεί η δομή του EED-c2 σε ατομική λεπτομέρεια, διερευνήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης DNA τόσο αυτού όσο και άλλων κατασκευών του chromodomain c2. Η πρόσδεση του chromodomain σε μόρια DNA επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας τη διαφορική ηλεκτροφορητική κινητικότητα DNA και συμπλόκου πολυπεπτιδίου-DNA<sup>[23]</sup>. Έτσι, η κίνηση ενός μορίου DNA προς το θετικό πόλο κατά την ηλεκτροφόρηση επιβραδύνεται κατόπιν πρόσδεσης μορίου ή μορίων c2, με αποτέλεσμα η αντίστοιχη ζώνη να εμφανίζεται ψηλότερα (Σχ.4.37). Τα μόρια DNA που χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία σε αυτή τη δοκιμασία ήταν αρκετά μεγάλα (220bp, 6000bp) ώστε να περιέχουν περισσότερες της μίας θέσεις δέσμευσης για ένα domain που αναγνωρίζει μη-ειδικά δίκλωνο DNA. Αν συνυπολογιστεί μάλιστα και η τάση του c2 να ολιγο/πολυ-μερίζεται, εκτός αυτών που μεταναστεύουν εντός του gel εξηγείται η ύπαρξη ζωνών που εμφανίζουν μηδαμινή κινητικότητα ακόμα και σε αραιά gel (0.5%).



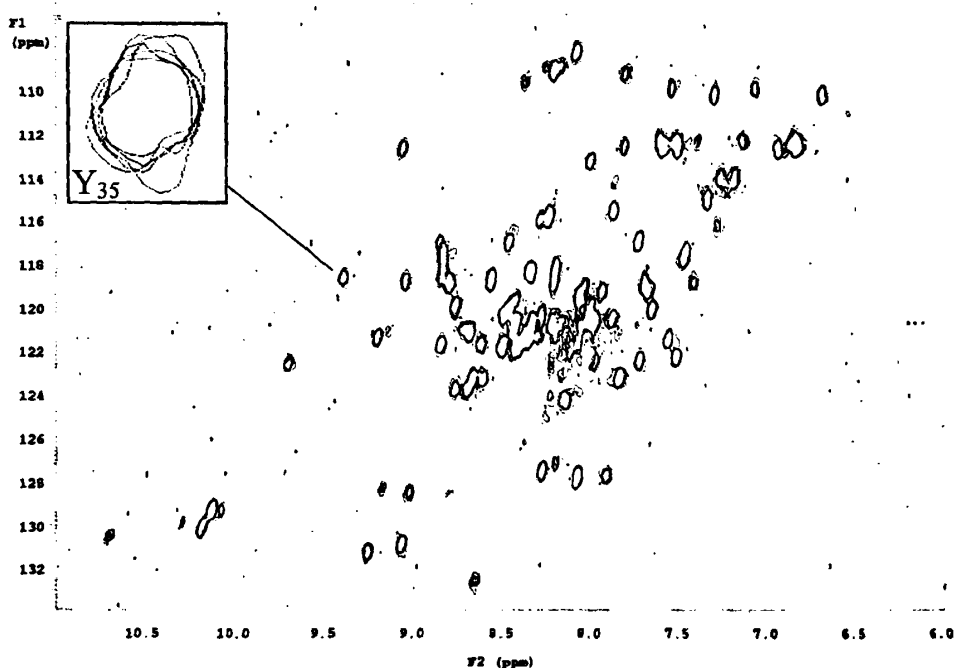
Σχήμα 4.37 Απ' ευθείας αλληλεπίδραση του c2 με DNA. (Α) Διαδρομές: 1. 0.5pmol γραμμικού δίκλωνου DNA προερχόμενου από το πλασμίδιο pETM41 (~6kbp). 2. Ίση ποσότητα από το DNA της διαδρομής 1 και 550pmol του πολυπεπτιδίου c2 κατόπιν επώασης για 5min. 3. αντί του c2, 550pmol από το domain I27 της πρωτεΐνης titin επωασμένο μαζί με το DNA χρησιμοποιούμενο ως control. (Β) Εξάρτηση της κινητικότητας του DNA 6kbp από την ποσότητα του chromodomain c2. Διαδρομές 1-6. 0.5pmol DNA επωασμένο για 5min με 0, 120, 240, 360, 480, 600pmol c2 αντίστοιχα. (Γ) Επώαση για 5min και διαδοχική ηλεκτροφόρηση τμήματος DNA 220bp μαζί με 0, 24, 96, 240, 480pmol c2 (διαδρομές 1-5). Όλες οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20mM pH=7.5, 200mM NaCl, 2mM β-ME. Χρησιμοποιήθηκαν gel αгарόζης 1.5% (Α) και 0.5% (Β, Γ).



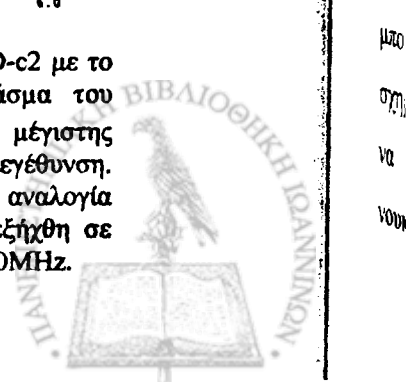
#### 4.3.1.2 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης του c2 με δίκλινα μόρια DNA περιορισμένου μήκους

Προκειμένου να δειχθεί η αλληλεπίδραση με NMR και να χαρτογραφηθεί με λεπτομέρεια η θέση δέσμευσης του DNA επί του chromodomain, ήταν αναγκαίο να περιοριστεί το μοριακό μέγεθος, δηλ. το μήκος του τμήματος DNA που θα χρησιμοποιείτο προκειμένου να υπάρχει πιθανότητα να ληφθούν αναλύσιμα φάσματα NMR. Ούτε το γραμμικό πλασμίδιο, αλλά ούτε και το παρασκευασμένο με PCR τμήμα των 220 ζευγών βάσεων τηρούσε το όριο μεγέθους, μια και το άθροισμα μοριακών μαζών θα υπερέβαινε σε κάθε περίπτωση τα 30kDa. Η μείωση του μήκους του DNA ήταν επιθυμητή και για έναν ακόμα λόγο. Δεδομένου ότι δεν αναμένεται ειδικότητα ως προς την αλληλουχία βάσεων, όσο μεγαλύτερο το τμήμα DNA τόσο περισσότερες οι πιθανές θέσεις δέσμευσης. Η πιθανή διολίσθηση (*sliding*) του c2 κατά μήκος του DNA, ακόμα και αν το μοριακό μέγεθος του συμπλόκου δεν υπερέβαινε το κρίσιμο όριο ώστε να μπορεί να μελετηθεί με NMR, ενδέχεται να καθιστούσε αδύνατη την καταγραφή σημάτων μιας μέσης κατάστασης, εξαλείφοντας τα σήματα NMR.

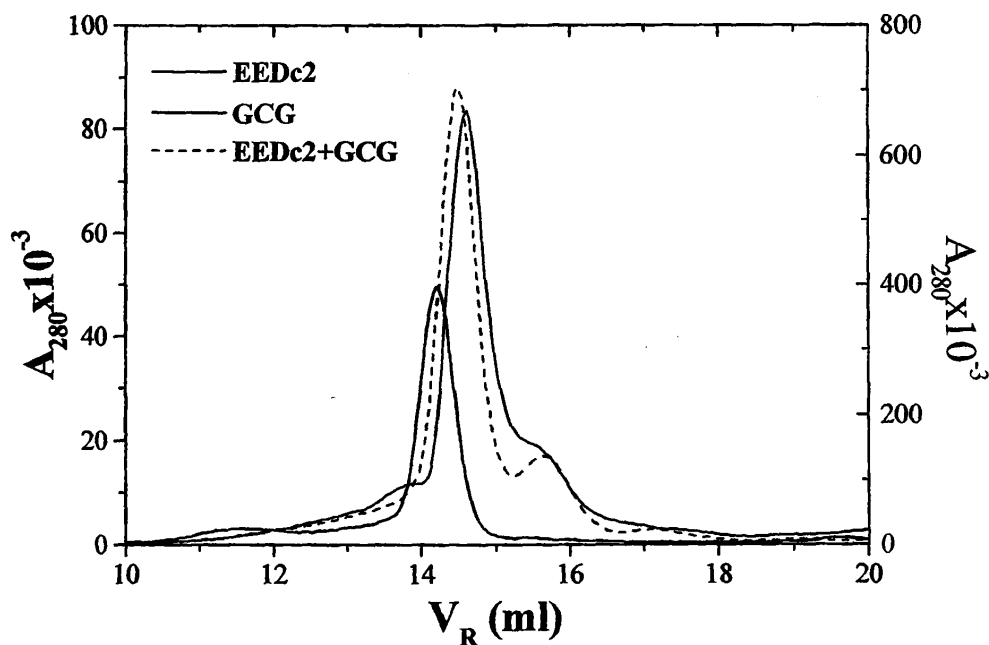
Με δεδομένη τη δομική ομολογία<sup>[15]</sup> των chromodomain (συμπεριλαμβανομένου και



Σχήμα 4.38 Αλληλεπικαλυπτόμενα <sup>15</sup>N-HSQC κατά την τιτλοδότηση του EED-c2 με το ολιγονουκλεοτίδιο GCGATCGC. Με μπλε χρώμα αναπαριστάται το φάσμα του chromodomain χωρίς προσθήκη DNA και με κόκκινο αυτό κατόπιν της μέγιστης προσθήκης. Στο ένθετο γράφημα η κορυφή του αμιδίου της τυροσίνης 35 με μεγέθυνση. Η αρχική συγκέντρωση του EED-c2 ήταν 150μM, η τελική 124μM, ενώ η αναλογία δίκλωνου DNA/chromodomain 0.2, 0.8, 1.5 και τελικά 2.6. Το πείραμα διεξήχθη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH=7, σε 17°C, και φασματόμετρο 500MHz.



του c2) με τις αρχαιοβακτηριακές πρωτεΐνες Sac7D, Sso7D που προσδέουν DNA μη ειδικά, κρίθηκε σκόπιμο να δοκιμασθούν τα μικρότερα τμήματα DNA ικανά να προσδεθούν στο Sac7D<sup>[30]</sup>. Συντέθηκαν δύο ολιγονουκλεοτίδια με παλινδρομικές αλληλουχίες (GCGATCGC, CTAGCGCGCTAG) από τα οποία κατόπιν υβριδοποίησης προέκυψαν δύο δίκλινα τμήματα DNA οκτώ και δώδεκα ζευγών βάσεων. Το <sup>15</sup>N-HSQC του EED-c2 δεν παρουσίασε καμία μεταβολή ως προς οποιοδήποτε από τα καταγεγραμμένα αμιδικά ή αμινικά σήματα ακόμα και μετά την προσθήκη περίσσειας σχεδόν 3:1 καθενός από τα δύο διαθέσιμα ολιγονουκλεοτίδια (Σχ.4.38). Η απουσία οποιασδήποτε μεταβολής των σημάτων του HSQC είναι αποδεικτική και της απουσίας σταθερής αλληλεπίδρασης, παρόλα αυτά επιστρατεύτηκε και η τεχνική της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι πολυπεπίδιο και DNA δεν συνεκλούνταν (Σχ.4.39).



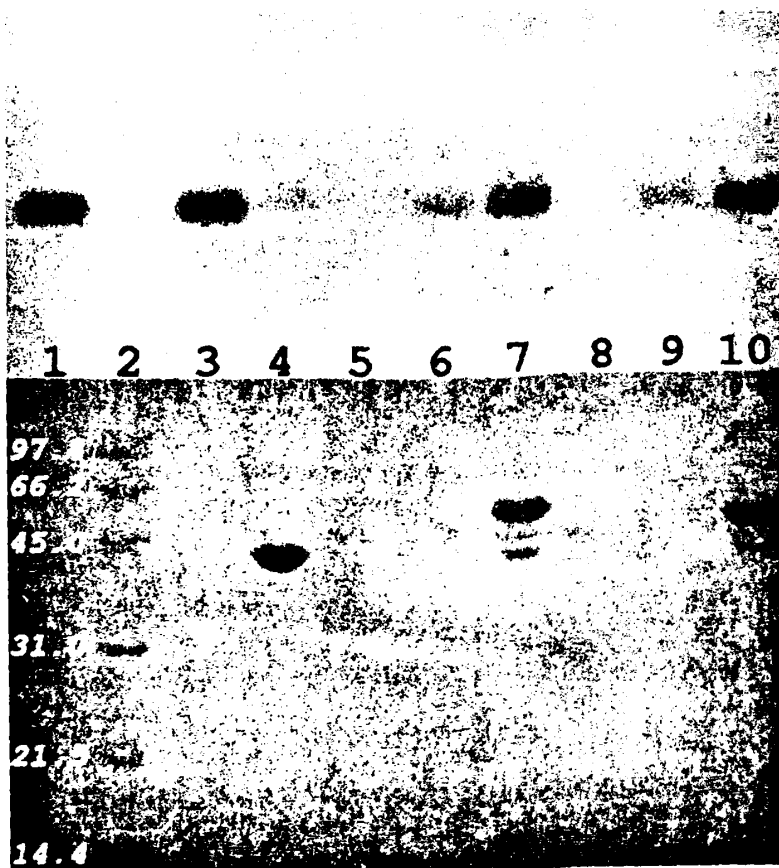
**Σχήμα 4.39** Χρωματογραφήματα του chromodomain c2 (μάυρη γραμμή), του ολιγονουκλεοτιδίου GCGATCGC (μπλε συνεχόμενη γραμμή) και του μίγματος (μπλε διακεκομμένη γραμμή) σε θερμοκρασία δωματίου. Οι άξονες αντιστοιχούν στις καμπύλες βάσει του χρώματος.

Η μη αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων με το EED-c2 θα μπορούσε να αποδοθεί στο μικρό τους μέγεθος και συνεπώς στον σχετικά ασταθή σχηματισμό της δίκλινης έλικας ειδικά στα άκρα της. Ίσως πάλι επειδή υστερούν σε μέγεθος να αδυνατούν να υιοθετήσουν δομή που πιθανά αναγνωρίζει το c2. Άλλωστε το νουκλεοσωμικό DNA δεν είναι ραβδόμορφο, αλλά τοπικά ελαφρώς κεκαμμένο ώστε να

μπορεί να περιελίσσεται γύρω από το ιστονικό οκταμερές. Μια τέτοια τοπική παραμόρφωση της διπλής έλικας του DNA ίσως να είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του DNA από το c2. Πιθανό είναι επίσης το ενδεχόμενο το chromodomain c2 να αναγνωρίζει επιπλέον του DNA συστατικά του νουκλεοσώματος με αποτέλεσμα η συγγένειά του για απομονωμένα ολιγονουκλεοτίδια να μην είναι τόσο υψηλή όσο αυτή του Sac7D. Η τελευταία άλλωστε - αντίθετα με το c2- είναι βασική πρωτεΐνη ( $pI=9.66$ ), ενώ δεσμεύεται ισχυρά στο DNA εκτελώντας "χρέη ιστονών" στα αρχαιοβακτήρια. Τέλος, αν και τεχνικής φύσης, η παράμετρος της συμπεριφοράς του πολυπεπτιδίου δεν είναι λιγότερο σημαντική. Ο εξαρτώμενος από τη συγκέντρωση ολιγομερισμός του (πιθανά διμερισμός), ενδέχεται να επηρεάζει την έκθεση της μοριακής επιφάνειας πρόσδεσης του DNA.

#### 4.3.1.3 Αλληλεπίδραση ακινητοποιημένου σε στήλη c2 με δίκλωνο DNA 31bp

Η αλληλεπίδραση c2-DNA εξετάσθηκε επίσης και με δύο πολυπεπτιδικές κατασκευές του chromodomain c2, το MBP-EED-c2 και το MBP-KNG-c2, ενώ βρισκόνταν ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια συγγένειας ιόντων νικελίου. Τη φορά αυτή χρησιμοποιήθηκε δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο μήκους 31bp. Και τα δύο πολυπεπτίδια φάνηκαν να προσδένουν το



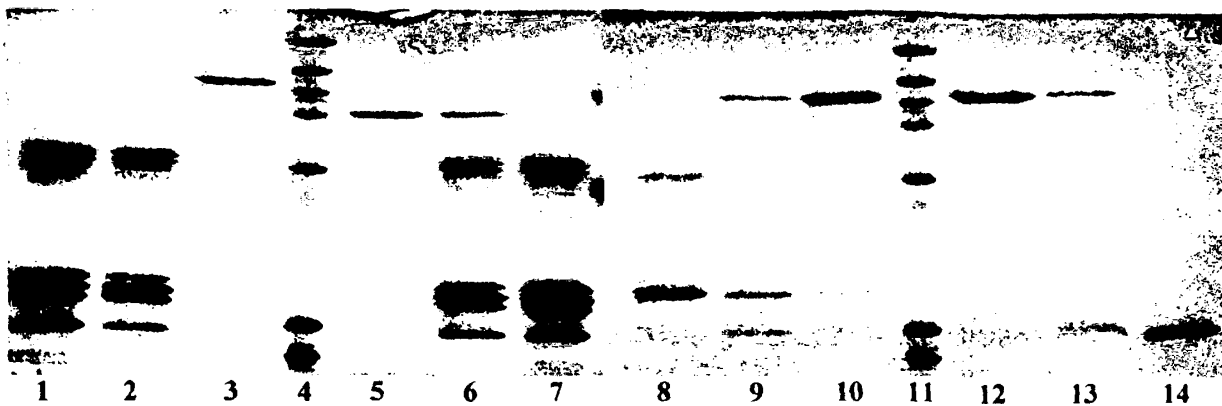
**Σχήμα 4.40** Πρόσδεση του δίκλωνου 5'-CAT TCT TGT CGT CCC GCT CCT CCA TGG CAT G-3', 3'-GTA AGA ACA GCA GGG CGA GGA GGT ACC GTA C-5' στα ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια συγγένειας ιόντων νικελίου His-MBP-EED-c2 και His-MBP-KNG-c2. Επάνω, διακρίνεται το DNA σε 1.5% gel αγαρόζης βαμμένο με EtBr και κάτω οι πρωτεΐνες σε 15% gel πολυακρυλαμιδίου βαμμένο με Coomassie brilliant blue. Διαδρομές: 1. DNA. 2. Μίγμα πρωτεϊνών αναφοράς μοριακού βάρους (το δείγμα φορτώθηκε μόνο στο gel πολυακρυλαμιδίου). 3. Δείγμα του διαλύματος που δεν προσδέθηκε (*flow-through*) στη στήλη ακινητοποιημένου His-MBP. 4. Έκλουση με 200mM ιμιδαζολίου της στήλης ακινητοποιημένου His-MBP. 5. κενό πηγάδι. 6. Δείγμα του διαλύματος που δεν προσδέθηκε (*flow-through*) στη στήλη ακινητοποιημένου His-MBP-EED-c2. 7. Έκλουση με 200mM ιμιδαζολίου της στήλης ακινητοποιημένου His-MBP-EED-c2. 8. κενό πηγάδι. 9. Δείγμα του διαλύματος που δεν προσδέθηκε (*flow-through*) στη στήλη ακινητοποιημένου His-MBP-KNG-c2. 10. Έκλουση με 200mM ιμιδαζολίου της στήλης ακινητοποιημένου His-MBP-KNG-c2. Το πείραμα έγινε σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 10mM, pH=7

ολιγονουκλεοτίδιο αυτό (Σχ.4.40).

### 4.3.2 Αλληλεπίδραση c2- ιστονών

Δεδομένου ότι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες αλληλεπιδράσεις εκπροσώπων των chromodomain είναι με ιστόνες, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η ικανότητα απ' ευθείας πρόσδεσης του c2 στις τέσσερις ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα και την H1. Πριν την παρούσα εργασία, όχι μόνο δεν ήταν γνωστή η αλληλεπίδραση του c2 με κάποια από τις ιστόνες, αλλά επιπλέον είχεδειχθεί η μη αλληλεπίδραση με κάποια πεπτιδία της ουράς της H3<sup>[23]</sup>. Αυτό βέβαια δεν οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το c2 δεν αλληλεπιδρά με καμία ιστόνη και ούτε καν αποκλείει την H3 από τη λίστα των πιθανών προσδετών. Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι πιθανοί συνδυασμοί τους, τα όρια των συντιθέμενων πεπτιδίων, η ύπαρξη θέσεων αναγνώρισης επί του αναδιπλωμένου τμήματος των ιστονών και όχι μόνο επί των ουρών, είναι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπ' όψη. Για να διαπιστωθεί αν το c2 αλληλεπιδρά απ' ευθείας με κάποια ιστόνη, όπως τα chromodomain της HP1 ή της Pc, χρησιμοποιήθηκε μίγμα ιστονών απομονωμένο από θύμο αδένα μοσχαριού. Στο υλικό αυτό υπάρχει το ευρύτερο δυνατό φάσμα τροποποιήσεων, ενώ δεδομένου ότι οι ιστόνες είναι οι περισσότερο συντηρημένες πρωτεΐνες σε όλα τα βασίλεια της ζωής το μίγμα αυτό κρίθηκε ως καλή πηγή πιθανού ιστονικού προσδέτη του c2.

Αρχικά το MBP-EED-c2 ακινητοποιήθηκε σε σφαιρίδια συγγένειας ιόντων νικελίου, στα οποία όμως τα μόρια των ιστονών προσδένονταν μη ειδικά σε κάποιο βαθμό, εμφανιζόμενα έτσι και στο control του MBP. Η μη ειδική αυτή αλληλεπίδραση εξαλείφθηκε τελείως με τη χρήση σφαιριδίων αμυλόξης για την ακινητοποίηση των κατασκευών που έφεραν αμινοτελικά MBP αν και η πρόσδεση δεν ήταν εξίσου ισχυρή με αυτή που βασιζόταν



**Σχήμα 4.41** Αλληλεπίδραση του EED-c2 με τις τέσσερις ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα και την H1. Διαδρομές: 1., 7. μίγμα ιστονών από θύμο αδένος μοσχαριού. 2., 6. Δείγμα του μίγματος που δεν προσδέθηκε (*flow-through*) σε στήλη αμυλόζης με ακινητοποιημένο MBP-EED-c2 και MBP αντίστοιχα. 3., 5. Έκλουση με 50mM μαλτόζης της στήλης ακινητοποιημένου MBP-EED-c2 και MBP αντίστοιχα. 4. Μίγμα πρωτεϊνών αναφοράς μοριακού βάρους (102, 68.5, 55, 45, 30.5, 14.4, 9kDa). 8., 14. Δείγμα ιστόνης H3 και H4 αντίστοιχα, από θύμο αδένος μοσχαριού. 9., 13. Δείγμα ιστόνης H3 και H4 αντίστοιχα, που δεν προσδέθηκε (*flow-through*) σε στήλη αμυλόζης με ακινητοποιημένο MBP-EED-c2. 10., 12. Έκλουση με 50mM μαλτόζης της στήλης ακινητοποιημένου MBP-EED-c2. 11. Μίγμα πρωτεϊνών αναφοράς μοριακού βάρους (102, 68.5, 55, 45, 30.5, 14.4, 9kDa). Το πείραμα έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7, 1M NaCl, 2mM β-ME, 0.01%NaN<sub>3</sub>. Χρησιμοποιήθηκε gel ακρυλαμιδίου 15%.

στην αλληλεπίδραση της πολυϊστιδινικής ουράς με τα ιόντα Ni<sup>2+</sup>. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη διαρροή (*leakage*) ποσότητας πρωτεΐνης κατά τις εκπλύσεις, κάτι που δεν επηρέασε πάντως τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων. Έτσι, το c2 συνδέεται επιλεκτικά με δύο από τις τέσσερις ιστόνες του μίγματος (H3, H4), ενώ αδυνατεί να προσδεθεί στην H4 όταν αυτή βρίσκεται απομονωμένη (Σχ.4.41). Συνάγεται λοιπόν ότι η αλληλεπίδραση c2 και H4 είναι έμμεση και διαμεσολαβείται από την H3, κάτι που βρίσκεται σε καλή συμφωνία με τον καλά χαρακτηρισμένο ετεροδιμερισμό μεταξύ H3 και H4.

Η ανάλυση με φασματοσκοπία μαζών της ζώνης της H3 που προσδέθηκε στο chromodomain απέδειξε ότι το παρασκεύασμα H3 που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα συγκατακρήμνισης ήταν σχετικά πλούσιο σε ιστονικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα τροποποιημένες βρέθηκαν οι θέσεις (σε ποικίλους συνδυασμούς):

- K4 (τριμεθυλιωμένη)
- K9 (ακετυλιωμένη, τριμεθυλιωμένη)
- K14 (ακετυλιωμένη)
- K18 (ακετυλιωμένη)
- K23 (ακετυλιωμένη)
- K27 (διμεθυλιωμένη)



- K36 (μονο-, δι- μεθυλιωμένη)
- K79 (μονο-, δι- μεθυλιωμένη)

Καμία όμως από αυτές τις τροποποιήσεις ή συνδυασμός τους δεν βρέθηκε να υπεραντιπροσωπεύεται στο δείγμα που προέκυψε από έκλυση της στήλης σε σχέση με αυτό που προέκυψε από το flow-through ή το αρχικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα συγκατακρήμνισης. Άρα η ανάλυση με φασματοσκοπία μαζών δεν ήταν διαφωτιστική ως προς την προτίμηση του c2 για κάποια ιστονική τροποποίηση.

Συμπερασματικά, για πρώτη φορά δείχθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ c2 και της ιστόνης H3, καθιστώντας το c2 το μοναδικό –μέχρι τη στιγμή της συγγραφής αυτής της διατριβής– chromodomain που μπορεί να αναγνωρίζει περισσότερα του ενός χρωματικά συστατικά.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ



**5.1 Σύντομη επισκόπηση των στόχων και των αποτελεσμάτων της πειραματικής μελέτης**

Σύνθετες βιολογικές διεργασίες –όπως η αναδιοργάνωση της χρωματίνης– εκτελούνται in vivo από πρωτεϊνικά σύμπλοκα- μηχανές. Εξαρτήματα αυτών των μηχανών αποτελούν οι συστατικές πρωτεΐνες (χωρίς να αποκλείεται η συμμετοχή και άλλων βιομορίων κατά περίπτωση), κάθε μία από τις οποίες αναλαμβάνει να φέρει εις πέρας ένα τμήμα του συνολικού έργου. Ο καταμερισμός όμως δεν καθορίζεται αναγκαστικά από τα όρια των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αντίθετα, διακριτοί ρόλοι διανέμονται και εντός καθενός από τα πρωτεϊνικά μόρια. Έτσι, εξελικτικά, πολλές πρωτεΐνες αναδείχθηκαν σε συνθέσεις περισσοτέρων της μίας **αυτόνομων δομικά και λειτουργικά περιοχών** (domains). Ο συντονισμός της δράσης καθεμιάς από τις περιοχές αυτές στο πλαίσιο ενός ακέραιου πολυπεπτιδίου συνθέτει και τη συνολική λειτουργικότητά του.

Το chromodomain έχει αναδειχθεί βιβλιογραφικά σε κεντρικό “παίκτη” στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τελικά στη ρύθμιση της μεταγραφής, ο ρόλος του όμως έχει περιοριστεί στην αναγνώριση μετα-μεταφραστικών σημάτων με τη μορφή ομοιοπολικών τροποποιήσεων επί των ιστονικών ουρών. Ειδικότερα, από το σύνολο των πιθανών συνδυασμών τροποποιήσεων, το chromodomain εμπλέκεται στην αναγνώριση δι- και τρι-μεθυλιωμένων καταλοίπων λυσινών. Η αντίληψη αυτή καθιερώθηκε με την επίλυση της τριτοταγούς δομής του συμπλόκου του chromodomain της πρωτεΐνης HP1 και πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην αμινοτελική ουρά της ιστόνης H3 με δι- ή τρι-μεθυλιωμένο το κατάλοιπο της λυσίνης 9<sup>[20,21]</sup>. Ο εγκλεισμός της μέθυλ-αμινομάδας σε κλωβό σχηματιζόμενο από αρωματικές πλευρικές αλυσίδες επιβεβαιώθηκε και για αλληλεπιδράσεις άλλων chromodomain με μεθυλιωμένες ιστονικές ουρές όπως αυτό της πρωτεΐνης Polcomb με πεπτίδιο της H3 μεθυλιωμένο στη λυσίνη της θέσης 27<sup>[22]</sup>. Η ποσοτικοποίηση της συγγένειας του chromodomain της HP1 με ιστονικά πεπτίδια διαφορετικού βαθμού μεθυλίωσης<sup>[85]</sup> ανήγαγε τον κλωβό στο επίκεντρο της αλληλεπίδρασης και εξήγησε την ειδικότητα για μεθυλιωμένες ιστονικές ουρές. Παρόλα αυτά η αλληλεπίδραση δεν εξαντλείται στην εγκλεισμένη μεθυλ-αμινομάδα. Σε αυτή συμμετέχουν πλευρικές ομάδες, αλλά και η κύρια αλυσίδα καταλοίπων που προηγούνται του μεθυλιωμένου, γεγονός που έχει σημαντικά υποτιμηθεί βιβλιογραφικά.

Η συντριπτική πλειοψηφία των αναφορών συσχετίζουν chromodomain ή πρωτεΐνες, στις οποίες εμπεριέχονται, με αναγνώριση μεθυλιωμένων ιστονών. Δύο τέτοιων εκπροσώπων



όμως οι λειτουργίες αναφέρονται να αποκλίνουν: του chromodomain της πρωτεΐνης MOF<sup>[24]</sup> και ενός εκ των δύο της dMi-2<sup>[23]</sup> από *Drosophila melanogaster*. Αυτά συνδέθηκαν με απ' ευθείας πρόσδεση RNA και DNA, αντίστοιχα. Η πρόσφατη επίλυση της τριτοταγούς δομής του chromodomain της MOF απέδειξε ότι εσφαλμένα κατηγοριοποιήθηκε ως chromodomain, αφού δεν υιοθετεί τη χαρακτηριστική αναδίπλωση<sup>[25]</sup>. Έτσι, ο μοναδικός εκπρόσωπος των chromodomain που φαίνεται να αποκλίνει λειτουργικά είναι το c2 της dMi-2. Προκειμένου να προσδιοριστεί πώς αυτό διαφοροποιείται ώστε να εμφανίζει συγγένεια για έναν τόσο χημικά διαφορετικό από τις ιστόνες προσδέτη, όπως είναι το DNA, επιχειρήθηκε η επίλυση της τριτοταγούς δομής του με NMR.

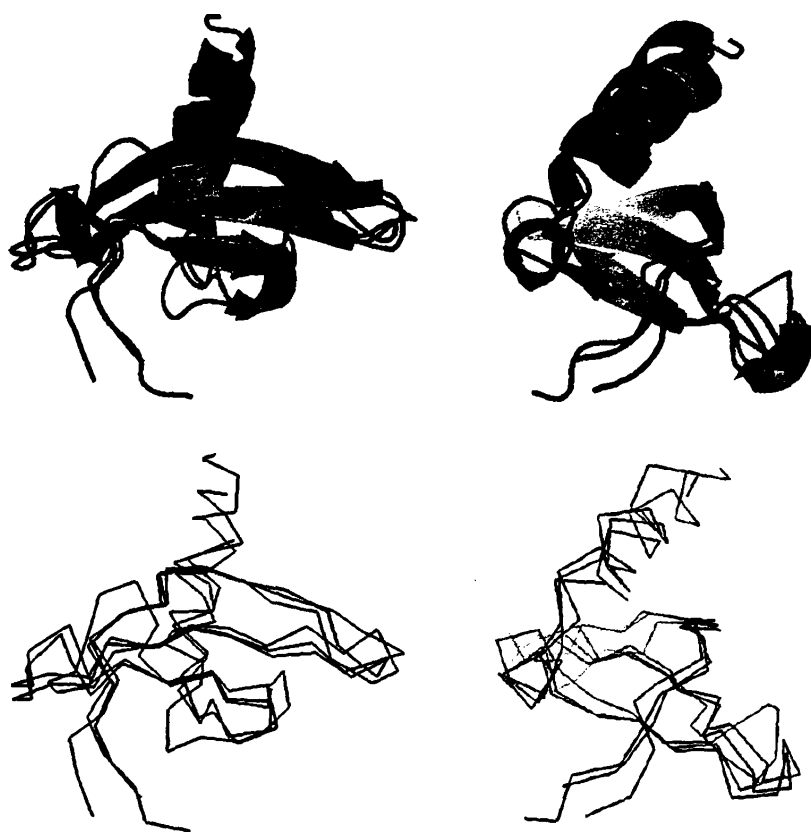
Ο ολιγομερισμός του απομονωμένου c2, πηγή τεχνικών προβλημάτων για την επίλυση της δομής του, περιορίστηκε με χρήση τεχνικών Μοριακής Βιολογίας σε βαθμό που να καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής με NMR. Αποκαλύφθηκε έτσι μια ανισομερής κατανομή φορτίου στην επιφάνεια του chromodomain η οποία επιτρέπει την ύπαρξη θετικά φορτισμένων όψεων του μορίου, γεγονός μη αναμενόμενο δεδομένου του θεωρητικού ισοηλεκτρικού σημείου (pI=4.90; aa 15-73). Παράλληλα, με χρήση βιοχημικών τεχνικών επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση του c2 απ' ευθείας σε μόρια DNA, ενώ για πρώτη φορά δείχθηκε συγγένεια προς την ιστόνη H3, καθιστώντας το c2 το μόνο –έως τη συγγραφή αυτής της διατριβής– chromodomain που αλληλεπιδρά με περισσότερα του ενός νουκλεοσωμικά συστατικά μόρια.

## 5.2 Σύγκριση με chromodomain επιλυμένης δομής

Αντίθετα με το υποτιθέμενο chromodomain της MOF, το δεύτερο chromodomain της dMi-2 υιοθετεί πλήρως τη χαρακτηριστική αναδίπλωση της τάξης του. Συγκρίνοντάς το με αυτά των πρωτεϊνών HP1 και Pc από *Drosophila* διακρίνεται σημαντική ομοιότητα, όχι μόνο ως προς τη διαδοχή των στοιχείων δευτεροταγούς δομής και το σχετικό προσανατολισμό τους, αλλά και ως προς δευτερεύοντα γεωμετρικά χαρακτηριστικά, όπως η απόκλιση του β- φύλλου από την επιπεδότητα (Σχ.5.1). Μικρές αποκλίσεις του c2 από τα άλλα δύο εστιάζονται στη θηλιά μεταξύ του δεύτερου και τρίτου β- κλώνου, τμήμα που διαφέρει αισθητά και στην αμινοξική σύνθεση και στην ελαφρά μεγαλύτερη έκταση της α- έλικας.



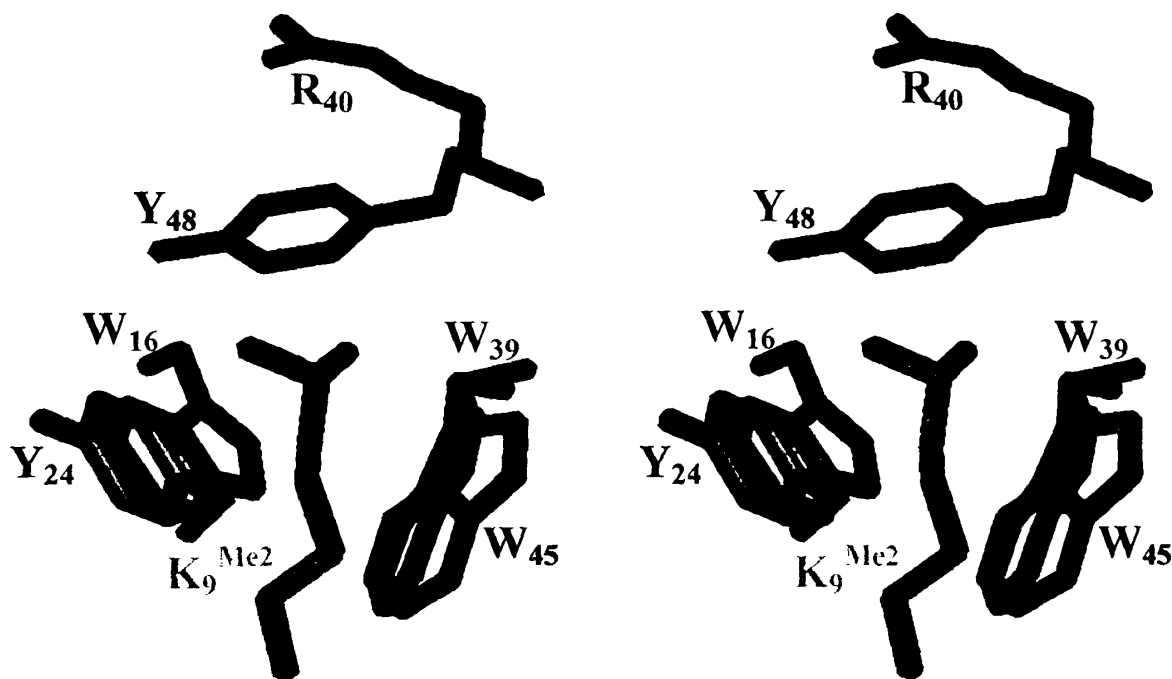
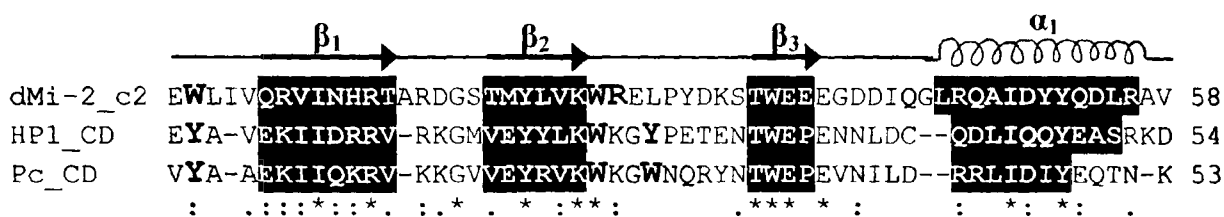
Σε σήμα κατατεθέν των chromodomains και αναπόσπαστο χαρακτηριστικό για την αναγνώριση μεθυλιωμένων καταλοίπων λυσινών ιστονικών ουρών έχει αναδειχθεί ο αρωματικός κλωβός. Τον συνθέτουν οι πλευρικές ομάδες τριών αρωματικών αμινοξέων. Στα chromodomains των dHP1 και dPc, με αυτό το ρόλο είναι επιφορτισμένες οι τριάδες αμινοξέων Y<sub>24</sub>, W<sub>45</sub>, Y<sub>48</sub> και Y<sub>26</sub>, W<sub>47</sub>, W<sub>50</sub>, αντίστοιχα (Σχ.1.13). Ήδη από τη στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών, ήταν προφανές ότι το c2 διαφοροποιείται ως προς το τρίτο αρωματικό κατάλοιπο (Σχ.5.2). Αν και τα κατάλοιπα Trp στις θέσεις 16 και 39 στοιχίζονται με δύο από τα τρία αρωματικά αμινοξέα των HP1 και Pc, στη θέση του τρίτου υπάρχει κατάλοιπο λευκίνης στο c2. Η τυροσίνη 44, το πλησιέστερο αρωματικό αμινοξύ, απέχει δύο θέσεις κατά τη στοίχιση. Τα πρωτόλεια αυτά συμπεράσματα, επιβεβαιώθηκαν με την επίλυση της τριτοταγούς δομής. Στο ελεύθερο c2, οι θέσεις των πλευρικών ομάδων των καταλοίπων Trp 16 και 39 είναι πολύ καλά ορισμένες, ενώ βρίσκονται σε σχεδόν τέλεια αλληλεπικάλυψη με τους αρωματικούς δακτυλίους των αντίστοιχων καταλοίπων της HP1 (Σχ.5.2). Η Tyr 44



Σχήμα 5.1 Αλληλεπικάλυψη της κύριας αλυσίδας του chromodomains c2 της πρωτεΐνης dMi-2 (κόκκινο) με αυτές των πρωτεϊνών dHP1 (1KNA-μαύρο) και dPc (1PDQ-μπλε) σε αναπαραστάσεις με έμφαση στη δευτεροταγή δομή (επάνω) ή ίχνους C<sub>α</sub> (κάτω). Η δομή του c2 είναι η μέση από 20 υπολογισμένες και επίλυθηκε με NMR, ενώ οι άλλες δύο με κρυσταλλογραφία ακτίνων X σε σύμπλοκο με τροποποιημένο ιστονικό πεπτίδιο. Για την αλληλεπικάλυψη χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος του DALIite<sup>[86]</sup>.

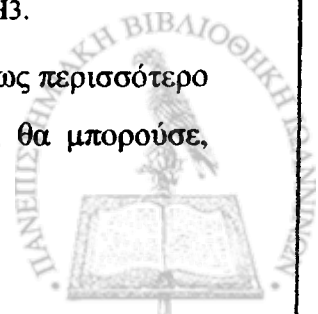


απέχει αρκετά στο χώρο, ενώ ο προσανατολισμός της πλευρικής της ομάδας εμφανίζει μεν ενδιαφέρον αφού εκτίθεται στο διαλύτη, αλλά δεν μπορεί να συνδράμει στο σχηματισμό του κλωβού. Αντιθέτως, ένα άλλο αμινοξύ του βρόγχου μεταξύ των  $\beta$ - κλώνων  $\beta_2$  και  $\beta_3$ , είναι πιθανόν σε θέση να μετριάσει την έλλειψη του τρίτου αρωματικού καταλοίπου. Πρόκειται για την αργινίνη 40, η πλευρική αλυσίδα της οποίας δεν έχει την επιπεδότητα αρωματικού δακτυλίου και είναι θετικά φορτισμένη, όμως δεν υστερεί σε μήκος ή υδροφοβικότητα. Σημειωτέον ότι μετάλλαξη της αντίστοιχης δομικά θέσης της HP1 από Tyr σε Ala οδήγησε σε ακύρωση της αλληλεπίδρασης. Εν κατακλείδι, η επίλυση της τριτοταγούς δομής απέδειξε ότι ο κλωβός του c2 υφίσταται μεν, διαφέρει δε σημαντικά από αυτούς των HP1 και Pc.



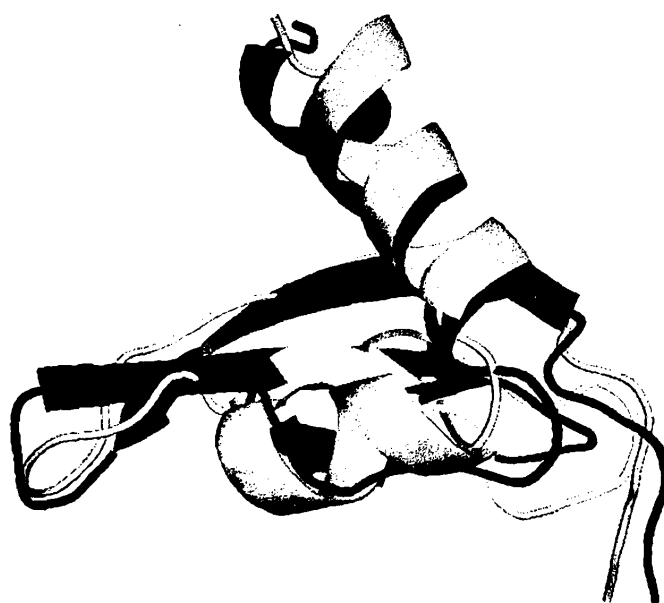
**Σχήμα 5.2** *Επάνω:* Στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών των chromodomain των πρωτεϊνών dMi-2, HP1 και Pc. Με μπλε σκίαση διακρίνεται η έκταση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής, ενώ με κόκκινο τα αμινοξέα του κλωβού. Για τη στοίχιση χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος T-COFFEE<sup>[87]</sup>. *Κάτω:* Επίθεση του κλωβού του c2 (κόκκινο) σε αυτόν του chromodomain της HP1 (1KNA-μαύρο). Με πράσινο χρώμα διακρίνεται η πλευρική αλυσίδα της διμέθυλ- λυσίνης 9 του πεπτιδίου ARTKQTARK<sup>Me2</sup>STGGKAY της H3.

Είτε συμμετέχει η R<sub>40</sub> στο σχηματισμό του, είτε όχι, ο κλωβός του c2, ως περισσότερο ευρύχωρος, “χαλαρός” από αυτούς των chromodomain της Pc ή της HP1, θα μπορούσε,



στεreoχημικά, να φιλοξενεί όχι μόνο μεθυλιωμένες  $N^{\epsilon}$ -αμινομάδες λυσινών, αλλά και ογκωδέστερες ομάδες (συμμετρικά διμεθυλιωμένες γουανιδινικές ομάδες αργινινών για παράδειγμα). Τέτοια πληροφορία δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία ούτε προέκυψε από αυτή τη διατριβή. Σε κάθε περίπτωση πάντως, το c2 αλληλεπιδρά ειδικά με ιστόνη H3 προερχόμενη από θύμο αδένα μοσχαριού. Η πρόσδεση λαμβάνει χώρα ακόμα και σε διαλύματα πολύ υψηλής ιονικής ισχύος ( $[NaCl]=1M$ ), γεγονός ενδεικτικό της ειδικότητας της αλληλεπίδρασης. Αν και η ανάλυση με φασματομετρία μαζών δεν τελεσιδίκησε σχετικά με την όποια προτίμηση του chromodomain για συγκεκριμένες τροποποιήσεις, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη (και η μόνη ως τώρα) που εμπλέκει το c2 σε απ' ευθείας πρόσδεση της ιστόνης H3 του νουκλεοσωμικού οκταμερούς.

Από τα 18 επιλυμένα έως σήμερα chromodomain, τρία κατατάσσονται στη “σκιάδη” υποκατηγορία. Εμφανίζουν περιορισμένη ομολογία με τους υπόλοιπους εκπροσώπους αυτής της τάξης, ενώ από την αμινοξική τους σύνθεση απουσιάζουν καίρια κατάλοιπα, όπως τα δύο από τα τρία αρωματικά αμινοξέα του κλωβού. Για τους λόγους αυτούς αρχικά δεν κατηγοριοποιούνταν ως chromodomain, αλλά σαν **chromoshadow domain**. Η ονομασία αυτή τους αποδόθηκε, επειδή έδειχναν να απαντώνται στη “σκιά” άλλων, περισσότερο συντηρημένων chromodomain, να έπονται δηλαδή αυτών στην αμινοξική αλληλουχία πρωτεϊνών, σε άμεση μάλιστα γειτνίαση. Με την επίλυση της τριτοταγούς δομής του



**Σχήμα 5.3** Επίθεση της κύριας αλυσίδας του chromodomain c2 της πρωτεΐνης dMi-2 (κόκκινο) σε αυτή του chromoshadow domain της HP1 ποντικού (1S4Z-κίτρινο) σε αναπαραστάσεις με έμφαση στη δευτεροταγή δομή (cartoon). Οι δύο δομές επιλύθηκαν με χρήση δεδομένων από φασματοσκοπία NMR.



επιφανέστερου εκπροσώπου τους, του έτερου μισού της HP1, κατέστη εμφανές ότι υιοθετούν τη χαρακτηριστική αναδίπλωση των chromodomain. Δομικά, όσον αφορά την τοπολογία του πολυπεπτιδικού σκελετού, η μοναδική διαφορά τους με τα chromodomain εστιάζεται στο τμήμα μεταξύ του τρίτου β- κλώνου και της α- έλικας. Μεταξύ των δύο αυτών στοιχείων δευτεροταγούς δομής, μεσολαβούν 8 αμινοξέα αντί των 6 του αμινοτελικού γείτονα, γεγονός που εξαργυρώνεται στη σταθεροποίηση μίας επιπλέον α- έλικας, μήκους 7 αμινοξέων.

Το αντίστοιχο τμήμα του c2 απαρτίζεται από 7 αμινοξέα, ενώ –όπως ήδη αναφέρθηκε– από τον κλωβό απουσιάζει ένα μόνο αρωματικό αμινοξύ. Τον “υβριδικό” του χαρακτήρα συμπληρώνει η βιοχημική του συμπεριφορά, μιας και μπορεί να αλληλεπιδρά με ιστόνες και DNA, πράγμα που δεν είναι σε θέση να κάνει το chromoshadow domain, αλλά από την άλλη διμερίζεται, χαρακτηριστικό που δεν αναφέρεται για τα chromodomain. Αντίθετα, στο διμερισμό<sup>[88]</sup> του chromoshadow domain της HP1, έχει αποδοθεί λειτουργικός ρόλος, αυτός της πρόσδεσης σε περιοχή μεταξύ των δύο μονομερών πεπτιδίων αλληλουχίας RxVxL που ενυπάρχει σε πρωτεΐνες εμμέσως σχετιζόμενες με τη χρωματίνη όπως ο CAF-1<sup>[89]</sup>. Παρόμοιος μηχανισμός πρόσδεσης επαληθεύθηκε και πρόσφατα<sup>[90]</sup>, για αλληλουχίες που δεν ακολουθούν πάντως την προαναφερθείσα ελάχιστη συμφωνία (*consensus*) και με τη συμμετοχή δύο διμερών στην αλληλεπίδραση. Το μονομερές του chromoshadow domain της HP1<sub>β</sub> ποντικού εμφανίζει υψηλότερη δομική συγγένεια με το c2 (Σχ.5.3) από το αντίστοιχο chromodomain (με DALI Z-scores 4.7 και 5.4, αντίστοιχα). Επιπλέον, το c2 ακολουθεί στην αμινοξική αλληλουχία το πρώτο chromodomain της dMi-2 όπως το chromoshadow το chromodomain της HP1.

### 5.3 Ηλεκτροχημικό δυναμικό- σύγκριση με Sac7D

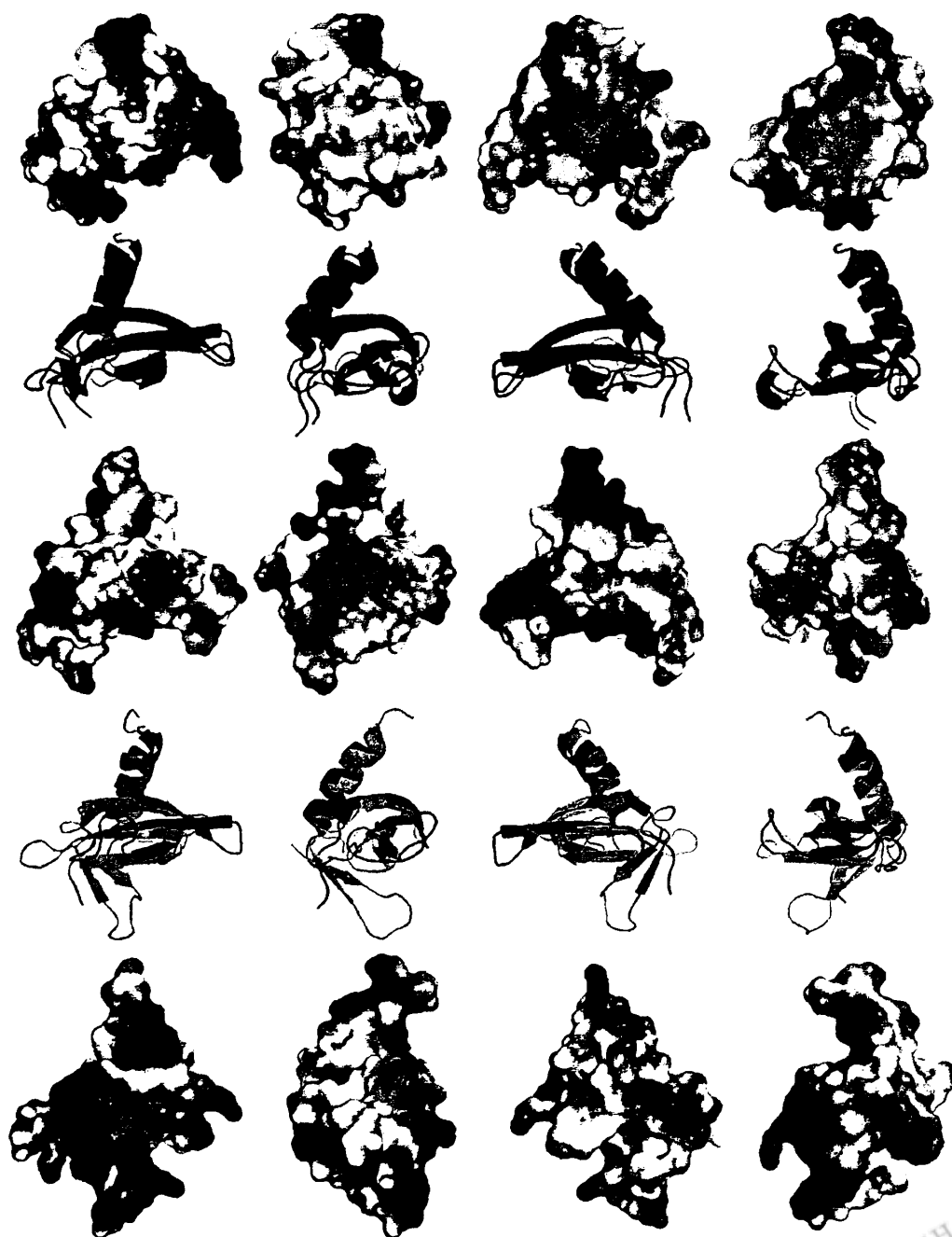
Το κίνητρο για την επίλυση της τριτοταγούς δομής του c2 σε ατομική λεπτομέρεια, διαδικασία χρονοβόρα και συχνά αβέβαιης έκβασης, δεν ήταν να αυξηθούν οι κατατεθειμένες στην τράπεζα δεδομένων δομές chromodomain. Και βέβαια, βιοχημικές μέθοδοι που απαιτούν σημαντικά μικρότερη επένδυση κόπου, χρόνου και πόρων είναι σε θέση να καταδείξουν την απ’ ευθείας πρόσδεση μορίων DNA στο c2. Τέτοιες τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν άλλωστε και σε αυτή τη διατριβή προκειμένου ναδειχθεί η συγγένεια του c2 προς το μικρότερο δίκλωνο τμήμα DNA τυχαίας αλληλουχίας που έχει χρησιμοποιηθεί σε



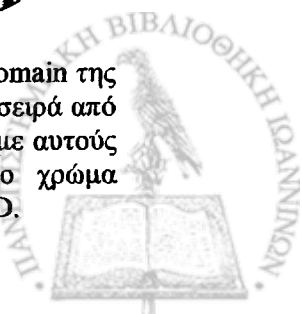


οποιαδήποτε δημοσιευμένη εργασία, το μόνο μάλιστα συνθετικό. Για να φωτιστεί όμως μηχανισμός αυτής της αλληλεπίδρασης απαιτείται γνώση λεπτομερειών σε ατομικό επίπεδο.

Σίγουρα η πιο ευθεία προσέγγιση, που οδηγεί στην πλειοψηφία τέτοιων περιπτώσεων –αν όχι σε όλες– σε αδιαμφισβήτητα συμπεράσματα, είναι η επίλυση μίας ή περισσότερων τριτοταγών δομών του συμπλόκου. Καθίσταται έτσι άμεσα εμφανής ο ρόλος πλευρικά δραστικών ομάδων, που συνθέτουν τη μεσεπιφάνεια της αλληλεπίδρασης. Αν όμως τέτοι



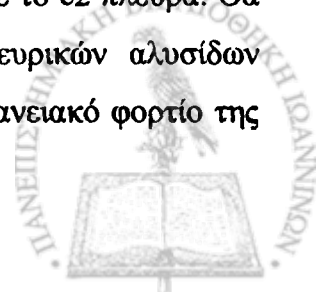
Σχήμα 5.4 Σύγκριση ηλεκτροστατικού δυναμικού στις επιφάνειες των chromodomain της dHP1 (1KNA), c2 της dMi-2, και του αρχαιοβακτηριακού Sac7D (1CA5) κατά σειρά από πάνω προς κάτω. Οι προσανατολισμοί των αναπαραστάσεων όγκου είναι ίδιοι με αυτούς των αναπαραστάσεων των αντίστοιχων πεπτιδικών σκελετών. Με μαύρο χρώμα διακρίνεται το chromodomain της dHP1, με κόκκινο το c2, και με κυανό ο Sac7D.



δομή δεν είναι διαθέσιμη, είναι δυνατόν –κατά περίπτωση– να εξαχθούν αντίστοιχα συμπεράσματα από τις δομές των απομονωμένων βιομορίων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση, σε συνδυασμό ίσως με αποτελέσματα βιοχημικών τεχνικών χαμηλότερης διακριτικής ικανότητας. Οι προσπάθειες λήψης δεδομένων από τη φασματοσκοπία NMR για την απ' ευθείας αλληλεπίδραση DNA-c2 δεν καρποφόρησαν, αφού τα περιορισμένου μήκους δίκλινα τμήματα που χρησιμοποιήθηκαν (8 και 12bp) δεν αποδείχθηκαν ικανά να προσδεθούν στο chromodomain. (Σχ.4.38). Παρόλα αυτά, η δομή του απομονωμένου c2 είναι σε θέση να υποδείξει πώς αυτό διαφοροποιείται λειτουργικά από τα υπόλοιπα μέλη της πρωτεϊνικής αυτής οικογένειας, ώστε να έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης DNA.

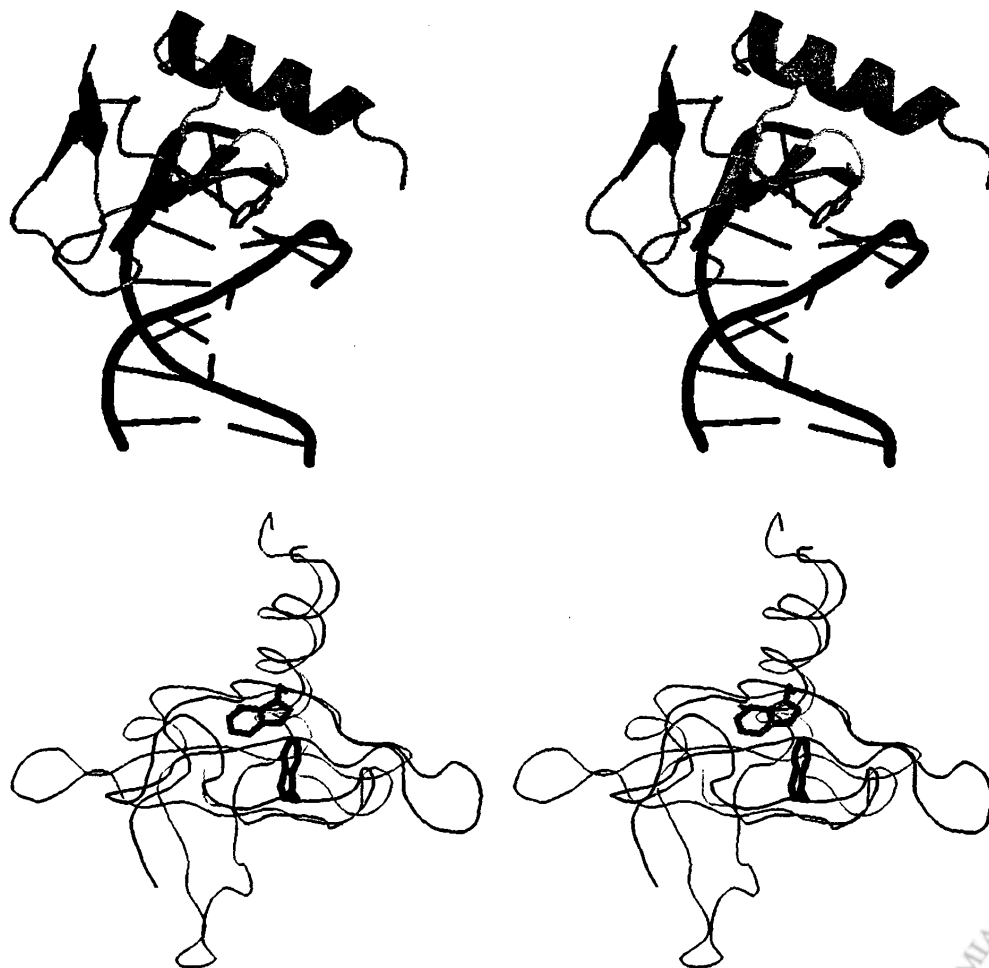
Η αναγνώριση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από πολυπεπτίδια βασίζεται σε απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις πλευρικών αλυσίδων –συνήθως αρωματικών αμινοξέων– με τις βάσεις. Αντίθετα, η μη ειδική αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με νουκλεϊκά οξέα, δηλαδή αυτή για την οποία δεν απαιτείται συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία, δεν μπορεί παρά να στηρίζεται σε κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ μορίων DNA ή RNA οποιασδήποτε αλληλουχίας. Το πλεόνασμα αρνητικού φορτίου στο φωσφορικό σκελετό και οι ριβοζικοί δακτύλιοι είναι λοιπόν τα χαρακτηριστικά αναγνώρισης ως προς τα οποία πρέπει να εμφανίζει συμπληρωματικότητα ένας υποψήφιος προσδέτης.

Πράγματι, εστιάζοντας στην εκτεθειμένη επιφάνεια του c2, μπορεί κανείς να διαπιστώσει ότι η διασπορά και ο κατάλληλος προσανατολισμός φορτισμένων πλευρικών και μη ομάδων (Σχ.4.36) ευνοούν τη συνάθροιση θετικού φορτίου σε κάποιες από τις πλευρές του βιομορίου, αν και το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (4.90) δεν προϋδεάζει σχετικά. Συγκρίνοντας το chromodomain c2 με αυτό της dHP1 (pI=4.79), προκύπτουν διαφορές, όχι μόνο ως προς τη συνολική έκθεση του θετικού φορτίου στην επιφάνεια των βιομορίων, αλλά και ως προς την τοπογραφική τους κατανομή (Σχ.5.4). Έτσι, αντίθετα με το chromodomain της HP1, το c2 συγκεντρώνει σημαντικό πλεόνασμα θετικού φορτίου στην πλευρά του β-φύλλου που κείται μακριά από την α-έλικα. Η παρατήρηση αυτή αποκτά ξεχωριστό ενδιαφέρον υπό το φως της αντιστοίχισης με την πρωτεΐνη Sac7D. Αν και συνολικά θετικότερη (pI=9.66), η αρχαιοβακτηριακή πρωτεΐνη διατάσσει το “οπλοστάσιο” θετικά φορτισμένων δραστικών ομάδων που διαθέτει προς τη δομικά ομόλογη με το c2 πλευρά. Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθεί και η συνεισφορά κάποιων πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων του πρώτου από τα δύο β- φύλλα του Sac7D στο θετικό επιφανειακό φορτίο της



επίμαχης “όψης” του μορίου. Και στα chromodomains όμως θα μπορούσε να υπάρξει σε δομικά ομόλογη θέση τέτοια εξωμοριακή συνεισφορά θετικά φορτισμένων δραστικών ομάδων. Πράγματι, η πρόσδεση ιστονικών ουρών σε chromodomains δημιουργεί ένα επιπλέον β- φύλλο σε δομικά ομόλογη θέση με το πρώτο εκ των δύο του Sac7D, με το κυρίως θετικά φορτισμένο ιστονικό πεπτίδιο να στοιχειοθετεί τον β- κλώνο που καταλαμβάνει ομόλογη θέση με τον πρώτο κλώνο της πρώτης β- πτυχωτής επιφάνειας του Sac7D<sup>[20-22]</sup>. Η πρόσδεση της όχι κατ’ ανάγκην τροποποιημένης H3 από το c2, σύμφωνα με το παραπάνω σκεπτικό, θα μπορούσε να είναι συζευγμένη με την πρόσδεση νουκλεοσωμικού DNA.

Η αλληλεπίδραση DNA-Sac7D δεν είναι όμως μόνο ηλεκτροστατικής φύσης. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης που βρίσκεται στον πρώτο κλώνο της δεύτερης β- πτυχωτής επιφάνειας του βιομορίου. Ο υδρολικός δακτύλιος της πλευρικής του ομάδας, καθοδηγούμενος από δυνάμεις Van der Waals, διατάσσεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να ευνοείται το “πακετάρισμά” του με δακτύλιο ριβόζης (Σχ.5.5). Την κρισιμότητα

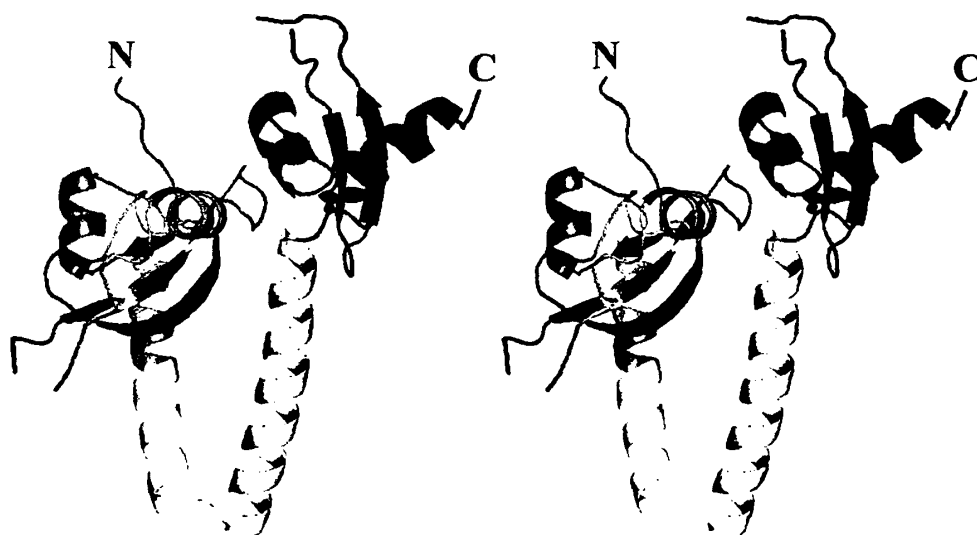


**Σχήμα 5.5** *Επάνω:* Στερεοδιάγραμμα της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου Sac7D-DNA (1CA5) με εμφανή τη θέση της τρυπτοφάνης 24. *Κάτω:* Στερεοδιάγραμμα επίθεσης του c2 στο Sac7D. Ευδιάκριτα είναι τα κατάλοιπα τρυπτοφανών 24 (Sac7D) και 49 (c2).

αυτής της αλληλεπίδρασης αποκάλυψε η δομικά κατευθυνόμενη μετάλλαξη W24A<sup>[91]</sup> που επηρέασε δραματικά τη συγγένεια της πρωτεΐνης για το DNA χωρίς να διαταράσσει τη δομική ακεραιότητα του μορίου. Συντηρημένο σε όλα τα chromodomain, αλλά όχι στην υποκατηγορία των chromoshadow, το κατάλοιπο W49 βρίσκεται σε ιδανική θέση για να παίζει αντίστοιχο ρόλο στην αναγνώριση δίκλωνου DNA από το c2 (Σχ.5.5).

#### 5.4 Chromodomain “σε σειρά”

Περισσότερα του ενός chromodomain είναι δυνατό να “συγκατοικούν” στο πλαίσιο ενός μόνο βιομορίου. Συνήθως μάλιστα, βρίσκονται και σε άμεση γειτνίαση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα και “πρότυπο” αποτελεί η HP1, που, όπως προαναφέρθηκε, περιέχει δύο: ένα αμινοτελικό chromodomain και ένα καρβοξυτελικό chromodomain. Αλλά και το chromodomain στη μελέτη του οποίου εστιάζεται αυτή η εργασία, το c2, έπεται στην αμινοξική αλληλουχία του έτερου chromodomain της dMi-2, του c1. Δύο μόνο από τις 18 επιλυμένες, κατατεθειμένες στην πρωτεϊνική τράπεζα δεδομένων PDB, δομές chromodomain αντιστοιχούν σε ζεύγη, καθένα από τα οποία περιλαμβάνει τα δυο chromodomain μαζί με το συνδετικό πεπτιδικό τμήμα. Μάλιστα, οι πρωτεΐνες από τις οποίες προέρχονται αυτά τα πολυπεπίδια (CHD1 ανθρώπου<sup>[92]</sup>, CHD1 ζύμης –budding yeast<sup>[94]</sup>) είναι ομόλογες μεταξύ τους και με τη dMi-2. Είναι χαρακτηριστικό-και αξιοσημείωτο- ότι η δομή της ακέραιας HP1

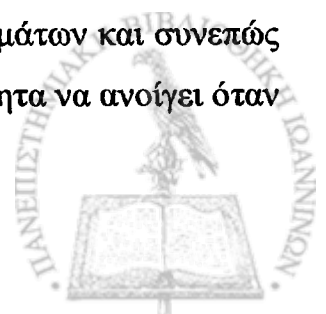


Σχήμα 5.6 Στερεοδιάγραμμα του μοντέλου της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια της περιοχής των chromodomain της ανθρώπινης πρωτεΐνης CHD1 (2B2T) όπως επιλύθηκε με χρήση της τεχνικής της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Με πορτοκαλί χρώμα διακρίνεται το πρώτο chromodomain και με μοβ το δεύτερο. Με γκρι απεικονίζονται τα αμινοξέα που ανήκουν στο ενδιάμεσο συνδετικό τμήμα, ενώ με πράσινο εκείνα που υπάρχουν στην ένθεση του hCHD1-c1 (βλ. εισαγωγή και Σχ.1.16)

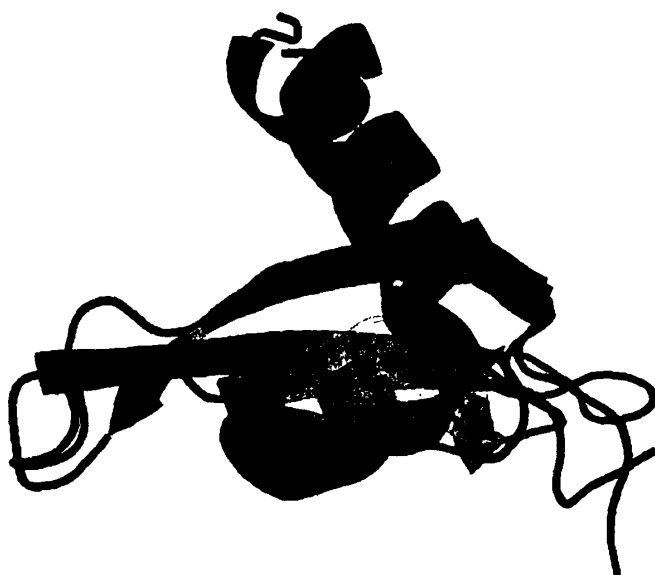
δεν έχει ακόμη επιλυθεί, παρότι η πρωτεΐνη αυτή έχει προσελκύσει εντονότατο ενδιαφέρον και είναι ήδη προ πολλού γνωστές οι δομές των επιμέρους περιοχών της, αποτελώντας μάλιστα το “πρότυπο” αναγνώρισης ιστονικών τροποποιήσεων.

Το μοντέλο της τριτοταγούς δομής της περιοχής των chromodomain της ανθρώπινης CHD1 (Σχ.5.6), ξαφνιάζει. Η καρβοξυτελική έλικα του πρώτου chromodomain δείχνει να αποτελεί τμήμα μιας συνεχόμενης, μεγαλύτερης έλικας, γεγονός που αντίκειται με την οριοθέτηση του hCHD1-c1 ως domain, αφού υπονομεύει τη δομική του αυτοτέλεια. Εκτός αυτού, τα δύο chromodomain δείχνουν να βρίσκονται σε επαφή, χαρακτηριστικό στο οποίο αποδίδεται λειτουργικός μάλιστα ρόλος<sup>[92]</sup>, γεγονός που καθιστά υπό αμφισβήτηση τη λειτουργική αυτονομία τους. Επιπλέον, τη μεσεπιφάνεια των δύο chromodomain συνθέτουν – μεταξύ άλλων– αμινοξέα που ανήκουν στην ένθεση του hCHD1-c1. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση από το CHD1-c2 και παράλληλα με την καρβοξυτελική έλικα του CHD1-c1 σε δύο επιλυμένες δομές του αντίστοιχου πολυπεπτιδίου ζυμών<sup>[93,94]</sup> λόγω σχηματιζόμενου δισουλφιδίου. Τέλος, το καρβοξυτελικό τμήμα του CHD1-c2 δείχνει να αναδιπλώνεται σε δύο κάθετες μεταξύ τους έλικες ομοιάζοντας έτσι περισσότερο σε chromoshadow παρά σε chromodomain. Με γνωστή και καλά χαρακτηρισμένη την τάση του chromoshadow domain της HP1 για διμερισμό, δεν εκπλήσσει ο σχηματισμός κρυστάλλων διμερούς από τον οποίο επιλύθηκε μάλιστα και η συγκεκριμένη δομή. Παρόλα αυτά, κανένα από τα αμινοξέα του hCHD1-c2 δεν συμμετέχει στο σχηματισμό της μεσεπιφάνειας διμερισμού, πόσω μάλλον αυτά των ελίκων.

Δυστυχώς, η προσπάθεια επίλυσης της τριτοταγούς δομής της περιοχής των c1 και c2 μαζί με το ενδιάμεσο τμήμα της dMi-2 σε διάλυμα, δεν καρποφόρησε εξ αιτίας εκτεταμένης συσσωμάτωσης, είτε το αντίστοιχο πολυπεπτίδιο προερχόταν από τη dMi-2 από *Drosophila* (αυτή η εργασία), είτε από τη CHD1 σακχαρομύκητα<sup>[93]</sup>. Έτσι, τα δομικά ευρήματα για την ανθρώπινη CHD1, δεν είναι δυνατό να επαληθευθούν ή να καταρριφθούν. Είναι πιθανό πάντως, η κάμψη της συνδετικής έλικας να οφείλεται σε τοπική υδροφοβικότητα ή κρυσταλλογραφικό τέχνημα, που θα μπορούσε όμως να σκιαγραφεί μία από τις πιθανές διαμορφώσεις που είναι σε θέση να υιοθετήσει το συγκεκριμένο τμήμα. Άλλωστε, μια μοριακή τανάλια –εργαλείο χρήσιμο στη μηχανική διατάραξη νουκλεοσωμάτων και συνεπώς την αναδιοργάνωση της χρωματίνης– αν και κλειστή, διατηρεί τη δυνατότητα να ανοίγει όταν οι περιστάσεις το απαιτούν.



Η τριτοταγής δομή του c2 βρίσκεται σε καλή συμφωνία, μεταξύ των επιλυμένων δομών πολυπεπτιδίων διαφορετικών ειδών, είτε αυτά αντιστοιχούν στο απομονωμένο c2<sup>[93]</sup>, είτε συμπεριλαμβάνουν και το c1<sup>[92,94]</sup>. Σημαντικές αποκλίσεις επίσης δεν παρατηρούνται μεταξύ της τοπολογίας των προαναφερθεισών δομών και αυτής που υπολογίστηκε κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής (Σχ.5.7). Η μοναδική διαφορά εστιάζεται στην απουσία της πρώτης εκ των δύο καρβοξυτελικών α- ελίκων στη δομή του dMi-2\_c2. Η διαφοροποίηση αυτή δεν είναι αστήρικτη. Η επίμαχη περιοχή δεν εμφανίζει υψηλή συντήρηση (Σχ.5.8), ενώ η έκτασή της περιορίζεται κατά ένα αμινοξύ στο chromodomain της dMi-2. Το δίκτυο NOE του EED-c2 (Σχ.4.32) δεν συμβαδίζει με δομή α- ελικας, τόσο επειδή απουσιάζουν σήματα χαρακτηριστικά συνεχόμενης δομής α- έλικας, όσο και επειδή υφίστανται άλλα που αντίκεινται στο συγκεκριμένο τύπο δευτεροταγούς δομής. Επίσης, η κινητικότητα του πεπτιδικού σκελετού όπως προδίδουν οι τιμές του χρόνου αποδιέγερσης T2 για τα αμιδικά



**Σχήμα 5.7** Επίθεση της κύριας αλυσίδας του chromodomain c2 της πρωτεΐνης dMi-2 (κόκκινο) σε αυτή του chromodomain c2 της CHD1 ζύμης (2DY8-μοβ) σε αναπαραστάσεις με έμφαση στη δευτεροταγή δομή (cartoon). Οι δύο δομές επιλύθηκαν με χρήση δεδομένων από φασματοσκοπία NMR.

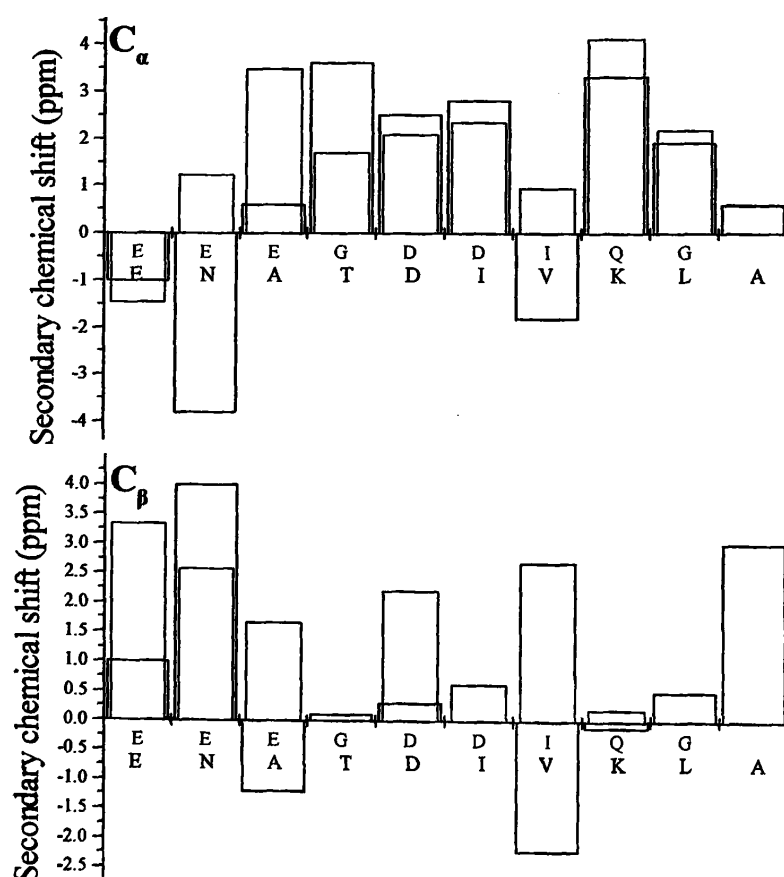
|            |                 |
|------------|-----------------|
| >dMi-2_c2  | E G D D I Q G - |
| >yCHD1_c2  | N A T D I V K L |
| >byCHD1_c2 | N A T D I V K L |
| >hCHD1_c2  | D S A L I S K K |
| >M31_csd   | P A K E A N V K |

**Σχήμα 5.8** Στοιχισμός αμινοξικών αλληλουχιών της περιοχής μεταξύ του τρίτου β- κλώνου και της καρβοξυτελικής α-έλικας των c2 chromodomain των πρωτεϊνών dMi-2, yCHD1, byCHD1, hCHD1 και του chromoshadow domain της M31.



σήματα της συγκεκριμένης περιοχής (Σχ.4.32), δεν συνάδει με τη δυσκαμψία που θα συνεπαγόταν η αναδίπλωση σε α- έλικα. Στην παραπάνω αλληλουχία παράθεσης πειραματικών δεδομένων και συλλογισμών δεν είναι παράταιρη και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων πυρήνων που ανήκουν στο τμήμα που έπεται του τρίτου β- κλώνου μεταξύ του EED-c2 και του μοναδικού άλλου c2 για το οποίο υπάρχουν διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>[93]</sup>. Η εξάρτηση των χημικών μετατοπίσεων ορισμένων πυρήνων NMR από τη δευτεροταγή δομή<sup>[95-97]</sup> (Σχ.4.28) τις καθιστά ισχυρά ενδεικτικές για διατάξεις α- ελίκων ή β- φύλλων. Συγκρίνοντας τις αποκλίσεις των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων C<sub>α</sub> και C<sub>β</sub> από τις τιμές τυχαίου σπειράματος (δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις – *secondary chemical shifts*) για τα c2 της dMi-2 και γCHD1, δεν προκύπτει συσχέτιση (Σχ.5.9). Όσο για το dMi-2\_c2, αν και οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις των C<sub>α</sub> θα μπορούσαν να παραπέμπουν σε α- έλικα, από αυτές των C<sub>β</sub> δεν μπορεί να εξαχθεί τέτοιο συμπέρασμα. Συνολικά, τα υπάρχοντα δεδομένα συνηγορούν υπέρ δομής θηλιάς στην περίπτωση του chromodomain της dMi-2 με περιορισμένα χαρακτηριστικά ελικοειδών στροφών, όπως μπορεί κανείς να δει για τα πρώτα αμινοξέα μετά τον τρίτο β- κλώνο.

Όπως ήδη αναλύθηκε, η λειτουργική διαφοροποίηση είναι που καθιστά το δεύτερο



**Σχήμα 5.9** Δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων C<sub>α</sub> και C<sub>β</sub> των αμινοξέων που απαρτίζουν το πεπτιδικό τμήμα μεταξύ του τρίτου β- φύλλου και της καρβοξυτελικής α- έλικας των chromodomain c2 των πρωτεϊνών yCHD1<sup>[91]</sup> (μαύρο - 2DY8) και dMi-2 (κόκκινο). Το πρώτο αμινοξύ (E) ανήκει στον τρίτο β- κλώνο.

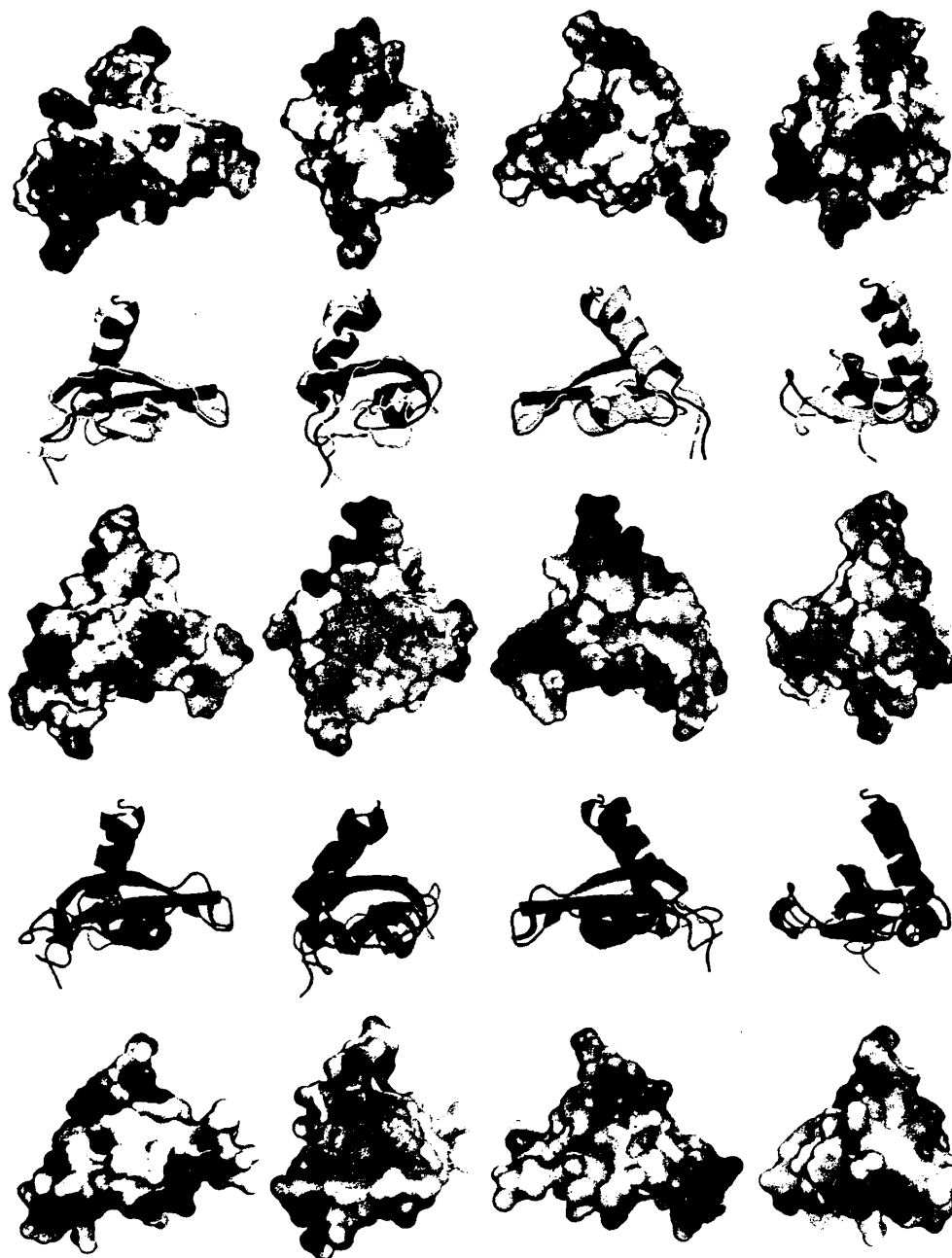
chromodomain της dMi-2 ενδιαφέρον και όχι η διάταξη των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής του πεπτιδικού σκελετού. Το c2 είναι το μοναδικό chromodomain για το οποίο έχει δειχθεί άμεση πρόσδεση DNA και παρουσιάζει αδιάλειπτα θετικά φορτισμένα πρόσωπα στην επιφάνειά του όπως αποκαλύπτει το ηλεκτροχημικό του δυναμικό. Οι κυρίως θετικά φορτισμένες αυτές πλευρές εμφανίζουν μάλιστα αντιστοιχία με αυτές της δομικά ομόλογης αρχαιοβακτηριακής πρωτεΐνης Sac7D, που επίσης προσδένει DNA χωρίς προαπαιτούμενη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Συμβαίνει όμως κάτι αντίστοιχο στην επιφάνεια των μορίων των εγγύτερων δομικά συγγενών του dMi-2\_c2; Παραθέτοντας τους μοριακούς όγκους των chromoshadow domain της πρωτεΐνης M31 και chromodomain c2 των dMi-2 και yCHD1 στον ίδιο προσανατολισμό, δεν καθίσταται εμφανής ισχυρή ηλεκτροστατική αντιστοιχία (Σχ.5.10). Αντίθετα με το chromoshadow, για το οποίο η κατανομή φορτίων διαφέρει εμφαντικά από αυτή για το chromodomain της dMi-2, το c2 της yCHD1 επιδεικνύει συναφές ηλεκτροστατικό προφίλ. Παρόλα αυτά, αυτή η συναφεια είναι σημαντικά περιορισμένη για τις πλευρές των δύο μορίων που είναι δομικά ομόλογες με την επιφάνεια επαφής DNA-Sac7D.

### 5.5 Ολιγομερισμός του c2

Η τάση του c2 για ολιγομερισμό έχει αντιμετωπισθεί στο μεγαλύτερο μέρος αυτής της διατριβής σαν πηγή τεχνικών προβλημάτων στην πορεία επίλυσης της τριτοταγούς δομής του. Είναι όμως προφανές ότι μια τέτοια πιθανότητα θα μπορούσε να παρουσιάζει αυτοτελώς ενδιαφέρον όσον αφορά τη λειτουργικότητα του μορίου και κατ' επέκταση του συμπλόκου της dMi-2. Απουσία όμως in vivo δεδομένων που να συσχετίζουν το φυσιολογικό ρόλο της dMi-2 με το βαθμό πολυμερισμού της, η δυνατότητα ολιγομερισμού του c2 που διαπιστώθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, δεν μπορεί να αξιολογηθεί λειτουργικά. Αντίθετα, μπορεί να χρησιμεύσει σαν μια αρχική παρατήρηση και βάση για περαιτέρω διερεύνηση του ερωτήματος αυτού. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλο που ο διμερισμός της πολύ καλύτερα χαρακτηρισμένης HP1 θεωρείται προ πολλού δεδομένος, δεν υπάρχει μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία άμεση πειραματική μαρτυρία για τον ομοδιμερισμό ή/και τον ετεροδιμερισμό με άλλες ισομορφές της in vivo<sup>[89]</sup>.



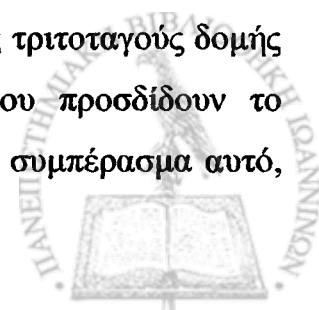




Σχήμα 5.10 Σύγκριση ηλεκτροστατικού δυναμικού στις επιφάνειες του chromoshadow domain της M31 (1S4Z), και των chromodomain c2 των dMi-2, και  $\gamma$ CHD1 (2DY8) κατά σειρά από πάνω προς κάτω. Οι προσανατολισμοί των αναπαραστάσεων όγκου είναι ίδιοι με αυτούς των αναπαραστάσεων των αντίστοιχων πεπτιδικών σκελετών. Με κίτρινο χρώμα διακρίνεται το chromoshadow domain της M31, με κόκκινο το c2, και με μωβ το CHD1\_c2.

### 5.6 Σύνοψη

Συνοπτικά, η σύγκριση του c2 με τα συγγενή και μη chromodomain ως προς τη θέση του στο μόριο της dMi-2, την τάση του για ολιγομερισμό, τα χαρακτηριστικά της τριτοταγούς δομής του και τη φύση των αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχει, του προσδίδουν το χαρακτήρα “υβριδίου” μεταξύ chromo- και chromoshadow- domain. Το συμπέρασμα αυτό,



σε συνδυασμό με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, θέτει σε αμφισβήτηση τις οριοθετήσεις που κυριαρχούν στη διεθνή βιβλιογραφία ως προς τον αυστηρά διακριτό λειτουργικό και δομικό χαρακτήρα αυτών και άλλων πρωτεϊνικών περιοχών που απαντώνται σε χρωματινικούς αναδιομορφωτές (Tudor, Agenet, PWWP, MBT) και έχουν καταταγεί συλλήβδην στην επιλεγόμενη "Royal Family of Protein Domains" [135].



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**  
**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

- i) Το δεύτερο chromodomain της πρωτεΐνης dMi-2 από *Drosophila melanogaster* (c2) αλληλεπιδρά απ' ευθείας με DNA, ανεξαρτήτως της αλληλουχίας του, και με ιστόνη H3 και φαίνεται να είναι το μόνο chromodomain που αλληλεπιδρά με περισσότερα του ενός νουκλεοσωμικά συστατικά
- ii) Το c2 υιοθετεί τη χαρακτηριστική  $\alpha+\beta$  αναδίπλωση των chromodomain ( ***$\alpha+\beta$  chromodomain fold***), όπως απέδειξε η επίλυση της τριτοταγούς δομής του με NMR
- iii) Η συγκέντρωση θετικού φορτίου σε ένα τμήμα της επιφάνειας του c2 μπορεί να εξηγήσει την πρόσδεση DNA
- iv) Η επιφάνεια του c2 διαθέτει ένα αρωματικό κλωβό με χαρακτηριστικά διαφορετικά από αυτά των πιο καλά χαρακτηρισμένων chromodomain, που θα μπορούσε να φιλοξενήσει μια ογκώδη πλευρική ομάδα, όχι αναγκαστικά τροποποιημένης ιστόνης H3
- v) Η πρόσδεση DNA και η αλληλεπίδραση με την H3 θα μπορούσαν να είναι συζευγμένες, μια και φαίνεται να μη σχετίζονται με το ίδιο τμήμα της επιφάνειάς του.
- vi) Η τάση για ολιγομερισμό του c2, τα χαρακτηριστικά της τριτοταγούς δομής του και η φύση των αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχει το κατατάσσουν σε μια τάξη "υβριδίων" μεταξύ chromo- και chromoshadow- domain και, σε συνδυασμό με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, θέτουν σε αμφισβήτηση τις σαφείς οριοθετήσεις που κυριαρχούν στη διεθνή βιβλιογραφία ως προς τον αυστηρά διακριτό λειτουργικό και δομικό χαρακτήρα αυτών και άλλων πρωτεϊνικών περιοχών που απαντώνται σε χρωματινικούς αναδιομορφωτές.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ



Σύνθετες βιολογικές διεργασίες –όπως η αναδιοργάνωση της χρωματίνης– εκτελούνται *in vivo* από πρωτεϊνικά σύμπλοκα- μηχανές. Εξαρτήματα αυτών των μηχανών αποτελούν οι συστατικές πρωτεΐνες (χωρίς να αποκλείεται η συμμετοχή και άλλων βιομορίων κατά περίπτωση), κάθε μία από τις οποίες αναλαμβάνει να φέρει εις πέρας ένα τμήμα του συνολικού έργου. Ο καταμερισμός όμως δεν καθορίζεται αναγκαστικά από τα όρια των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αντίθετα, διακριτοί ρόλοι διανέμονται και εντός καθενός από τα πρωτεϊνικά μόρια. Έτσι, εξελικτικά, πολλές πρωτεΐνες αναδείχθηκαν σε συνθέσεις περισσότερων της μίας αυτόνομων δομικά και λειτουργικά περιοχών (domains). Ο συντονισμός της δράσης καθενός από τα domain στο πλαίσιο ενός ακέραίου πολυπεπτιδίου συνθέτει και τη συνολική λειτουργικότητά του.

Το chromodomain έχει αναδειχθεί βιβλιογραφικά σε κεντρικό “παίκτη” στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, ο ρόλος του όμως περιορίζεται στην αναγνώριση μετα- μεταφραστικών σημάτων με τη μορφή ομοιοπολικών τροποποιήσεων επί των ιστονικών ουρών. Ειδικότερα, από το σύνολο των πιθανών συνδυασμών τροποποιήσεων, το chromodomain εμπλέκεται στην αναγνώριση δι- και τρι- μεθυλιωμένων καταλοίπων λυσινών. Η αντίληψη αυτή καθιερώθηκε με την επίλυση της τριτοταγούς δομής σε ατομική λεπτομέρεια του συμπλόκου του chromodomain της πρωτεΐνης HP1 και πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην αμινοτελική ουρά της ιστόνης H3 με δι- ή τρι- μεθυλιωμένο το κατάλοιπο της λυσίνης 9. Ο εγκλεισμός της μέθυλ-αμινομάδας σε κλωβό σχηματιζόμενο από αρωματικές πλευρικές αλυσίδες επιβεβαιώθηκε και για αλληλεπιδράσεις άλλων chromodomain με μεθυλιωμένες ιστονικές ουρές, ανήγαγε τον αρωματικό κλωβό στο επίκεντρο της αλληλεπίδρασης και εξήγησε την ειδικότητα για μεθυλιωμένες ιστονικές ουρές. Παρόλα αυτά η αλληλεπίδραση δεν εξαντλείται στην εγκλεισμένη μεθυλ-αμινομάδα. Σε αυτή συμμετέχουν πλευρικές ομάδες, αλλά και η κύρια αλυσίδα καταλοίπων που προηγούνται του μεθυλιωμένου, γεγονός που έχει σημαντικά υποτιμηθεί βιβλιογραφικά.

Πληθώρα αναφορών συσχετίζουν chromodomain ή πρωτεΐνες, στις οποίες εμπεριέχονται, με αναγνώριση μετα- μεταφραστικά μεθυλιωμένων ιστονών. Δύο τέτοιων εκπροσώπων οι λειτουργίες αναφέρονται να αποκλίνουν: του chromodomain της πρωτεΐνης MOF και ενός εκ των δύο της dMi-2 από *Drosophila melanogaster*. Αυτά συνδέθηκαν με απ’ ευθείας πρόσδεση RNA και DNA, αντίστοιχα. Πρόσφατα δομικά και λειτουργικά δεδομένα απέδειξαν ότι το chromodomain της MOF εσφαλμένα κατηγοριοποιήθηκε ως chromodomain

και έθεσαν σε σοβαρή αμφισβήτηση την υποτιθέμενη αλληλεπίδρασή του με RNA. Έτσι, ο μοναδικός εκπρόσωπος των chromodomain που φαίνεται να αποκλίνει λειτουργικά είναι το c2 της dMi-2, στη μελέτη του οποίου εστιάστηκε η διατριβή αυτή.

Με χρήση βιοχημικών τεχνικών επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση του c2 απ' ευθείας σε μόρια DNA, ενώ για πρώτη φορά δείχθηκε συγγένεια και προς την ιστόνη H3. Προκειμένου να προσδιοριστεί πώς το c2 διαφοροποιείται ώστε να εμφανίζει συγγένεια για έναν τόσο χημικά διαφορετικό από τις ιστόνες προσδέτη όπως είναι το DNA, επιχειρήθηκε η επίλυση της τριτοταγούς δομής του με NMR. Ο ολιγομερισμός του απομονωμένου c2 τιθασεύτηκε μερικώς με χρήση τεχνικών Μοριακής Βιολογίας σε βαθμό που να καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής με NMR. Ανάλυση της δομής έδειξε ότι το c2 είναι μια συμπαγής, καλά αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, αποτελούμενη από μια β- πτυχωτή επιφάνεια και μια καρβοξυτελική α-έλικα, που είναι διατεταγμένα στο χώρο, έτσι ώστε να σχηματίζουν τη χαρακτηριστική α+β αναδίπλωση των chromodomain (*α+β chromodomain fold*). Ο χαρακτηριστικός για τα chromodomain αρωματικός κλωβός υφίσταται μεν στην επιφάνεια του c2, διαφέρει όμως από αυτόν των "προτύπων" μελών της οικογένειας των chromodomain. Αποκαλύφθηκε επιπλέον μια ανισομερής κατανομή φορτίου στην επιφάνεια του c2, η οποία επιτρέπει την ύπαρξη θετικά φορτισμένων όψεων του μορίου, γεγονός μη αναμενόμενο δεδομένου του θεωρητικού ισοηλεκτρικού του σημείου (pI=4.90). Τα χαρακτηριστικά της επιφάνειάς του θα επέτρεπαν τη συζευγμένη πρόσδεση νουκλεοσωμικού DNA και ιστονών στο c2, καθιστώντας το το μόνο –έως τη συγγραφή αυτής της διατριβής– chromodomain που αλληλεπιδρά με περισσότερα του ενός νουκλεοσωμικά συστατικά. Τέλος ο βιοφυσικός, βιοχημικός και δομικός χαρακτηρισμός του c2 προδίδει τον υβριδικό του χαρακτήρα μεταξύ του chromo- και του chromo- shadow domain.



## SUMMARY

The present study is a part of a larger project which aims to investigate the role of the family in the development of the child's personality. The study is based on the theoretical framework of the family systems theory, which views the family as a complex system of interacting individuals. The research is conducted through a series of interviews with parents and children, as well as through the analysis of family records. The findings of the study indicate that the family environment plays a significant role in the child's development, particularly in terms of emotional and social skills. The study also highlights the importance of the parent-child relationship and the need for a supportive and nurturing family environment. The results of the study have implications for family therapy and for the development of interventions aimed at improving family functioning. The study is limited by its reliance on self-reported data and its focus on a specific population. Further research is needed to explore the role of the family in the development of the child's personality in different cultural contexts.

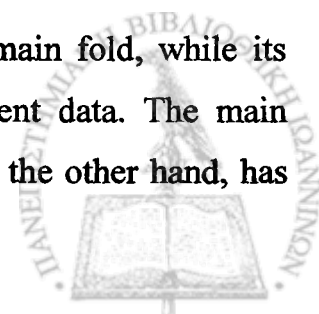




## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHROMATIN-RELATED PROTEINS

**Dimos Bolis**

In eukaryotic cells, the genetic material is packed in a highly condensed structure, known as chromatin. The formation of this hypermolecular structure buries DNA loci thus limiting their accessibility. Although this "arrangement" can be viewed as a brilliant mechanism for the accommodation of charges and mass in a tiny space, key cellular processes linked to DNA transactions or chromatin state transitions require access of the appropriate protein machinery to their substrate. Protein complexes called chromatin remodelers often mediate the rearrangement of chromatin components and the alteration of DNA loci accessibility. Many protein components of such complexes are made up from combinations of several, clearly identifiable, domains or modules, which are structurally and functionally autonomous. Among them, a protein domain known as **chromodomain**, is thought to play a central role in chromatin remodeling by interacting with chromatin components, in particular post-translationally modified histones. While the atomic resolution structure of the chromodomain of Heterochromatin Protein 1 (HP1) bound to di- and tri-methylated histone H3 revealed for the first time how a class of chromodomains recognize patterns on the protein components of chromatin, the mechanism of action of other classes of chromodomains remains poorly understood. Such chromodomains belong to Drosophila's MOF and Mi-2 proteins, the only two members of this class implicated in nucleic acid binding to date. Determination of the tertiary structure of MOF proved that it does not adopt the chromodomain fold, while its initially presumed RNA-binding has not been confirmed by more recent data. The main determinant of nucleosome recognition by the dMi-2 chromodomain, on the other hand, has



been reported to be nucleosomal DNA rather than histones. However, the structural determinants of chromodomains indicative of nucleic acid binding have not been identified to date.

To shed some light onto the mode of recognition of nucleosomal DNA by a chromodomain, we solved by multi-dimensional NMR spectroscopy the 3D structure of the chromodomain c2 of dMi-2 protein and explored its structure/function relationship. The domain was produced in bacteria and was shown to bind to dsDNA of various lengths in a sequence-independent manner and to histone H3. C2 folds into a compact globular domain made up of three anti-parallel  $\beta$ -strands and a C-terminal  $\alpha$ -helix packed together in the canonical  $\alpha+\beta$  chromodomain fold. Analysis of the electrostatic surface potential calculated for c2 reveals a large and distinct positively charged patch on one face of the domain, despite its overall acidic pI (pI=4.90). This feature is not shared by other chromodomains of known structure and function and suggests that this patch could be the site of interaction with DNA. The aromatic cage, which is crucial in histone tail binding by typical chromodomains, such as HP1 and Polycomb, is present on the surface of c2, but significantly altered. A search of the Brookhaven Protein Databank for structural homologues revealed remarkable structural similarity of c2 with both chromo and chromoshadow domains. c2 was also found to have a clear tendency for oligomerization.

Overall, the biochemical, biophysical and structural analysis of c2 showed that this chromodomain shares features of both the chromo and chromoshadow protein families and is able to interact with more than one chromatin components. The information gained from this study strongly supports the hypothesis that the chromodomain fold can be viewed as a successful structural scaffold that allows a considerable sequence variation to fulfill various functions in different molecular contexts.

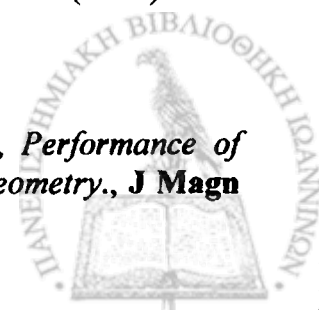


# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



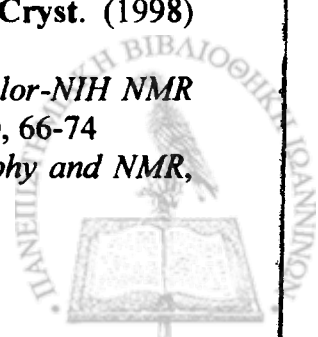
1. Kornberg, RD, "*Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*", **Science**. (1974); 184
2. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*, **Nature** (1997) 389(6648):251-60
3. Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ, "*X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre*", **Nature** (2005) 436: 138-141
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, **Molecular Biology of the Cell**, 4<sup>th</sup> Edition, Garland Science (2002)
5. Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell JE., **Molecular Cell Biology**, 4<sup>th</sup> Edition, W. H. Freeman (2000)
6. Franke W., *Structure, Biochemistry and Functions of the nuclear envelope*, **Init. Rev. Cytol, Suppl.** (1974)
7. Tyler JK., Kadonaga J.T., *The "Dark Side" of Chromatin Remodeling: Repressive Effects on Transcription*, **Cell** (1999) 99; 443- 446
8. Strahl BD., Allis CD., *The Language of Covalent Histone Modification*, **Nature** (2000) 403 (6765) 41-5
9. Jenuwein T., Allis CD., *Translating the histone code*. **Science** (2001) 293 (5532): 1074-80
10. Ng HH., Feng Q., Wang H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Zhang Y., Struhl K., *Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association*, **Genes Dev.** (2002) 16 (12): 1518-27
11. Nielsen AL., Oulad-Abdelghanni M., Ortiz JA., Remboutsika E., Chambon P., Losson R., *Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins*. **Mol. Cell** (2001) (4): 729-39
12. Vakoc CR., Mandat SA., Olenchock BA., Blobel GA., *Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin*. **Mol. Cell** (2005) 19 (3): 381-91
13. Talasz H., Lindner HH., Sarg B., Hellinger W., *Histone H4 lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation*. **J. Biol. Chem.** (2005) 280 (46) 38814-22
14. Bottomley MJ., *Structures of protein domains that create or recognize histone modifications*, **EMBO rep.** (2004) 5 (5): 464-9
15. Ball LJ., Murzina NV., Broadhurst RW., Raine ARC., Archer SJ., Stott FJ., Murzin AG., Singh PB., Dmaille PJ., Laue ED., *Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1*, **EMBO J.** (1997); 16 2473
16. Cryderman DE, Grade SK, Li Y, Fanti L, Pimpinelli S, Wallrath LL., *Role of Drosophila HP1 in euchromatic gene expression.*, **Dev Dyn.** (2005) 232 (3) : 767-74.
17. Piacentini L, Fanti L, Berloco M, Perrini B, Pimpinelli S., *Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in Drosophila euchromatin.*, **J Cell Biol.** (2003) 161(4):707-14..
18. Hwang KK, Eissenberg JC, Worman HJ., *Transcriptional repression of euchromatic genes by Drosophila heterochromatin protein 1 and histone modifiers.*, **Proc Natl Acad Sci U S A.** (2001) 98(20):11423-7.
19. Minc E, Courvalin JC, Buendia B., *HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes.*, **Cytogenet Cell Genet.** (2000) 90(3-4):279-84.

20. Jacobs SA, Khorasanizadeh S., *Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail.* **Science** (2002) 295:2080-2083
21. Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T, Murzin AG, Murzina NV, Laue ED., *Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9.* **Nature** (2002) 416:103-107.
22. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S., *Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains.*, **Genes Dev.** (2003) 17(15):1870-81.
23. Bouazoune K, Mitterweger A, Langst G, Imhof A, Akhtar A, Becker PB, Brehm A. *The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization.* **EMBO J.** (2002) 21:2430-2440
24. Akhtar A, Zink D, Becker PB., *Chromodomains are protein-RNA interaction modules.* **Nature.** (2000) 407(6802):405-9.
25. Nielsen PR., Nietlispach D., Buscaino A., Warner RJ., Akhtar A., Murzin AG., Murzina NV., Laue ED., *Structure of the chromo barrel domain from the MOF acetyltransferase.* **J. Biol. Chem.** (2005) 280(37):32326-31
26. Zhang Y., LeRoy G., Seelig HP., Lane WS., Reinberg D., *The dermatomyosis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities.* **Cell** (1998) 95; 279-289
27. Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M, Musco G., *NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease.*, **J Biol Chem.** (2005) 280 (12): 11505-12. Epub 2005 Jan 13.
28. Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF., *The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation.*, **Trends Biochem Sci.** (1995) 20(2):56-9.
29. Bianchi ME, Agresti A., *HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation.* **Curr Opin Genet Dev.** (2005) 15(5):496-506.
30. S. Su, Y. Gao, H. Robinson, Y. Liaw, SP. Edmondson, JW. Shriver AHJ. Wang, *Crystal Structures of the Chromosomal Proteins Sso7d/Sac7d Bound to DNA Containing T-G Mismatched Base-pairs,* **J Mol Biol.** (2000) 303; 395-403
31. Edmondson SP, Qiu L, Shriver JW., *Solution structure of the DNA-binding protein Sac7d from the hyperthermophile Sulfolobus acidocaldarius.*, **Biochemistry.** (1995) 34(41):13289-304.
32. McAfee JG, Edmondson SP, Zegar I, Shriver JW., *Equilibrium DNA binding of Sac7d protein from the hyperthermophile Sulfolobus acidocaldarius: fluorescence and circular dichroism studies.*, **Biochemistry.** (1996) 35(13):4034-45.
33. Holm L, Sander C., *Abstract Protein structure comparison by alignment of distance matrices.* **J Mol Biol** (1993) 233(1):123-38.
34. Holm L, Sander C., *Dali: a network tool for protein structure comparison.*, **Trends Biochem Sci.** (1995) 20(11):478-80.
35. Holm L, Sander C., *Mapping the protein universe.*, **Science.** (1996) 273 (5275): 595-603.
36. Voehler MW, Collier G, Young JK, Stone MP, Germann MW., *Performance of cryogenic probes as a function of ionic strength and sample tube geometry.*, **J Magn**



- Reson.** (2006) 183(1):102-9.
37. Lane AN, Arumugam S., *Improving NMR sensitivity in room temperature and cooled probes with dipolar ions.*, **J Magn Reson.** (2005) 173(2):339-43.
  38. Kelly AE, Ou HD, Withers R, Dotsch V., *Low-conductivity buffers for high-sensitivity NMR measurements.*, **J Am Chem Soc.** (2002) 124(40):12013-9.
  39. De Marco V, Stier G, Blandin S, de Marco A., *The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA.*, **Biochem Biophys Res Commun.** (2004) 322(3):766-71
  40. Nallamsetty S, Waugh DS., *Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners.*, **Protein Expr Purif.** (2006) 45(1):175-82
  41. Sørensen H. P., Mortensen K. K., *Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli*, **Microbial Cell Factories** (2005), 4:1
  42. Waugh D. S., *Making the most of affinity tags*, **TRENDS in Biotechnology** (2005) 23(6)
  43. Nietlispach D., *Structure Determination of Biological Macromolecules by Solution NMR*, **EMBO practical course**, Basel (2005)
  44. Tugarinov V, Choy WY, Orekhov VY, Kay LE. , *Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme.*, **Proc Natl Acad Sci U S A.** (2005) 102(3):622-7
  45. Horst R, Bertelsen EB, Fiaux J, Wider G, Horwich AL, Wuthrich K., *Direct NMR observation of a substrate protein bound to the chaperonin GroEL.*, **Proc Natl Acad Sci U S A.** (2005) 102(36):12748-53.
  46. Pervushin K, Riek R, Wider G, Wuthrich K., *Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution.*, **Proc Natl Acad Sci U S A.** (1997) 94(23):12366-71.
  47. Salzmann M, Pervushin K, Wider G, Senn H, Wuthrich K., *TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins.*, **Proc Natl Acad Sci U S A.** (1998) 95(23):13585-90.
  48. Wider G, Wuthrich K., *NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution.*, **Curr Opin Struct Biol.** (1999) 9(5):594-601.
  49. Goto NK, Kay LE., *New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy.*, **Curr Opin Struct Biol.** (2000) 10(5):585-92
  50. Ralston G., *Introduction to Analytical Ultracentrifugation*, **Beckman handbook**
  51. Berg J., Tymoczko J., Stryer L., *Biochemistry*, 5<sup>th</sup> Edition, **Freeman**
  52. Wagner G, Kumar A, Wuthrich K. *Systematic application of two-dimensional 1H nuclear-magnetic-resonance techniques for studies of proteins. 2. Combined use of correlated spectroscopy and nuclear Overhauser spectroscopy for sequential assignments of backbone resonances and elucidation of polypeptide secondary structures.* **Eur J Biochem.** (1981) 114(2):375-84.
  53. M. Rance, O. Sorensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. Ernst, K. Wuthrich, *Improved spectral resolution in COSY 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering.* **Biochemical and Biophysical Research Communications** (1983)117(2):479-485
  54. Wuthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, **J. Wiley & Sons: N.Y** (1986)
  55. Herrmann, T., Guntert, P. & Wuthrich, K. *Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle*

- dynamics algorithm DYANA. J. Mol. Biol.* (2002), 319, 209-227
56. Guntert P., *Automated NMR protein structure calculation with CYANA, Meth. Mol. Biol.* (2004), 278, 353-378
  57. JP Linge, SI O'Donoghue and M Nilges, *Assigning Ambiguous NOEs with ARIA, Methods in Enzymology* (2001), 339, 71-90.
  58. M Nilges, *Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. , Journal of Molecular Biology* (1995), 645-660.
  59. Bax A, Ikura M., *An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and 15N backbone amide resonances with the alpha-carbon of the preceding residue in uniformly 15N/13C enriched proteins. J Biomol NMR.* (1991) 1(1):99-104.
  60. Friedrichs MS, Mueller L, Wittekind M., *An automated procedure for the assignment of protein 1HN, 15N, 13C alpha, 1H alpha, 13C beta and 1H beta resonances., J Biomol NMR.* (1994) 4(5):703-26.
  61. M. Sattler, J. Schleucher, and C. Griesinger, *Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* (1999), 34, 93-158.
  62. Clore GM, Bax A, Driscoll PC, Wingfield PT, Gronenborn AM., *Assignment of the side-chain 1H and 13C resonances of interleukin-1 beta using double- and triple-resonance heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy, Biochemistry.* (1990) 29(35):8172-84.
  63. Ikura M, Spera S, Barbato G, Kay LE, Krinks M, Bax A., *Secondary structure and side-chain 1H and 13C resonance assignments of calmodulin in solution by heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy., Biochemistry.* (1991) 30(38):9216-28.
  64. Toshio Yamazaki, Julie D. Forman-Kay, Lewis E. Kay, *Two-dimensional NMR experiments for correlating carbon-13.beta. and proton.delta./epsilon. chemical shifts of aromatic residues in 13C-labeled proteins via scalar couplings, J. Am. Chem. Soc.* (1993) 115(23); 11054-11055.
  65. F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer and A. Bax, *NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR.* (1995) 6, 277-293.
  66. Ch. Bartels, T.-H. Xia, M. Billeter, P. Guntert and K. Wuthrich, *The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. J. Biomolecular NMR* (1995) 5, 1-10
  67. Gabriel Cornilescu, Frank Delaglio, and Ad Bax, *Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology, J. Biomol. NMR,* (1999) 13 289-302
  68. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L.. *Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination, Acta Cryst.* (1998) D54, 905-921.
  69. C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, N. Tjandra and G.M. Clore, *The Xplor-NIH NMR Molecular Structure Determination Package, J. Magn. Res.,* (2003) 160, 66-74
  70. Brunger, A.T. *X-PLOR Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR,* Yale University Press, (1992).

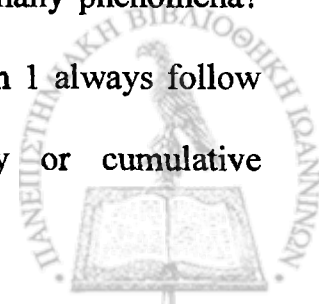


71. <http://www.bruker-biospin.com/topspin.html>
72. Koradi, R., Billeter, M., and Wuthrich, K., *MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures*, **J Mol Graphics** (1996) 14, 51-55
73. <http://pymol.sourceforge.net/>
74. Roger A. Sayle and E. J. Milner-White, "RasMol: Biomolecular graphics for all", *Trends in Biochemical Science TIBS*, (1995), Vol. 20, No. 9, p.374
75. <http://www.originlab.com>
76. B. Xia, V. Tsui, D. A. Case, H. J. Dyson. P. E. Wright, *Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water*, **J. Biomol. NMR**, (2002) 22: 317-331
77. A. J. Nederveen, J. F. Doreleijers, W. Vranken, Z. Miller, C. A.E.M. Spronk, S. B. Nabuurs, P. Guentert, M. Livny, J. L. Markley, M. Nilges, E. L. Ulrich, R. Kaptein, Al. M.J.J. Bonvin. *RECOORD: a REcalculated COORDinates Database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank*. **Proteins** (2005) 59, 662-672.
78. Laskowski R A, Rullmann J A C, MacArthur M W, Kaptein R, Thornton J M, *AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR*. **J. Biomol. NMR**, (1996) 8, 477-486.
79. Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S & Thornton J M, *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. **J. Appl. Cryst.** (1993), 26, 283-291.
80. Morris A L, MacArthur M W, Hutchinson E G & Thornton J M, *Stereochemical quality of protein structure coordinates*. **Proteins** (1992) 12, 345-364.
81. G.Vriend, *WHAT IF: A molecular modeling and drug design program*, **J. Mol. Graph.** (1990) 8, 52-56.
82. Rich A., *Why RNA and DNA have different structures*, **Handb. Exp. Pharmacol.** (2006) 173;1-8
83. <http://apbs.sourceforge.net/>
84. Baker NA., Sept D., Joseph S., Holst MJ., McCammon JA., *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. **Proc. Nat. Acad. Sci.** (2001) 98;10037-10041
85. Jacobs SA, Fischle W, Khorasanizadeh S., *Assays for the determination of structure and dynamics of the interaction of the chromodomain with histone peptides.*, **Methods Enzymol.** (2004) 376:131-48.
86. Holm L, Park J., *DaliLite workbench for protein structure comparison.*, **Bioinformatics.** (2000) 16(6):566-7.
87. Notredame C., Higgins D., Heringa J., *T-Coffee: A novel method for multiple alignments* **J. Mol. Biol.** (2000) 302, 205-217
88. Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, Broadhurst RW, Ball LJ, Murzina NV, Laue ED., *The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer.*, **EMBO J.** (2000) 19(7):1587-97.
89. Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, Hirshberg M, Verreault A, Murzina NV, Laue ED., *Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide*



- interactions and HP1 localisation to heterochromatin., **EMBO J.** (2004) 23(3):489-99
90. Huang Y, Myers MP, Xu RM., *Crystal structure of the HP1-EMSY complex reveals an unusual mode of HP1 binding*, **Structure** (2006) 14(4):703-12
  91. Bedell, J.L., Edmondson, S.P., Shriver, J.W. *Role of a surface tryptophan in defining the structure, stability, and DNA binding of the hyperthermophile protein sac7d*. **Biochemistry** (2005) 44 915-925
  92. Flanagan JF, Mi LZ, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, Minor W, Rastinejad F, Khorasanizadeh S., *Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail.*, **Nature**. (2005) 438(7071):1181-5.
  93. Okuda M., Horikoshi M., Nishimura Y., *Structural Polymorphism of Chromodomains in Chd1*, **J. Mol. Biol.** (2006)
  94. Flanagan JF, Blus BJ, Kim D, Clines KL, Rastinejad F, Khorasanizadeh S., *Molecular Implications of Evolutionary Differences in CHD Double Chromodomains*. **J Mol Biol.** (2007)
  95. Wishart DS, Sykes BD, Richards FM., *Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure.*, **J Mol Biol.** (1991) 20;222(2):311-33.
  96. Wishart DS, Sykes BD, Richards FM., *The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy.*, **Biochemistry**. (1992) 18;31(6):1647-51.
  97. Neal S, Berjanskii M, Zhang H, Wishart DS., *Accurate prediction of protein torsion angles using chemical shifts and sequence homology.*, **Magn Reson Chem.** (2006) ;44 Spec No:S158-67.
  98. Sambrook, Fritsch, Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual* **Cold Spring Harbor Laboratory Press** (1989) 2<sup>nd</sup> Edition.
  99. The QIA expressionist, a handbook for high-level expression and purification of 6x His tagged proteins **QIAGEN** (2003) 5<sup>th</sup> Edition
  100. Vogelstein B, Gillespie D., *Preparative and analytical purification of DNA from agarose.*, **Proc Natl Acad Sci U S A.** (1979);76(2):615-9.
  101. [http://www.embl.de/ExternalInfo/protein\\_unit/draft\\_frames/frame\\_which\\_vector\\_ext.htm](http://www.embl.de/ExternalInfo/protein_unit/draft_frames/frame_which_vector_ext.htm)
  102. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*, **Methods Enzymology** (1990) 185
  103. Schagger H., von Jagow G., *Tricine- sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa*, **Analytical Biochemistry** (1987) 166, 368-379
  104. Dill KA, Truskett TM, Vlachy V, Hribar-Lee B., *Modeling water, the hydrophobic effect, and ion solvation.*, **Annu Rev Biophys Biomol Struct.** (2005);34:173-99.
  105. Yue K, Dill KA., *Forces of tertiary structural organization in globular proteins.*, **Proc Natl Acad Sci U S A.** (1995) 92(1):146-50.
  106. Brehm A, Langst G, Kehle J, Clapier CR, Imhof A, Eberharder A, Muller J, Becker PB., *dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties*. **EMBO J.** (2000) 19(16):4332-41.
  107. Murawsky CM, Brehm A, Badenhorst P, Lowe N, Becker PB, Travers AA., *Tramtrack69 interacts with the dMi-2 subunit of the Drosophila NuRD chromatin*

- remodelling complex.*, **EMBO Rep.** (2001) 2(12):1089-94.
108. Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, Christen B, Kennison JA, Bienz M, Muller J., *dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression.* **Science.** (1998) 282(5395):1897-900.
109. Lakowich, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, **Plenum Press New York & London** (1982)
110. Van Holde K.E., Johnson W.C., Ho P.S., *Principles of physical biochemistry*; **Prentice Hall** (1998)
111. Radhakrishnan I, Perez-Alvarado GC, Parker D, Dyson HJ, Montminy MR, Wright PE, *Structural analyses of CREB-CBP transcriptional activator-coactivator complexes by NMR spectroscopy: implications for mapping the boundaries of structural domains*, **J Mol Biol.** (1999) 287(5):859-65.
112. Iwaya N, Goda N, Unzai S, Fujiwara K, Tanaka T, Tomii K, Tochio H, Shirakawa M, Hiroaki H. *Fine-tuning of protein domain boundary by minimizing potential coiled coil regions.*, **J Biomol NMR.** (2007) 37(1):53-63.
113. Politou AS, Gautel M, Joseph C, Pastore A. *Immunoglobulin-type domains of titin are stabilized by amino-terminal extension.*, **FEBS Lett.** (1994) 352(1):27-31.
114. Hamill SJ, Meekhof AE, Clarke J., *The effect of boundary selection on the stability and folding of the third fibronectin type III domain from human tenascin.* **Biochemistry.** (1998) 37(22):8071-9.
115. Pfuhl M, Improta S, Politou AS, Pastore A. *When a module is also a domain: the role of the N terminus in the stability and the dynamics of immunoglobulin domains from titin.*, **J Mol Biol.** (1997) 265(2):242-56.
116. Wheelan SJ, Marchler-Bauer A, Bryant SH., *Domain size distributions can predict domain boundaries.* **Bioinformatics.** (2000) 16(7):613-8.
117. Rigden DJ., *Use of covariance analysis for the prediction of structural domain boundaries from multiple protein sequence alignments.*, **Protein Eng.** (2002) 15(2):65-77.
118. Macias MJ, Gervais V, Civera C, Oschkinat H., *Structural analysis of WW domains and design of a WW prototype.*, **Nat Struct Biol.** (2000) 7(5):375-9.
119. Adinolfi S, Bagni C, Castiglione Morelli MA, Fraternali F, Musco G, Pastore, *A Novel RNA-binding motif: the KH module.*, **Biopolymers.** (1999) 51(2):153-64.
120. Ευσταθίου Κ., *Αγγλοελληνικό λεξικό χημικών και συγγενών με τη χημεία όρων*, **Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών- Τμήμα Χημείας** (1998).
121. Kusch T, Workman JL. *Histone variants and complexes involved in their exchange.* **Subcell Biochem.** 2007;41:91-109.
122. Li G, Widom J. *Nucleosomes facilitate their own invasion.* **Nat Struct Mol Biol.** (2004) 11(8):763-9.
123. Chakravarthy S, Park YJ, Chodaparambil J, Edayathumangalam RS, Luger K. *Structure and dynamic properties of nucleosome core particles.* **FEBS Lett.** (2005) 579(4):895-8.
124. Langst G, Becker PB. *Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena?* **Biochim Biophys Acta.** (2004)1677(1-3):58-63.
125. Li Y, Kirschmann DA, Wallrath LL. *Does heterochromatin protein 1 always follow code?* **Proc Natl Acad Sci U S A.** (2002)99 Suppl 4:16462-9.
126. Henikoff S. *Histone modifications: combinatorial complexity or cumulative simplicity?* **Proc Natl Acad Sci U S A.** (2005)102(15):5308-9.



127. Dion, M. F., Altschuler, S. J., Wu, L. F. & Rando, O. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:, 5501–5506.
128. Dialynas GK, Makatsori D, Kourmouli N, Theodoropoulos PA, McLean K, Terjung S, Singh PB, Georgatos SD. Methylation-independent binding to histone H3 and cell cycle-dependent incorporation of HP1beta into heterochromatin. *J Biol Chem.* 2006 281(20):14350-60.
129. Hughes RM, Wiggins KR, Khorasanizadeh S, Waters ML. Recognition of trimethyllysine by a chromodomain is not driven by the hydrophobic effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, in press.
130. Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, Christen B, Kennison JA, Bienz M, Muller J. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science.* (1998) 282(5395):1897-900.
131. Brehm A, Langst G, Kehle J, Clapier CR, Imhof A, Eberharter A, Muller J, Becker PB. dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *EMBO J.* (2000) 19(16):4332-41.
132. Khattak S, Lee BR, Cho SH, Ahnn J, Spoerel NA. Genetic characterization of *Drosophila* Mi-2 ATPase. *Gene.* (2002) 293(1-2):107-14.
133. Yamasaki Y, Nishida Y. Mi-2 chromatin remodeling factor functions in sensory organ development through proneural gene repression in *Drosophila*. *Dev Growth Differ.* (2006) 48(7):411-8.
134. Stevens, R. C.. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure Fold Des* 20008: R177-85.
135. Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci.* (2003) 28(2):69-74.
136. Morales V, Straub T, Neumann MF, Mengus G, Akhtar A, Becker PB. Functional integration of the histone acetyltransferase MOF into the dosage compensation complex. *EMBO J.* (2004) 23(11):2258-68.



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**  
**ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ ΤΟΥ CHROMODOMAIN**  
**c2 ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ dMi-2**

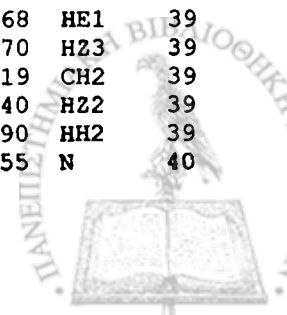


## Χημικές μετατοπίσεις του συνόλου των πυρήνων του EED-c2 που αποδόθηκαν

Σε κάθε στήλη εμφανίζονται, κατά σειρά, η αρίθμηση του πυρήνα, η χημική του μετατόπιση, το όνομά του και η αρίθμηση του αμινοξέος στο οποίο ανήκει.

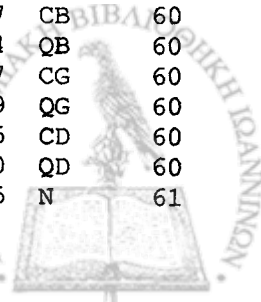
|     |        |     |    |     |        |     |    |     |        |      |    |
|-----|--------|-----|----|-----|--------|-----|----|-----|--------|------|----|
| 3   | 43.33  | CA  | 1  | 123 | 8.17   | H   | 11 | 218 | 7.55   | HE3  | 16 |
| 6   | 3.86   | QA  | 1  | 124 | 45.40  | CA  | 11 | 219 | 122.09 | CZ3  | 16 |
| 8   | 123.61 | N   | 2  | 125 | 3.97   | HA2 | 11 | 220 | 114.51 | CZ2  | 16 |
| 9   | 8.66   | H   | 2  | 126 | 3.89   | HA3 | 11 | 221 | 10.11  | HE1  | 16 |
| 10  | 14.67  | CA  | 2  | 129 | 120.40 | N   | 12 | 222 | 7.09   | HZ3  | 16 |
| 11  | 4.32   | HA  | 2  | 130 | 7.98   | H   | 12 | 223 | 124.67 | CH2  | 16 |
| 12  | 1.41   | QB  | 2  | 131 | 24.21  | CA  | 12 | 224 | 7.44   | HZ2  | 16 |
| 13  | 19.23  | CB  | 2  | 132 | 4.01   | HA  | 12 | 225 | 7.19   | HH2  | 16 |
| 18  | 118.69 | N   | 3  | 133 | 32.56  | CB  | 12 | 227 | 122.91 | N    | 17 |
| 19  | 8.53   | H   | 3  | 134 | 2.02   | HB  | 12 | 228 | 7.77   | H    | 17 |
| 20  | 17.77  | CA  | 3  | 137 | 21.08  | CG1 | 12 | 229 | 16.48  | CA   | 17 |
| 21  | 4.43   | HA  | 3  | 141 | 21.08  | CG2 | 12 | 230 | 4.27   | HA   | 17 |
| 22  | 32.51  | CB  | 3  | 145 | 0.90   | QOG | 12 | 231 | 42.69  | CB   | 17 |
| 23  | 2.10   | HB2 | 3  | 147 | 127.60 | N   | 13 | 234 | 1.63   | QB   | 17 |
| 24  | 2.04   | HB3 | 3  | 148 | 8.24   | H   | 13 | 235 | 27.18  | CG   | 17 |
| 26  | 32.06  | CG  | 3  | 149 | 15.70  | CA  | 13 | 236 | 1.59   | HG   | 17 |
| 27  | 2.61   | HG2 | 3  | 150 | 4.51   | HA  | 13 | 237 | 0.88   | QD1  | 17 |
| 28  | 2.53   | HG3 | 3  | 151 | 32.25  | CB  | 13 | 238 | 0.83   | QD2  | 17 |
| 30  | 2.07   | QE  | 3  | 152 | 1.70   | HB2 | 13 | 239 | 25.04  | CD1  | 17 |
| 31  | 16.84  | CE  | 3  | 153 | 1.54   | HB3 | 13 | 243 | 25.65  | CD2  | 17 |
| 36  | 120.80 | N   | 4  | 155 | 29.01  | CG  | 13 | 251 | 21.59  | CA   | 18 |
| 37  | 8.40   | H   | 4  | 158 | 1.57   | QG  | 13 | 252 | 4.55   | HA   | 18 |
| 38  | 18.67  | CA  | 4  | 159 | 24.43  | CD  | 13 | 253 | 41.27  | CB   | 18 |
| 39  | 4.28   | HA  | 4  | 160 | 1.35   | HD2 | 13 | 254 | 1.74   | HB   | 18 |
| 40  | 30.06  | CB  | 4  | 161 | 1.32   | HD3 | 13 | 255 | 0.88   | QG2  | 18 |
| 41  | 2.07   | HB2 | 4  | 163 | 42.13  | CE  | 13 | 256 | 17.11  | CG2  | 18 |
| 42  | 1.95   | HB3 | 4  | 166 | 2.91   | QE  | 13 | 260 | 27.48  | CG1  | 18 |
| 44  | 36.34  | CG  | 4  | 174 | 12.43  | CD  | 14 | 261 | 1.58   | HG12 | 18 |
| 47  | 2.27   | QG  | 4  | 175 | 24.86  | CA  | 14 | 262 | 1.09   | HG13 | 18 |
| 50  | 121.74 | N   | 5  | 176 | 4.21   | HA  | 14 | 264 | 0.84   | QD1  | 18 |
| 51  | 8.46   | H   | 5  | 177 | 31.86  | CB  | 14 | 265 | 12.83  | CD1  | 18 |
| 52  | 18.80  | CA  | 5  | 178 | 2.00   | HB2 | 14 | 270 | 128.30 | N    | 19 |
| 53  | 4.23   | HA  | 5  | 179 | 1.50   | HB3 | 14 | 271 | 8.74   | H    | 19 |
| 54  | 30.19  | CB  | 5  | 181 | 27.18  | CG  | 14 | 272 | 27.05  | CA   | 19 |
| 55  | 2.06   | HB2 | 5  | 182 | 1.87   | HG2 | 14 | 273 | 3.15   | HA   | 19 |
| 56  | 1.96   | HB3 | 5  | 183 | 1.82   | HG3 | 14 | 274 | 32.06  | CB   | 19 |
| 58  | 36.34  | CG  | 5  | 185 | 3.76   | HD2 | 14 | 275 | 1.70   | HB   | 19 |
| 61  | 2.27   | QG  | 5  | 186 | 3.48   | HD3 | 14 | 276 | 0.58   | QG1  | 19 |
| 64  | 121.97 | N   | 6  | 189 | 120.33 | N   | 15 | 277 | 0.36   | QG2  | 19 |
| 65  | 8.38   | H   | 6  | 190 | 8.45   | H   | 15 | 278 | 23.52  | CG1  | 19 |
| 66  | 16.35  | CA  | 6  | 191 | 19.06  | CA  | 15 | 282 | 21.38  | CG2  | 19 |
| 68  | 30.44  | CB  | 6  | 192 | 3.94   | HA  | 15 | 288 | 128.30 | N    | 20 |
| 78  | 121.50 | N   | 7  | 193 | 29.93  | CB  | 15 | 289 | 9.13   | H    | 20 |
| 79  | 8.32   | H   | 7  | 194 | 2.06   | HB2 | 15 | 290 | 18.93  | CA   | 20 |
| 80  | 18.54  | CA  | 7  | 195 | 1.92   | HB3 | 15 | 291 | 3.98   | HA   | 20 |
| 82  | 41.66  | CB  | 7  | 203 | 117.99 | N   | 16 | 292 | 30.32  | CB   | 20 |
| 101 | 4.83   | HA  | 9  | 204 | 7.46   | H   | 16 | 295 | 1.74   | QB   | 20 |
| 102 | 32.51  | CB  | 9  | 205 | 17.51  | CA  | 16 | 296 | 36.34  | CG   | 20 |
| 112 | 120.80 | N   | 10 | 206 | 4.73   | HA  | 16 | 297 | 2.09   | HG2  | 20 |
| 113 | 8.40   | H   | 10 | 207 | 29.93  | CB  | 16 | 298 | 1.95   | HG3  | 20 |
| 114 | 18.67  | CA  | 10 | 208 | 3.24   | HB2 | 16 | 301 | 112.25 | NE2  | 20 |
| 115 | 4.56   | HA  | 10 | 209 | 3.14   | HB3 | 16 | 302 | 7.61   | HE21 | 20 |
| 116 | 41.40  | CB  | 10 | 212 | 126.86 | CD1 | 16 | 303 | 7.15   | HE22 | 20 |
| 117 | 2.66   | HB2 | 10 | 214 | 120.92 | CE3 | 16 | 306 | 112.40 | N    | 21 |
| 118 | 2.60   | HB3 | 10 | 216 | 129.32 | NE1 | 16 | 307 | 7.77   | H    | 21 |
| 122 | 109.08 | N   | 11 | 217 | 7.11   | HD1 | 16 | 308 | 16.61  | CA   | 21 |

|     |        |      |    |     |        |     |    |     |        |     |    |
|-----|--------|------|----|-----|--------|-----|----|-----|--------|-----|----|
| 309 | 4.46   | HA   | 21 | 432 | 121.74 | N   | 27 | 532 | 2.60   | HG2 | 34 |
| 310 | 33.19  | CB   | 21 | 433 | 8.81   | H   | 27 | 533 | 2.37   | HG3 | 34 |
| 311 | 1.95   | HB2  | 21 | 434 | 24.34  | CA  | 27 | 535 | 1.94   | QE  | 34 |
| 312 | 1.72   | HB3  | 21 | 435 | 4.87   | HA  | 27 | 536 | 16.84  | CE  | 34 |
| 314 | 26.57  | CG   | 21 | 436 | 31.82  | CB  | 27 | 541 | 118.69 | N   | 35 |
| 315 | 1.37   | HG2  | 21 | 437 | 3.87   | HB  | 27 | 542 | 9.35   | H   | 35 |
| 316 | 1.26   | HG3  | 21 | 438 | 1.29   | QG2 | 27 | 543 | 19.96  | CA  | 35 |
| 318 | 43.35  | CD   | 21 | 440 | 21.69  | CG2 | 27 | 544 | 5.08   | HA  | 35 |
| 321 | 3.22   | QD   | 21 | 445 | 130.88 | N   | 28 | 545 | 42.17  | CB  | 35 |
| 334 | 121.50 | N    | 22 | 446 | 9.03   | H   | 28 | 546 | 2.74   | HB2 | 35 |
| 335 | 8.58   | H    | 22 | 447 | 13.13  | CA  | 28 | 547 | 2.27   | HB3 | 35 |
| 336 | 23.31  | CA   | 22 | 448 | 4.43   | HA  | 28 | 550 | 133.11 | CD1 | 35 |
| 337 | 4.34   | HA   | 22 | 449 | 1.48   | QB  | 28 | 552 | 117.80 | CE1 | 35 |
| 338 | 33.32  | CB   | 22 | 450 | 20.65  | CB  | 28 | 561 | 6.72   | QE  | 35 |
| 339 | 1.51   | HB   | 22 | 455 | 121.03 | N   | 29 | 562 | 6.82   | QD  | 35 |
| 340 | 0.48   | QG1  | 22 | 456 | 8.70   | H   | 29 | 564 | 127.60 | N   | 36 |
| 341 | 0.40   | QG2  | 22 | 457 | 20.73  | CA  | 29 | 565 | 7.88   | H   | 36 |
| 342 | 22.30  | CG1  | 22 | 458 | 3.98   | HA  | 29 | 566 | 15.19  | CA  | 36 |
| 346 | 22.60  | CG2  | 22 | 459 | 29.67  | CB  | 29 | 567 | 3.67   | HA  | 36 |
| 352 | 118.69 | N    | 23 | 460 | 1.99   | HB2 | 29 | 568 | 40.50  | CB  | 36 |
| 353 | 8.81   | H    | 23 | 461 | 1.86   | HB3 | 29 | 569 | 0.84   | HB2 | 36 |
| 354 | 22.92  | CA   | 23 | 463 | 25.96  | CG  | 29 | 570 | -1.43  | HB3 | 36 |
| 355 | 4.50   | HA   | 23 | 464 | 1.81   | HG2 | 29 | 572 | 25.65  | CG  | 36 |
| 356 | 40.37  | CB   | 23 | 465 | 1.59   | HG3 | 29 | 573 | 0.42   | HG  | 36 |
| 357 | 1.89   | HB   | 23 | 467 | 42.74  | CD  | 29 | 574 | 0.62   | QD1 | 36 |
| 358 | 0.85   | QG2  | 23 | 468 | 3.28   | HD2 | 29 | 575 | -0.62  | QD2 | 36 |
| 359 | 18.02  | CG2  | 23 | 469 | 3.18   | HD3 | 29 | 576 | 25.96  | CD1 | 36 |
| 363 | 25.96  | CG1  | 23 | 471 | 113.13 | NE  | 29 | 580 | 19.55  | CD2 | 36 |
| 366 | 1.07   | QG1  | 23 | 472 | 7.33   | HE  | 29 | 586 | 128.30 | N   | 37 |
| 367 | 0.70   | QD1  | 23 | 483 | 115.41 | N   | 30 | 587 | 8.99   | H   | 37 |
| 368 | 13.45  | CD1  | 23 | 484 | 7.83   | H   | 30 | 588 | 24.21  | CA  | 37 |
| 373 | 117.29 | N    | 24 | 485 | 15.19  | CA  | 30 | 589 | 3.75   | HA  | 37 |
| 374 | 7.43   | H    | 24 | 486 | 4.52   | HA  | 30 | 590 | 33.70  | CB  | 37 |
| 375 | 13.25  | CA   | 24 | 487 | 40.24  | CB  | 30 | 591 | 1.49   | HB  | 37 |
| 376 | 5.32   | HA   | 24 | 488 | 3.07   | HB2 | 30 | 592 | 0.33   | QG1 | 37 |
| 377 | 41.27  | CB   | 24 | 489 | 2.60   | HB3 | 30 | 593 | -0.56  | QG2 | 37 |
| 378 | 2.90   | HB2  | 24 | 493 | 108.18 | N   | 31 | 594 | 21.69  | CG1 | 37 |
| 379 | 2.48   | HB3  | 24 | 494 | 8.10   | H   | 31 | 598 | 20.77  | CG2 | 37 |
| 382 | 109.85 | ND2  | 24 | 495 | 45.01  | CA  | 31 | 604 | 124.08 | N   | 38 |
| 383 | 7.52   | HD21 | 24 | 496 | 4.35   | HA2 | 31 | 605 | 8.12   | H   | 38 |
| 384 | 7.06   | HD22 | 24 | 497 | 3.55   | HA3 | 31 | 606 | 14.54  | CA  | 38 |
| 387 | 118.69 | N    | 25 | 500 | 118.46 | N   | 32 | 607 | 4.43   | HA  | 38 |
| 388 | 9.01   | H    | 25 | 501 | 8.16   | H   | 32 | 608 | 33.92  | CB  | 38 |
| 389 | 18.28  | CA   | 25 | 502 | 20.60  | CA  | 32 | 630 | 132.52 | N   | 39 |
| 390 | 5.80   | HA   | 25 | 503 | 4.37   | HA  | 32 | 631 | 8.62   | H   | 39 |
| 391 | 35.60  | CB   | 25 | 504 | 25.76  | CB  | 32 | 632 | 17.25  | CA  | 39 |
| 392 | 2.96   | HB2  | 25 | 507 | 3.82   | QB  | 32 | 633 | 4.76   | HA  | 39 |
| 393 | 2.63   | HB3  | 25 | 510 | 118.93 | N   | 33 | 634 | 30.83  | CB  | 39 |
| 399 | 138.38 | CE1  | 25 | 511 | 8.76   | H   | 33 | 635 | 3.42   | HB2 | 39 |
| 401 | 6.80   | HD2  | 25 | 512 | 24.73  | CA  | 33 | 636 | 2.89   | HB3 | 39 |
| 402 | 7.81   | HE1  | 25 | 513 | 5.01   | HA  | 33 | 639 | 127.80 | CD1 | 39 |
| 404 | 118.22 | N    | 26 | 514 | 32.33  | CB  | 33 | 641 | 120.37 | CE3 | 39 |
| 405 | 8.80   | H    | 26 | 515 | 3.87   | HB  | 33 | 643 | 130.63 | NE1 | 39 |
| 406 | 16.73  | CA   | 26 | 516 | 0.79   | QG2 | 33 | 644 | 7.36   | HD1 | 39 |
| 407 | 4.44   | HA   | 26 | 518 | 22.30  | CG2 | 33 | 645 | 7.24   | HE3 | 39 |
| 408 | 33.02  | CB   | 26 | 523 | 123.14 | N   | 34 | 646 | 122.48 | CZ3 | 39 |
| 409 | 1.45   | HB2  | 26 | 524 | 8.57   | H   | 34 | 647 | 114.28 | CZ2 | 39 |
| 410 | 1.31   | HB3  | 26 | 525 | 15.96  | CA  | 34 | 648 | 10.68  | HE1 | 39 |
| 412 | 25.65  | CG   | 26 | 526 | 5.15   | HA  | 34 | 649 | 6.70   | HZ3 | 39 |
| 415 | 1.03   | QG   | 26 | 527 | 37.02  | CB  | 34 | 650 | 123.19 | CH2 | 39 |
| 416 | 43.05  | CD   | 26 | 528 | 2.19   | HB2 | 34 | 651 | 7.40   | HZ2 | 39 |
| 417 | 2.27   | HD2  | 26 | 529 | 1.74   | HB3 | 34 | 652 | 6.90   | HH2 | 39 |
| 418 | 1.74   | HD3  | 26 | 531 | 32.67  | CG  | 34 | 654 | 124.55 | N   | 40 |



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ ΤΟΥ c2

|     |        |     |    |     |        |     |    |      |        |      |    |
|-----|--------|-----|----|-----|--------|-----|----|------|--------|------|----|
| 655 | 9.43   | H   | 40 | 794 | 7.26   | H   | 47 | 895  | 2.67   | HB3  | 54 |
| 656 | 20.73  | CA  | 40 | 795 | 22.79  | CA  | 47 | 899  | 121.03 | N    | 55 |
| 657 | 4.24   | HA  | 40 | 796 | 4.88   | HA  | 47 | 900  | 8.65   | H    | 55 |
| 658 | 30.32  | CB  | 40 | 797 | 25.37  | CB  | 47 | 901  | 16.48  | CA   | 55 |
| 661 | 1.83   | QB  | 40 | 800 | 3.45   | QB  | 47 | 902  | 4.55   | HA   | 55 |
| 662 | 27.18  | CG  | 40 | 803 | 113.07 | N   | 48 | 903  | 40.37  | CB   | 55 |
| 665 | 1.60   | QG  | 40 | 804 | 7.97   | H   | 48 | 904  | 2.74   | HB2  | 55 |
| 666 | 43.35  | CD  | 40 | 805 | 21.25  | CA  | 48 | 905  | 2.60   | HB3  | 55 |
| 669 | 3.14   | QD  | 40 | 806 | 4.72   | HA  | 48 | 909  | 122.21 | N    | 56 |
| 698 | 16.10  | CA  | 42 | 807 | 33.36  | CB  | 48 | 910  | 7.47   | H    | 56 |
| 699 | 4.40   | HA  | 42 | 808 | 4.41   | HB  | 48 | 911  | 22.28  | CA   | 56 |
| 700 | 42.44  | CB  | 42 | 809 | 1.30   | QG2 | 48 | 912  | 4.22   | HA   | 56 |
| 703 | 1.11   | QB  | 42 | 816 | 123.14 | N   | 49 | 913  | 39.47  | CB   | 56 |
| 704 | 26.26  | CG  | 42 | 817 | 8.63   | H   | 49 | 914  | 1.70   | HB   | 56 |
| 705 | 1.12   | HG  | 42 | 818 | 18.54  | CA  | 49 | 915  | 1.09   | QG2  | 56 |
| 706 | 0.33   | QD1 | 42 | 819 | 4.95   | HA  | 49 | 916  | 18.63  | CG2  | 56 |
| 707 | 0.16   | QD2 | 42 | 820 | 29.80  | CB  | 49 | 920  | 27.79  | CG1  | 56 |
| 708 | 22.91  | CD1 | 42 | 821 | 3.07   | HB2 | 49 | 921  | 1.59   | HG12 | 56 |
| 712 | 24.74  | CD2 | 42 | 822 | 2.89   | HB3 | 49 | 922  | 1.16   | HG13 | 56 |
| 719 | 12.74  | CD  | 43 | 825 | 127.64 | CD1 | 49 | 924  | 1.05   | QD1  | 56 |
| 720 | 24.34  | CA  | 43 | 827 | 119.67 | CE3 | 49 | 925  | 13.45  | CD1  | 56 |
| 721 | 4.60   | HA  | 43 | 829 | 129.97 | NE1 | 49 | 930  | 131.34 | N    | 57 |
| 722 | 32.25  | CB  | 43 | 830 | 7.27   | HD1 | 49 | 931  | 9.20   | H    | 57 |
| 723 | 2.49   | HB2 | 43 | 831 | 6.95   | HE3 | 49 | 932  | 20.34  | CA   | 57 |
| 724 | 2.23   | HB3 | 43 | 833 | 115.22 | CZ2 | 49 | 933  | 4.14   | HA   | 57 |
| 726 | 27.48  | CG  | 43 | 834 | 10.15  | HE1 | 49 | 934  | 28.25  | CB   | 57 |
| 727 | 2.10   | HG2 | 43 | 835 | 6.58   | HZ3 | 49 | 935  | 2.24   | HB2  | 57 |
| 728 | 2.03   | HG3 | 43 | 837 | 7.37   | HZ2 | 49 | 936  | 2.16   | HB3  | 57 |
| 730 | 3.88   | HD2 | 43 | 838 | 6.62   | HH2 | 49 | 938  | 33.89  | CG   | 57 |
| 731 | 3.46   | HD3 | 43 | 840 | 122.44 | N   | 50 | 939  | 2.50   | HG2  | 57 |
| 734 | 121.03 | N   | 44 | 841 | 9.66   | H   | 50 | 940  | 2.42   | HG3  | 57 |
| 735 | 9.11   | H   | 44 | 842 | 15.19  | CA  | 50 | 943  | 112.47 | NE2  | 57 |
| 736 | 23.82  | CA  | 44 | 843 | 4.90   | HA  | 50 | 944  | 7.58   | HE21 | 57 |
| 737 | 3.75   | HA  | 44 | 844 | 32.25  | CB  | 50 | 945  | 6.84   | HE22 | 57 |
| 738 | 38.69  | CB  | 44 | 851 | 2.64   | QG  | 50 | 948  | 112.60 | N    | 58 |
| 741 | 3.05   | QB  | 44 | 854 | 121.27 | N   | 51 | 949  | 9.01   | H    | 58 |
| 743 | 133.42 | CD1 | 44 | 855 | 9.17   | H   | 51 | 950  | 45.53  | CA   | 58 |
| 745 | 118.27 | CE1 | 44 | 856 | 18.15  | CA  | 51 | 951  | 4.32   | HA2  | 58 |
| 754 | 6.80   | QE  | 44 | 857 | 4.66   | HA  | 51 | 952  | 3.89   | HA3  | 58 |
| 755 | 7.15   | QD  | 44 | 858 | 31.48  | CB  | 51 | 955  | 123.14 | N    | 59 |
| 757 | 117.29 | N   | 45 | 859 | 2.23   | HB2 | 51 | 956  | 7.80   | H    | 59 |
| 758 | 8.81   | H   | 45 | 860 | 1.97   | HB3 | 51 | 957  | 20.73  | CA   | 59 |
| 759 | 20.22  | CA  | 45 | 862 | 36.64  | CG  | 51 | 958  | 3.84   | HA   | 59 |
| 760 | 4.39   | HA  | 45 | 865 | 2.45   | QG  | 51 | 959  | 42.30  | CB   | 59 |
| 761 | 39.47  | CB  | 45 | 868 | 119.86 | N   | 52 | 960  | 2.12   | HB2  | 59 |
| 762 | 2.90   | HB2 | 45 | 869 | 8.42   | H   | 52 | 961  | 1.16   | HB3  | 59 |
| 763 | 2.88   | HB3 | 45 | 870 | 20.34  | CA  | 52 | 963  | 26.87  | CG   | 59 |
| 767 | 119.16 | N   | 46 | 871 | 4.00   | HA  | 52 | 964  | 1.52   | HG   | 59 |
| 768 | 7.64   | H   | 46 | 872 | 30.70  | CB  | 52 | 965  | 1.01   | QD1  | 59 |
| 769 | 16.61  | CA  | 46 | 875 | 2.28   | QB  | 52 | 966  | 0.55   | QD2  | 59 |
| 770 | 4.66   | HA  | 46 | 876 | 36.03  | CG  | 52 | 967  | 26.87  | CD1  | 59 |
| 771 | 32.25  | CB  | 46 | 877 | 2.41   | HG2 | 52 | 971  | 23.52  | CD2  | 59 |
| 774 | 1.76   | QB  | 46 | 878 | 2.26   | HG3 | 52 | 977  | 119.86 | N    | 60 |
| 775 | 24.74  | CG  | 46 | 882 | 109.32 | N   | 53 | 978  | 8.72   | H    | 60 |
| 776 | 1.54   | HG2 | 46 | 883 | 7.76   | H   | 53 | 979  | 20.99  | CA   | 60 |
| 777 | 1.44   | HG3 | 46 | 884 | 45.01  | CA  | 53 | 980  | 4.03   | HA   | 60 |
| 779 | 28.40  | CD  | 46 | 887 | 4.09   | QA  | 53 | 981  | 29.67  | CB   | 60 |
| 780 | 1.72   | HD2 | 46 | 889 | 119.63 | N   | 54 | 984  | 1.84   | QB   | 60 |
| 781 | 1.62   | HD3 | 46 | 890 | 8.03   | H   | 54 | 985  | 26.87  | CG   | 60 |
| 783 | 42.44  | CE  | 46 | 891 | 16.48  | CA  | 54 | 988  | 1.69   | QG   | 60 |
| 784 | 3.03   | HE2 | 46 | 892 | 4.83   | HA  | 54 | 989  | 43.05  | CD   | 60 |
| 785 | 2.98   | HE3 | 46 | 893 | 42.05  | CB  | 54 | 992  | 3.20   | QD   | 60 |
| 793 | 116.11 | N   | 47 | 894 | 2.76   | HB2 | 54 | 1005 | 117.05 | N    | 61 |



|      |        |      |    |      |        |      |    |      |        |     |    |
|------|--------|------|----|------|--------|------|----|------|--------|-----|----|
| 1006 | 8.43   | H    | 61 | 1088 | 7.84   | H    | 66 | 1168 | 26.87  | CG  | 70 |
| 1007 | 20.73  | CA   | 61 | 1089 | 22.66  | CA   | 66 | 1171 | 1.42   | QG  | 70 |
| 1008 | 4.06   | HA   | 61 | 1090 | 4.16   | HA   | 66 | 1172 | 43.35  | CD  | 70 |
| 1009 | 27.99  | CB   | 61 | 1091 | 39.34  | CB   | 66 | 1173 | 2.93   | HD2 | 70 |
| 1010 | 2.02   | HB2  | 61 | 1094 | 3.19   | QB   | 66 | 1174 | 2.85   | HD3 | 70 |
| 1011 | 1.91   | HB3  | 61 | 1096 | 133.66 | CD1  | 66 | 1188 | 122.21 | N   | 71 |
| 1013 | 34.50  | CG   | 61 | 1098 | 117.33 | CE1  | 66 | 1189 | 7.67   | H   | 71 |
| 1014 | 2.45   | HG2  | 61 | 1107 | 6.68   | QE   | 66 | 1190 | 15.06  | CA  | 71 |
| 1015 | 2.37   | HG3  | 61 | 1108 | 7.02   | QD   | 66 | 1191 | 4.24   | HA  | 71 |
| 1018 | 112.69 | NE2  | 61 | 1110 | 117.29 | N    | 67 | 1192 | 1.43   | QB  | 71 |
| 1019 | 7.51   | HE21 | 61 | 1111 | 8.80   | H    | 67 | 1193 | 18.84  | CB  | 71 |
| 1020 | 6.94   | HE22 | 61 | 1112 | 20.22  | CA   | 67 | 1198 | 117.10 | N   | 72 |
| 1023 | 121.50 | N    | 62 | 1113 | 3.96   | HA   | 67 | 1199 | 7.70   | H   | 72 |
| 1024 | 7.53   | H    | 62 | 1114 | 27.99  | CB   | 67 | 1200 | 24.34  | CA  | 72 |
| 1025 | 16.61  | CA   | 62 | 1115 | 2.15   | HB2  | 67 | 1201 | 4.14   | HA  | 72 |
| 1026 | 4.26   | HA   | 62 | 1116 | 2.08   | HB3  | 67 | 1202 | 32.56  | CB  | 72 |
| 1027 | 1.38   | QB   | 62 | 1118 | 33.59  | CG   | 67 | 1203 | 2.16   | HB  | 72 |
| 1028 | 18.97  | CB   | 62 | 1119 | 2.70   | HG2  | 67 | 1206 | 21.08  | CG1 | 72 |
| 1033 | 123.85 | N    | 63 | 1120 | 2.53   | HG3  | 67 | 1210 | 21.08  | CG2 | 72 |
| 1034 | 8.73   | H    | 63 | 1123 | 110.07 | NE2  | 67 | 1214 | 0.95   | QOG | 72 |
| 1035 | 28.46  | CA   | 63 | 1124 | 7.29   | HE21 | 67 | 1216 | 118.93 | N   | 73 |
| 1036 | 3.15   | HA   | 63 | 1125 | 6.68   | HE22 | 67 | 1217 | 8.18   | H   | 73 |
| 1037 | 38.18  | CB   | 63 | 1128 | 120.57 | N    | 68 | 1218 | 20.60  | CA  | 73 |
| 1038 | 1.70   | HB   | 63 | 1129 | 7.94   | H    | 68 | 1219 | 4.57   | HA  | 73 |
| 1039 | 0.57   | QG2  | 63 | 1130 | 18.54  | CA   | 68 | 1220 | 25.76  | CB  | 73 |
| 1040 | 17.41  | CG2  | 63 | 1131 | 4.41   | HA   | 68 | 1223 | 3.89   | QB  | 73 |
| 1044 | 28.71  | CG1  | 63 | 1132 | 40.88  | CB   | 68 | 1226 | 115.88 | N   | 74 |
| 1045 | 1.30   | HG12 | 63 | 1133 | 2.75   | HB2  | 68 | 1227 | 8.20   | H   | 74 |
| 1046 | -0.64  | HG13 | 63 | 1134 | 2.61   | HB3  | 68 | 1228 | 23.31  | CA  | 74 |
| 1048 | 0.47   | QD1  | 63 | 1138 | 120.10 | N    | 69 | 1229 | 4.46   | HA  | 74 |
| 1049 | 15.89  | CD1  | 63 | 1139 | 7.62   | H    | 69 | 1230 | 31.56  | CB  | 74 |
| 1054 | 120.80 | N    | 64 | 1140 | 18.54  | CA   | 69 | 1231 | 4.32   | HB  | 74 |
| 1055 | 8.19   | H    | 64 | 1141 | 4.05   | HA   | 69 | 1232 | 1.23   | QG2 | 74 |
| 1056 | 19.70  | CA   | 64 | 1142 | 42.05  | CB   | 69 | 1234 | 21.69  | CG2 | 74 |
| 1057 | 4.30   | HA   | 64 | 1143 | 1.60   | HB2  | 69 | 1239 | 118.22 | N   | 75 |
| 1058 | 39.85  | CB   | 64 | 1144 | 1.48   | HB3  | 69 | 1240 | 8.31   | H   | 75 |
| 1061 | 2.69   | QB   | 64 | 1146 | 26.87  | CG   | 69 | 1241 | 20.47  | CA  | 75 |
| 1064 | 119.16 | N    | 65 | 1147 | 1.51   | HG   | 69 | 1242 | 4.52   | HA  | 75 |
| 1065 | 7.90   | H    | 65 | 1148 | 0.77   | QD1  | 69 | 1243 | 25.89  | CB  | 75 |
| 1066 | 22.79  | CA   | 65 | 1149 | 0.75   | QD2  | 69 | 1246 | 3.87   | QB  | 75 |
| 1067 | 4.35   | HA   | 65 | 1150 | 25.04  | CD1  | 69 | 1249 | 127.83 | N   | 76 |
| 1068 | 38.69  | CB   | 65 | 1154 | 23.21  | CD2  | 69 | 1250 | 8.04   | H   | 76 |
| 1069 | 3.21   | HB2  | 65 | 1160 | 118.69 | N    | 70 | 1251 | 20.22  | CA  | 76 |
| 1070 | 3.08   | HB3  | 65 | 1161 | 7.66   | H    | 70 | 1252 | 4.14   | HA  | 76 |
| 1073 | 133.03 | CD1  | 65 | 1162 | 18.93  | CA   | 70 | 1253 | 31.22  | CB  | 76 |
| 1075 | 118.03 | CE1  | 65 | 1163 | 4.03   | HA   | 70 | 1254 | 2.06   | HB2 | 76 |
| 1084 | 6.88   | QE   | 65 | 1164 | 30.06  | CB   | 70 | 1255 | 1.90   | HB3 | 76 |
| 1085 | 7.23   | QD   | 65 | 1165 | 1.74   | HB2  | 70 | 1257 | 36.64  | CG  | 76 |
| 1087 | 120.57 | N    | 66 | 1166 | 1.63   | HB3  | 70 | 1260 | 2.21   | QG  | 76 |





