



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
“ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”

**ΔΟΜΙΚΟΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**  
**ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΦΑΚΕΛΟΥ LBR**

**Σταμάτιος Λιοκάτης**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000304436

1



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)



Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία» του κ. Λιοκάτη Σταμάτη: 12-12-2003

**Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής:** 12-12-2003 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία», έγγραφο του Επιστημονικού Υπευθύνου κ. Ιωάννη Λαζαρίδη Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Βιολογίας.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπουσα

Γεωργάτο Σπυρίδωνα Καθηγητή Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Παπαμαρκάκη Θωμαή Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

**Ορισμός Θέματος:** 12-12-2003

*«Δομικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της πυρηνικής πρωτεΐνης LBR»*

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσίκαρης Βασίλειος	Καθηγητής Οργανικής Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φράγκου Λαζαρίδη- Μαρία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-9-2008

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<i>1.1 Οργάνωση του πυρηνικού φακέλου</i>	2
1.1.1 Κύρια μέρη – Πυρηνική λάμινα	2
1.1.2 Σημαντικότερα πρωτεϊνικά συστατικά της έσω πυρηνικής μεμβράνης	3
1.1.3 Υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR)	4
1.1.4 Διακριτές περιοχές του LBR και ρόλος τους	5
1.1.5 Ρυθμιστικός ρόλος του LBR	7
<i>1.2 Οργάνωση της γενετικής πληροφορίας εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου</i>	8
1.2.1 Χρωματίνη	8
1.2.2 Το νουκλεόσωμα είναι η βασική υπομονάδα της χρωματίνης	8
1.2.3 Δομή και οργάνωση των ιστονών του νουκλεοσωμικού πυρήνα	10
1.2.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά χρωματίνης	11
<i>1.3 Δυναμικός χαρακτήρας της χρωματίνης</i>	12
1.3.1 Παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης	13
1.3.2 Ανταλλαγή ισομορφών ιστονών	14
1.3.3 Τροποποιήσεις πλευρικών αλυσίδων ιστονών	15
<i>1.4 Ιστονικός κώδικας (histone code)</i>	15
1.4.1 Πρωτεϊνικά μοτίβα που αναγνωρίζουν ιστονικές τροποποιήσεις	17
1.4.2 Συνοπτική περιγραφή των Tudor μοτίβων (Tudor domains)	18
1.4.3 Τρόπος αναγνώρισης μεθυλωμένων καταλοίπων από τα Tudor domains	20
<i>1.5 Σκοπός της διατριβής</i>	22

### ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

<i>2.1 Κλωνοποίηση-Πλασμιδιακές κατασκευές</i>	24
2.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς – Βακτηριακά στελέχη	24
2.1.2 Παρασκευή κωδικοποιού τμήματος DNA του Tudor domain με τη μέθοδο της αλυσιδωτής ανίδρασης πολυμεράσης (PCR)	25
2.1.3 Ενζυμικές πέψεις	26
2.1.4 Κατάλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών	26
2.1.5 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων – Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	27
<i>2.2 Υπερέκφραση και απομόνωση Tudor domain</i>	27
2.2.1 Υπερέκφραση ιστοπικά μη σημασμένου πολυπεπτιδίου	27
2.2.2 Υπερέκφραση ιστοπικά σημασμένου πολυπεπτιδίου	28
2.2.3 Λύση βακτηρίων και απομόνωση πολυπεπτιδίων με χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου	29
2.2.4 Αποκοπή συνοδών πεπτιδικών τμημάτων (tags) με χρήση της πρωτεάσης TEV – Απομόνωση καθαρού Tudor domain	29
2.2.5 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε gel SDS-πολυακρυλαμιδίου	30
2.2.6 Παρασκευή δείγματος για NMR πειράματα	30
<i>2.3 Παρασκευή λοιπών ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών</i>	31
2.3.1 Παρασκευή διαφορετικών μορφών ιστόνης H3	31
2.3.2 Παρασκευή ολόκληρου και αμινοτελικών υποπεριοχών LBR	32
<i>2.4 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων</i>	32
2.4.1 Απομόνωση πυρήνων ερυθροκυττάρων	32
2.4.2 Κατεργασία πυρήνων με νουκλεάσες - παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων	33
<i>2.5 Παρασκευή τετραμερών συμπλόκων H3-H4</i>	34
2.5.1 Απομόνωση φυσικού τετραμερούς συμπλόκου H3-H4	34
2.5.2 Ανασύσταση τετραμερούς H3/H4 από ανασυνδυσμένες πρωτεΐνες	34
<i>2.6 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων με βιοχημικές τεχνικές</i>	35
2.6.1 Δοκιμές συγκατακρήμνισης (pull-down assays)	35
2.6.2 Ανάλυση σε βαθμίδωση σουκρόζης (sucrose gradient)	35



2.7	Πειράματα μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA) παρουσίας DNA ή RNA	36
2.8	Πειράματα υπερσπείρωσης DNA (DNA supercoiling assay)	36
2.9	Φασματοσκοπία NMR	36
2.9.1	Οργανολογία – Αρχή της μεθόδου	36
2.9.2	Είδη NMR φασμάτων	37
2.9.3	Ανάλυση φασμάτων	38
2.9.4	Υπολογισμός και ποιοτικός έλεγχος τριτοταγούς δομής	38
2.9.5	Πειράματα διάταραξης χημικών μεταταπίσεων (chemical shift perturbation experiments)	39
2.10	Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)	39
2.11	Ηλεκτρονική μικροσκοπία	40
2.11.1	Τεχνική της 'αρνητικής χρώσης' (Negative Staining)	40
2.11.2	Προετοιμασία δειγμάτων	40
2.12	Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση	41
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>		<b>43</b>
3.1	Απομόνωση και αρχικός βιοφυσικός χαρακτηρισμός του Tudor domain	44
3.1.1	Επιλογή φορέα έκφρασης	44
3.1.2	Απομόνωση του Tudor domain	44
3.1.3	Φασματοσκοπικός έλεγχος της δομικής ακεραιότητας του Tudor domain	45
3.1.4	Εκτίμηση βαθμού ολιγομερισμού του Tudor domain	46
3.2	Επίλυση τριτοταγούς δομής του Tudor domain με φασματοσκοπία NMR	47
3.2.1	Γενικές ιδιότητες φασμάτων που χρησιμοποιούνται στην επίλυση δομής βιομορίου	48
3.2.2	Φάσματα δύο διαστάσεων – Ετεροπυρηνικό φάσμα <sup>15</sup> N-HSQC	48
3.2.3	Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού ατόμων πολυπεπτιδίου – Φάσματα τριών διαστάσεων	49
3.2.4	Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού ατόμων κύριας αλυσίδας	50
3.2.5	Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού ατόμων αλειφατικών πλευρικών ομάδων – Φάσμα HCCH-TOCSY	53
3.2.6	Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού ατόμων αρωματικών πλευρικών ομάδων – Φάσματα CbHd και CbHe	55
3.2.7	Εξαγωγή περιορισμών διατομικών αποστάσεων – Φάσματα NOESY	56
3.2.8	Περιορισμοί διεδρων γωνιών	59
3.2.9	Υπολογισμός τριτοταγούς δομής	60
3.2.10	Περιορισμοί διατομικών αποστάσεων μέσω αναγνώρισης δεσμών υδρογόνου	60
3.2.11	Περαιτέρω αύξηση ακρίβειας υπολογιζόμενων δομών – Βελτιστοποίηση σε νερό	61
3.2.12	Ποιοτικά χαρακτηριστικά της δομής του Tudor domain	62
3.2.13	Τριτοταγής δομή του Tudor domain του LBR	63
3.2.14	Αρωματικός κλωβός του Tudor domain του LBR	64
3.3	Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με νουκλεϊκά οξέα	65
3.4	Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με μεθυλιωμένα αμινοξέα	66
3.5	Αλληλεπίδραση του Tudor domain με ιστόνες	67
3.5.1	Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων με φυσικές ιστόνες	68
3.5.2	Διερεύνηση αλληλεπίδρασης με την ανασυνδυασμένη H3	69
3.5.3	Διερεύνηση της ειδικότητας της αλληλεπίδρασης μεταξύ Tudor domain και ιστόνης H3	69
3.5.4	Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain και της H3 με φασματοσκοπία NMR – Χαρτογράφηση της περιοχής σύνδεσης	69
3.5.5	Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την H3 στο πλαίσιο του νουκλεοσώματος	71
3.5.6	Αναγνώριση της περιοχής της H3 που προσδένεται στο Tudor domain	72
3.5.7	Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την H3 στο πλαίσιο του τετραμερούς H3/H4	73
3.6	Διερεύνηση της ικανότητας του Tudor domain να επάγει υπερσπειρώσεις στο DNA	74
3.7	Διερεύνηση του ρόλου των άλλων περιοχών του αμινοτελικού τμήματος του LBR	77
3.7.1	Σύνδεση του LBR με τη χρωματίνη	77



3.7.2 Η RS περιοχή ευθύνεται για τον ολιγομερισμό του LBR	80
3.8 Απεικόνιση των ολιγομερών σωματιδίων του LBR και εκτίμηση του βαθμού ολιγομερισμού του	81
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>85</b>
4.1 Σύντομη επισκόπηση των αποτελεσμάτων της πειραματικής μελέτης	86
4.2 Σύγκριση με Tudor domains γνωστής δομής και λειτουργίας	88
4.3 Συνθήκες αναγνώρισης της H3 από το Tudor domain του LBR- Ομοιότητες και διαφορές με τη δράση των ιστονικών σαπερονών	92
4.4 Αλληλεπίδραση του LBR με τη χρωματίνη	95
4.5 Ολιγομερισμός του LBR	99
4.6 Συμπεράσματα	101
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>103</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>111</b>
<i>Δομικός-λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης του πυρηνικού φακέλου LBR</i>	112
<b>SUMMARY</b>	<b>115</b>
<i>Structural and functional characterization of the nuclear protein LBR</i>	116



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



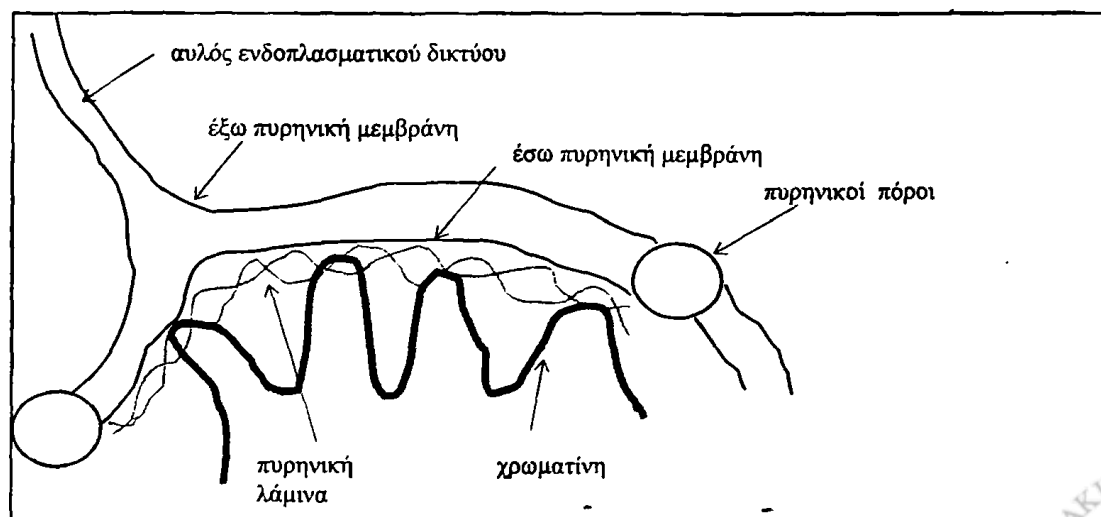


## 1.1 Οργάνωση του πυρηνικού φακέλου

### 1.1.1 Κύρια μέρη – Πυρηνική λάμινα

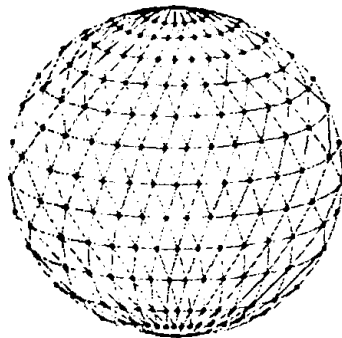
Μία από τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων είναι η παρουσία του πυρήνα στα πρώτα. Ο διαχωρισμός κυτταροπλάσματος και πυρηνοπλάσματος επιτυγχάνεται από ένα ιδιαίτερο σύστημα μεμβρανών, που ονομάζεται πυρηνικός φάκελος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μοναδικού δομικά και λειτουργικά περιβάλλοντος, στο οποίο το γενετικό υλικό είναι αποθηκευμένο και βασικές για το κύτταρο διεργασίες όπως η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή και η επεξεργασία του RNA λαμβάνουν χώρα αυτόνομα σε σχέση με την μετάφραση. Επιτυγχάνεται έτσι ο αυστηρότερος έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων σε σχέση με αυτόν των προκαρυωτικών (Lodish et al, 2000).

Τα κύρια μέρη του πυρηνικού φακέλου είναι οι πυρηνικές μεμβράνες και τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων. Οι πυρηνικές μεμβράνες αποτελούνται από τρία αλληλοσυνδεόμενα τμήματα, την έξω-, την έσω- και την μεμβράνη των πόρων. Η έξω πυρηνική μεμβράνη είναι συνεχής με το ενδοπλασματικό δίκτυο και έχει παρόμοια σύσταση με αυτό. Αντίστοιχα, η έσω πυρηνική μεμβράνη 'βλέπει' το πυρηνόπλασμα και συνδέεται με την πυρηνική λάμινα και τη χρωματίνη. Οι έξω- και έσω- πυρηνικές μεμβράνες συντήκονται μέσω της μεμβράνης των πόρων στις περιοχές όπου υπάρχουν οι πύλες εισόδου και εξόδου του πυρήνα, οι οποίες αποτελούνται από τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1: Οργάνωση πυρηνικού φακέλου

Ένα εκτεταμένο δίκτυο ινιδίων, η πυρηνική λάμινα, καλύπτει τη πυρηνοπλάσματική περιφέρεια του πυρηνικού φακέλου και βρίσκεται σε στενή επαφή με αυτόν. Η πυρηνική λάμινα αποτελείται από τις λαμίνες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες της κατηγορίας των ενδιάμεσων ινιδίων και ταξινομούνται με βάση βιοχημικά και δομικά κριτήρια σε δύο τύπους, τις λαμίνες τύπου Α και Β. Οι τύπου Β λαμίνες εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ δεν ισχύει το ίδιο για τις τύπου Α λαμίνες, η έκφραση των οποίων παρουσιάζει εξελικτικά συνδεδεμένες διαφοροποιήσεις. Κατά τη μίτωση, οπότε η πυρηνική λάμινα αποσυντίθεται παροδικά, οι τύπου Α λαμίνες είναι πλήρως διαλυτοποιημένες, ενώ οι τύπου Β παραμένουν συνδεδεμένες στις μεμβράνες (Gerace and Burke, 1998). Η σημασία αυτών των πρωτεϊνών σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η αντιγραφή του DNA και η σύνθεση του RNA έχει αναγνωρισθεί στο παρελθόν (Hutchison CL, 2002). Ο πρωταρχικός τους όμως ρόλος σχετίζεται με την αρχιτεκτονική του πυρήνα και κύρια με το καθορισμό του σχήματος και των διαστάσεων του, καθώς και με την αγκυροβόληση σε αυτόν δομών όπως η χρωματίνη και οι πυρηνικοί πόροι. Στην Εικόνα 1.2 απεικονίζεται η πυρηνική λάμινα σαν ένας 'γεωδαιτικός θόλος' (geodesic dome), στην επιφάνεια του οποίου οι λαμίνες (γραμμές) συνδέουν τους πυρηνικούς πόρους (κόκκινες κουκίδες) και σχηματίζεται με αυτό το τρόπο ένας 'κλωβός' με το μέγιστο δυνατό λόγο όγκου προς μάζα, που καλύπτει το πυρήνα και δημιουργεί ένα προστατευτικό περιβάλλον για τη χρωματίνη.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα 1.2: Η πυρηνική λάμινα ως γεωδαιτικός θόλος (Hutchison CL, 2002).

### 1.1.2 Σημαντικότερα πρωτεϊνικά συστατικά της έσω πυρηνικής μεμβράνης

Οι λαμίνες υπήρξαν τα πρώτα περιφερικά συστατικά της έσω πυρηνικής μεμβράνης που χαρακτηρίστηκαν. Αργότερα ταυτοποιήθηκαν και άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι ο υποδοχέας της λαμίνης Β



(LBR), τα συνδεόμενα με τη λάμινα πολυπεπίδια 1 και 2 (LAP1, LAP2), η emerlin, η MAN1 και η nu1im (Εικ. 1.3). Τα κοινά χαρακτηριστικά αυτών των πρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να συνδέονται με τη χρωματίνη και την πυρηνική λάμινα και η παρουσία υδρόφιλων αμινοτελικών άκρων που προβάλλουν προς το πυρηνόπλασμα και τροποποιούνται με τη δράση διάφορων κινασών. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι αυτές οι πρωτεΐνες οργανώνονται σε σύμπλοκα αποτελούμενα από πολλές υπομονάδες, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η επανασυναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της μίτωσης και η σύνδεσή του με πυρηνικές δομές κατά τη μεσόφαση (Lodish et al, 2000).

### 1.1.3 Υποδοχέας της λαμίνης B (LBR)

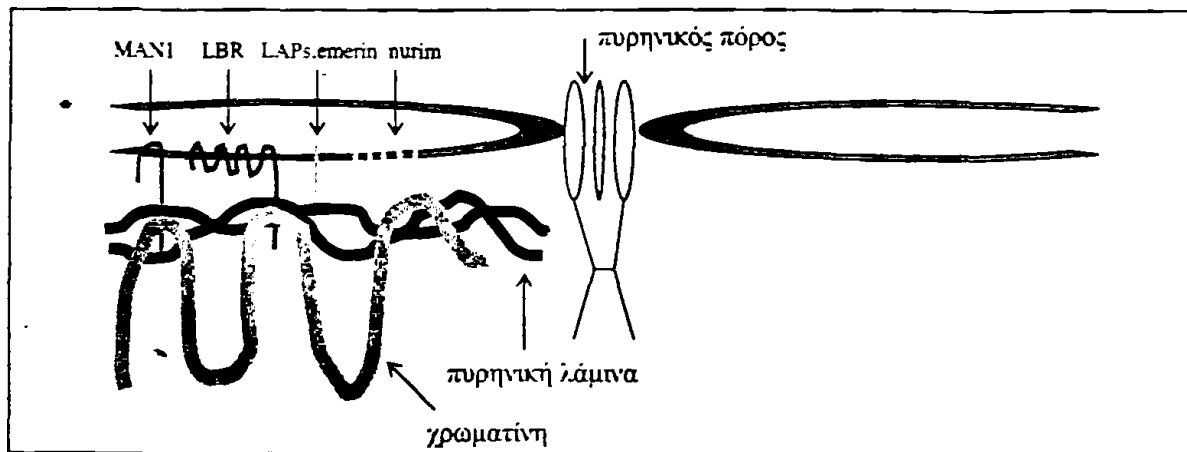
Ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR) είναι μία πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης, εξελικτικά συντηρημένη σε όλα τα μετόζωα. Αναγνωρίστηκε ως μία πρωτεΐνη που είχε την ικανότητα να συνδέεται στη λαμίνη B. Η πρώτη εργασία σχετική με τον LBR δημοσιεύτηκε πριν από περίπου 20 χρόνια (Worman et al, 1988), όταν ερευνητές παρασκεύασαν πυρηνικούς φακέλους από ερυθροκύτταρα πτηνών, από τους οποίους απομακρύνθηκαν οι περιφερικά συνδεόμενες λαμίνες με χρήση ουρίας. Το παρασκεύασμα αυτό αποδείχτηκε ότι μπορεί να συνδεθεί με απομονωμένη λαμίνη B, αλλά όχι με λαμίνη A. Στη συνέχεια αναγνωρίστηκε ο πρωτεϊνικός παράγοντας των πυρηνικών μεμβρανών που ήταν υπεύθυνος για αυτή τη σύνδεση, με βάση την υψηλή συγκέντρωσή του στον πυρηνικό φάκελο και την ικανότητά του να συνδέεται στη λαμίνη B σε δοκιμές αποτύπωσης. Αρχικά ονομάστηκε p58 γιατί κατά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση μεταναστεύει στην περιοχή των 58 kDa. Όταν αργότερα προσδιορίστηκε η αμινοξική αλληλουχία του, αρχικά στα πτηνά (Worman et al, 1990) και μετά στον άνθρωπο (Ye and Worman, 1994), φάνηκε ότι ο LBR αποτελείται από 637 και 615 αμινοξέα αντίστοιχα και το πραγματικό μοριακό του βάρος υπολογίστηκε στα 73kDa.

Όπως και άλλες πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης, έτσι και ο LBR φαίνεται να είναι τμήμα ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου που εκτός του LBR περιέχει επίσης τις λαμίνες A και B, μία ειδική κινάση, μία άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη (p18) και μία πρωτεΐνη (p34/p32) που συνδέεται με τον παράγοντα ματίσματος 2 (splicing factor 2/SF2) (Simos and Georgatos, 1992).

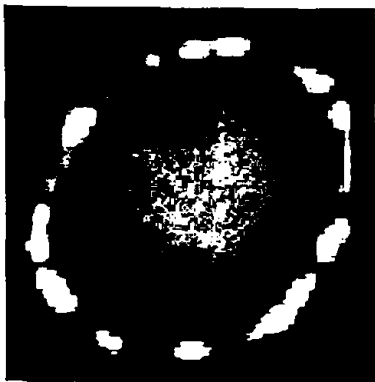
Πρόσφατα βιοχημικά και μορφολογικά πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι ο LBR έχει την ιδιότητα να ολιγομερίζεται και να συσσωρεύεται σε διακριτές νησίδες



(microdomains) στην έσω πυρηνική μεμβράνη (Εικ. 1.4). Τα χαρακτηριστικά αυτά αναμένεται να παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη δημιουργία του συμπλόκου, όσο και στην εν γένει λειτουργία του (Makatsori et al, 2004).



Εικόνα 1.3: Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης

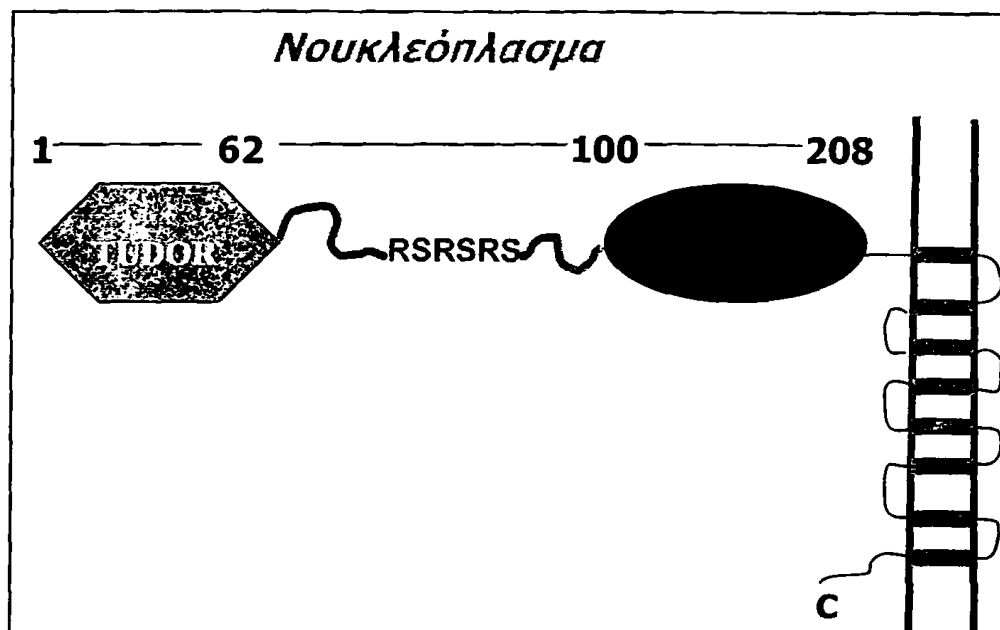


Εικόνα 1.4: *In situ* οργάνωση του LBR σε ερυθροκύτταρα ποδλερικών. Χρήση ειδικών αντισωμάτων και παρατήρηση με συνθετικό μικροσκόπιο αποκαλύπτουν τη συσσώρευση της πρωτεΐνης σε χαρακτηριστικές μικροπεριοχές (Makatsori et al, 2004).

#### 1.1.4 Διακριτές περιοχές του LBR και ρόλος τους

Ο LBR αποτελείται από μία αμινοτελική-υδρόφιλη περιοχή, από ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα, και από ένα πολύ μικρό καρβοξυτελικό άκρο. Η αμινοτελική περιοχή του LBR έχει έκταση ~210 αμινοξέων και φαίνεται να περιέχει δύο υποπεριοχές οι οποίες παρουσιάζουν χαρακτηριστικά αυτόνομων δομικά οντοτήτων. Ενδιάμεσα αυτών των τομέων υπάρχει μία θετικά φορτισμένη περιοχή έκτασης 40 αμινοξέων, της οποίας το κύριο χαρακτηριστικό είναι η παρουσία συνεχόμενων διεπτιδίων αργινίνης-σερίνης (RS repeats) (Εικ. 1.5). Χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής στο εργαστήριό μας, διαπιστώσαμε ότι το πρώτο (αμινοξέα 1-62) από τα δύο αυτόνομα δομικά τμήματα του N-τελικού τμήματος του LBR, μπορεί να ανήκει στην οικογένεια των Tudor μοτίβων (*tudor domains*). Ο ρόλος

του παραμένει αδιευκρίνιστος, αν και έμμεσες παρατηρήσεις το θεωρούν υπεύθυνο για τη σύνδεση του LBR με την λαμίνη Β (*Lin et al, 1996*).



Εικόνα 1.5: Τοπολογικά χαρακτηριστικά του LBR.

Η δεύτερη πιθανόν δομημένη περιοχή (αμινοξέα 100-208) δεν παρουσιάζει ομοιότητα με καμιά γνωστή οικογένεια πρωτεϊνικών μοτίβων και παρά την ύπαρξη σε αυτήν τμημάτων με υδροφοβικό χαρακτήρα, φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία σύμφωνα με αλγορίθμους πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής. Πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από χρήση της τεχνικής των δύο-υβριδίων στο ζυμομύκητα (yeast two-hybrid assay), καθώς και δοκιμές συγκατακρήμνισης (pull-down assays), εμπλέκουν την περιοχή αυτή στη σύνδεση του LBR με την ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (Heterochromatin protein 1, HP1), (*Ye et al, 1997*).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή που περιέχει τα RS διπεπτίδια. Αναμένεται να έχει δομή τυχαίου σπειράματος (random coil), τουλάχιστον όταν δεν είναι δεσμευμένη με άλλα μόρια, λόγω του πολύ βασικού χαρακτήρα της (pI~10) και της αμινοξικής της σύστασης, καθώς είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα κατάλοιπα. Χαρακτηρίζεται κυρίως από την ικανότητά της να φωσφορυλιώνεται στα κατάλοιπα σερίνης, τόσο από μία ειδική για τον LBR, όσο και από μία μιτωτική *cdc2* κινάση. Η πρώτη είναι παρόμοια με την SRPK1 (SR Protein Kinase 1) κινάση και δρώντας στον LBR ελέγχει τη σύνδεσή του με άλλα στοιχεία του συμπλόκου του LBR (*Nikolakaki et al, 1996*), ενώ η

δεύτερη πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στη σύνδεση του LBR με τη χρωματίνη (*Takano et al, 2004*).

Το διαμεμβρανικό τμήμα του LBR έχει προβλεφθεί ότι περιέχει οχτώ τμήματα (*Worman et al, 1990*). Αυτό που του προσδίδει όμως ξεχωριστό ενδιαφέρον είναι η ομολογία του με αναγωγάσες των στερολών, καθώς και η ικανότητά του να έχει αντίστοιχη ενζυμική δράση σε ζύμες (*Silve et al, 1998*). Η παρεμβολή ενός μεγάλου ιντρονίου μεταξύ των εξονίων που κωδικοποιούν το N-τελικό και το διαμεμβρανικό τμήμα του LBR, δείχνει ότι το γονίδιο του πιθανώς να προήλθε από ανασυνδυασμό δύο αρχέγονων γονιδίων, το ένα από τα οποία κωδικοποιούσε μία ιστονική πρωτεΐνη και το άλλο ένα ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου (*Schuler et al, 1994*).

Τέλος, ο LBR περιέχει και ένα πολύ μικρό καρβόξυ τελικό άκρο, το οποίο πιθανότητα βρίσκεται προς την πλευρά του πυρηνοπλάσματος με άγνωστο μέχρι στιγμής ρόλο.

### 1.1.5 Ρυθμιστικός ρόλος του LBR

Παρότι έχουν περάσει 20 χρόνια από την αναγνώρισή του, ο λειτουργικός ρόλος του LBR παραμένει αδιευκρίνιστος. Η ικανότητά του να συνδέεται με την πυρηνική λάμινα και τη χρωματίνη έχει δειχθεί επαρκώς, ο λόγος όμως και ο μηχανισμός αυτών των αλληλεπιδράσεων φαίνεται να είναι πιο πολύπλοκος από όσο αρχικά φαινόταν. Ο ρόλος του LBR στη δυναμική του πυρηνικού φακέλου διερευνήθηκε με υπερέκφραση πρωτεϊνών σύντηξης LBR και πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*green fluorescent protein, GFP*) και μελέτη του εντοπισμού και της κινητικότητά τους στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, ενώ στη μεσόφαση ο LBR βρίσκεται ακινητοποιημένος στην έσω πυρηνική μεμβράνη συνδεόμενος με χρωματινικές δομές, στα μιτωτικά κύτταρα αυτή η σύνδεση φαίνεται να χαλαρώνει και η πρωτεΐνη διαχέεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετά την αποσυναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου. Στο τέλος της μίτωσης, όταν ο πυρηνικός φάκελος επανασχηματίζεται περικλείοντας τη χρωματίνη, τα σημεία συνδεσής του LBR με τη χρωματίνη αποκαλύπτονται και ο LBR ακινητοποιείται και πάλι (*Ellenberg et al, 1997*). Η μελέτη έχει όμως γίνει με μικρό μόνο τμήμα της πρωτεΐνης και δεν είναι διεξοδική, οπότε τα συμπεράσματα της δεν μπορούν να γενικευθούν.

Η ιδιότητα του LBR να αναγνωρίζει και να συνδέεται σε συγκεκριμένες χρωματινικές περιοχές, αλλά και να στρατολογεί παράγοντες ανασυγκρότησης των περιοχών αυτών διαγράφει ένα ρυθμιστικό ρόλο του LBR τόσο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης, όσο και



στη γονιδιακή έκφραση. Ένας τέτοιος ρόλος υποστηρίζεται από την αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη HP1, που είναι κύριο συστατικό μεταγραφικά ανενεργών χρωματινικών περιοχών και με ένα πρωτεϊνικό παράγοντα που προκαλεί αποδιάταξη των νουκλεοσωμάτων με ταυτόχρονη υδρόλυση ATP (*Georgatos et al, αδημοσίευτο υλικό*).

## **1.2 Οργάνωση της γενετικής πληροφορίας εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου**

### **1.2.1 Χρωματίνη**

Η γενετική πληροφορία ενός ευκαρυωτικού κυττάρου είναι αποθηκευμένη στον πυρήνα, με τη μορφή του δίκλωνου μακρομορίου του DNA, το οποίο αν και έχει μήκος περίπου δύο μέτρα, περικλείεται σε ένα χώρο όγκου κάποιων δεκάδων κυβικών μικρομέτρων. Όσο και αν κάτι τέτοιο φαντάζει αδύνατο, επιστρατεύονται από το κύτταρο πρωτεϊνικοί παράγοντες, οι οποίοι υποβοηθούν το DNA να αναδιπλωθεί και να συμπυκνωθεί περίπου εκατό χιλιάδες φορές, ώστε να επιτευχθεί το 'αδύνατο'. Οι πρωτεΐνες που επιστρατεύονται για να επιτελέσουν αυτό το έργο ονομάζονται ιστόνες και αφού αρχικά σχηματίσουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, επιτρέπουν στο DNA να περιελιχθεί πάνω σε επαναλαμβανόμενες μονάδες του συμπλόκου αυτού και με αυτό τον τρόπο να συμπυκνωθεί.

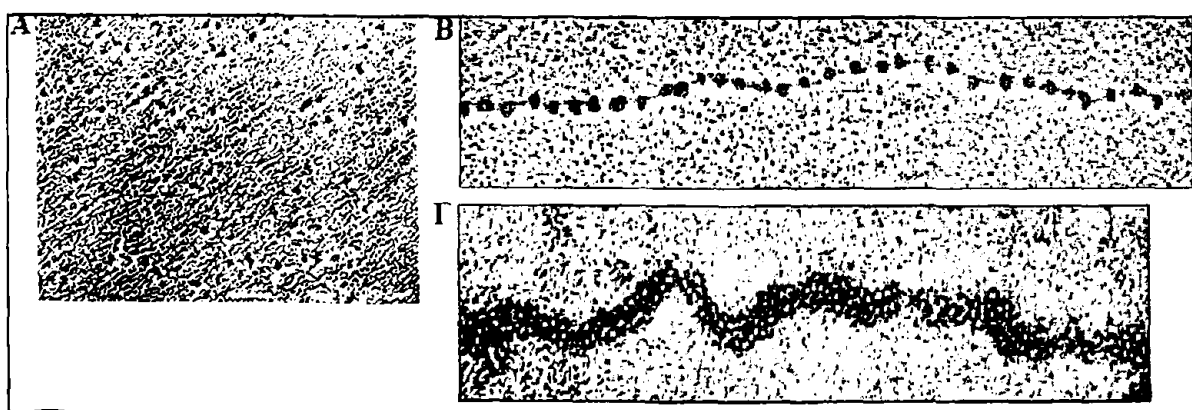
Ιστόνες και DNA σχηματίζουν ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο στα μεσοφασικά κύτταρα κατάνεμεται σε όλο τον πυρήνα και ονομάζεται χρωματίνη. Περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματίνης κατά τη μίτωση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των χαρακτηριστικών χρωμοσωμικών δομών. Η διαδικασία που ακολουθείται για το σχηματισμό της χρωματινικής δομής λαμβάνει χώρα σε διάφορα στάδια και μετάβαση από το ένα στάδιο στο επόμενο συνεπάγεται αύξηση του βαθμού συμπύκνωσης του DNA (*Alberts et al, 2002*).

### **1.2.2 Το νουκλεόσωμα είναι η βασική υπομονάδα της χρωματίνης**

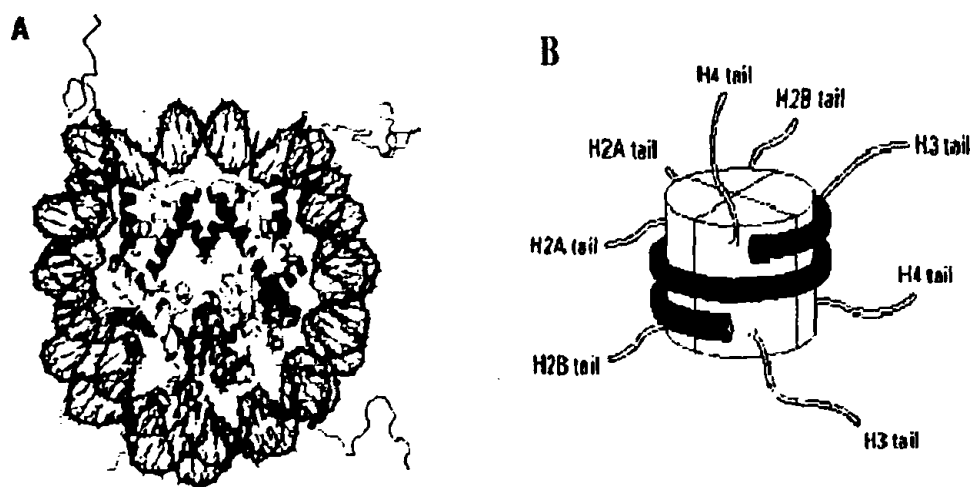
Όταν χρωματίνη επωαστεί εκτεταμένα με μικροκοκκική νουκλεάση (*micrococcal nuclease, MNase*) και το παρασκεύασμα εξεταστεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, παρατηρούνται κάποια σωματίδια που μοιάζουν μακροσκοπικά σαν χάνδρες και έχουν διάμετρο περίπου 10nm (*Εικ. 1.6, Α*). Αυτά τα σωματίδια αποτελούν το πρώτο επίπεδο οργάνωσης της χρωματίνης και ονομάζονται νουκλεοσώματα.



Σημαντικές πληροφορίες για την αρχιτεκτονική αυτού του σωματιδίου έγιναν γνωστές όταν προσδιορίστηκε η κρυσταλλική του δομή (Luger et al, 1997) (Εικ. 1.7, Α), που απέδειξε ότι το νουκλεόσωμα περιέχει 147 ζεύγη βάσεων DNA που περιελίσσονται γύρω από ένα οκταμερές σύμπλοκο ιστονών διαγράφοντας δύο πλήρεις περιστροφές. Το ιστονικό σύμπλοκο, που αποτελεί τον πυρήνα του νουκλεοσώματος συνθέτουν τέσσερις ιστόνες, οι H2A, H2B, H3, H4 (ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα, core histones), συνεισφέροντας η καθεμία ένα ζεύγος μορίων. Συγκεκριμένα, ένα τετραμερές H3-H4 ενώνεται με δύο διμερή H2A-H2B. Από το κυρίως σώμα του κυλινδρικού σωματιδίου που σχηματίζεται και διαπερνώντας τις έλικες του DNA ξεπροβάλλουν και εκτίθενται τα αμινοτελικά άκρα των ιστονών, γνωστά ως αμινοτελικές ουρές (histone tails) (Εικ. 1.7, Β).



Εικόνα 1.6: Ηλεκτρονικές μικρογραφίες χρωματικών δομών σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης (Alberts et al, 2002). Α. Μεμονωμένα νουκλεοσώματα, Β. 'Χάνδρες σε νήμα', Γ. Σωληνοειδή διαμέτρου 30 nm



Εικόνα 1.7: Α. Δομή νουκλεοσώματος. Διακρίνονται οι ιστόνες H2A (κόκκινο), H2B (κίτρινο), H3 (μπλε), H4 (πράσινο) και η διπλή έλικα του DNA (μαύρο) (Luger et al, 1997).

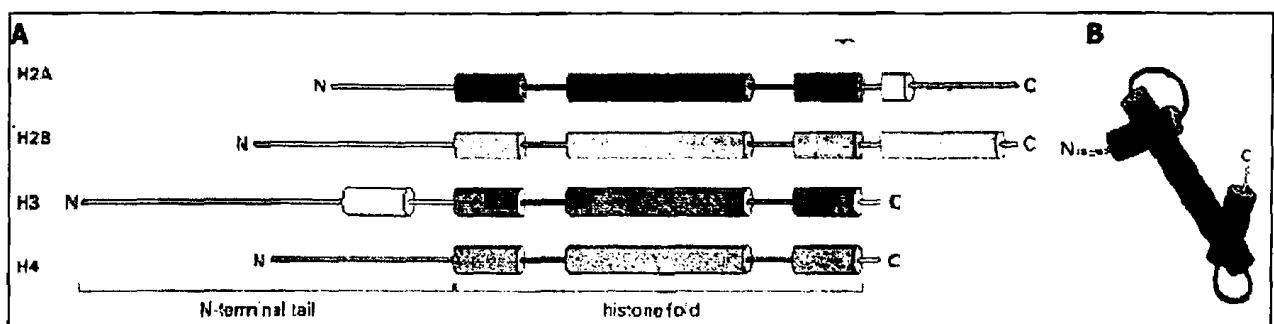
Β. Σχηματική παράσταση του νουκλεοσώματος όπου φαίνονται οι ουρές των ιστονών να ξεπροβάλλουν (Alberts et al, 2002).



Αν μεσοφασικοί πυρήνες βρεθούν σε υποτονικές συνθήκες διογκώνονται και ακολούθως λύνονται, απελευθερώνοντας ινίδια χρωματίνης. Παρατηρώντας τέτοια παρασκευάσματα με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, βλέπουμε τα νουκλεοσώματα να συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό (linker) DNA και να σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές δομές ‘χανδρών σε νήμα’ (beads on a string) (Εικ. 1.6, Β). Σε συνθήκες υψηλότερης ιονικής ισχύος παρατηρούμε αυτή την ίνα χρωματίνης να συσπειρώνεται περαιτέρω, σχηματίζοντας σωληνοειδή διαμέτρου 30 nm (Εικ. 1.6, Γ), τα οποία με τη σειρά τους οργανώνονται σε δομές υψηλότερης τάξης, ώστε τελικά να σχηματιστεί το μιτωτικό χρωμόσωμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα σημεία εισόδου και εξόδου του DNA από τα νουκλεοσώματα σφραγίζει το πέμπτο μέλος της οικογένειας των ιστονών, η συνδετική (linker) ιστόνη H1.

### 1.2.3 Δομή και οργάνωση των ιστονών του νουκλεοσωμικού πυρήνα

Ξεκινώντας από την πρωτοταγή και φτάνοντας ως την τριτοταγή δομή τους οι τέσσερις ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα παρουσιάζουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Είναι σχετικά μικρές πρωτεΐνες με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 11kDa (H4) έως 15kDa (H3) και περιέχουν μεγάλο αριθμό αμινοξέων (αργινίνες, λυσίνες) με θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, που τους επιτρέπει να σχηματίζουν εκτεταμένες επιφάνειες σύνδεσης με τον αρνητικά φορτισμένο κορμό του DNA. Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί ο σχεδόν ολοκληρωτικός βαθμός συντήρησής τους σε όλους τους οργανισμούς, που αναδεικνύει το σημαντικό ρόλο αυτών των πρωτεϊνών στη χρωματινική δομή και στη λειτουργία του κυττάρου γενικότερα.



Εικόνα 1.8: Α. Απεικόνιση των τμημάτων και της δευτεροταγούς δομής των τεσσάρων ιστονών του νουκλεοσωμικού πυρήνα.

B. Η χαρακτηριστική τριτοταγής δομή των ιστονών (histone fold) (Alberts et al, 2002).

Οι ιστόνες δομικά αποτελούνται από δύο διακριτές περιοχές, την κεντρική-δομημένη περιοχή τους (histone core) η οποία σχηματίζεται από τρία ελικοειδή τμήματα και δύο μικρές συνδετικές θηλιές (loops). Οι έλικες διατάσσονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζουν τη χαρακτηριστική δομή της 'αναδίπλωσης των ιστονών' (histone fold) (Εικ. 1.8). Εκατέρωθεν της κεντρικής περιοχής εκτείνονται αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα, με τα πρώτα να είναι μακρύτερα και να διακρίνονται από την απουσία σταθερής δευτεροταγούς δομής, τουλάχιστον όταν δεν συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια. Λόγω της ιδιαίτερης αμινοξικής τους σύστασης, οι ιστονικές ουρές υφίστανται πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που φαίνεται να αποτελούν σημαντικό εργαλείο μεταγωγής σημάτων και λειτουργιών.

#### 1.2.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά χρωματίνης

Στην Εικόνα 1.6 παρουσιάστηκαν τα διάφορα επίπεδα οργάνωσης της χρωματίνης, όπως αυτά διακρίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε διαφορετικά μέσα. Πώς όμως φαίνεται η χρωματίνη με παρατήρηση πυρήνων οι οποίοι δεν έχουν υποστεί κανενός είδους επεξεργασία; Αυτό που γίνεται άμεσα αντιληπτό είναι ότι μέσα στον ίδιο πυρήνα υπάρχουν περιοχές στις οποίες τα επίπεδα συμπύκνωσής της χρωματίνης διαφέρουν. Οι περιοχές αυτές είναι δύο τύπων ανάλογα με την ηλεκτροσκοιερότητά τους (Εικ. 1.9). Αυτές που φαίνονται πιο σκουρόχρωμες αντιστοιχούν σε χρωματίνη υψηλής συμπύκνωσης ή ετεροχρωματίνη (heterochromatin) και αυτές που εμφανίζονται πιο ανοιχτόχρωμες σε χαλαρότερης μορφής χρωματίνη ή ευχρωματίνη (euchromatin) (Lodish et al, 2000)..

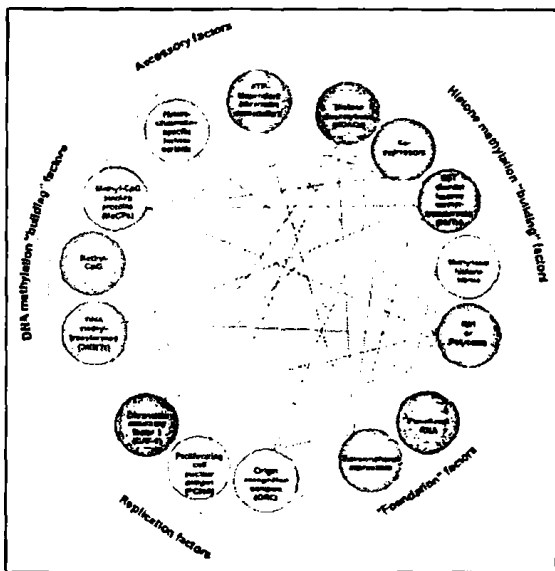


Εικόνα 1.9: Α. Ηλεκτρονική μικρογραφία ευκαρυωτικού κυττάρου εμφανίζει την ετεροχρωματίνη πιο σκουρόχρωμη να βρίσκεται κυρίως γύρω από τους πυρήνισκους και στην περιφέρεια του πυρήνα. Β. Κατανομή των δύο μορφών χρωματίνης στη περιφέρεια του πυρήνα (Franke W., 1974).



Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.9*, η ευχρωματίνη καλύπτει τη μεγαλύτερη επιφάνεια και ο χαλαρότερος χαρακτήρας της την κάνει ευκολότερα προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες. Άλλωστε, περιέχει τις περισσότερες μεταγραφικά ενεργές περιοχές του DNA. Αντιθέτως η ετεροχρωματίνη περιέχει μεγάλα τμήματα επαναλαμβανόμενου DNA (repetitive DNA) και πολύ λίγα εκφραζόμενα γονίδια, διακρίνεται δε σε περικεντρομεριδιακή ή ιδιοστατική (constitutive) και σε περιστασιακή (facultive). Η πρώτη παραμένει συμπυκνωμένη καθόλη τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού, ενώ η δεύτερη έχει πιο δυναμικό χαρακτήρα και μπορεί υπό διάφορες συνθήκες να ‘ευχρωματοποιείται’.

Ποιοί είναι όμως οι μηχανισμοί που λειτουργούν και συντελούν στη δημιουργία ετεροχρωματινικών περιοχών; Η αναγνώρισή τους αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας και ήδη έχουν αναγνωρισθεί πολλοί παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία (*Craig et al, 2004*). Στην *Εικόνα 1.10* αναγράφονται τέτοιοι παράγοντες, οι οποίοι μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου αλληλεπιδράσεων και δρώντας συνεργιστικά, συντελούν στη δημιουργία και διατήρηση της ετεροχρωματίνης.



*Εικόνα 1.10: Χάρτης αλληλεπιδράσεων των κυριότερων ομάδων πρωτεϊνών πῶν συμμετέχουν στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης (Craig et al, 2004).*

### **1.3 Δυναμικός χαρακτήρας της χρωματίνης**

Είδαμε τους τρόπους με τους οποίους λύνεται το χωροταξικό πρόβλημα της διεύθετης της τόσο μακριάς αλυσίδας του DNA στον περιορισμένο όγκο του πυρήνα. Ανακύπτει όμως ένα δεύτερο εύλογο ερώτημα. Πώς οι πρωτεϊνικές μηχανές έχουν πρόσβαση σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, οι οποίες είναι βαθιά κρυμμένες στο ‘κουβάρι’ της χρωματίνης; Κάτι τέτοιο είναι αναγκαίο να επιτευχθεί, καθώς αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ολοκλήρωση λειτουργιών όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η



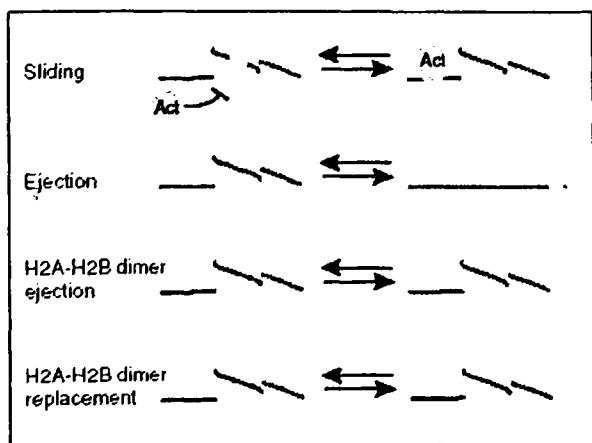
επιδιόρθωση του DNA. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με την ύπαρξη μηχανισμών που επιτρέπουν την προσβασιμότητα του DNA σε διάφορες χρωματινικές περιοχές. Τέτοιοι μηχανισμοί σχετίζονται με την παροδική αποσύνδεση και έκθεση ρυθμιστικών περιοχών, με την ολίσθηση (sliding) των νουκλεοσωμάτων και με μεταβολές στις χρωματινικές δομές ανώτερης τάξης. Όλες αυτές οι διαδικασίες επάγονται από την δράση παραγόντων αναδιαμόρφωσης (remodeling factors), από την ανταλλαγή ισομορφών ιστονών (histone variant exchange), από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και από τη διαμεσολάβηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη (Luger K, 2006).

### 1.3.1 Παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης

Οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης μπορούν να επιδράσουν στα νουκλεοσώματα τουλάχιστον με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους (Εικ. 1.11).

- (i) ολισθαίνουν ή μετακινούν το ιστονικό οκταμερές
- (ii) το εκτοπίζουν τελείως ώστε να αποκαλυφθεί το DNA
- (iii) απομακρύνουν διμερή H2A-H2B
- (iv) εναλλάσσουν διμερή H2A-H2B με διμερή που περιέχουν H2B και την ισομορφή H2A.Z

Οι αναδιαμορφωτές χρωματίνης κατηγοριοποιούνται σε διάφορες οικογένειες με βάση τη δράση και τη σύστασή τους, καθώς αποτελούνται από επιμέρους υπομονάδες. Η ικανότητά τους να επιδρούν σε νουκλεοσωμικές δομές και να προκαλούν τη χαλάρωσή τους, ώστε η κρυμμένη περιοχή του DNA να αποκαλυφθεί, επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: είτε συνδέονται στο DNA, υδρολύουν ATP και χρησιμοποιούν την εκλυόμενη ενέργεια είτε στρατολογούνται από τροποποιημένες ιστόνες. Η δεύτερη υπόθεση άρχισε να μορφοποιείται πρόσφατα, καθώς παρατηρήθηκε ότι μέλη πολλών αναδιομορφωτών περιέχουν μοτίβα που αναγνωρίζουν αυτές τις τροποποιήσεις των ιστονών (Cosgrove et al, 2004).



Εικόνα 1.11: Τρόποι αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων (Cairns BR., 2007)



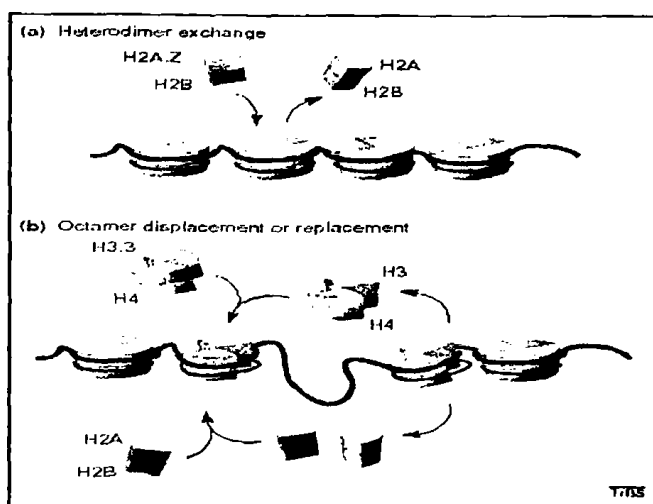
### 1.3.2 Ανταλλαγή ισομορφών ιστονών

Δομικές αλλαγές στη χρωματίνη μπορούν να προκύψουν επίσης μέσω μηχανισμών αντικατάστασης των ιστονών με τις ισομορφές τους. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν ισομορφές των H2A και H3, οι οποίες διαφέρουν από τις κανονικές στην αμινοξική αλληλουχία και στη δυνατότητα που έχουν να συντίθενται και να ενσωματώνονται στα νουκλεοσώματα ανεξάρτητα με την αντιγραφή του DNA (Πιν. 1.1)..

<b>H2A.X.</b>	στη φωσφορυλιωμένη μορφή της αποτελεί δείκτη βλαβών στο DNA
<b>H2A.Z.</b>	ανάλογα με τον οργανισμό, έχει ανασταλτικό και κατασταλτικό ρόλο στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης
<b>macroH2A</b>	δείκτης αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X των θηλαστικών
<b>H2A<sup>Bbd</sup></b>	συγκεντρώνεται σε θέσεις μεταγραφής και αποκλείεται από το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X
<b>H3.3</b>	εντοπίζεται σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές και αποτρέπει την επέκταση ετεροχρωματινικών περιοχών
<b>CENP-A</b>	εντοπίζεται στα κεντρομερίδια

Πίνακας 1.1: Χαρακτηριστικά κυριότερων ιστονικών ισομορφών

Λίγα πράγματα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς ενσωμάτωσης των ιστονικών ισομορφών στα νουκλεοσώματα. Ετεροδιμέρη ιστονών που περιέχουν H2A ή κάποια ισομορφή της είναι δυνατό να ενσωματωθούν χωρίς πλήρη αποσυναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων. Αντίθετα, ανταλλαγή τετραμερών H3-H4 απαιτεί τον εκτοπισμό και επανασχηματισμό ολόκληρου του οκταμερούς (Εικ. 1.12).



Εικόνα 1.12: Πιθανοί τρόποι ανταλλαγής ιστονών (Jin et al, 2005)

- a) Ανταλλαγή ετεροδιμερών H2A-H2B
- b) Ανταλλαγή τετραμερών H3-H4

### 1.3.3 Τροποποιήσεις πλευρικών αλυσίδων ιστονών

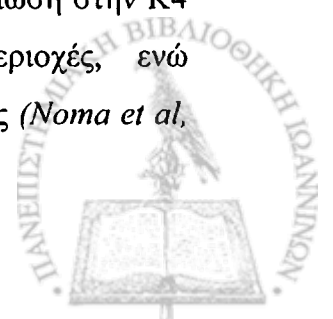
Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πλευρικών αλυσίδων των ιστονών έχει δειχθεί ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία του DNA. Στο αμέσως επόμενο κεφάλαιο θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στις τροποποιήσεις που υφίστανται οι ιστονικές αμινοτελικές ουρές και στον τρόπο με τον οποίο επιδρούν στη δομή της χρωματίνης.

Τον τελευταίο καιρό ταυτοποιήθηκε μια νέα κατηγορία τροποποιήσεων, οι οποίες χαρτογραφήθηκαν στην κεντρική περιοχή των ιστονών (*Freitas et al, 2004*). Τα τροποποιήσιμα αμινοξέα είτε συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με το DNA είτε βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με αυτό, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι τροποποιήσεις ρυθμίζουν άμεσα τις συνδέσεις ιστονών-DNA και αναμένεται να μεταβάλλουν την ελεύθερη ενέργεια αυτών των συνδέσεων. Προτείνεται λοιπόν ότι διαφορετικός συνδυασμός τροποποιήσεων στην κεντρική περιοχή των ιστονών επιδρά στην κινητική των νουκλεοσωμάτων (*Cosgrove et al, 2004*). Επειδή το DNA παρεμποδίζει την άμεση επαφή ενζύμων που επάγουν αυτές τις τροποποιήσεις με τις πλευρικές αλυσίδες των ιστονών, πιστεύεται ότι αυτές οι χημικές τροποποιήσεις συμβαίνουν απουσία DNA από το νουκλεόσωμα ή μετά από δράση μηχανισμών που συντελούν στην έκθεση των αντίστοιχων περιοχών.

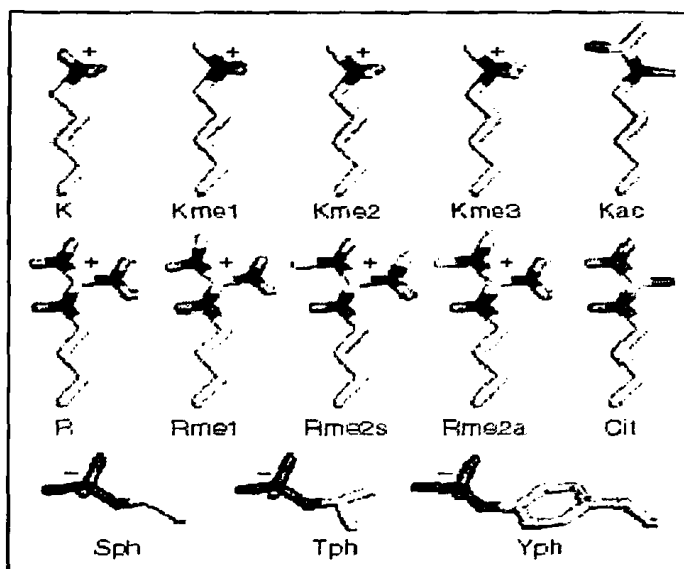
## 1.4 Ιστονικός κώδικας (*histone code*)

Είδαμε στη προηγούμενη παράγραφο το ρόλο των τροποποιημένων ιστονικών κεντρικών τμημάτων στη δυναμική της χρωματίνης. Αντίστοιχη λειτουργία είχε ήδη αποδοθεί νωρίτερα και στις τροποποιήσεις που παρατηρούνται στις ιστονικές αμινοτελικές ουρές. Είναι χαρακτηριστικό ότι ήδη τα δύο-τρίτα των πιθανά τροποποιήσιμων αμινοξέων αυτών των περιοχών έχουν βρεθεί τροποποιημένα και ο αριθμός τους αναμένεται να αυξηθεί στα επόμενα χρόνια.

Η πλειοψηφία αυτών των χημικών τροποποιήσεων βασίζεται στην ομοιοπολική σύνδεση κυρίως μικρών ομάδων (ακέτυλο-, μέθυλο-, φωσφορο-) σε πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, όπως λυσίνης (K), αργινίνης (R), σερίνης (S), θρεονίνης (T), τυροσίνης (Y) (*Εικ. 1.13*). Παρατηρήθηκε ότι συγκεκριμένες τροποποιήσεις σχετίζονται με διακριτές χρωματινικές καταστάσεις. Έτσι, υπερακετυλίωση ιστονικών ουρών και μεθυλίωση στην K4 της H3 συσχετίστηκαν με μεταγραφικά ενεργές ευχρωματινικές περιοχές, ενώ υποακετυλίωση και μεθυλίωση στην K9 της H3 με ετεροχρωματινικές περιοχές (*Noma et al,*



2001). Παρόμοιες παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση του 'ιστονικού κώδικα', ο οποίος αναφέρει ότι τροποποιήσεις σε συγκεκριμένες θέσεις και συνδυασμός αυτών στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών αλλάζουν τη δομή της χρωματίνης, είτε άμεσα, επηρεάζοντας αλληλεπιδράσεις ιστονών-DNA ή ιστονών-ιστονών, είτε έμμεσα, στρατολογώντας πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν αυτές τις τροποποιήσεις (Strahl and Allis, 2000). Μέσω της άμεσης οδού η συμπύκνωση της χρωματίνης επηρεάζεται από τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση και η φωσφορυλίωση, οι οποίες αναιρώντας το θετικό ή προσδίδοντας αρνητικό φορτίο εξασθενούν τις αλληλεπιδράσεις των βασικών ιστονών με το αρνητικά φορτισμένο DNA (Wolffe and Hayes, 1999).



Εικόνα 1.13: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών. Φαίνονται οι πλευρικές αλυσίδες τροποποιήσεων αμινοξέων και τονίζονται οι μικρές χημικές ομάδες που προστίθενται.

Κίτρινο-άνθρακας, μπλε-άζωτο, ροζ-πολικό υδρογόνο, κόκκινο-οξυγόνο, πορτοκαλί-φώσφορος, πράσινο-μεθύλια.

Το φόντο είναι χρωματισμένο ανάλογα με το φορτίο που αποκτούν οι πλευρικές αλυσίδες σε ουδέτερο pH. Μπλε-θετικό, ροζ-αρνητικό, ανοικτό πράσινο-μη φορτισμένο (Taverna et al, 2007).

Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονικών ουρών και του DNA έχουν μικρότερη επίδραση στη δυναμική της χρωματίνης, καθώς πειράματα αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης με συστοιχίες νουκλεοσωμάτων έδειξαν ότι δεν μεταβάλλεται ο βαθμός συμπύκνωσής τους, όταν έχουν αφαιρεθεί οι ιστονικές ουρές (Dorigo et al, 2003). Φάνηκε λοιπόν ότι σημαντικό ρόλο στην αποκρυπτογράφηση του ιστονικού κώδικα και στην επαγωγή γεγονότων που επιδρούν στη δομή της χρωματίνης παίζουν πρωτεΐνες, οι οποίες αναγνωρίζουν τις ιστονικές τροποποιήσεις και συμμετέχουν στη προσέλκυση μηχανών που δρουν τοπικά (Seet et al, 2006). Τα πρώτα χρόνια της διατύπωσής της, η υπόθεση του ιστονικού κώδικα απέδιδε στους διαφορετικούς συνδυασμούς ιστονικών τροποποιήσεων τα χαρακτηριστικά ενός γραμμικού, πληροφοριακού συστήματος εντολών που καθόριζε μονοσήμαντα για κάθε είδους τροποποίησης την προσβασιμότητα του DNA και την έκβαση της γονιδιακής έκφρασης. Κεντρικό ρόλο στη διαδικασία αυτή έπαιξαν οι



πρωτεΐνες-‘αναγνώστες’ των αντίστοιχων τροποποιήσεων. Τελευταία όμως πειραματικά αποτελέσματα μετατοπίζουν το βάρος της θεωρίας αυτής προς την κατεύθυνση των δομικών αλλαγών στη χρωματίνη, έτσι που η βάση του ιστονικού κώδικα να αποκτά κυρίως δομικά παρά πληροφοριακά χαρακτηριστικά (Henikoff, 2005).

#### 1.4.1 Πρωτεϊνικά μοτίβα που αναγνωρίζουν ιστονικές τροποποιήσεις

Τη περασμένη δεκαετία εκτεταμένη χρήση βιοχημικών και βιοφυσικών μεθόδων ανέδειξε μία πλειάδα συντηρημένων πρωτεϊνικών μοτίβων, τα οποία αναγνώριζαν και συνδέονταν ειδικά σε τροποποιημένες ιστονικές ουρές, με τρόπο εξαρτώμενο, τόσο από το είδος και το βαθμό της τροποποίησης, όσο και από τη θέση της στην ιστονική αλληλουχία.

Το πρώτο πρωτεϊνικό μοτίβο που χαρακτηρίστηκε δομικά ήταν το μοτίβο bromo (bromodomain) του μεταγραφικού ενεργοποιητή Gcn5p. Η κρυσταλλική του δομή (Owen *et al*, 2000, *Εικ. 1.14, A*) μαζί με πεπτίδιο της H4 ακετυλιωμένο στη K16 ανέδειξε την γενικότερα αποδεκτή ιδιότητα των bromodomains να αναγνωρίζουν ακετυλιωμένες λυσίνες.

Reader module		PTM mark
Bromodomain		Many histone Kac. (Kac)
R o y a l	Chromodomain	H3K9me2/3, H3K27me2/3
	Double chromodomain	H3K4me1/2/3
	Chromo barrel	H3K36me2/3
	Tudor	(Rme2s)
	Double/tandem tudor	H3K4me3, H4K20me3 H4K20me1/2. (Kme2)
	MBT	H4K20me1/2. H1K26me1/2 H3K4me1, H3K9me1/2
PHD finger		H3K4me3, H3K4me0 H3K9me3, H3K36me3
WD40 repeat		H3R2/K4me2. (R, Sph, Tph)
14-3-3		H3S10ph, H3S28ph, (Sph, Tph)
BRCT		H2AX-S139ph. (Sph, Tph)

*Πίνακας 1.2: Πρωτεϊνικά μοτίβα και τα ιστονικά ‘σημάδια’ (PTM marks) που αναγνωρίζουν. Οι παρενθέσεις αναφέρονται σε τροποποιήσεις εκτός ιστονών (Taverna *et al*, 2007).*

Τα πράγματα περιπλέκονται στην αναγνώριση μεθυλιωμένων καταλοίπων, καθώς η μεθυλίωση επεκτείνεται και στις αργινίνες, αλλά ποικίλει επίσης και στο βαθμό (μόνο-, δι-, τρι-). Σε αντίθεση με την αναγνώριση των ακετυλιωμένων λυσινών από ένα είδος μοτίβου (bromodomain), οι μεθυλιωμένες λυσίνες αναγνωρίζονται από περισσότερα (Chromo, Tudor, PWWP, MBT, PHD). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ομοιότητες αυτών των μοτίβων (εκτός των PHD) τόσο ως προς τις αλληλουχίες τους, όσο και ως προς τις τριτοταγείς δομές τους, κάτι που πιθανολογεί την εξέλιξή τους από κάποιον κοινό πρόγονο, που παρουσίαζε ιδιότητες





σύνδεσης σε μεθυλιωμένα κατάλοιπα. Με βάση αυτά τα κοινά χαρακτηριστικά, τα παραπάνω μοτίβα κατατάχθηκαν στην υπεροικογένεια 'Royal family' ( Πίνακας 1.2) (Maurer-Stroh *et al*, 2003).

Το πρώτο μοτίβο αυτής της υπεροικογένειας, του οποίου χαρακτηρίστηκε δομικά η ικανότητα να συνδέεται σε μεθυλιωμένες λυσίνες ήταν το chromodomain. Στην Εικόνα 1.14, Β φαίνεται η δομή του καλύτερα χαρακτηρισμένου chromo domain, αυτού της πρωτεΐνης HP1, συνδεδεμένο με την διμεθυλιωμένη K9 της H3 (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002). Αντίθετα με τις μεθυλιωμένες λυσίνες, οι αντίστοιχα τροποποιημένες αργινίνες ακόμα αναζητούν τον 'αναγνώστη' τους, καθώς έως τώρα δεν υπάρχει λυμένη δομή κάποιου συμπλόκου πρωτεϊνικού μοτίβου και πεπτιδίου ιστονικής ουράς μεθυλιωμένου σε κατάλοιπο αργινίνης. Παρόλα αυτά, κάποιες λειτουργικές μελέτες με άλλες πρωτεΐνες δείχνουν σαν πιθανότερα υποψήφια για αυτό το ρόλο τα Tudor domains (Taverna *et al*, 2007).



Εικόνα 1.14: Α. Τριτοταγής δομής του μοτίβου *Bromo* της πρωτεΐνης *Gcn5p*. Με κόκκινο διακρίνεται η ακετυλιωμένη K16 της H4.

Β. Τριτοταγής δομή του μοτίβου *Chromo* της πρωτεΐνης *HP1*. Με κόκκινο διακρίνεται η διμεθυλιωμένη K9 της H3.

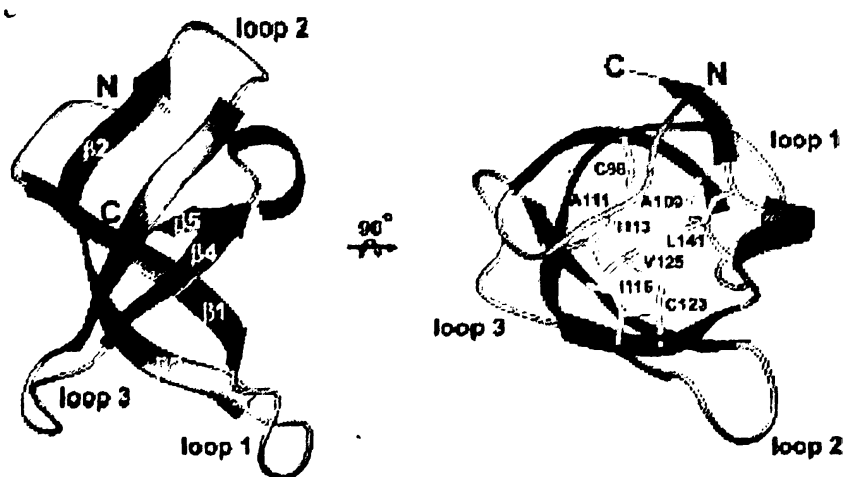
#### 1.4.2 Συνοπτική περιγραφή των Tudor μοτίβων (Tudor domains)

Το μοτίβο Tudor αναγνωρίστηκε μετά από μία ενδελεχή σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Πήρε το όνομά του από την ομώνυμη πρωτεΐνη της *Drosophila* η οποία περιέχει 11 αντίγραφα του και η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό των σπερματοκυττάρων με άγνωστο όμως μηχανισμό. Στη συνέχεια φάνηκε να περιέχεται κυρίως σε πρωτεΐνες που συνδέονταν με RNA και έτσι του αποδόθηκε ρόλος στο μεταβολισμό του RNA (Ponting, 1997). Τα πρώτα όμως πειραματικά δεδομένα που προέκυπταν άρχισαν να καταρρίπτουν την



αρχική υπόθεση. Για παράδειγμα, απαλοιφή της μοναδικής Tudor περιοχής στη πρωτεΐνη της *Drosophila* OTU (Ovarian Tumor protein) δεν επηρεάζει τη σύνδεσή της με ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (mRNPs) (Glenn and Searles, 2001).

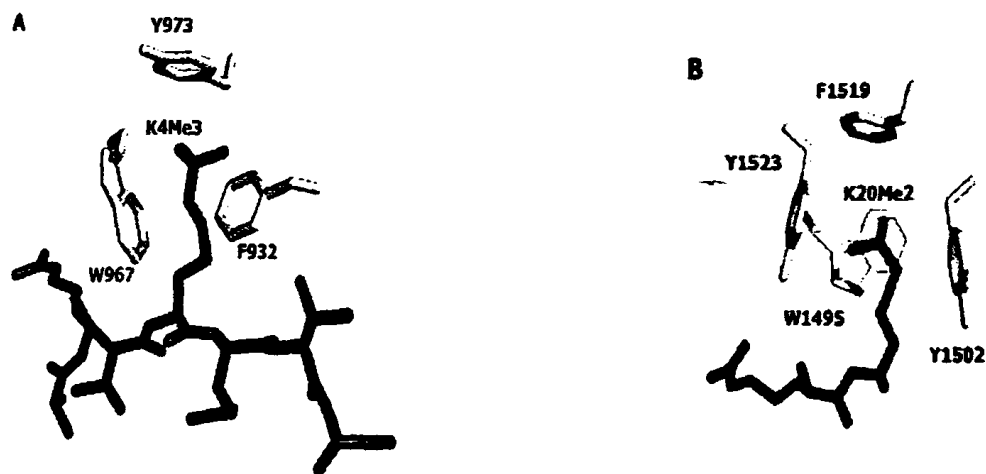
Ο δομικός χαρακτηρισμός του Tudor μοτίβου που προερχόταν από την πρωτεΐνη SMN (Survival Motor Neuron protein) ήρθε να ενισχύσει αυτές τις λειτουργικές παρατηρήσεις, καθώς η τρίτοταγής του δομή διαφοροποιούταν από αυτές πρωτεϊνικών περιοχών που συνδέονται με RNA. Η SMN συμμετέχει στο μάτισμα του RNA, παίζοντας ρόλο στο σχηματισμό των μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (snRNPs) με τη σύνδεσή της στις Sm πρωτεΐνες (spliceosomal Sm proteins), μέσω του Tudor domain που περιέχει. Επίλυση της τρισδιάστατης δομής του Tudor domain με NMR (Selenko et al, 2001), αποκάλυψε την αναδίπλωσή του σε μία δομή 'βαρελιού', κλειστού από τη μία πλευρά, το οποίο σταθεροποιείται από την παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων που έχουν τις πλευρικές τους αλυσίδες στραμμένες στην εσωτερική του πλευρά (Εικ. 1.15). Η αύξηση της συγγένειας της SMN με τις Sm πρωτεΐνες, όταν αυτές είναι συμμετρικά διμεθυλιωμένες σε κατάλοιπα αργινίνης των καρβόξυ-τελικών τους άκρων (Brahms et al, 2001), ανέδειξε για πρώτη φορά την ικανότητα των Tudor domains να αναγνωρίζουν τέτοιες τροποποιήσεις, γεγονός που επιβεβαιώθηκε αργότερα και με άλλες πρωτεΐνες, που είναι κυρίως παράγοντες ματίσματος και περιέχουν Tudor domains (Cote et al, 2005).



Εικόνα 1.15: Τρισδιάστατη δομή του Tudor domain της πρωτεΐνης SMN σε δύο διαφορετικούς προσανατολισμούς. Με κίτρινο φαίνονται οι πλευρικές αλυσίδες των υδρόφοβων αμινοξέων που σταθεροποιούν την χαρακτηριστική αναδίπλωση 'βαρελιού' (Selenko et al, 2001).

### 1.4.3 Τρόπος αναγνώρισης μεθυλιωμένων καταλοίπων από τα Tudor domains .

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε, εκτός από την επίλυση της δομής του Tudor domain της SMN πρωτεΐνης και για την χαρτογράφηση της περιοχής σύνδεσης των μεθυλιωμένων αργινινών. Έτσι φάνηκε ότι σημαντικό ρόλο στην αναγνώρισή τους έχουν τέσσερα αρωματικά αμινοξέα, των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες σχηματίζουν ένα 'αρωματικό κλωβό' (aromatic cage). Ο ρόλος του αρωματικού κλωβού σαν δομικό χαρακτηριστικό στην ικανότητα αναγνώρισης μεθυλιωμένων καταλοίπων φάνηκε όταν τα Tudor domains εμπλέχτηκαν στην ανάγνωση του ιστονικού κώδικα και συγκεκριμένα στην αναγνώριση μεθυλιωμένων λυσινών. Έτσι, οι δομές των διπλών Tudor περιοχών (double Tudor domains) των πρωτεϊνών JMJD2A και 53BP1 μαζί με ιστονικά πεπτίδια, έδειξαν σε ατομική λεπτομέρεια πώς η πρώτη αναγνωρίζει την τριμεθυλιωμένη K4 της H3 (Huang et al, 2006) και πώς η δεύτερη την διμεθυλιωμένη K20 της H4 (Botuyan et al, 2006). Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι τα ιστονικά πεπτίδια υφίστανται αλλαγές στη διαμόρφωσή τους σχηματίζοντας τοπικά δομές β-πτυχωτής επιφάνειας συνδεόμενα με κατάλοιπα των Tudor περιοχών και ταυτόχρονα οι πλευρικές αλυσίδες των μεθυλιωμένων λυσινών περικυκλώνονται από τις αντίστοιχες των καταλοίπων που συνθέτουν τον αρωματικό κλωβό (Εικ. 1.16). Η σύνδεση σταθεροποιείται από κατά βάση ηλεκτροστατικούς δεσμούς που σχηματίζει η κατιοντική N<sup>ε</sup>-μεθυλομάδα της λυσίνης με τ<sup>ο</sup> π-σύστημα των αρωματικών δακτυλίων.



Εικόνα 1.16: Διακρίνονται οι αρωματικοί κλωβοί (πράσινο) των Tudor περιοχών των πρωτεϊνών A. JMJD2A (Huang et al, 2006), B. 53BP1 (Botuyan et al, 2006), καθώς και τα αντίστοιχα ιστονικά πεπτίδια (κόκκινο) που αναγνωρίζουν.

Όσον αφορά το δυνητικό Tudor domain του LBR δεν είναι γνωστή η δομή του, ούτε έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής προτίμησή του για πρόσδεση μεθυλιωμένων ιστονών. Η μόνη σχετική αναφορά που υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία βασίζεται στη χρήση πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών που σκοπό είχαν τον εντοπισμό τυχόν αλληλεπιδράσεων μιας σειράς πρωτεϊνικών μοτίβων με πεπτιδικά ανάλογα τροποποιημένων ιστονών H3 και H4 (Kim *et al*, 2006). Οι περιορισμένες τροποποιήσεις που δοκιμάστηκαν, αλλά και τα τεχνικά προβλήματα που συνδέονται με τη χρήση πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών δεν επιτρέπουν την γενίκευση της απουσίας αλληλεπίδρασης του Tudor domain του LBR και τροποποιημένων ιστονών που προέκυψε από τη μελέτη αυτή. Έτσι παραμένει ανοιχτό το ενδεχόμενο να αναγνωρίζει ο LBR τροποποιημένες ιστόνες.



## 1.5 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι:

- Ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής του προβλεπόμενου Tudor domain του LBR σε ατομική λεπτομέρεια με χρήση φασματοσκοπίας NMR
- Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain του LBR με νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) καθώς και με τα κύρια πρωτεϊνικά συστατικά του νουκλεοσώματος (ιστόνες)
- Ο εντοπισμός των θεμελιωδών δομικών χαρακτηριστικών του Tudor domain του LBR που ευθύνονται για την τυχόν αλληλεπίδρασή του με νουκλεοσωμικά ή μη συστατικά
- Η σύγκριση της σχέσης δομής-λειτουργίας του Tudor domain του LBR με αυτή των άλλων μελών της οικογένειας των Tudor μοτίβων
- Ο ρόλος των άλλων τμημάτων του αμινοτελικού τμήματος του LBR στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τη χρωματίνη
- Η αναπαράσταση των ολιγομερών σωματιδίων του LBR, καθώς και ο υπολογισμός του μεγέθους τους
- Ο εντοπισμός της περιοχής του LBR που ευθύνεται για τον ολιγομερισμό του



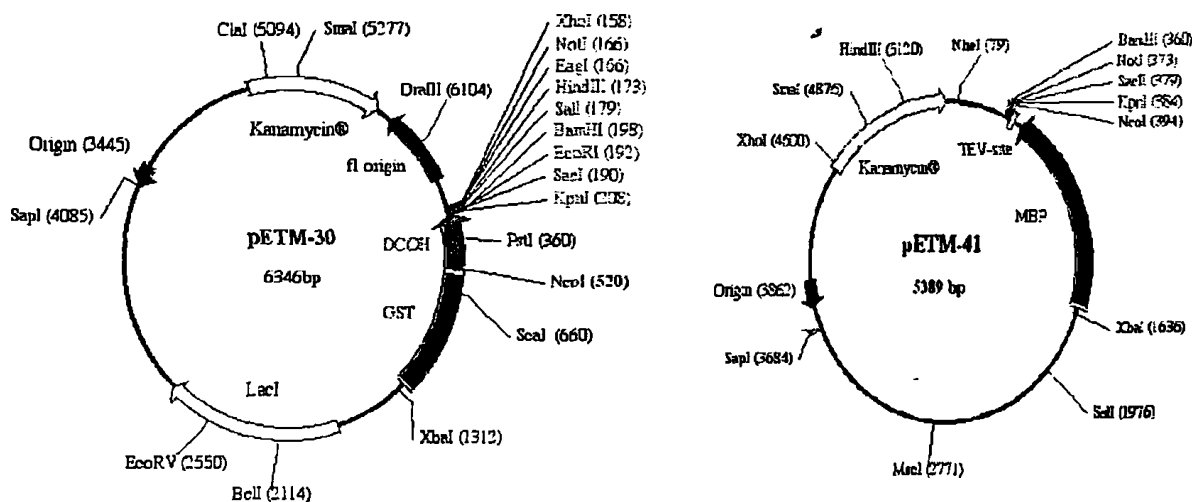
# ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ



## 2.1 Κλωνοποίηση-Πλασμιδιακές κατασκευές

### 2.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς – Βακτηριακά στελέχη

Για την υπερέκφραση των κατασκευών του Tudor domain χρησιμοποιήθηκαν οι τροποποιημένοι pETM-30 και pETM-41 πλασμιδιακοί φορείς, τους οποίους μας παραχώρησε ο G.Stier (EMBL, Heidelberg) (Εικ. 2.1). Κύριο χαρακτηριστικό αυτών των φορέων έκφρασης είναι ότι τα γονίδια προς έκφραση βρίσκονται υπό τον έλεγχο του T7 υποκινητή (T7 promoter) και του καταστολέα της λακτόζης. Αφού τα επιθυμητά πλασμίδια κατασκευαστούν, μεταφέρονται σε βακτηριακά κύτταρα ξενιστές που περιέχουν αντίγραφο του γονιδίου που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση, το οποίο ελέγχεται επίσης από τον καταστολέα της λακτόζης. Η έκφραση του πολυπεπτιδίου επιτελείται αποκλειστικά από την T7 RNA πολυμεράση, κατόπιν ρύθμισης με προσθήκη IPTG. Έτσι, επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση έκφρασης, με αποτέλεσμα σε λίγες ώρες το επιθυμητό προϊόν να αποτελεί περισσότερο από 50% της ολικής βακτηριακής πρωτεΐνης (Pan and Malcolm, 2000).



Εικόνα 2.1: Χάρτες πλασμιδίων pETM-30 και pETM-41.

Εκτός όμως από τη δυνατότητα υπερέκφρασης, οι παραπάνω πλασμιδιακοί φορείς προσφέρουν και τη δυνατότητα απομόνωσης του πολυπεπτιδίου, το οποίο συνεκφράζεται με αμινοτελικές συνοδές επισημάνσεις (tags), οι οποίες συνδέονται ειδικά σε στήλες συγγένειας. Χρησιμοποιώντας τους παραπάνω φορείς, το πολυπεπτίδιο συνεκφράζεται με μία

εξαϊστιδινική ουρά και τις πρωτεΐνες GST (Glutathione S Transferase) και MBP (Maltose Binding Protein) για τους φορείς pETM-30 και pETM-41 αντίστοιχα. Μεταξύ αυτών των συνεκφραζομένων πρωτεϊνών και του επιθυμητού πολυπεπτιδίου, υπάρχει θέση αναγνώρισης για την TEV (Tobacco Etch Virus) πρωτεάση, χρήση της οποίας επιτρέπει την αποκοπή των tags. Τέλος, οι παραπάνω πλασμιδιακοί φορείς παρέχουν στο κύτταρο ανθεκτικότητα στο αντιβιοσικό καναμυκίνη.

Για την υπερέκφραση του Tudor domain χρησιμοποιήθηκε το ευρέως διαδεδομένο βακτηριακό *E.Coli* στέλεχος BL21(DE3), από το οποίο έχουν αφαιρεθεί γενετικά οι πρωτεάσες Ipp και ompT. Για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a, ακολουθώντας καθιερωμένα πρωτόκολλα (*Sambrook et al, 1989*).

### 2.1.2 Παρασκευή κωδικοποιού τμήματος DNA του Tudor domain με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Τα πειράματα PCR για την παρασκευή του κωδικοποιού τμήματος DNA του Tudor domain του LBR έγιναν σε συνεργασία με την Ε.Νικολακάκη (Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης), η οποία μας παραχώρησε πλασμιδιακή κατασκευή του LBR πτηνών που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο. Σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers) (*Πιν.2.1*), οι οποίοι περιείχαν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NcoI* και *NotI*, μέσω των οποίων το PCR προϊόν εισήχθη στους φορείς pETM.

Εκκινητές (Primers)
Ευθύς (Forward) GGGCGCCATGGGTATGCCAAACCGGAAGTATGC
Αντίστροφος (Reverse) TGAAGAATGCGGCCCTACTACTGCTTGAATGATGACTG

**Πίνακας 2.1:** Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις πλασμιδιακές κατασκευές του Tudor domain. Με έντονους χαρακτήρες διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NcoI* και *NotI*, ενώ υπογραμμισμένες είναι οι δύο συμπληρωματικές τριπλέτες που αντιστοιχούν σε κωδικόνια τερματισμού.

Οι αντιδράσεις PCR έγιναν σε διαλύματα όγκου 50μl που περιείχαν:

- 1X buffer πολυμεράσης
- 0.2μM από τον κάθε primer
- 200μM από κάθε dNTP
- 2U DNA πολυμεράση (Invitrogen)
- 20ng από το DNA εκμαγείο





Τυπικά, το πρόγραμμα διαδοχικών εναλλαγών θερμοκρασίας είχε ως εξής:

5 λεπτά (94°C) αποδιάταξη DNA	} 30 κύκλοι
1 λεπτό (94°C)	
1 λεπτό (62-68°C) επαναδιάταξη	
1 λεπτό (72°C) επιμήκυνση	
10 λεπτά (72°C) τελική επιμήκυνση	

Η παραγωγή και καθαρότητα του προϊόντος ελέγχθηκε ηλεκτροφορητικά σε 1.5% gel αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη χαμηλού σημείου ζέσεως και οι ηλεκτροφορήσεις έλαβαν χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE. Οι ζώνες των μορίων DNA παρατηρήθηκαν με λάμπα UV, μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

### 2.1.3 Ενζυμικές πέψεις

Προκειμένου να εισαχθεί το γονίδιο του Tudor domain στους δύο πλασμιδιακούς φορείς, πραγματοποιήθηκαν διπλές πέψεις με *NcoI* και *NotI*, τόσο στους φορείς, όσο και στο προϊόν της PCR, έτσι ώστε να σχηματιστούν αλληλεπικαλυπτόμενα άκρα (sticky ends). Οι δύο αντιδράσεις έγιναν ταυτόχρονα σε διαλύματα συνολικού όγκου 30μl που περιείχαν:

- 1.5μl *NcoI* (Takara)
- 1.5μl *NotI* (Takara)
- 3μl 10xbuffer 3 (NEB)
- 10μg DNA φορέα ή όλο το προϊόν PCR
- 3μl 10xBSA
- H<sub>2</sub>O έως τα 30μl

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στους 37°C για ~12 ώρες. Στη συνέχεια τα μίγματα των αντιδράσεων αναλύθηκαν σε gel αγαρόζης, από τα οποία οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στους γραμμικούς pETM φορείς και στο ένθεμα (insert) αποκόπηκαν και τα αντίστοιχα μόρια DNA απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το Quick gel extraction kit (Invitrogen).

### 2.1.4 Κατάλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών

Για να ολοκληρωθούν οι κατασκευές, τα δύο τμήματα DNA (φορέας και ένθεμα) που περιέχουν πλέον αλληλεπικαλυπτόμενα άκρα, συνδέθηκαν παρουσία DNA λιγάσης, η οποία καταλύει το σχηματισμό των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Χρησιμοποιήθηκε T4 DNA λιγάση (Takara) και το μίγμα αντίδρασης (20μl) περιείχε επίσης το ένθεμα και τον γραμμικό φορέα σε μοριακή αναλογία 3:1. Η αντίδραση προχώρησε για ~12 ώρες στους 14°C και διακόπηκε με απενεργοποίηση του ενζύμου για 1h στους 56° C.



## 2.1.5 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων – Απομόνωση πλασμιδιακού

### DNA

Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα παρασκευάστηκαν μετά από επαναδιάλυση κυτταρικής καλλιέργειας η οποία αναπτύχθηκε για ~12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM PIPES pH 6.8, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 3mM MnCl<sub>2</sub>. Τα βακτηριακά εναιωρήματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C παρουσία 15% DMSO.

10μl από το διάλυμα της αντίδρασης κατάλυσης από την DNA λιγάση προστέθηκε σε 100μl εναιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων DH5a. Το μίγμα αφέθηκε για 20 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια υπέστη θερμικό shock στους 42°C για 90sec. Ακολούθησε προσθήκη θρεπτικού διαλύματος LB και επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια το κυτταρικό αιώρημα απλώθηκε σε τρυβλία με LB και καναμυκίνη, τα οποία επώαστηκαν στους 37°C για ~12 ώρες.

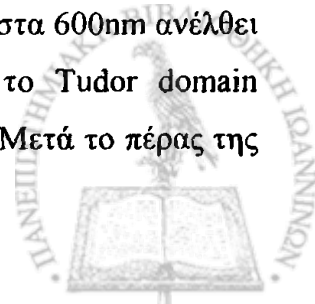
Μονή αποικία εμβολιάστηκε σε καλλιέργεια όγκου 5ml, η οποία αναπτύχθηκε για ~12 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε λύση των βακτηρίων και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας το HiPure plasmid miniprep kit (Invitrogen). Το ίζημα του DNA επαναδιαλύθηκε σε νερό, η συγκέντρωσή του και η ποιότητά του εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε 1% gel αγαρόζης. Η ύπαρξη του σωστού ενθέματος στις πλασμιδιακές κατασκευές επιβεβαιώθηκε με νουκλεοτιδική αλληλούχιση (DNA sequencing).

Οι φορείς που περιέχουν πλέον τη κωδικοποιούσα αλληλουχία του Tudor domain εισήχθησαν σε επιδεκτικά κύτταρα BL21(DE3), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων.

## 2.2 Υπερέκφραση και απομόνωση Tudor domain

### 2.2.1 Υπερέκφραση ισοτοπικά μη σημασμένου πολυπεπτιδίου

Υγρές καλλιέργειες όγκου 50ml που περιείχαν καναμυκίνη επιμολύνθηκαν με μετασχηματισμένα BL21(DE3) βακτήρια που περιείχαν τα κατάλληλα πλασμίδια και τα οποία προερχόταν από μονή αποικία τρυβλίου. Μετά από ανάπτυξη για 12 ώρες στους 37°C, νέες καλλιέργειες όγκου 1000ml επιμολύνθηκαν με αραιώση 1:100 από τις αρχικές και αφέθηκαν να μεγαλώσουν στους 37°C έως ότου η οπτική τους πυκνότητα στα 600nm ανέλθει στο 0.5-0.6. Η έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών που περιέχουν το Tudor domain συντελέστηκε με επαγωγή για 3 ώρες μετά από προσθήκη 0.4mM IPTG. Μετά το πέρας της



έκφρασης οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν, τα βακτηριακά ιζήματα πλύθηκαν με 150mM NaCl, 1mM PMSF και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

### 2.2.2 Υπερέκφραση ισοτοπικά σημασμένου πολυπετιδίου

Για την καταγραφή δι- και τρισδιάστατων NMR φασμάτων ήταν απαραίτητη η αντικατάσταση των φυσικά απαντώμενων  $^{14}\text{N}$  και  $^{12}\text{C}$  ατόμων του πολυπετιδίου με τα ενεργά στο NMR ισότοπα  $^{15}\text{N}$  και  $^{13}\text{C}$ . Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία υπερέκφρασης με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά μέσα τα οποία περιείχαν ως μοναδικές πηγές αζώτου και άνθρακα,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και γλυκόζη αντίστοιχα, εμπλουτισμένα με τα αντίστοιχα ισότοπα. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου, καθώς και των επιμέρους διαλυμάτων ήταν η εξής:

#### Θρεπτικό μέσο (ανά λίτρο)

100 ml	M9 μέσο (10x)
10 ml	Διάλυμα ιχνοστοιχείων (100x)
20 ml	20% (w/v) $^{13}\text{C}$ -γλυκόζη
1 ml	1 M $\text{MgSO}_4$
0.3 ml	1 M $\text{CaCl}_2$
1 ml	Βιοτίνη (1mg/ml)
1 ml	Θειαμίνη (1mg/ml)
2 ml	Καναμυκίνη (10mg/ml)

#### Διάλυμα ιχνοστοιχείων (100x), (ανά λίτρο)

5 g	EDTA
0.83 g	$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
84 g	$\text{ZnCl}_2$
13 g	$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
10 g	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
10 g	$\text{H}_3\text{BO}_3$
1.6 g	$\text{MnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

#### M9 μέσο (10x), (ανά λίτρο)

60 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
30 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
5 g	$\text{NaCl}$
5 g	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

Παρότι η ανάπτυξη των βακτηρίων στο παραπάνω μέσο ήταν αρκετά πιο αργή σε σχέση με το LB, η τελική απόδοση διαλυτού σημασμένου πολυπετιδίου ήταν παρόμοια με αυτή του αντίστοιχου μη σημασμένου πολυπετιδίου.



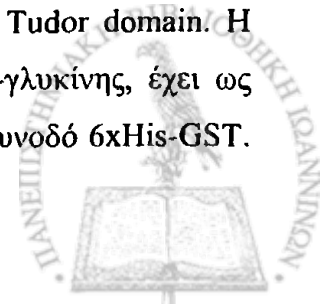
### 2.2.3 Λύση βακτηρίων και απομόνωση πολυπεπτιδίων με χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου

Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH 7.5 που περιείχε 150mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο, 2mM β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME), 0.1% IGEPAL, 1mM PMSF. Η λύση των βακτηρίων επετεύχθη με προσθήκη λυσοζύμης (0.5mg/ml διαλύματος λύσης) και με χρήση υπερήχων (5x10sec, 30% ampr.). Το διαλυτό τμήμα διαχωρίστηκε από τα κυτταρικά οργανίδια και από τυχόν αδιάσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 15000rpm για 30min. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ίσο όγκο διαλύματος λύσης και ελήφθησαν δείγματα για ηλεκτροφορητική ανάλυση.

Για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια που περιείχαν ακινητοποιημένα συμπλοκοποιημένα ιόντα νικελίου (Ni-NTA Agarose, Qiagen), τα οποία συνδέονται με τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους των έξι αμινοτελικών ιστιδινών που συνεκφράζονται με το Tudor domain. Η προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης (10mM) ιμιδαζολίου στο διάλυμα λύσης αποσκοπούσε στο να αποτρέψει σύνδεση στα ιόντα νικελίου βακτηριακών πρωτεϊνών μέσω ιστιδινών που τυχόν περιέχουν. Μετά από επώαση του υπερκειμένου με τα σφαιρίδια νικελίου για 30min στους 4°C, ακολούθησαν πλύσεις με διαλύματα που περιείχαν ιμιδαζόλιο (20mM) και NaCl (1M), ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που συνδέθηκαν στη στήλη μη ειδικά και με χαμηλότερη συγγένεια. Η έκλουση της στήλης πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 7.5 που περιείχε υψηλή σύγκεντρωση ιμιδαζολίου (250mM).

### 2.2.4 Αποκοπή συνοδών πεπτιδικών τμημάτων (tags) με χρήση της πρωτεάσης TEV – Απομόνωση καθαρού Tudor domain

Σε ένα τμήμα του παραπάνω εκλούσματος που περιείχε καθαρή πλέον πρωτεΐνη 6xHis-GST-Tudor (επιλέχθηκε έναντι της 6xHis-MBP-Tudor, λόγω καλύτερης έκφρασης) έγινε διαπίδυση με σκοπό την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου και την αλλαγή του μέσου σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 10% σουκρόζη, 1mM EGTA, 2mM β-ME, 1mM PMSF, ώστε να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε δοκιμές συγκατακρήμνισης (pull-down assays). Στο μεγαλύτερο μέρος προστέθηκε πρωτεάση TEV η οποία αναγνωρίζει την αμινοξική αλληλουχία *ENLYFQG* που προηγείται της αλληλουχίας του Tudor domain. Η ικανότητα της πρωτεάσης να διασπά τον πεπτιδικό δεσμό γλουταμίνης-γλυκίνης, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του Tudor domain από το πολυπεπτίδιο συνοδό 6xHis-GST.



Για την πέψη χρησιμοποιήθηκε βακτηριακά παραγόμενη 6xHis-TEV πρωτεάση (προσφορά του Δ.Μπόλη, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) σε μοριακή αναλογία 1:1 με το υπόστρωμα και η αντίδραση αφέθηκε να προχωρήσει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για ~12 ώρες στους 4°C. Η πρόοδος της πέψης ελέγχθηκε ηλεκτροφορητικά λαμβάνοντας δείγματα σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Μετά το πέρας της πέψης το δείγμα που περιείχε τα δύο προϊόντα (Tudor, 6xHis-GST), τυχόν άκοπο 6xHis-GST-Tudor και την 6xHis-TEV υποβλήθηκε σε νέο χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη ιόντων νικελίου, αφού προηγουμένως απομακρύνθηκε με διαπίδυση το ιμιδαζόλιο, με σκοπό την απομάκρυνση μέσω κατακράτησης στη στήλη όλων των πολυπεπτιδίων που έφεραν την εξαϊστιδινική ουρά και την παραμονή μόνο του Tudor domain στο διάλυμα που περνάει από τη στήλη (flowthrough). Η απόδοση της πέψης με TEV υπό τις παραπάνω συνθήκες ήταν ~70-90%.

### **2.2.5 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε gel SDS-πολυακρυλαμιδίου**

Οι διαδικασίες υπερέκφρασης και απομόνωσης του Tudor domain ελεγχόταν ηλεκτροφορητικά. Δείγματα φυλασσόταν 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 (Biorad), στα 35mA. Οι ζώνες των πρωτεϊνών βάφονταν με coomassie brilliant blue R-250.

### **2.2.6 Παρασκευή δείγματος για NMR πειράματα**

Για την καταγραφή πολύπλοκων NMR φασμάτων και λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της τεχνικής, ήταν απαραίτητη η παρασκευή δείγματος Tudor domain υψηλής συγκέντρωσης και καθαρότητας, το οποίο να βρίσκεται σε ένα μέσο με όσο γίνεται λιγότερα συστατικά, ώστε να αποφευχθεί η επίδραση των τελευταίων στη ποιότητα των φασμάτων. Έτσι, καθαρό Tudor πολυπεπτίδιο μετά από διαπίδυση μεταφέρθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.9, 100mM NaCl και ακολούθως συμπυκνώθηκε ~50 φορές κάτω από πίεση αερίου αζώτου με τη χρήση της συσκευής συμπύκνωσης ultrafiltration stirred cell (Millipore) και ηθμών ορίων αποκλεισμού 3kDa. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη παρασκευή δειγμάτων συγκέντρωσης 0.5-1mM, τα οποία αποδείχτηκαν επαρκή για την καταγραφή όλων των ειδών φασμάτων NMR που χρειάστηκαν.



## 2.3 Παρασκευή λοιπών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

### 2.3.1 Παρασκευή διαφορετικών μορφών ιστόνης H3

Διάφορες μορφές ανασυνδυασμένης ιστόνης H3 χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, η ανασυνδυασμένη H3 και η 6xHis-H3, καθώς και η περιοχή 27-135 της H3 (H3 core domain) υπερεκφράστηκαν σε βακτήρια BL21(DE3) με τη χρήση πλασμιδιακών φορέων pET3a στους οποίους είχαν κλωνοποιηθεί τα αντίστοιχα πολυπεπίδια. Οι πλασμιδιακές κατασκευές ήταν προσφορά της K.Luger (University of Colorado). Ο καθαρισμός τους έγινε σε αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία ουρίας, λόγω της χαρακτηριστικής ιδιότητας όλων των ιστονών να σχηματίζουν αδιάλυτα συσσωματώματα (inclusion bodies) κατά την έκφρασή τους. Ο καθαρισμός της 6xHis-H3 έγινε χρησιμοποιώντας σφαιρίδια ιόντων νικελίου ακολουθώντας κλασικά πρωτόκολλα (*The QIAexpressionist, 2003*). Η έκλουση από τη στήλη έγινε με διάλυμα ιμιδαζολίου 250mM, παρουσία 6M ουρίας και δείγματα καθαρής 6xHis-H3 αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Ο καθαρισμός των δύο άλλων τύπων H3 ιστονών έγινε χρησιμοποιώντας χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (SP sepharose, Amersham) (*Luger et al, 1977b*). Η έκλουση από τη στήλη έγινε με διαλύματα 6M ουρίας, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων άλατος NaCl. Δείγματα εμπλουτισμένα με τα αντίστοιχα πολυπεπίδια, υπέστησαν εκτεταμένη διαπίδυση σε νερό παρουσία 5mM β-ME, ώστε να απομακρυνθεί η ουρία, στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και τελικώς επαναδιαλύθηκαν σε 5mM β-ME. Η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε φωτομετρικά και αφού ρυθμίστηκε σε ~2mg/ml αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Η αμινοτελική ουρά (H3tail) της H3 (αμινοξέα 1-46) εκφράστηκε επίσης σαν χμιαϊρική πρωτεΐνη με τη GST στο αμινοτελικό της άκρο, χρησιμοποιώντας ένα φορέα έκφρασης pGEX2T, προσφορά του Dr.Grunstein (University of California). Η έκφραση και ο καθαρισμός έγινε με κλασικό πρωτόκολλο καθαρισμού GST πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας σφαιρίδια γλουταθειόνης (Glutathione-Sepharose Fast flow, Amersham). Η καθαρή GST-H3tail πρωτεΐνη μεταφέρθηκε με διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 10% σουκρόζη, 2mM β-ME, 1mM PMSF και αποθηκεύτηκε στους -80°C.



### 2.3.2 Παρασκευή ολόκληρου και αμινοτελικών υποπεριοχών LBR

Για την έκφραση του αμινοτελικού άκρου του LBR (Nt-LBR), χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET15b, ο οποίος έφερε κλωνοποιημένη τη περιοχή αμινοξέων 1-201 του γονιδίου ανθρώπινου LBR. Η πρωτεΐνη συνεκφράστηκε με ιστιδινική ουρά 10 καταλοίπων. Η πρωτεΐνη εκφράζεται ελάχιστα σε διαλυτή μορφή, γι' αυτό το λόγο ο καθαρισμός της έγινε υπό μετουσιωτικές συνθήκες παρουσία ουρίας. Χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια ιόντων νικελίου στα οποία η πρωτεΐνη προσδέθηκε μέσω της ιστιδινικής ουράς. Έκλυση με ιμιδαζόλιο και απομάκρυνση της ουρίας με διαπίδυση αποδείχτηκε ανεπαρκής για την ανάκτηση δείγματος ικανοποιητικής συγκέντρωσης, καθώς παρατηρήθηκε σχηματισμός συσσωματωμάτων (aggregates) μόλις η συγκέντρωση της ουρίας έφτασε τα επίπεδα του 1M. Η απόδοση σε διαλυτή πρωτεΐνη βελτιώθηκε αισθητά με χρήση εναλλακτικού πρωτοκόλλου επαναδίπλωσης (refolding) (Oganesyan et al, 2005). Συγκεκριμένα, η επαναδίπλωση έγινε καθώς η πρωτεΐνη βρισκόταν συνδεδεμένη στη στήλη ιόντων νικελίου. Έτσι πλύση της στήλης με διάλυμα 0.1 % Triton απουσία ουρίας αποτρέπει λανθασμένη αναδίπλωση (misfolding) και σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ακολούθως, πλύση με διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης απομακρύνει το απορρυπαντικό και προάγει τη σωστή επαναδίπλωση του μορίου. Τελικά, η πρωτεΐνη εκλούστηκε από τη στήλη σε φυσιολογικό πλέον ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε ιμιδαζόλιο συγκέντρωσης 250mM. Η συγκέντρωσή της υπολογίστηκε σε ~0.1mg/ml.

Εκτός της Tudor περιοχής, τα υπόλοιπα δύο διακριτά τμήματα της αμινοτελικής περιοχής του LBR συνεκφράστηκαν ως GST-πρωτεΐνες. Έτσι, τόσο η RS περιοχή (αμινοξέα 63-110), όσο και το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 111-205 του LBR, κλωνοποιήθηκαν στον τροποποιημένο pETM-30 φορέα, με την πολύτιμη συμβολή της Ν.Παναγιωτίδου (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων). Για την παρασκευή τους ακολουθήθηκε κλασική μεθοδολογία έκφρασης και καθαρισμού GST-πρωτεϊνών.

## 2.4 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων

### 2.4.1 Απομόνωση πυρήνων ερυθροκυττάρων

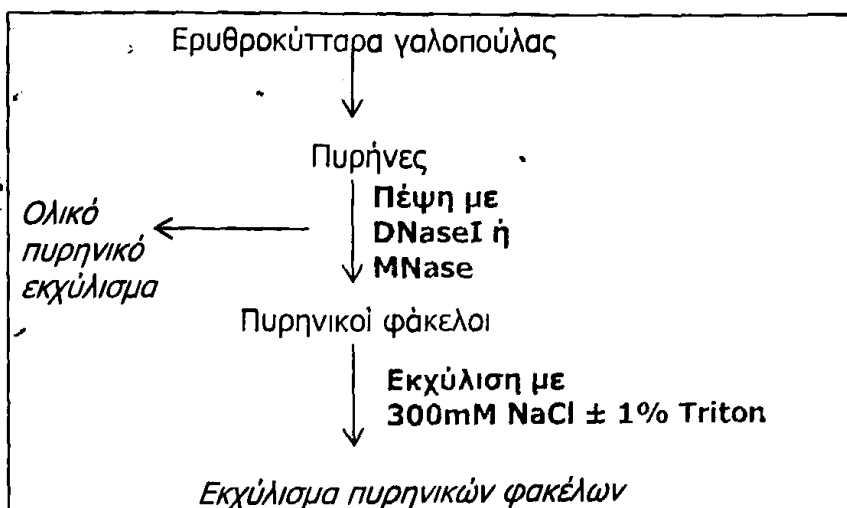
Για την απομόνωση πυρήνων χρησιμοποιήθηκαν ερυθροκύτταρα πτηνών. Συγκεκριμένα, έγινε λήψη αίματος από γαλοπούλα, το οποίο αναμείχθηκε με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), το οποίο περιείχε 2mM EDTA. Μετά από



διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα PBS και απομόνωση με φυγοκέντρηση στις 3000rpm/10min, τα ερυθροκύτταρα λύθηκαν με επαναδιάλυση σε υποτονικό διάλυμα 10mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.5, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM PMSF. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4200rpm/18min και απομόνωση του ιζήματος που είναι πλούσιο σε πυρήνες και άλλα κυτταρικά οργανίδια. Περαιτέρω κατεργασία περιλάμβανε χρήση υπερήχων και 'φιλτράρισμα' του δείγματος από σάρριγα σχήματος Z, καταλήγοντας σε ένα ίζημα πυρήνων, το οποίο αφού πλύθηκε με διάλυμα PBS, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF, αποθηκεύτηκε στους -80°C.

#### 2.4.2 Κατεργασία πυρήνων με νουκλεάσες - παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων

Για την παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων (Georgatos and Blobel, 1987), οι απομονωμένοι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM HEPES-KOH pH 7.4, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM PMSF, μίγμα αναστολέων πρωτεασών (5ml διαλύματος/ίζημα πυρήνων προερχόμενο από 20ml γαλοπούλας). Ακολούθησε πέψη είτε με 20 units MNase (Sigma) παρουσία 1mM CaCl<sub>2</sub> για 15min/37°C, είτε με 80μg/ml DNase I (Sigma) για 15min/25°C. Η αντίδραση με την MNase διακόπηκε με τη προσθήκη 2mM EDTA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10000rpm/10min συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο χαρακτηρίζεται ως ολικό πυρηνικό εκχύλισμα, ενώ το ίζημα αποτελούμενο από τους πυρηνικούς φακέλους επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl, 10% σουκρόζη, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF. Ακολούθησε προσθήκη 1% Triton εφόσον ήταν επιθυμητή η παραλαβή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου σε διαλυτή μορφή. Το υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση στις 50000rpm/30min συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε αμέσως σε πειράματα συγκατακρήμνισης. Στην Εικόνα 2.2 παρουσιάζεται συνοπτικά η πορεία παρασκευής των διαφόρων τύπων πυρηνικών εκχυλισμάτων



Εικόνα 2.2: Διάγραμμα ροής παρασκευής πυρηνικών εκχυλισμάτων.





## 2.5 Παρασκευή τετραμερών συμπλόκων H3-H4

### 2.5.1 Απομόνωση φυσικού τετραμερούς συμπλόκου H3-H4

Για την απομόνωση φυσικού τετραμερούς συμπλόκου H3-H4 (H3/H4 tetramer ή H3/H4t) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία υδρόξυ-απατίτη (*Simon and Felsenfeld, 1979*). Σαν πηγή νουκλεοσωμάτων από τα οποία απομονώθηκε το ιστονικό τετραμερές, χρησιμοποιήθηκε το πυρηνικό εκχύλισμα που προέκυψε μετά από πέψη των πυρήνων ερυθροκυττάρων πτηνών με MNase. Συγκεκριμένα, πυρηνικό εκχύλισμα που προέκυψε από κατεργασία 20ml αίματος γαλοπούλας, μεταφέρθηκε με διαπίδυση σε ρυθμιστικό μέσο 10mM φωσφορικών pH 6.8, 1mM DTT. 1g υδρόξυ-απατίτη (Bio-rad) πλύθηκε δύο φορές με 30ml του παραπάνω διαλύματος και πακεταρίστηκε σε στήλη. Το πυρηνικό εκχύλισμα περάστηκε από τη στήλη στην οποία τα νουκλεοσώματα προσδέθηκαν μέσω του DNA. Μετά από έκπλυση της στήλης με το διάλυμα πρόσδεσης, ακολούθησε έκλυση των διαφόρων πρωτεϊνικών συστατικών των νουκλεοσωμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα 80mM φωσφορικών pH 6.8, 1mM DTT, που περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου. Έτσι έκλυση με 0.65M NaCl απελευθέρωσε τις συνδετικές ιστόνες. Στη συνέχεια δείγματα εμπλουτισμένα σε διμερή H2A/H2B και τετραμερή H3/H4, παραλήφθηκαν εκλούοντας τη στήλη με διαλύματα 1M και 2M NaCl αντίστοιχα.

### 2.5.2 Ανασύσταση τετραμερούς H3/H4 από ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες

Για την ανασύσταση τετραμερούς χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της μείωσης συγκέντρωσης άλατος με διαπίδυση (salt-dialysis method) (*Luger et al, 1997b*). Χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη His-H3 και φυσική H4 από θύμο αδένα μοσχαριού (Roche). Οι δύο πρωτεΐνες αναμείχθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες σε διάλυμα 6M ουρίας, 50mM Tris pH 7.5, 2mM β-ME. Το δείγμα υπέστη διαπίδυση για ~12h/4°C σε διάλυμα 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 5mM β-ME, που περιείχε 2M NaCl. Η συγκέντρωση του NaCl μειώθηκε σταδιακά σε 1M (4h διαπίδυση), 0.5M (4h διαπίδυση) και τελικώς σε 150mM (~12h διαπίδυση). Τυχόν συσσωματώματα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση στις 13000rpm/10min.



## 2.6 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων με βιοχημικές τεχνικές

### 2.6.1 Δοκιμές συγκατακρήμνισης (pull-down assays)

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συγκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας ως ‘δολώματα’ κυρίως τις GST- και ενίοτε τις His-πρωτεΐνες. Σε κάθε περίπτωση, ~10-20μg πρωτεΐνης προσδέθηκε σε ~30μl σφαιριδίων αντίστοιχης συγγένειας, μετά από επώαση για 30min/18-22°C σε ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικής ιονικής ισχύος. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια πλύθηκαν δύο φορές με το παραπάνω διάλυμα και επώαστηκαν είτε με κάποιο πυρηνικό εκχύλισμα, είτε με διάλυμα καθαρής πρωτεΐνης για 1h/18-22°C ή για 12h/4°C. Σε περίπτωση που δεν αναγράφεται στα αποτελέσματα, η ιονική ισχύς του μέσου ήταν 300mM. Ακολούθως, τα σφαιρίδια πλύθηκαν πέντε φορές με το διάλυμα της επώασης και οι προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλούστηκαν μετά από επώαση για 5min/100°C με διάλυμα φόρτωσης gel SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS sample buffer). Τα δείγματα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε gel περιεκτικότητας 15% σε ακρυλαμίδιο και οι ζώνες των πρωτεϊνών βάφτηκαν με coomassie brilliant blue R-250.

Η ισχύς της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την ιστόνη H3 εκτιμήθηκε με ημι-ποσοτική δοκιμή συγκατακρήμνισης (semi-quantitative pull-down). Συγκεκριμένα ίδιες ποσότητες His-GST-Tudor (~15μg) προσδέθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επώαση με διάλυμα φυσικής (native) απομονωμένης από θύμο αδένα μοσχαριού (Roche), αλλά και ανασυνδυασμένης ιστόνης H3. Οι αντιδράσεις έγιναν σε διαφορετικούς όγκους (0.3-15ml), διατηρώντας τη ποσότητα της H3 σταθερή, μεταβάλλοντας όμως τη συγκέντρωσή της.

### 2.6.2 Ανάλυση σε βαθμίδωση σουκρόζης (sucrose gradient)

Δείγματα GST-Tudor ή Tudor και τετραμερούς H3-H4 υπέστησαν διαπίδυση σε κοινό ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl, 5% σουκρόζη, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF και στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν ώστε η συγκέντρωσή τους να φτάσει το 1mg/ml. Στη συνέχεια δείγματα όγκου 300μl επιστρώθηκαν πάνω σε παρόμοιο διάλυμα του οποίου η συγκέντρωση σε σουκρόζη παρουσίαζε βαθμίδωση από 5 έως 20% σε συνολικό όγκο 11ml. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 40000rpm/20h στους 4°C και συλλογή κλασμάτων όγκου 500μl, τα οποία αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε gel περιεκτικότητας 15% σε ακρυλαμίδιο.



## **2.7 Πειράματα μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας ( EMSA ) παρουσίας DNA ή RNA**

Τα πειράματα ανίχνευσης μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay) βασίζονται στην ιδιότητα των μορίων DNA ή RNA να μεταναστεύουν με μικρότερη ταχύτητα όταν είναι προσδεμένα σε πολυπεπτίδια κατά την ηλεκτροφόρηση, σε σχέση με όταν είναι ελεύθερα. Χρησιμοποιήθηκαν gel αгарόζης περιεκτικότητας 1% σε 1xTBE. Η ανίχνευση των μορίων DNA και RNA έγινε με χρήση EtBr μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ώστε να αποφευχθεί τυχόν αναστολή αλληλεπίδρασης.

## **2.8 Πειράματα υπερσπείρωσης DNA (DNA supercoiling assay)**

Για τις δοκιμές υπερσπείρωσης DNA (Sayer *et al*, 2001) χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pCMV (προσφορά του F.Fackelmayer), ο οποίος υπέστη ενζυμική κατεργασία με τοποϊσομεράση I (Invitrogen), που είχε ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του υπερσπειρωμένου (supercoiled) τύπου του σε χαλαρό (relaxed). Χρησιμοποιήθηκαν 5 units ενζύμου ανά 0.5μg πλασμιδίου και η αντίδραση προχώρησε για 30min στους 37°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM EDTA, 100μg/ml BSA, 0.5mM DTT, συνολικού όγκου 40μl. Υπό τις ίδιες συνθήκες επώαστηκαν δείγματα που περιείχαν 1μl απομονωμένου τετραμερούς H3/H4 συγκέντρωσης 1mg/ml και αυξανόμενες ποσότητες καθαρού Tudor συγκέντρωσης 2mg/ml. Οι δύο αντιδράσεις συνδυάστηκαν και συνεπώαστηκαν για 45min/37°C. Οι αντιδράσεις διακόπηκαν με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 1% SDS, 500μg/ml πρωτεϊνάση K και περαιτέρω επώαση για 30min/37°C. Ακολούθησε εκχύλιση του DNA με ίσους όγκους φαινόλης και μίγματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1 και καταβύθισή του με προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης και επώαση για 1h/-80°C. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε νερό και αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε gel 1% αгарόζης.

## **2.9 Φασματοσκοπία NMR**

### **2.9.1 Οργανολογία – Αρχή της μεθόδου**

Φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρα 500 και 600 MHz (Bruker), κατάλληλα εξοπλισμένα με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας και με cryoprobe. Στα δείγματα



Tudor που εισήχθησαν στο μαγνήτη προστέθηκε επιπλέον 10% D<sub>2</sub>O ώστε να καθίσταται δυνατός ο έλεγχος της σταθερότητας της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Η κορυφή του νερού στα παραπάνω δείγματα κατεστάλη με χρήση κατάλληλων παλμικών ακολουθιών. Η καταγραφή όλων των φασμάτων έλαβε χώρα στους 25°C με τη πολύτιμη συμβολή των C.Edlich και B.Simon (EMBL, Heidelberg).

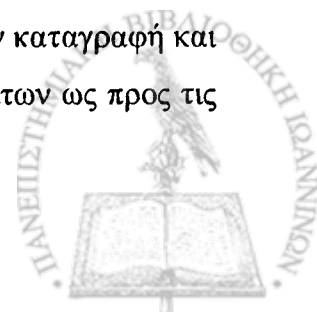
• Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στην ιδιότητα των πυρήνων ενός μορίου που βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου, να διεγείρονται μετά από απορρόφηση ενέργειας. Η διέγερση των πυρήνων έχει ως αποτέλεσμα τη μετάπτωση από τη βασική στη διηγεμένη στάθμη ενέργειας και επιτυγχάνεται μετά από επίδραση με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία της περιοχής των ραδιοσυχνοτήτων. Αυτή η μετάπτωση χαρακτηρίζεται με τον όρο συντονισμός (resonance). Λόγω του διαφορετικού ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος του 'αισθάνεται' κάθε πυρήνας, απαιτεί και διαφορετική ενέργεια (άρα και συχνότητα) ώστε να συντονιστεί, κάτι το οποίο τον χαρακτηρίζει και εκφράζεται μέσω της χημικής μετατόπισης  $\delta$  (chemical shift), η οποία εκφράζεται σε κλασματικές μονάδες (ppm) σε σχέση με ένα πυρήνα αναφοράς.

## 2.9.2 Είδη NMR φασμάτων

Τύπος φάσματος	διαστάσεις	ισοτοπική επισήμανση	χρόνος καταγραφής
1D-H	1	-	2min
<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC	2	<sup>15</sup> N	20min
<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-HSQC	2	<sup>13</sup> C	20min
2D-TOCSY	2	-	10h
2D-NOESY	2	-	10h
HNCA	3	<sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C	20h
HNCACB	3	<sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C	20h
CBCA(CO)NH	3	<sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C	20h
HCCH-TOCSY	3	<sup>13</sup> C	40h
CBHE	2	<sup>13</sup> C	3h
CBHD	2	<sup>13</sup> C	3h
<sup>15</sup> N-NOESY	3	<sup>15</sup> N	60h
<sup>13</sup> C-NOESY	3	<sup>13</sup> C	60h
<sup>13</sup> C-aromatic-NOESY	3	<sup>13</sup> C	60h

**Πίνακας 2.2:** Φάσματα NMR που καταγράφηκαν σε αυτή τη μελέτη. Με πλάγιους χαρακτήρες φαίνονται τα φάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των συχνοτήτων συντονισμού των ατόμων του Tudor domain, ενώ με έντονους χαρακτήρες τα αντίστοιχα που συνέβαλαν στην εξαγωγή περιοριστικών συνθηκών απόσταση πυρήνων.

Η επίλυση της τριτοταγούς δομής ενός βιομορίου με NMR απαιτεί την καταγραφή και ανάλυση μίας πληθώρας φασμάτων. Η διαφοροποίηση των διαφόρων φασμάτων ως προς τις



πληροφορίες που παρέχουν προέρχεται από το εύρος των συχνοτήτων και τη διαδοχή των ηλεκτρομαγνητικών παλμών που θα εφαρμοστούν. Έτσι διαφορετικές παλμικές αλληλουχίες (pulse sequences) ή διαφορετικά πειράματα NMR, καθορίζουν τους πυρήνες των οποίων οι μαγνητικές αλληλεπιδράσεις θα χρησιμοποιηθούν στη καταγραφή του αντίστοιχου φάσματος.

Τα τελευταία μπορεί να ομαδοποιηθούν με διάφορους τρόπους, όπως με τον αριθμό των συσχετιζομένων πυρήνων (μονο-, δισ-, τρις-, τετρα- διάστατα φάσματα) ή με το είδος των συσχετιζόμενων ατόμων (ομοπυρηνικά, ετεροπυρηνικά φάσματα). Μία σημαντική κατηγορία φασμάτων είναι τα φάσματα τύπου NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy), που ανιχνεύουν αλληλεπιδράσεις πυρήνων που βρίσκονται σε απόσταση  $<5\text{\AA}$ , χωρίς να είναι αναγκαστικά γειτονικά στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Τέτοια φάσματα χρησιμεύουν για την εξαγωγή μεγάλου αριθμού περιοριστικών συνθηκών, όσον αφορά τις αποστάσεις μεταξύ όσο γίνεται περισσότερων ατόμων της πρωτεΐνης και είναι πολύτιμα για το προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής βιομορίων.

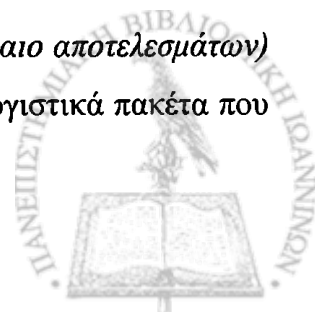
Στο Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται τα φάσματα NMR που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, ενώ μία πιο αναλυτική περιγραφή για το καθένα από αυτά θα γίνει στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

### 2.9.3 Ανάλυση φασμάτων

Για να αποβεί επιτυχής η προσπάθεια επίλυσης της τριτοταγούς δομής ενός βιομορίου είναι απαραίτητη η προσεκτική ανάλυση των καταγραφέντων φασμάτων, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι αρκετά πολύπλοκα. Αυτό σημαίνει ότι περιέχουν πολλές κορυφές, ο αριθμός των οποίων αυξάνει καθώς μεγαλώνει το μέγεθος του προς μελέτη βιομορίου. Στόχος κάθε φορά είναι η απόδοση των κορυφών στους πυρήνες από τους οποίους προέρχονται. Η διαδικασία αυτή ανάλογα με τη ποιότητα των φασμάτων μπορεί να αποβεί αρκετά χρονοβόρα, σε κάθε περίπτωση όμως απαιτείται μεγάλη προσοχή, καθώς τυχόν λάθη μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στον υπολογισμό της τριτοταγούς δομής. Για την ανάλυση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα NMRview (Johnson and Blevins, 1994), το οποίο αποδείχτηκε αρκετά φιλικό, καθώς ήταν δυνατή η χρήση πολλών παραθύρων ταυτόχρονα, τα οποία επικοινωνούσαν μεταξύ τους.

### 2.9.4 Υπολογισμός και ποιοτικός έλεγχος τριτοταγούς δομής

Αφού ένας ικανός αριθμός περιοριστικών συνθηκών (βλέπε κεφάλαιο αποτελεσμάτων) δημιουργηθεί μετά την ανάλυση των φασμάτων, χρησιμοποιούνται υπολογιστικά πακέτα που



βασίζονται σε πρωτόκολλα προσομοιωμένης αναδιάταξης (simulated annealing) στο κενό (Kirkpatrick et al, 1983). Μετά από μερικούς κύκλους αξιολόγησης, επανεκτίμησης και υπολογισμών, προκύπτουν τριτοταγείς δομές οι οποίες ικανοποιούν τις περιοριστικές πειραματικές συνθήκες. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πακέτο CYANA (Guntert et al, 1997).

- Για τον ποιοτικό έλεγχο των προσδιορισμένων δομών χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα PROCHECK (Laskowski et al, 1996) και WHATIF (Vriend 1990) και για την απεικόνιση τρισδιάστατων δομών και μοριακών επιφανειών τα προγράμματα MOLMOL (Koradi et al, 1996) και PyMol (Delano 2002).

### 2.9.5 Πειράματα διάταραξης χημικών μεταταπίσεων (chemical shift perturbation experiments)

Εκτός από τη χρήση για την επίλυση τριτοταγούς δομής, πειράματα NMR χρησιμοποιήθηκαν και για τη χαρτογράφηση τυχόν επιφανειών του Tudor domain που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις με ταυτόχρονη καταγραφή διαδοχικών διδιάστατων φασμάτων  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα  $^{15}\text{N}$ -σημασμένου Tudor συγκέντρωσης 50μM σε ρυθμιστικό μέσο φωσφορικών pH 6.9, 100mM NaCl. Σε πρώτο στάδιο δοκιμάστηκαν καθαρά αμινοξέα αργινίνης και λυσίνης (Sigma), που έφεραν μεθυλιώσεις όλων των βαθμών. Η τιτλοδότηση με κάθε τύπο αμινοξέος προχώρησε έως ότου η μοριακή αναλογία Tudor:αμινοξέος φτάσει το 1:25. Ακολούθως έγινε τιτλοδότηση με ολόκληρη H3 πρωτεΐνη, η οποία μεταφέρθηκε σε διάλυμα παρόμοιας σύστασης με το Tudor. Η τιτλοδότηση προχώρησε έως ότου η μοριακή αναλογία Tudor:H3 φτάσει το 1:3.

### 2.10 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 στη περιοχή του απώτερου υπεριώδους (far-UV). Από φάσματα CD μπορεί να πιστοποιηθεί η αναδίπλωση



πρωτεϊνών, αλλά και να εκτιμηθεί το ποσοστό συμμετοχής κάθε επιμέρους τύπου δευτεροταγούς δομής στη συνολική.

Δείγματα Tudor domain συγκέντρωσης 20-50 $\mu$ M χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού. 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 φασματοπολωσίμετρο Jasco J-810 (ΕΚΕΦΕ 'Δημόκριτος') συνδεδεμένα με συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας τύπου Peltier. Η προτυποποίηση και συντήρηση του οργάνου έγινε με χρήση διαλυμάτων καμφουροσουλφονικού οξέος.

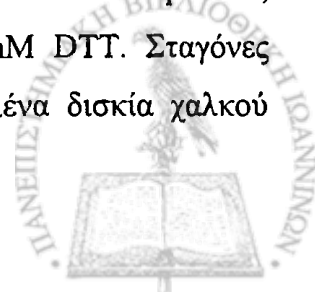
## **2.11 Ηλεκτρονική μικροσκοπία**

### **2.11.1 Τεχνική της 'αρνητικής χρώσης' (Negative Staining)**

Η τεχνική του negative staining (Brenner *et al*, 1998) χρησιμοποιήθηκε για τη παρατήρηση δειγμάτων αμινοτελικής περιοχής LBR με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στη συγκεκριμένη τεχνική το προς εξέταση σωματίδιο αρχικά εναποτίθεται σε ένα δικτυωτό δισκίο χαλκού (grid), επιστρωμένο με μία πολύ λεπτή στοιβάδα άνθρακα ή πλαστικού, του οποίου η ικανότητα σκέδασης των ηλεκτρονίων είναι πολύ μικρή και ομοιόμορφη. Στη συνέχεια το δισκίο με το δείγμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα βαρέος μετάλλου, το οποίο εισέρχεται στις σχισμές που σχηματίζει το σωματίδιο πάνω στο φιλμ, απεικονίζοντας κατά μία έννοια τη μοριακή αρχιτεκτονική του. Λόγω της ιδιότητας των ατόμων βαρέων μετάλλων (U, W, Au, Pt, Pb) να σκεδάζουν ηλεκτρόνια ισχυρότερα από τα άτομα των μακρομορίων (C, H, O, N, P, S), η αντίθεση (contrast) δειγμάτων που έχουν υποστεί αυτή την κατεργασία είναι πολύ μεγαλύτερη από αντίστοιχα που δεν την έχουν υποστεί. Καθώς λοιπόν η δέσμη των ηλεκτρονίων περνά από το δείγμα, εξασθενεί ανάλογα με το πάχος της στοιβάδας του βαρέος μετάλλου που είναι μικρότερο στα σημεία που καλύπτονται από το μακρομόριο. Έτσι η εικόνα που προκύπτει 'αποκαλύπτει' το μακρομόριο από το διαφορετικό βαθμό ηλεκτροσκοπιότητας στα σημεία που καλύπτει.

### **2.11.2 Προετοιμασία δειγμάτων**

Δείγματα Nt-LBR (αμινοξέα 1-210) συνεκφρασμένου με αμινοτελική ουρά δέκα ιστιδινών μεταφέρθηκε με διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM HEPES-KOH pH 7.5, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 150-450mM NaCl, 10% σουκρόζη, 0.1mM EGTA, 1mM DTT. Σταγόνες διαφορετικών όγκων δείγματος (5-30 $\mu$ l) εναποτέθηκαν σε αποφορτισμένα δισκία χαλκού



επιδρωμένα με λεπτή στοιβάδα parlodium και αφού αφέθηκαν για 1min ώστε να προσροφηθεί το δείγμα απομακρύνθηκαν προσεκτικά χρησιμοποιώντας απορροφητικό χαρτί. Ακολούθησε πλύση με σταγόνα νερού και χρώση με προσθήκη σταγόνας διαλύματος 2% οξικού ουρανίου pH 4.5. Μετά από 15sec η σταγόνα του διαλύματος χρώσης απομακρύνθηκε και ακολούθησε πλύση με νερό. Χρησιμοποιώντας πιπέτα pasteur απομακρύνθηκε προσεκτικά η ποσότητα υγρού που είχε εναπομείνει και τα δισκία ήταν έτοιμα πλέον για εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (H-7000, Hitachi). Τα πειράματα έγιναν με τη πολύτιμη καθοδήγηση του G.Machaidze (Biozentrum, Basel).

## 2.12 Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση

Διαλύματα Tudor και Nt-LBR συγκεντρώσεων 0.5mg/ml και 0.1mg/ml αντίστοιχα, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης. Τα πειράματα έγιναν σε φυγόκεντρο Beckman Optima XL-A στους 20°C. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της καθίζησης σε ισορροπία (sedimentation equilibrium) και μετρήθηκε η απορρόφηση των πολυπεπτιδίων στα 277nm κατά μήκος της κυψελίδας, μετά από φυγοκέντρωση για 18h στις 32000rpm. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό Segal (G.Machaidze). Η διεξαγωγή και ανάλυση των πειραμάτων έγιναν σε συνεργασία με τον A.Lustig (Biozentrum, Basel).





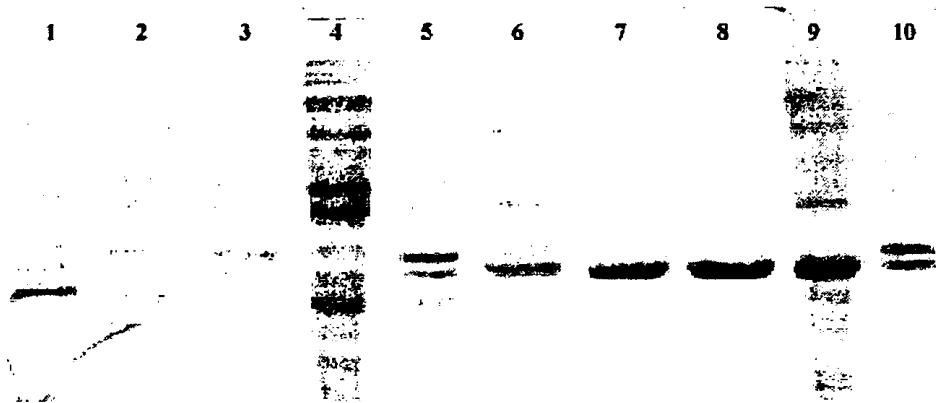
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



### 3.1 Απομόνωση και αρχικός βιοφυσικός χαρακτηρισμός του Tudor domain \*

#### 3.1.1 Επιλογή φορέα έκφρασης

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των μεθόδων, το γονίδιο του Tudor domain του LBR κλωνοποιήθηκε στους δύο φορείς έκφρασης, pETM-30 και pETM-41. Αρχικά λοιπόν έπρεπε να επιλεγεί ο καταλληλότερος, στη βάση της έκφρασης μεγαλύτερης ποσότητας διαλυτού πολυπεπτιδίου. Πραγματοποιήθηκε έκφραση των δύο πολυπεπτιδίων σε καλλιέργεια μικρής κλίμακας (50ml), τα κύτταρα συλλέχθηκαν, λύθηκαν και δείγματα του διαλυτού αλλά και αδιάλυτου τμήματος αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά.



**Εικόνα 3.1:** Προφίλ έκφρασης των κλωνοποιημένων με το Tudor domain φορέων pETM-30 και pETM-41. 1. Βακτήρια που περιέχουν τον κλωνοποιημένο pETM-41, πριν τη προσθήκη IPTG, 2,3. Ίδιος αριθμός βακτηρίων μετά από επαγωγή με IPTG για 2 και 3 ώρες αντίστοιχα, 4,5. Διαλυτό και αδιάλυτο τμήμα αντίστοιχα μετά λύση των βακτηρίων, 6-10. Η ίδια πορεία για τον φορέα pETM-30.

Στην Εικόνα 3.1 φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης και οι ποσότητες των εκφραζομένων πολυπεπτιδίων σε διαλυτή μορφή. Όπως παρατηρείται, αν και υπήρξε έκφραση των αντίστοιχων πολυπεπτιδίων και με τους δύο φορείς, η ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τον pETM-30 ήταν σαφώς μεγαλύτερη, σε σχέση με τον pETM-41. Έτσι, για την απομόνωση Tudor domain σε μεγάλη κλίμακα, επιλέχθηκε ο φορέας pETM-30.

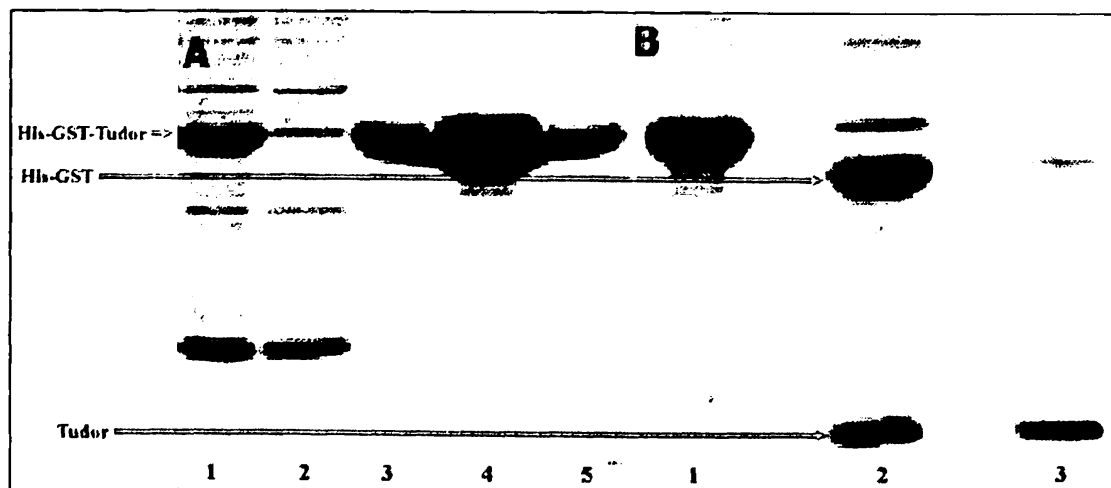
#### 3.1.2 Απομόνωση του Tudor domain

Λόγω της πολύ καλής του έκφρασης, 1lt καλλιέργειας βακτηρίων αποδείχτηκε αρκετό για την απομόνωση καθαρού Tudor domain υψηλής συγκέντρωσης για NMR πειράματα. Στην Εικόνα 3.2A περιγράφεται η πορεία έκφρασης και καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου του πολυπεπτιδίου His-GST-Tudor. Έκλουση με ιμιδαζόλιο, πέψη με τη πρωτεάση TEV και διέλευση από δεύτερη στήλη ιόντων νικελίου, οδήγησαν στη παραλαβή Tudor πολυπεπτιδίου υψηλής καθαρότητας και διαλυτότητας (Εικ. 3.2B).



### 3.1.3 Φασματοσκοπικός έλεγχος της δομικής ακεραιότητας του Tudor domain

Πριν προχωρήσει κάποιος στη προσπάθεια επίλυσης της τριτοταγούς δομής ενός πολυπεπτιδίου, πρέπει να βεβαιωθεί για τη δομική του ακεραιότητα. Η απομόνωση αποδιατεταγμένου-μη λειτουργικού μορίου είναι κάτι που δεν μπορεί να αποκλειστεί, και σε τυχόν τέτοιο ενδεχόμενο νέες προσπάθειες έκφρασης και απομόνωσης σε διαφορετικές συνθήκες πρέπει να δοκιμαστούν. Έτσι, το πρώτο δείγμα Tudor που παρασκευάστηκε εξετάστηκε αρχικά με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού και στη συνέχεια με φασματοσκοπία NMR. Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (Εικ. 3.3A) ήταν χαρακτηριστικό αναδιπλωμένου πολυπεπτιδίου με κυρίαρχο τύπο δευτεροταγούς δομής τη β-πτυχωτή επιφάνεια, όπως υποδηλώνει το ελάχιστο στα 205nm. Ο μικρός ώμος στα 218nm υποδηλώνει και τη παρουσία πολύ μικρού ποσοστού α-έλικας. Επιπλέον μαρτυρία για τη δομική ακεραιότητα του μορίου προκύπτει από την ύπαρξη μεγίστου στα 230nm το οποίο προέρχεται από σταθερές τριτοταγείς αλληλεπιδράσεις αρωματικών αμινοξέων που απαντώνται μόνο όταν οι πλευρικές αλυσίδες τους βρίσκονται σε ένα συμπαγές μικροπεριβάλλον.



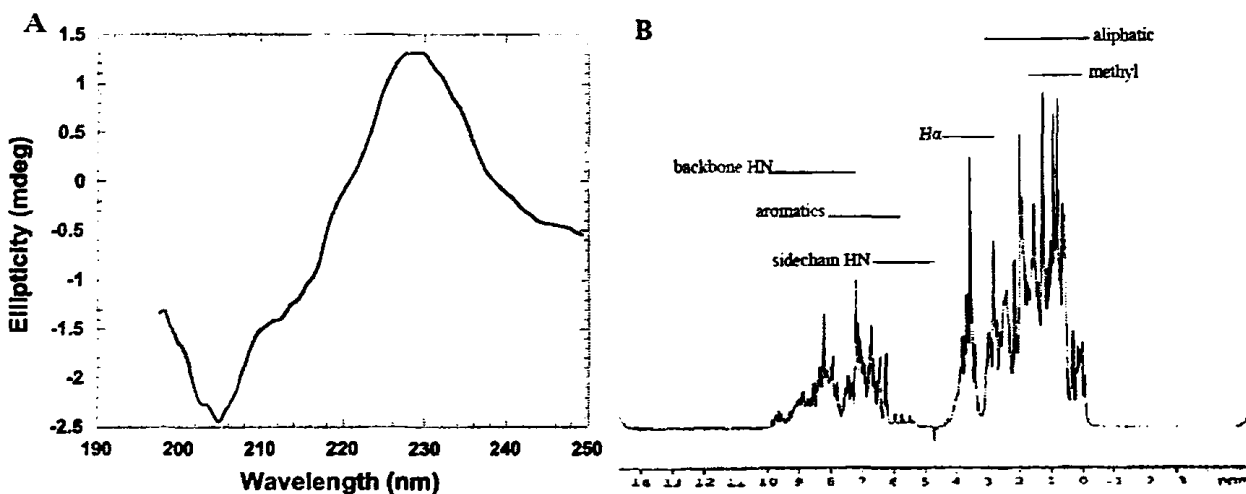
**Εικόνα 3.2:** *A.* Καθαρισμός του His-GST-Tudor με χρωματογραφία ιόντων νικελίου. 1. Διαλυτό τμήμα μετά τη λύση βακτηρίων, 2. Το ίδιο τμήμα μετά διέλευση από τη στήλη, 3,4,5. Εκλούσματα από τη στήλη με ιμιδαζόλιο καθαρής His-GST-Tudor πρωτεΐνης.

*B.* Πέψη με TEV πρωτεάση και παραλαβή καθαρού Tudor πολυπεπτιδίου μετά από δεύτερη διέλευση από στήλη ιόντων νικελίου. 1. Διάλυμα πριν την πέψη, 2. Διάλυμα μετά την πέψη, 3. Το ίδιο διάλυμα μετά από διέλευση από τη στήλη.

Η φασματοσκοπία NMR ήρθε να επιβεβαιώσει τις παραπάνω παρατηρήσεις. Συγκεκριμένα, καταγράφηκε το απλούστερο μονοδιάστατο φάσμα πρωτονίου, του οποίου οι απαιτήσεις σε συγκέντρωση δείγματος και σε χρόνο καταγραφής είναι ελάχιστες και επίσης δεν προϋποθέτει ισοτοπική σήμανση του δείγματος. Το φάσμα επιβεβαίωσε την αναδίπλωση του πολυπεπτιδίου, που συνάγεται από την εκτενή διασπορά των κορυφών. Αυτή η διασπορά



υποδηλώνει ότι οι πυρήνες πρωτονίων που φαίνονται στο φάσμα 'αλληλεπιδρούν' με διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα, δείγμα ύπαρξης συγκεκριμένης τριτοταγούς δομής (Εικ. 3.3B).

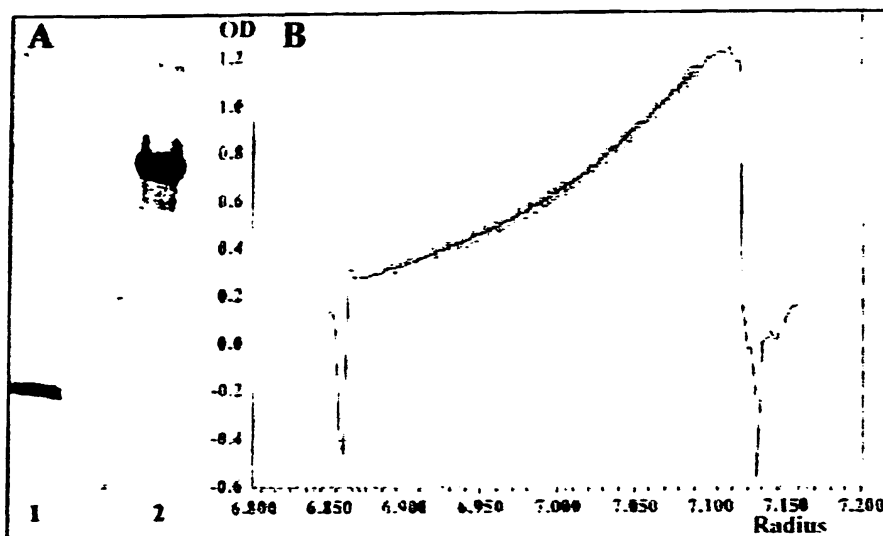


Εικόνα 3.3: Α. Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του Tudor domain σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM φωσφορικών pH 7, 100mM NaCl. Β. Μονοδιάστατο φάσμα πρωτονίου του Tudor domain στις ίδιες συνθήκες. Φαίνονται οι περιοχές που συντονίζονται οι διάφοροι τύποι πρωτονίων μίας πρωτεΐνης.

### 3.1.4 Εκτίμηση βαθμού ολιγομερισμού του Tudor domain

Πριν προχωρήσει η διαδικασία επίλυσης της τριτοταγούς δομής του Tudor domain, μελετήθηκε η τυχόν ικανότητά του να πολυμερίζεται. Ήταν ήδη γνωστό ότι ο LBR πιθανότατα σχηματίζει ολιγομερή μέσω της αμινοτελικής του περιοχής. Εμπλέκεται άραγε το Tudor domain σε αυτή τη διαδικασία; Αρχικά πειράματα συγκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας καθαρές πρωτεΐνες έδειξαν ότι το Tudor domain δεν ολιγομερίζεται (Εικ. 3.4A). Οι αρχικές παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν με χρήση αναλυτικής υπερφυγοκέντρησης, όπου φάνηκε ότι το Tudor domain σε διάλυμα συμπεριφέρεται ως μονομερές. Συγκεκριμένα, μετρήσεις σε ισορροπία σε δείγμα Tudor συγκέντρωσης 0.5mg/ml, έδειξαν ότι το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου είναι ~7.5kDa, όσο ακριβώς αναμένεται από την αμινοξική αλληλουχία του (Εικ. 3.4B). Η σχετικά υψηλή συγκέντρωση δείγματος που χρησιμοποιήθηκε, αλλά και η ικανότητα της τεχνικής στον υπολογισμό μοριακού βάρους, δεν αφήνει περιθώρια σκέψης για τυχόν εμπλοκή του Tudor domain στον ολιγομερισμό του LBR, τουλάχιστον μέσω αλληλεπιδράσεων Tudor-Tudor. Η παρατήρηση αυτή είναι χρήσιμη και σε σχέση με την επίλυση της δομής, καθώς τυχόν σχηματισμός πολυμερούς μεγάλου μοριακού βάρους, ίσως να καθιστούσε ανέφικτη τη χρήση NMR.





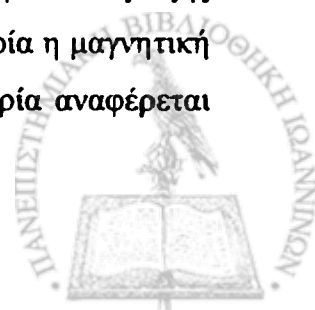
Εικόνα 3.4: A. GST pull-down χρησιμοποιώντας καθαρές πρωτεΐνες δείχνει ότι το Tudor domain δεν ολιγομερίζεται. 1. 20% Tudor input, 2. Ίζημα μετά από επώαση GST-Tudor και Tudor. B. Κατανομή του Tudor domain στον άξονα της γραμμικής κίνησης μετά από φυγοκέντρηση και επίτευξη ισορροπίας (equilibrium). Η απορρόφηση (O.D.) μετρήθηκε στα 277nm μετά από φυγοκέντρηση στις 32000rpm για 18h σε Beckman Optima XL-A.

### 3.2 Επίλυση τριτοταγούς δομής του Tudor domain με φασματοσκοπία NMR

#### 3.2.1 Γενικές ιδιότητες φασμάτων που χρησιμοποιούνται στην επίλυση δομής βιομορίου

Για να αποβεί επιτυχής η διαδικασία επίλυσης τριτοταγούς δομής με NMR, απαιτείται η καταγραφή και ανάλυση μιας πληθώρας πολύπλοκων φασμάτων. Αυτό σημαίνει ότι τα σήματα-κορυφές κάθε φάσματος πρέπει να αποδοθούν στα αντίστοιχα άτομα, των οποίων τα πυρηνικά spin συσχετίστηκαν μαγνητικά. Τελικός σκοπός είναι η κατάρτιση μιας λίστας περιορισμών διατομικών αποστάσεων και γωνιών, η ικανοποίηση των οποίων οδηγεί στην επίλυση της δομής. Στην περίπτωση πολυπεπτιδίων, οι περιορισμοί αποστάσεων αφορούν κυρίως ζεύγη πρωτονίων που βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 5Å, ενώ οι αντίστοιχοι των γωνιών προέρχονται από τις διεδρες γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  κατά μήκος της κύριας αλυσίδας του μορίου. Οι περιορισμοί αποστάσεων αποτελούν τη μεγάλη πλειοψηφία περιοριστικών συνθηκών που απαιτούνται για την επίλυση δομής και συλλέγονται αναλύοντας φάσματα τύπου NOESY, για τα οποία θα γίνει εκτενέστερη αναφορά σε επόμενη παράγραφο.

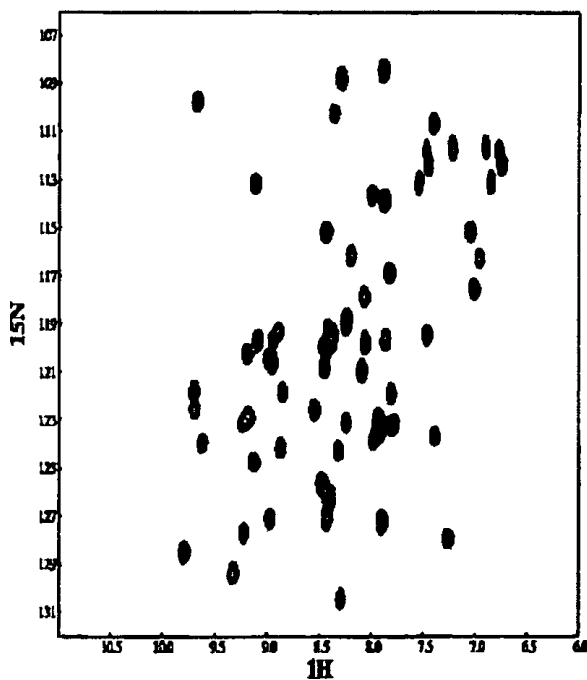
Σε αυτό το στάδιο, μπορούμε να χωρίσουμε το πλήθος των φασμάτων που καταγράφηκαν και αναλύθηκαν σε δύο κύριες κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο σύζευξης των ατόμων του πολυπεπτιδίου. Έτσι εκτός από τα φάσματα NOESY, στα οποία η μαγνητική αλληλεπίδραση πυρήνων προϋποθέτει εγγύτητα στο χώρο, μία άλλη κατηγορία αναφέρεται



σε φάσματα στα οποία οι πυρήνες αλληλεπιδρούν μέσω δικτύου ομοιοπολικών δεσμών ανεξάρτητα από την απόστασή τους. Τα φάσματα της τελευταίας κατηγορίας χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των χημικών μετατοπίσεων των ατόμων του πολυπεπτιδίου.

### 3.2.2 Φάσματα δύο διαστάσεων – Ετεροπυρηνικό φάσμα $^{15}\text{N}$ -HSQC

Τα φάσματα NMR βιομορίων περιέχουν εκατοντάδες κορυφές, οι οποίες είναι αδύνατο να αναλυθούν σε ένα τυπικό μονοδιάστατο πείραμα που βασίζεται στη παρατήρηση ενός μόνου πυρήνα, καθώς ο βαθμός αλληλεπικάλυψης είναι μεγάλος. Επιπλέον, πολλές φορές καθίσταται αναγκαία η συσχέτιση διαφορετικών πυρήνων, κάτι που είναι απαραίτητο για τη επίλυση μίας δομής. Τα πολυδιάστατα φάσματα παρέχουν μεγαλύτερη ανάλυση και δυνατότητα συσχετισμών διαφόρων πυρήνων ταυτόχρονα.



Εικόνα 3.5: Ετεροπυρηνικό φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC του Tudor domain.

Το πιο χαρακτηριστικό διδιάστατο φάσμα που συσχετίζει διαφορετικούς πυρήνες είναι το  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence). Στο συγκεκριμένο φάσμα συσχετίζονται τα άτομα αζώτου ενός πολυπεπτιδίου με τα αντίστοιχα πρωτόνια τους. Ονομάζεται και φάσμα αποτύπωμα (fingerprint spectrum), καθώς οι κορυφές του αντιστοιχούν στις αμιδικές ομάδες του πολυπεπτιδίου. Αυτό σημαίνει ότι ο αριθμός των κορυφών αυτού του φάσματος αναμένεται να είναι ίσος με τον αριθμό των αμινοξέων του



πολυπεπτιδίου (αφαιρώντας τις προλίνες που δεν περιέχουν αμιδικές ομάδες και προσθέτοντας τις αντίστοιχες ομάδες πλευρικών αλυσίδων).

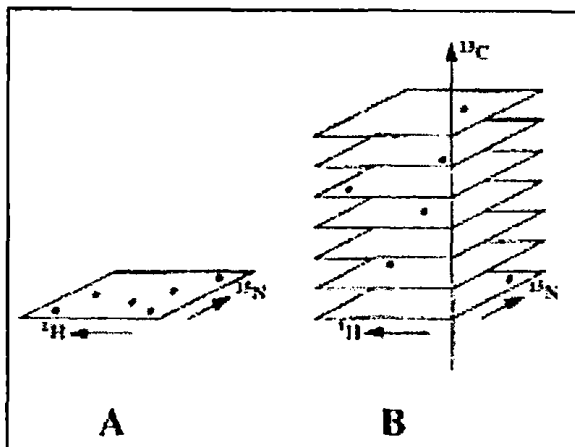
Η χρησιμότητα όμως του φάσματος αυτού επεκτείνεται και στη χαρτογράφηση επιφανειών του πολυπεπτιδίου, οι οποίες εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια. Προς αυτή την κατεύθυνση πραγματοποιούνται τιτλοδοτήσεις με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πιθανού προσδέτη και ταυτόχρονη καταγραφή του εν λόγω φάσματος. Τα αμινοξέα του πολυπεπτιδίου που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αναγνωρίζονται με βάση την αλλαγή της θέσης ή της έντασης των αντίστοιχων κορυφών τους. Στην *Εικόνα 3.5* φαίνεται το  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC φάσμα του Tudor domain.

### 3.2.3 Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού ατόμων πολυπεπτιδίου – Φάσματα τριών διαστάσεων

Ένα σημαντικό στάδιο στη διαδικασία επίλυσης δομής με NMR είναι η εξαγωγή των συχνοτήτων συντονισμού των ατόμων του πολυπεπτιδίου που μεταφράζονται σε χημικές μετατοπίσεις στο χάρτη του κάθε φάσματος. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο, καθώς γνωρίζοντας πλέον τις 'συντεταγμένες' του κάθε ατόμου θα μπορούσαμε μετέπειτα να αναλύσουμε τα φάσματα NOESY και να αναγνωρίσουμε τα άτομα εκείνα που αλληλεπιδρούν λόγω εγγύτητας στο χώρο, άρα τριτοταγούς δομής. Μέχρι πριν λίγα χρόνια και για μικρά πολυπεπίδια (<10kDa), ο συνδυασμός και ανάλυση διδιάστατων ομοπυρηνικών φασμάτων αποδεικνυόταν επαρκής για την αντιστοίχιση των χημικών μετατοπίσεων στα αντίστοιχα πρωτόνια από τα οποία προήλθαν (*Wuthrich, 1986*). Καθώς όμως μεγάλωνε το μοριακό βάρος του μορίου και αύξανε ο βαθμός αλληλεπικάλυψης των κορυφών, ήταν αναγκαίο να παρασκευαστούν ισοτοπικά σημασμένα δείγματα ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) και να σχεδιαστούν τρισδιάστατα πειράματα. Κάτι τέτοιο έχει γίνει κοινή πρακτική πλέον, καθώς διευκολύνει την ανάλυση των φασμάτων και επίσης επιτρέπει την εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού και για τα βαρέα άτομα της κύριας, αλλά και των πλευρικών αλυσίδων. Στην *Εικόνα 3.6* φαίνεται η αυξανόμενη ανάλυση που επιτυγχάνεται, καθώς μεταφερόμαστε από ένα δι- σε ένα τρισδιάστατο φάσμα.

Καταγράφοντας και αναλύοντας τρισδιάστατα φάσματα, κατέστη δυνατή η απόδοση των συχνοτήτων συντονισμού της συντριπτικής πλειοψηφίας των ατόμων ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) του Tudor domain. Τα φάσματα βασίστηκαν στο συσχετισμό πυρήνων που ήταν συνδεδεμένοι ομοιοπολικά, ξεκινώντας από το αμιδικό πρωτόνιο της α-αμινομάδας κάθε αμινοξέος (*Sattler et al, 1999*).



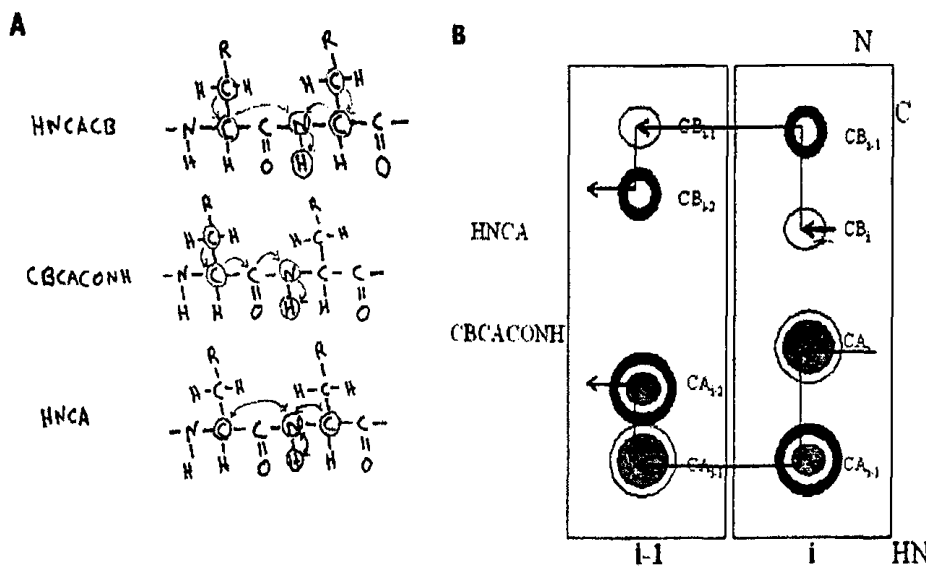


**Εικόνα 3.6:** Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την αύξηση στη ανάλυση με τη προσθήκη μίας επιπλέον διάστασης στα φάσματα NMR.

Οι έξι κορυφές στο 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] φάσμα (A), διαχωρίζονται σε διαφορετικά επίπεδα σε ένα 3D φάσμα (B), χρησιμοποιώντας τον συσχετισμό με πυρήνα α-άνθρακα ( $^{13}\text{C}$ ) ο οποίος συνδέεται ομοιοπολικά με το άτομο αζώτου ( $^{15}\text{N}$ ). Οι χημικές μετατοπίσεις του πυρήνα άνθρακα χρησιμοποιούνται για τη διάδοση των συχνотήτων συντονισμού από ένα διάστατο επίπεδο σε μία τρίτη διάσταση.

### 3.2.4 Εξαγωγή συχνотήτων συντονισμού ατόμων κύριας αλυσίδας

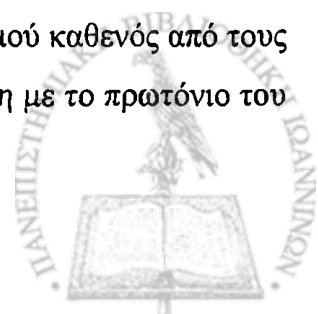
Για την απόδοση των συχνотήτων συντονισμού των ατόμων της κύριας αλυσίδας του Tudor domain, αναλύθηκαν τα τρισδιάστατα φάσματα HNCa (Bax *et al*, 1991), HNCaCb (Grzesiek *et al*, 1992a) και CbCaCONH (Grzesiek *et al*, 1992b). Σε αυτά καταγράφονται οι μαγνητικές συζεύξεις του αμιδικού πρωτονίου της α-αμινομάδας ενός αμινοξέος, με τα α-άτομα C του ίδιου και του προηγούμενου στην αμινοξική αλληλουχία (HNCa), με τα α- και β-άτομα C του προηγούμενου αμινοξέος (CbCaCONH) και με τα α- και β-άτομα C του ίδιου και του προηγούμενου αμινοξέος (HNCaCb) αντίστοιχα (Εικ. 3.7A).



**Εικόνα 3.7:** A. Σχηματική αναπαράσταση των συσχετισμών που επιτυγχάνονται σε κάθε είδος φάσματος. Με κύκλους περικλείονται τα άτομα που συμμετέχουν στη καταγραφή του κάθε φάσματος και για τα οποία οι συχνотήτες συντονισμού μπορούν να αντληθούν. B. Διευθετημένες λωρίδες στο επίπεδο  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  δύο συνεχόμενων αμινοξέων (i-1, i). Φαίνονται με τα αντίστοιχα χρώματα για το

κάθε φάσμα οι κορυφές που αναμένονται. Τα βελάκια ακολουθούν τα σήματα κατά μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας και δείχνουν τη λογική της διαδοχικής απόδοσης (sequential assignment).

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι οι συχνотήτες συντονισμού καθενός από τους πυρήνες άνθρακα εμφανίζεται δύο φορές σε κάθε φάσμα: μία σε σύζευξη με το πρωτόνιο του



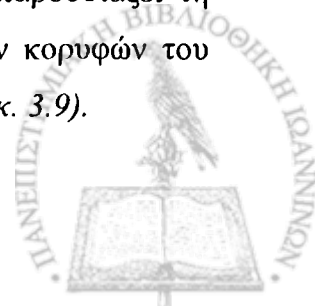


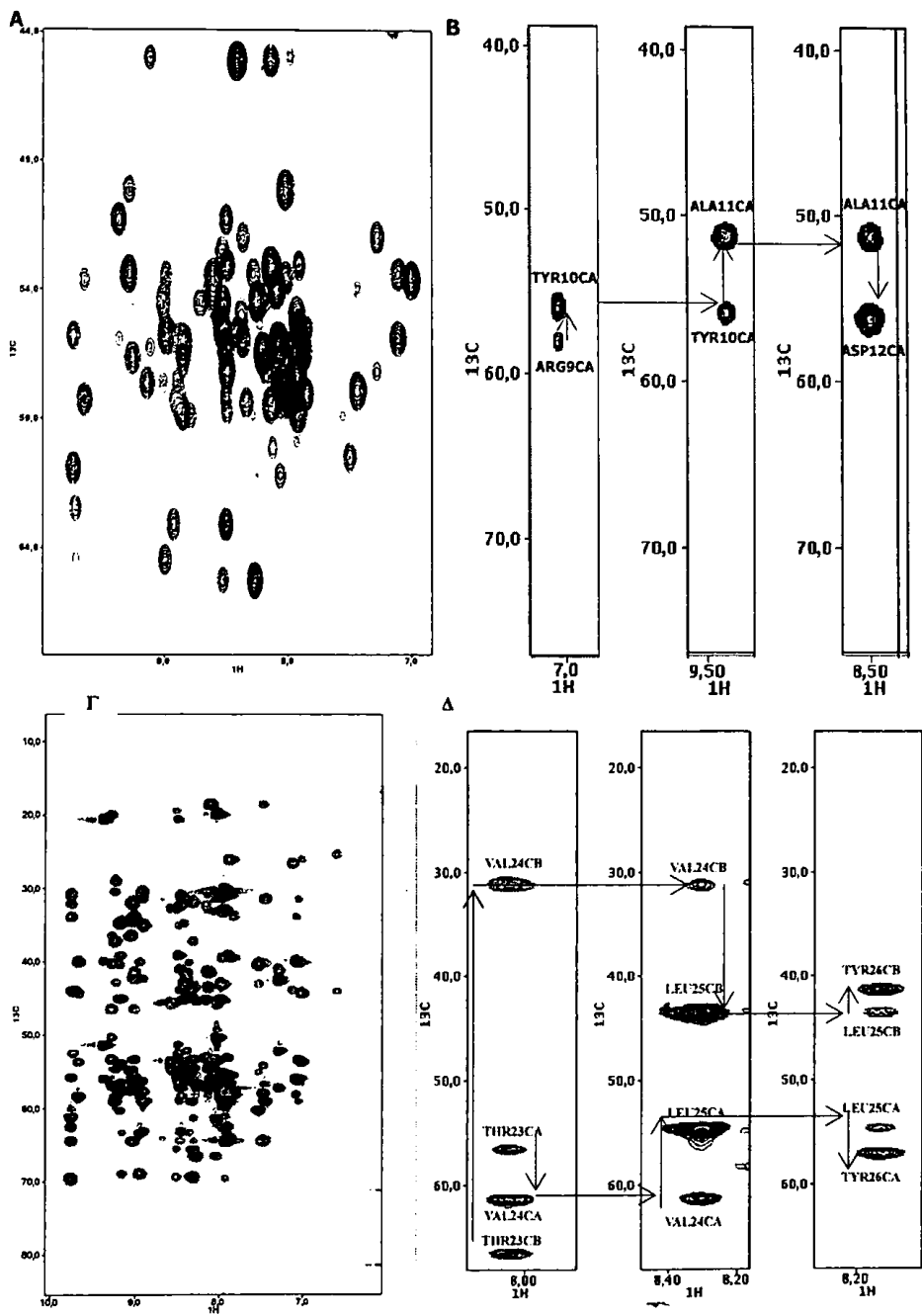
ιδιού αμινοξέος και μία με αυτό του επόμενου στην αμινοξική αλληλουχία. Έτσι, τα φάσματα μπορεί να τμηθούν σε λωρίδες (strips) στο επίπεδο  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , που στη συνέχεια διατάσσονται κατά τη σειρά της αμινοξικής αλληλουχίας ( *Εικ. 3.7B*). Με αυτό τον τρόπο, χρησιμοποιώντας τη τεχνική της διαδοχικής απόδοσης (sequential assignment, *Wuthrich 1986*), είναι εφικτή η εξαγωγή των συχνοτήτων συντονισμού των  $\alpha$ - και  $\beta$ -ατόμων C του πολυπεπτιδίου. Η διαδικασία διευκολύνεται από την ιδιότητα της ενδο-αμινοξικής σύζευξης να είναι ισχυρότερη της δια-αμινοξικής, κάτι που αντικατοπτρίζεται και στην ένταση των αντίστοιχων κορυφών. Θεωρητικά, καταγραφή μόνο του  $\text{HNCA/C}\beta$  φάσματος, το οποίο συσχετίζει την  $\alpha$ -αμινομάδα με τα  $\alpha$ - και  $\beta$ -άτομα C δύο σε σειρά αμινοξέων, είναι αρκετή για πλήρη απόδοση των ατόμων ολόκληρης της πεπτιδικής αλυσίδας. Παρόλα αυτά, καταγραφή των υπολοίπων φασμάτων διευκολύνει τη διαδικασία στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν αλληλεπικαλύψεις σημάτων. Στην *Εικόνα 3.8* παρουσιάζονται τα φάσματα  $\text{HNCA}$  και  $\text{HNCA/C}\beta$  του Tudor domain και κάποιες αντιπροσωπευτικές διευθετημένες λωρίδες στο επίπεδο  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ .

Η διαδικασία απόδοσης των συχνοτήτων συντονισμού παρουσιάζει ομοιότητες με τη λύση ενός παζλ και το πρώτο πράγμα που σκέφτεται κανείς είναι από που να ξεκινήσει. Στα παζλ συνήθως προτιμάται να φτιαχτεί πρώτα το εξωτερικό περίγραμμα και στη συνέχεια να προχωρήσει κανείς προς το εσωτερικό. Στη διαδικασία απόδοσης των συχνοτήτων συντονισμού στα άτομα C της κύριας αλυσίδας, η εκκίνηση επιτυγχάνεται μέσω των πολύ χαρακτηριστικών χημικών μετατοπίσεων, που διάφορα αμινοξέα (γλυκίνη, αλανίνη, θρεονίνη, σερίνη, βαλίνη, προλίνη) παρουσιάζουν. Για παράδειγμα το  $\text{Ca}$  της γλυκίνης είναι το μοναδικό που συντονίζεται στα  $\sim 43\text{ppm}$ , ενώ το συγκεκριμένο αμινοξύ δεν περιέχει  $\text{C}\beta$ . Αντίστοιχα το  $\text{C}\beta$  της αλανίνης συντονίζεται σε χαρακτηριστική συχνότητα (15-20ppm), που διαφέρει από τα άλλα αμινοξέα.

Ιδιαίτερη είναι επίσης και η περίπτωση της προλίνης, η οποία λόγω απουσίας  $\alpha$ -αμιδικής ομάδας, διακόπτει τη σύνδεση των λωρίδων. Έτσι, από το αμινοξύ που ακολουθεί τη προλίνη μπορούν να εξαχθούν οι τιμές  $\text{Ca}$  και  $\text{C}\beta$  αυτής, αλλά δεν θα υπάρχει σύνδεση με το προηγούμενο από αυτή αμινοξύ.

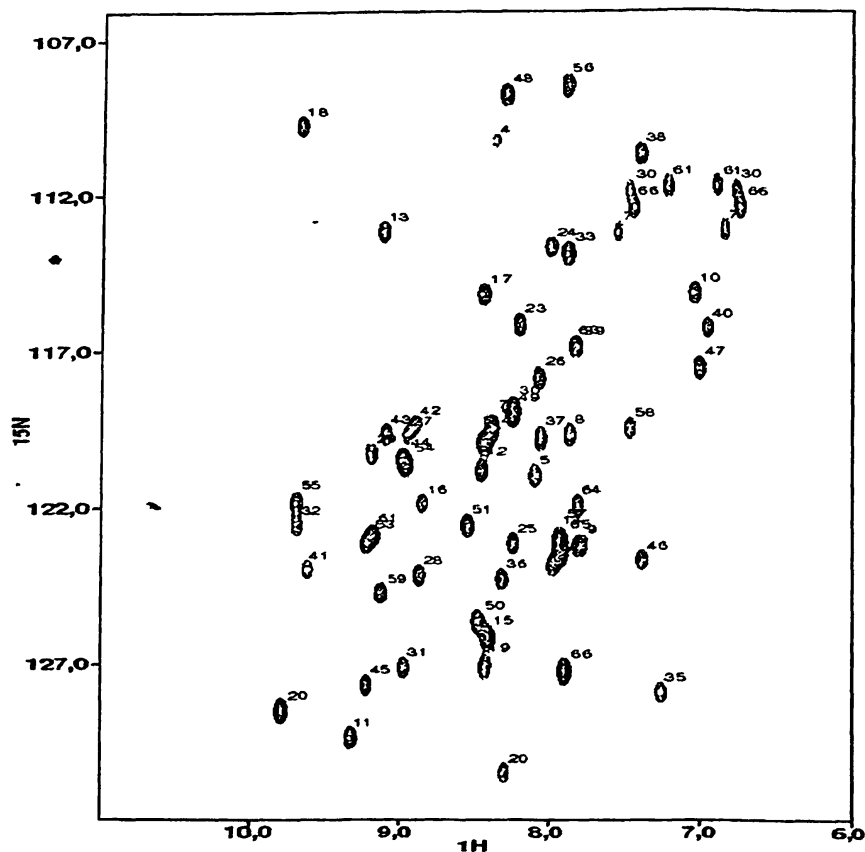
Αφού κάθε λωρίδα στα παραπάνω φάσματα αποδοθεί στα αντίστοιχα αμινοξέα, είναι δυνατή και η εξαγωγή πλέον των συχνοτήτων συντονισμού των ατόμων της αμιδικής ομάδας κάθε καταλοίπου, με βάση τη συχνότητα-επίπεδο  $^{15}\text{N}$  όπου κάθε λωρίδα παρουσιάζει τη μέγιστη ένταση κορυφών. Έτσι μπορεί να γίνει και αντιστοίχιση όλων των κορυφών του φάσματος-αποτυπώματος  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC στις αντίστοιχες αμιδικές ομάδες ( *Εικ. 3.9*).





Εικόνα 3.8: Α,Γ. Τα φάσματα HNCa και HNCaCb του Tudor domain προβεβλημένα στο επίπεδο  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Β. Διευθετημένες λωρίδες στο επίπεδο  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  από το HNCa για τα αμινοξέα 10-12 του Tudor domain. Δ. Το ίδιο για τα αμινοξέα 24-26 στο φάσμα HNCaCb.





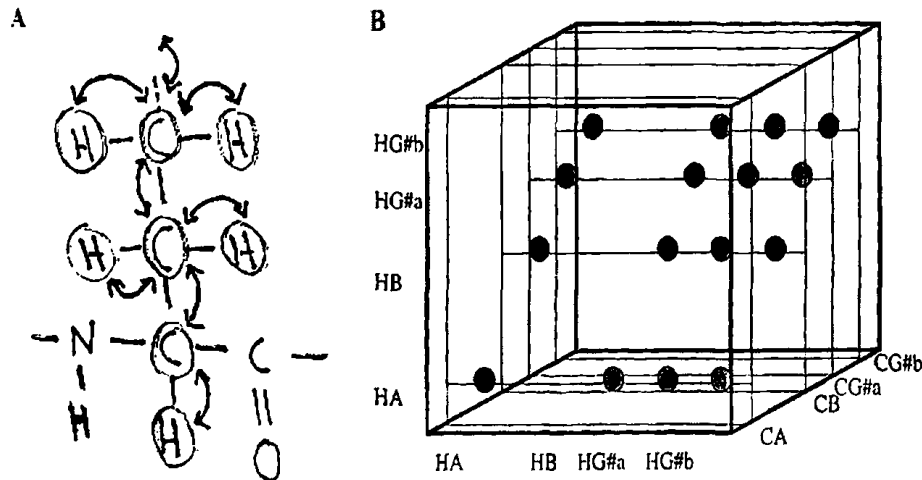
Εικόνα 3.9: Ετεροπυρηνικό φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC του Tudor domain. Ο αριθμός σε κάθε κορυφή αντιστοιχεί στο αντίστοιχο αμινοξύ της αμινοξικής αλληλουχίας του Tudor domain.

### 3.2.5 Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού ατόμων αλειφατικών πλευρικών ομάδων – Φάσμα HCCH-TOCSY

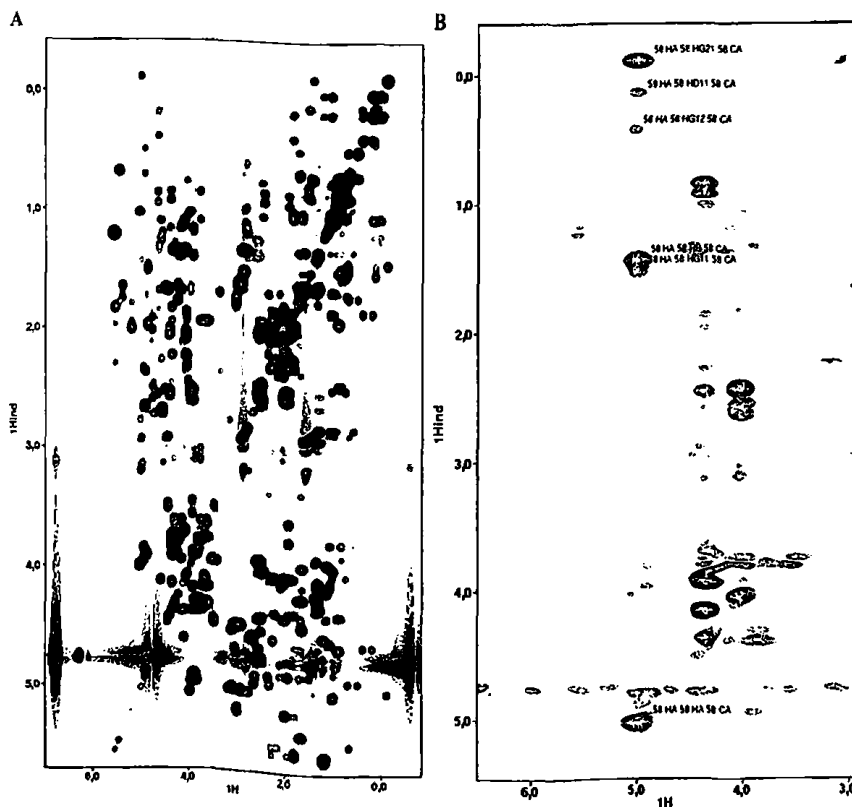
Με την ανάλυση των μέχρι τώρα αναφερθέντων φασμάτων κατέστη δυνατή η απόδοση των συχνοτήτων συντονισμού των αμιδικών ομάδων, καθώς και των  $\alpha$ - και  $\beta$ -ατόμων C. Ουσιαστικά από τον κορμό της πεπτιδικής αλυσίδας υπολείπονται οι συχνότητες συντονισμού των καρβονυλικών ατόμων άνθρακα και των Ha. Η γνώση των πρώτων δεν είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής, ενώ τα Ha προσδιορίζονται μαζί με τα άτομα των αλειφατικών ομάδων, αναλύοντας το τρισδιάστατο φάσμα HCCH-TOCSY (Bax et al, 1990, Majumdar et al, 1993). Στο συγκεκριμένο ετεροπυρηνικό φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , η μαγνητική συσχέτιση των πρωτονίων προχωρεί κατά μήκος της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας, μέσω του δικτύου ομοιοπολικών δεσμών των αλειφατικών ατόμων άνθρακα ( Εικ. 3.10A). Η μαγνήτιση εκκινεί από οποιοδήποτε πρωτόνιο της πλευρικής αλυσίδας, κάτι που σημαίνει ότι οι πληροφορίες που εμπεριέχονται στο φάσμα επαναλαμβάνονται για κάθε αμινοξύ τόσες φορές , όσες και οι μαγνητικά μη ισοδύναμες ομάδες πρωτονίων τις πλευρικής αλυσίδας. Η ανάλυση του φάσματος λαμβάνει χώρα σε



ομοπυρηνικά επίπεδα  $^1\text{H}$ , με τη τιμή της χημικής μετατόπισης της τρίτης διάστασης να αντιστοιχεί σε έναν αλειφατικό άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας ή στον Ca (Εικ. 3.10B). Η διαδικασία χρησιμοποιεί ως 'εκκινήτες' τις γνωστές από προηγουμένως χημικές μετατοπίσεις των Ca και Cβ.



Εικόνα 3.10: Α. Σχηματική αναπαράσταση των συσχετισμών που επιτυγχάνονται μέσω του φάσματος HCCH-TOCSY. Με κύκλους φαίνονται τα άτομα, των οποίων οι συχνότητες συντονισμού μπορεί να εξαχθούν. Β. Αναπαράσταση φάσματος HCCH-TOCSY, όπου φαίνεται ο τρόπος ανάλυσης που επιτυγχάνεται σε τρεις διαστάσεις και τα αναμενόμενα σήματα για μία πλευρική ομάδα βαλίνης.



Εικόνα 3.11: Α. Φάσμα HCCH-TOCSY του Tudor domain προβεβλημένο στο επίπεδο  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Β. Τμήμα του φάσματος όπου συντονίζεται ο πυρήνας του ατόμου C της ILE58. Στη κατακόρυφο όπου συντονίζεται το Ha (~5ppm), διακρίνονται οι κορυφές που προέρχονται από τη μαγνητική του σύζευξη με τους υπόλοιπους πυρήνες της πλευρικής αλυσίδας.

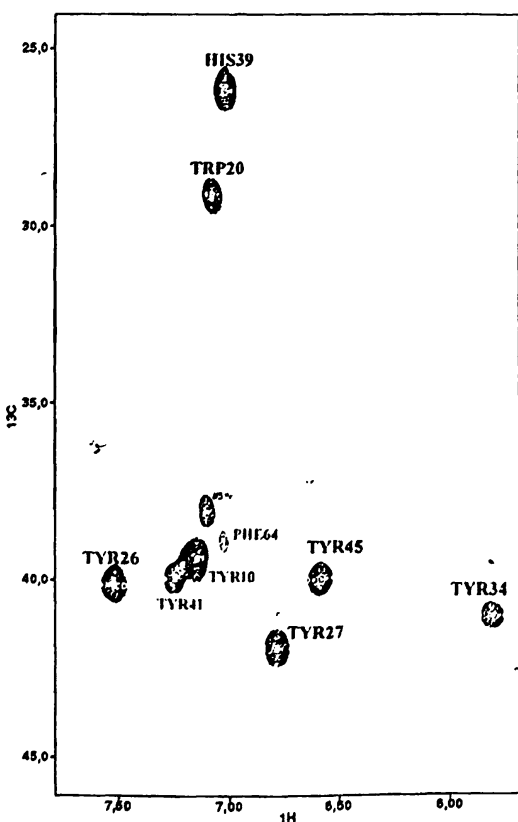
Με αυτό τον τρόπο ήταν δυνατή η απόδοση όλων των χημικών μετατοπίσεων των πλευρικών αλειφατικών ομάδων του Tudor domain. Στην Εικόνα 3.11 φαίνεται το φάσμα



HCCH-TOCSY του Tudor domain, μαζί με μια περιοχή του φάσματος όπου φαίνονται οι συζεύξεις που παρατηρούνται εκκινώντας από το H $\alpha$  της ILE58.

### 3.2.6 Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού ατόμων αρωματικών πλευρικών ομάδων – Φάσματα CbHd και CbHe

Εκτός από τα άτομα των πλευρικών αλειφατικών ομάδων, μεγάλη σημασία για το προσδιορισμό δομών μεγάλης ακρίβειας είναι και η γνώση των συχνοτήτων συντονισμού των ατόμων αρωματικών δακτυλίων. Λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους, οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες συνήθως βρίσκονται 'θαμμένες' στον εσωτερικό πυρήνα των πρωτεϊνών και συνεπώς τα αντίστοιχα πρωτόνια γειτνιάζουν με πληθώρα άλλων πρωτονίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων να εγείρουν πολλαπλά σήματα στα φάσματα NOESY, από τα οποία ανιχνεύονται αυτές οι γειτνιάσεις. Τα σήματα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής. Εκτός αυτού, πολλές φορές η έκθεση των δακτυλίων εκτός του πυρηνικού πυρήνα συμβαίνει όταν συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια, κάτι που προσδίδει μεγάλη σημασία στο προσδιορισμό του ακριβούς προσανατολισμού τους.



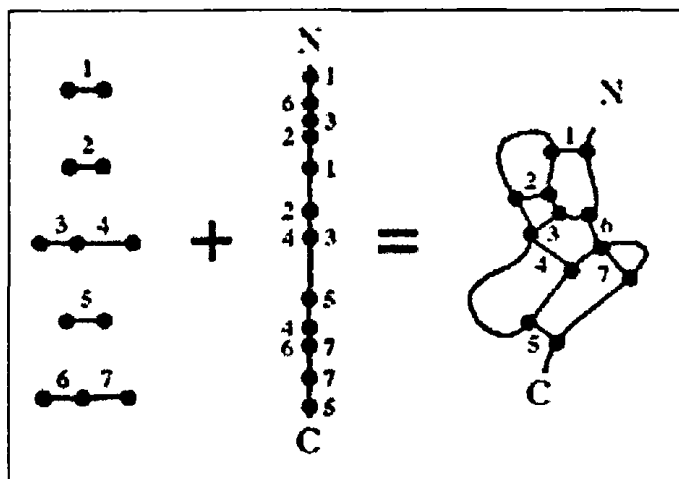
Εικόνα 3.12: Φάσμα CbHd του Tudor domain. Διακρίνονται τα σήματα που αντιστοιχούν στις μαγνητικές συζεύξεις των β-ατόμων C με τα αρωματικά πρωτόνια H $\delta$ .



Για την καταγραφή των συχνοτήτων συντονισμού των ατόμων αρωματικών δακτυλίων γίνεται χρήση εξειδικευμένων φασμάτων NMR. Στη περίπτωση του Tudor domain, έγινε χρήση των δισδιάστατων φασμάτων CbHd και CbHe (Yamazaki T et al, 1993). Στο πρώτο φάσμα συσχετίζονται τα δ-πρωτόνια των δακτυλίων με το β-άτομο άνθρακα του ίδιου αμινοξέος, ενώ στο δεύτερο η σύζευξη είναι μεταξύ Cβ και He. Στην Εικόνα 3.12 φαίνεται τα φάσμα CbHd του Tudor domain.

### 3.2.7 Εξαγωγή περιορισμών διατομικών αποστάσεων – Φάσματα NOESY

Αφού εντοπίστηκαν οι συχνότητες συντονισμού των περισσότερων ατόμων του πολυπεπτιδίου, απομένει να εξαχθούν οι περιορισμοί διαμόρφωσης (conformational restraints), οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της τριτοταγούς δομής. Αν και τέτοιοι περιορισμοί μπορεί να προκύψουν με διάφορους τρόπους, οι κρίσιμες πληροφορίες προέρχονται από μετρήσεις των NOEs (Nuclear Overhauser Effects). Το φαινόμενο NOE αναφέρεται στη μαγνητική αλληλεπίδραση πυρήνων με βάση την εγγύτητά τους στο χώρο. Συγκεκριμένα, η ένταση των σημάτων NOE είναι αντιστρόφως ανάλογη της έκκτης δύναμης της απόστασης των δύο πυρήνων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση, κάτι που πρακτικά σημαίνει ότι η μέγιστη δυνατή απόσταση των πυρήνων για τη καταγραφή τέτοιων σημάτων είναι τα ~5Å. Καταγράφοντας λοιπόν κατάλληλα φάσματα, είναι δυνατό να συλλεχθούν πληροφορίες διατομικών αποστάσεων πυρήνων και να καταρτιστεί μία λίστα που να καλύπτει το σύνολο του όγκου του πολυπεπτιδίου ( Εικ. 3.13). Τα φάσματα αυτής της κατηγορίας ονομάζονται NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) και μπορεί να είναι ομοπυρηνικά-διδιάστατα ή ετεροπυρηνικά-τρισδιάστατα.

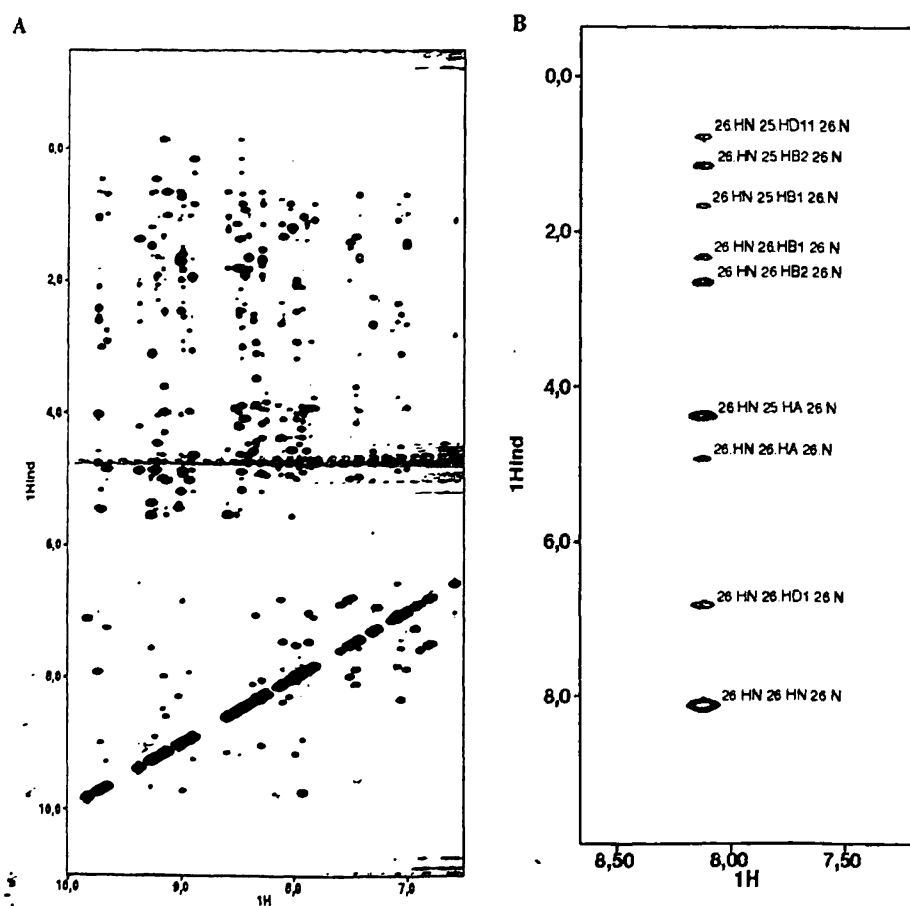


Εικόνα 3.13: Σχηματική αναπαράσταση της χρήσης των περιορισμών αποστάσεων στην επίλυση τριτοταγούς δομής με NMR. Στο αριστερό σχήμα φαίνονται οι αποστάσεις που υπολογίστηκαν από τα NOESY φάσματα για επτά ζεύγη πρωτονίων (1-7). Στο μεσαίο σχήμα η κατακόρυφη γραμμή αναπαριστά τη πεπτιδική αλυσίδα και οι μαύρες κουκκίδες τις θέσεις των πρωτονίων που καθορίζουν τις επτά αποστάσεις του αριστερού σχήματος. Προσθέτοντας τις πληροφορίες που προέρχονται από τις αποστάσεις και τις θέσεις των πρωτονίων στην

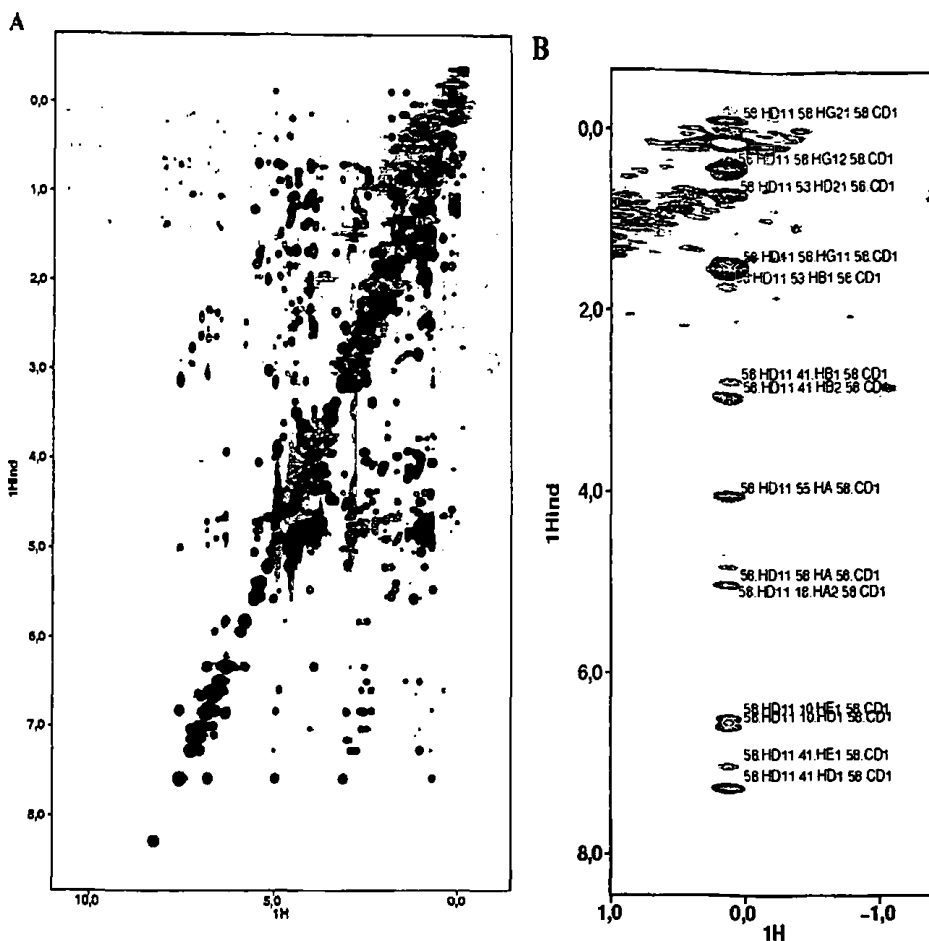
αλληλουχία, επιτρέπεται η κατασκευή πιθανών διαμορφώσεων του πολυπεπτιδίου, όπου όλοι οι περιορισμοί απόστασης ικανοποιούνται (δεξιό σχήμα).



- Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού πυρήνων οι οποίοι γειτνιάζουν σε μία σωστά αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, τέτοια φάσματα περιέχουν πολλές κορυφές με αποτέλεσμα να υπάρχουν αρκετές αλληλεπικαλύψεις. Γι' αυτό το λόγο συνήθως προτιμάται η καταγραφή και ανάλυση τρισδιάστατων φασμάτων NOESY, όπου ένα από τα δύο συζευγμένα πρωτόνια είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με άτομα  $^{15}\text{N}$  ή  $^{13}\text{C}$ . Για τον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής του Tudor domain χρησιμοποιήθηκαν τρία φάσματα NOESY ( $^{15}\text{N}$ -NOESY,  $^{13}\text{C}$ -NOESY,  $^{13}\text{C}$ -aromatic-NOESY). Από το πρώτο εξάγονται διατομικές αποστάσεις πυρήνων υδρογόνου που γειτνιάζουν με πρωτόνια ομοιοπολικά συνδεδεμένα με άτομο  $^{15}\text{N}$ . Στα άλλα δύο, τα σήματα οφείλονται σε γειτνίαση πρωτονίων, ένα εκ των οποίων είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με αλειφατικό ή αρωματικό άτομο  $^{13}\text{C}$  αντίστοιχα. Στις Εικόνες 3.14, 3.15 φαίνονται κάποια από τα φάσματα NOESY του Tudor domain.



Εικόνα 3.14: Α. Φάσμα  $^{15}\text{N}$ -NOESY του Tudor domain προβεβλημένο στο επίπεδο  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Β. Τμήμα του φάσματος στο επίπεδο που συντονίζεται ο πυρήνας  $^{15}\text{N}$  της α-αμιδικής ομάδας της TYR26. Οι μαγνητικές συζεύξεις του πρωτονίου της αμιδικής ομάδας με γειτνιάζοντα στο χώρο πρωτόνια, εγείρουν τα σήματα που φαίνονται.



Εικόνα 3.15: Α. Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NOESY του Tudor domain προβεβλημένο στο επίπεδο  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Β. Τμήμα του φάσματος στο επίπεδο που συντονίζεται ο πυρήνας  $^{13}\text{C}$  της  $\text{CD}_1$  ομάδας της ILE58. Οι μαγνητικές συζεύξεις του πρωτονίου της  $\text{CD}_1$  ομάδας με γειτνιάζοντα στο χώρο πρωτόνια, εγείρουν τα σήματα που φαίνονται.

Αναλύοντας τα τρισδιάστατα φάσματα NOESY επιτεύχθηκε η απόδοση ενός μεγάλου μέρους των κορυφών στα αντίστοιχα ζεύγη πρωτονίων. Ακολούθησε ολοκλήρωση των κορυφών σε δύο διαστάσεις, στο επίπεδο της μέγιστης έντασής τους και τελικώς καταρτίστηκε μία λίστα περιορισμών ως προς τη μέγιστη απόσταση που είναι δυνατό να χωρίζει τα ζεύγη των συζευγμένων πυρήνων. Οι κορυφές οι οποίες ήταν αδύνατο να αποδοθούν, λόγω πολλαπλών πιθανών επιλογών πυρήνων, αποκλείστηκαν αρχικά από τη λίστα.

Ο υπολογισμός κάποιων αρχικών δομών βοήθησε ώστε η λίστα των περιορισμών να εμπλουτιστεί, καθώς ήταν δυνατό πλέον να αποδοθούν περισσότερες κορυφές των φασμάτων NOESY. Όσο αύξανε ο αριθμός των περιορισμών, τόσο αύξανε και η ποιότητα των υπολογιζόμενων δομών.



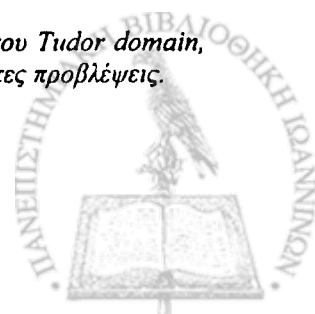


### 3.2.8 Περιορισμοί διέδρων γωνιών

Εκτός από τους περιορισμούς διατομικών αποστάσεων που εξήχθησαν αναλύοντας τα φάσματα NOESY, η ποιότητα των υπολογιζόμενων δομών βελτιώθηκε με τη προσθήκη περιορισμών που αφορούσαν τις διέδρες γωνίες  $\varphi$  και  $\psi$ . Για την εξαγωγή των περιορισμών που αφορούσαν τις διέδρες γωνίες χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα TALOS (Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity) (Cornilescu et al, 1999). Το συγκεκριμένο πρόγραμμα κάνει προβλέψεις για τις γωνίες  $\varphi$  και  $\psi$ , εκμεταλλευόμενο τη παρατήρηση ότι η απόκλιση των χημικών μετατοπίσεων των ατόμων της κύριας αλυσίδας πρωτεΐνης από τις τιμές που θα είχαν αν το αντίστοιχο άτομο βρισκόταν σε δομή τυχαίου σπειράματος, συσχετίζεται με τη δευτεροταγή δομή (και άρα τις γωνίες  $\varphi$ ,  $\psi$ ) στην οποία ανήκει. Τα αμινοξέα ομαδοποιούνται σε αλληλεπικαλυπτόμενες τριάδες, οι οποίες συγκρίνονται με αντίστοιχες τριάδες μίας βάσης δεδομένων πρωτεϊνών με γνωστές τριτοταγείς δομές. Το πρόγραμμα αναζητεί ομόλογες τριάδες στη βάση δεδομένων και συγκρίνοντας τις τιμές χημικών μετατοπίσεων των ατόμων N, H $\alpha$ , C $\alpha$ , CO, C $\beta$ , κάνει προβλέψεις για τις γωνίες  $\varphi$  και  $\psi$ . Για να κριθούν οι προβλέψεις αξιόπιστες θα πρέπει οι τιμές των γωνιών να συμφωνούν με 10 ομόλογες τριάδες αμινοξέων που αναγνωρίζονται στη βάση δεδομένων. Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται οι προβλέψεις διέδρων γωνιών του TALOS που κρίθηκαν αξιόπιστες για τα αμινοξέα του Tudor domain.

Αμινοξύ	$\varphi$	$\psi$
14E	-75±12	138±7
15V	-94±14	131±10
16V	-132±12	164±13
17M	-110±15	133±19
28E	-95±12	126±10
29V	-135±9	164±10
30Q	-133±16	132±19
42T	-93±12	132±9
43V	-129±9	160±14
44K	-125±13	134±12
46K	-61±5	-24±7
47D	-86±9	0±10
49T	-78±10	130±19
50E	-134±21	153±17
51L	-137±18	146±13
52A	-109±18	138±10
53L	-138±19	152±16
54K	-81±19	157±14
55E	-60±5	-30±7
56S	-78±13	-11±18
58I	-118±21	134±15
59R	-131±16	157±14

Πίνακας 3.1: Τιμές διέδρων γωνιών  $\varphi$  και  $\psi$  για αμινοξέα του Tudor domain, για τα οποία το πρόγραμμα TALOS μπόρεσε να κάνει αξιόπιστες προβλέψεις.



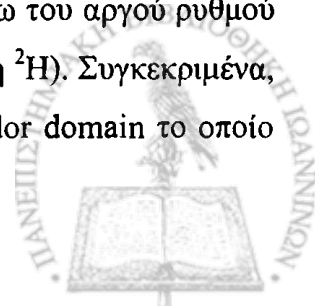
### 3.2.9 Υπολογισμός τριτοταγούς δομής

Αφού συμπληρώθηκε η λίστα των περιορισμών διαμόρφωσης, ο υπολογισμός της τριτοταγούς δομής έγινε, με χρήση του προγράμματος CYANA που βασίζεται στη μέθοδο της προσομοιωμένης αναδιάταξης (simulated annealing) στο κενό. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, ο υπολογισμός ξεκινάει από δομές τυχαίου σπειράματος που θα είχε το μόριο αν βρισκόταν σε πολύ υψηλή ενεργειακή στάθμη. Στην πορεία του υπολογισμού η θερμοκρασία, που λειτουργεί ως μέτρο ενέργειας μειώνεται, με αποτέλεσμα το μόριο να υιοθετεί διαμορφώσεις οι οποίες στηρίζονται στις σχέσεις διατομικών αποστάσεων και γωνιών, όπως αυτές προέκυψαν από τα δεδομένα NMR. Τελικώς, από τις διάφορες δομές που υπολογίζονται και οι οποίες οφείλουν να πληρούν τις περιοριστικές συνθήκες, επιλέγονται αυτές που έχουν τη μικρότερη ενέργεια.

Γίνεται αντιληπτό ότι όσο πιο μεγάλη είναι η λίστα με τις περιοριστικές συνθήκες, τόσο πιο μεγάλη ακρίβεια έχουν οι υπολογιζόμενες δομές. Ο υπολογισμός κάποιων αρχικών δομών έρχεται να βοηθήσει προς αυτή τη κατεύθυνση, καθώς γνωρίζοντας πλέον την τοπολογία του πολυπεπτιδίου, είναι ευκολότερη η απόδοση κάποιων κορυφών των φασμάτων NOESY. Αυτές οι κορυφές αρχικά ήταν αδύνατο να αποδοθούν λόγω της ύπαρξης περισσότερων του ενός πρωτονίων, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις συνέπιπταν με τις συντεταγμένες των σημάτων. Οι διαδικασίες της απόδοσης των κορυφών NOE και του υπολογισμού της τρισδιάστατης δομής, από ένα σημείο και μετά προχωρούν παράλληλα με στόχο τον εμπλουτισμό της λίστας περιοριστικών συνθηκών, κάτι που συνεπάγεται δομές μεγαλύτερης ακρίβειας και ποιότητας.

### 3.2.10 Περιορισμοί διατομικών αποστάσεων μέσω αναγνώρισης δεσμών υδρογόνου

Στον υπολογισμό της δομής χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον περιορισμοί που προήλθαν από την αναγνώριση αμινοξέων του Tudor domain που συμμετείχαν σε δεσμούς υδρογόνου. Είναι γνωστό ότι αμινοξέα που βρίσκονται σε τμήματα καθορισμένων δευτεροταγών δομών σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μέσω των αμιδικών και καρβονυλικών ομάδων τους. Το Tudor domain αποκτά μία διαμόρφωση αποτελούμενη κυρίως από β-πτυχωτές επιφάνειες, άρα αναμένεται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου σε αμινοξέα που βρίσκονται 'απέναντι' σε β-πτυχωτούς κλώνους. Η αναγνώριση αυτών των αμινοξέων γίνεται μέσω του αργού ρυθμού αντικατάστασης των αμιδικών τους πρωτονίων από άτομα δευτερίου (D ή  $^2\text{H}$ ). Συγκεκριμένα, έγινε καταγραφή του φάσματος 'αποτύπωμα'  $^{15}\text{N}$ -HSQC σε δείγμα Tudor domain το οποίο



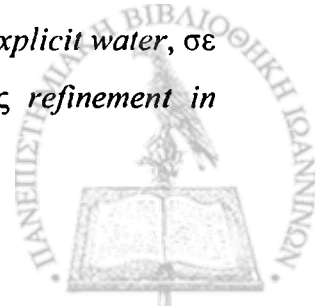
είχε λυοφιλοποιηθεί και επαναδιαλυθεί σε D<sub>2</sub>O. Αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μέσω των αμιδικών τους πρωτονίων, αναγνωρίστηκαν από την διατήρηση των σημάτων τους στο φάσμα. Αντιθέτως, αμινοξέα που δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, αντάλλαξαν το αμιδικό τους πρωτόνιο με δευτέριο σε πολύ λίγο χρόνο και λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων των δύο ισοτόπων, οι αντίστοιχες κορυφές στο φάσμα ελαχιστοποιήθηκαν.

Με αυτή τη μέθοδο αναγνωρίστηκαν τα αμινοξέα 'δότες' δεσμών υδρογόνου του Tudor domain. Επίσης, υποθέσεις για τα αντίστοιχα αμινοξέα 'δέκτες' ήταν δυνατό να γίνουν με βάση τις ήδη υπολογισμένες τρισδιάστατες δομές, των οποίων η ακρίβεια αυξήθηκε περαιτέρω με τη προσθήκη των περιορισμών διατομικών αποστάσεων που σχετιζόταν άμεσα με τους δεσμούς υδρογόνου.

### 3.2.11 Περαιτέρω αύξηση ακρίβειας υπολογιζόμενων δομών – Βελτιστοποίηση σε νερό

Όπως αναφέρθηκε, το μέσο στο οποίο εκτελείται η προσομοιωμένη αναδιάταξη (simulated annealing) και υπολογίζονται οι τρισδιάστατες δομές είναι το κενό. Αντιθέτως, τα δεδομένα από τη φασματοσκοπία NMR έχουν ληφθεί σε διάλυμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κατά τον υπολογισμό των τρισδιάστατων δομών να λαμβάνεται με έμμεσο τρόπο η επίδραση που ασκεί το πεδίο δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσεως λόγω της παρουσίας ιόντων και διπόλων-ιόντων νερού. Η ενσωμάτωση συναρτήσεων που θα λάμβαναν τα παραπάνω δεδομένα υπ' όψη κατά τη διάρκεια υπολογισμού δομών, καθιστά τη διαδικασία υπολογιστικά απαιτητική και χρονοβόρα. Για να επιλυθεί το συγκεκριμένο ζήτημα ακολουθείται μία διαδικασία γνωστή ως βελτιστοποίηση σε νερό (water refinement), κατά την οποία υπολογίζεται η επίδραση πεδίων δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσης στις δομές που υπολογίστηκαν στο κενό.

Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ώστε να ληφθεί υπ' όψη η παρουσία του νερού στον υπολογισμό δομών βιομορίων (Xia et al, 2002). Σύμφωνα με τη πρώτη, το βιομόριο βυθίζεται σε δοχείο (box) γεμάτο με μόρια του διαλύτη έτσι ώστε το εγγύτερό του σημείο να απέχει από τις επιφάνειες του δοχείου τουλάχιστον 10Å. Στη δεύτερη μέθοδο, 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 γι' αυτό και ονομάζεται *refinement in explicit water*, σε αντίθεση με τη δεύτερη για την οποία χρησιμοποιείται ο χαρακτηρισμός *refinement in*



*implicit water*. Στη περίπτωση της δομής του Tudor domain του LBR εφαρμόστηκε η μέθοδος εξευγενισμού απ' ευθείας σε νερό (refinement in explicit water) (Brunger et al, 1998).

### 3.2.12 Ποιοτικά χαρακτηριστικά της δομής του Tudor domain

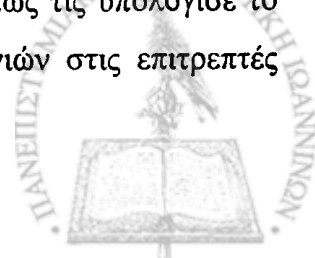
<b>NOE and hydrogen bond distance restraints</b>		
Total	869	
Intraresidue	215	
Sequential	212	
Medium range (1<i>i</i><5)	84	
Long range ( <i>i&gt;5</i> )	358	
<b>Dihedral angle restraints (<math>\varphi</math> and <math>\psi</math>)</b>	68	
<b>CYANA target function value (<math>\text{\AA}^2</math>)</b>	0.91±0.03	
<b>Restraint violations</b>		
Distance restraint violations (>0.2 $\text{\AA}$ )	0	
Dihedral angle restraint violations (>5.0°)	0	
<b>RMSD deviation from the average coordinates (<math>\text{\AA}</math>)</b>		
Backbone atoms (residues 8-62)	0.32±0.11 <sup>a</sup>	0.53±0.11 <sup>b</sup>
Heavy atoms	0.82±0.07	1.03±0.09
<b>WHATIF quality check</b>		
Packing	-2.24 <sup>a</sup>	-1.31 <sup>b</sup>
Ramachandran	-2.89	-2.68
<b>PROCHECK ramachandran plot analysis (%)</b>		
Residues in most favored regions	78.9 <sup>a</sup>	91.2 <sup>b</sup>
Residues in additional allowed regions	17.5	7.0
Residues in generously allowed regions	3.5	1.8
Residues in disallowed regions	0.0	0.0

**Πίνακας 3.2:** Συγκεντρωτική λίστα περιορισμών διατομικών αποστάσεων και διεδρων γωνιών που χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό της τρισδιάστατης δομής του Tudor domain του LBR. Ποιοτικοί δείκτες υπολογιζόμενων δομών.

<sup>a</sup> Πριν τη διαδικασία του water refinement

<sup>b</sup> Μετά τη διαδικασία του water refinement

Μετά την επίλυση της τριτοταγούς δομής ενός βιομορίου παρατίθεται ένας πίνακας στον οποίο αναγράφονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της δομής, καθώς και το είδος και οι παραβιάσεις των περιορισμών που χρησιμοποιήθηκαν στους υπολογισμούς. Όπως φαίνεται λοιπόν στον Πίνακα 3.2 δεν υπήρχαν παραβιάσεις των περιορισμών απόστασης μεγαλύτερες των 0.2 $\text{\AA}$ , καθώς και παραβιάσεις των περιορισμών διεδρων γωνιών μεγαλύτερες των 5°. Επίσης, ο έλεγχος της ποιότητας των δομών έδειξε ότι αυτές πληρούν τα ποιοτικά κριτήρια. Αυτό φαίνεται από τις τιμές των παραμέτρων  $z$  για το πακετάρισμα (packing) των αμινοξέων και το διάγραμμα Ramachandran οι οποίες είναι μεγαλύτερες του -3 όπως τις υπολόγισε το πρόγραμμα WHATIF, καθώς και από τη κατανομή των διεδρων γωνιών στις επιτρεπτές



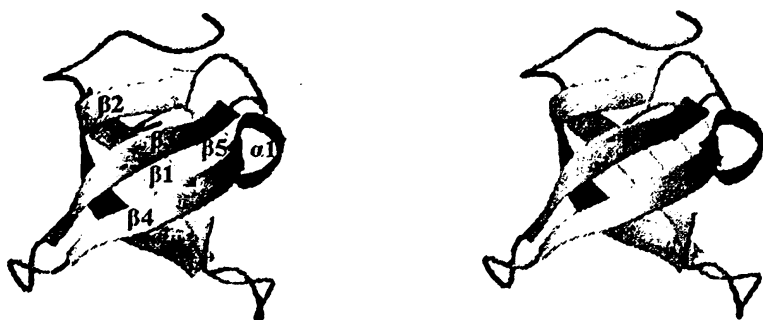
περιωχές του διαγράμματος Ramachandran όπως τις υπολόγισε το πρόγραμμα PROCHECK. Είναι εμφανής επίσης η ευεργετική επίδραση της διαδικασίας του water refinement στη ποιότητα των υπολογιζόμενων δομών, καθώς μετά τη συγκεκριμένη κατεργασία όλοι οι προαναφερθέντες ποιοτικοί δείκτες βελτιώνονται ακόμα περισσότερο.

### 3.2.13 Τριτοταγής δομή του Tudor domain του LBR

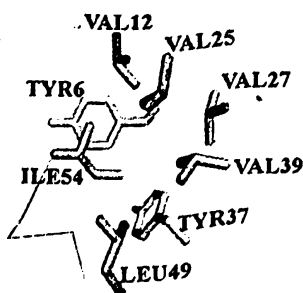
A



B



Γ



Εικόνα 3.16: A. Τρισδιάστατη δομή του Tudor domain του LBR. A. Στερεοδιάγραμμα που δείχνει το ίχνος του πεπτιδικού σκελετού των δέκα δομών με τη χαμηλότερη ενέργεια. Με κyanό φαίνονται οι β-κλώνοι και με κόκκινο η 3<sup>η</sup> έλικα. B. Στερεοδιάγραμμα μίας δομής του Tudor domain που αντιστοιχεί στο μέσο όρο των δέκα δομών. Διακρίνονται τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής με τα αντίστοιχα χρώματα όπως στο A. Γ. Απεικόνιση όπου φαίνονται με πράσινο οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων που σχηματίζουν τον υδρόφοβο πυρήνα και σταθεροποιούν την αναδίπλωση του β-βαρελιού.



Όπως τα άλλα Tudor μοτίβα των οποίων οι τριτοταγείς δομές είναι γνωστές, έτσι και το Tudor domain του LBR υιοθετεί τη χαρακτηριστική αναδίπλωση του β-βαρελιού (β-barrel fold). Η συγκεκριμένη διαμόρφωση σχηματίζεται από πέντε β-κλώνους, οι οποίοι οργανώνονται σε δύο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες. Μία β-διόγκωση (β-bulge) που σχηματίζουν τα αμινοξέα T28-S29, επιτρέπει στον ένα κλώνο (β2) να συμμετέχει και στις δύο β-πτυχωτές επιφάνειες, 'αγκαλιάζοντας' τη δομή, καθώς διατρέχει και τις δύο πλευρές του βαρελιού. Οι κλώνοι β1-4 συνδέονται με μικρού μήκους στροφές, ενώ η σύνδεση των β4 και β5 κλώνων πραγματοποιείται μέσω μίας  $3_{10}$ -έλικας ( *Εικ.3.16A,B*). Η δομή σταθεροποιείται με το σχηματισμό ενός υδρόφοβου πυρήνα από τις πλευρικές αλυσίδες των Y6, V12, V25, V27, Y37, V39, L49, I54 ( *Εικ.3.16Γ*).

### 3.2.14 Αρωματικός κλωβός του Tudor domain του LBR

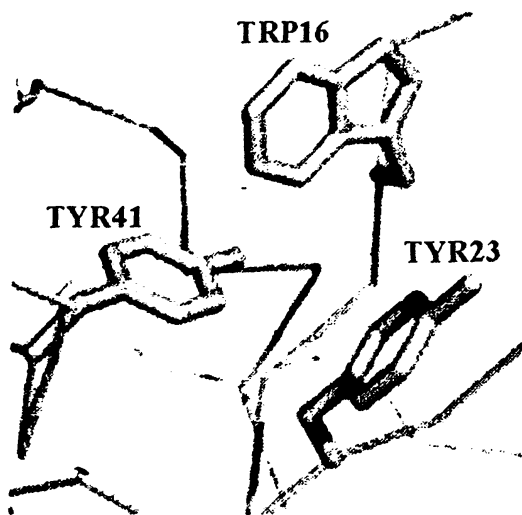
Από τη στοίχιση των πρωτοταγών αλληλουχιών Tudor μοτίβων των οποίων οι τρισδιάστατες δομές είναι γνωστές, με αυτήν του Tudor domain του LBR διαφάνηκε ότι και ο LBR περιέχει τρία αρωματικά κατάλοιπα τα οποία θα μπορούσαν να σχηματίσουν το χαρακτηριστικό αρωματικό κλωβό που υπάρχει στα άλλα Tudor domains ( *Εικ. 3.17*).

<b>LBR</b>	MPNRKYADGEVVMGRWPGSVLYYEVQVTSYDDASHL-YTVKY-----KDGT-ELALKE-SDIRLQSSF---KQ
<b>SMN</b>	GPP---AEGEVNVQRHT-DGQVYGAKFVA-SLTTFYEVNF-----DDGSFSDNLYP-EDIVSQDCL---QF
<b>53BP1</b>	-----FVGLRVVAKWSSNGYFYSKTR-DVGAGK-YKLLF-----DDG-----YE-CDVLGKDIILCDPI
<b>JMJD2A</b>	----QWKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRET-CVVVYTYGNGNREEQNLSDLLSPICEVA-----NN

*Εικόνα 3.17: Στοίχιση πρωτοταγών αλληλουχιών των Tudor μοτίβων των πρωτεϊνών LBR, SMN, 53BP1 και JMJD2A. Με κόκκινο διακρίνονται τα συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα που σχηματίζουν τον αρωματικό κλωβό.*

Ο αρωματικός κλωβός αποτελεί τη θέση πρόσδεσης των μεθυλιωμένων λυσινών ή αργινινών και η παρουσία του στο Tudor domain του LBR ήταν δυνατό πλέον να εξεταστεί μετά την επίλυση της δομής του. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.18* οι πλευρικές αλυσίδες τριών αρωματικών καταλοίπων (W16, Y23, Y41) σχηματίζουν τη χαρακτηριστική διάταξη του κλωβού, κάτι που υπαινίσσεται την πιθανότητα το Tudor domain του LBR να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με μεθυλιωμένα πολυπεπίδια.



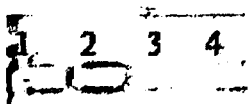


Εικόνα 3.18: Απεικόνιση τμήματος της κύριας αλυσίδας του Tudor domain του LBR, όπου φαίνονται με πράσινο οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων που σχηματίζουν τον αρωματικό κλωβό.

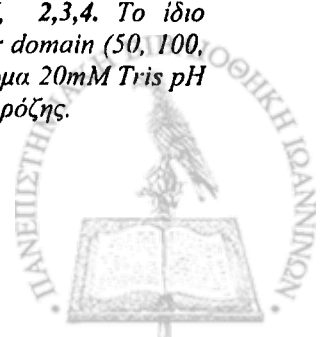
### 3.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με νουκλεϊκά οξέα

Σε πρώτο στάδιο εξετάστηκε η ικανότητα του Tudor domain να αλληλεπιδρά με νουκλεϊκά οξέα (RNA και DNA). Τα δύο μόρια θεωρούνταν υποψήφια υποστρώματα Tudor μοτίβων, καθώς για το μεν πρώτο (RNA) υπήρχαν ενδείξεις βασισμένες σε βιοπληροφορικές αναλύσεις (Ponting 1997), ενώ για το δεύτερο (DNA) είχε δειχθεί η ικανότητα του διπλού Tudor domain της πρωτεΐνης 53BP1 να συνδέεται σε ολιγονουκλεοτίδια (Charier et al, 2004).

Δοκιμές μετατοπίσεως ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay) με χρήση τυχαίων αλληλουχιών RNA και DNA και Tudor πολυπεπτιδίου δεν έδωσαν καμία ένδειξη για τυχόν αλληλεπίδραση του Tudor domain του LBR με τα παραπάνω υποστρώματα (Εικ. 3.19).

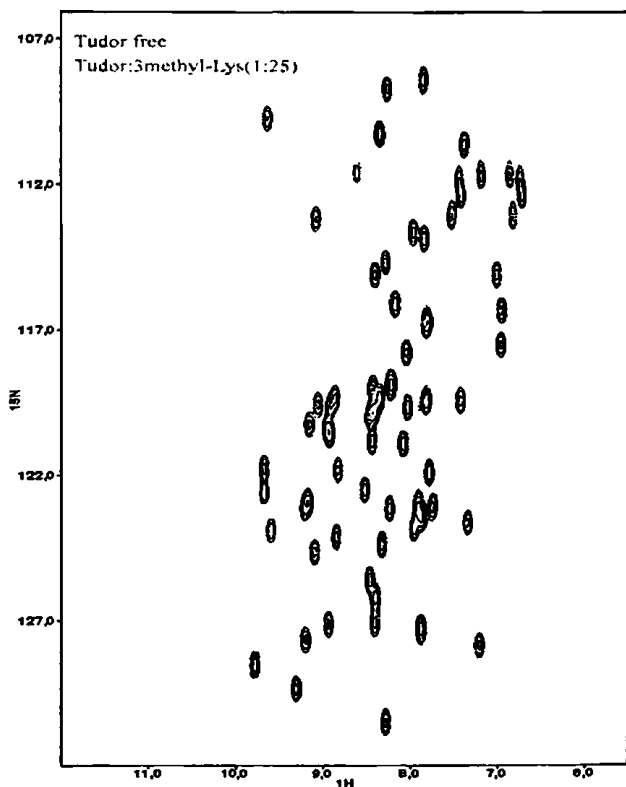


Εικόνα 3.19: Διερεύνηση αλληλεπίδρασης DNA και Tudor domain με πειράματα EMSA. 1. 0.5μg DNA προερχόμενο από το πλασμίδιο pCMV, 2,3,4. Το ίδιο πλασμίδιο μετά από επώαση για 5min με αυξανόμενες ποσότητες Tudor domain (50, 100, 200μg αντίστοιχα). Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM β-ME. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 1% gel αгарόζης.



### 3.4 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με μεθυλιωμένα αμινοξέα

Αφού αρχικά εξετάστηκε η τριτοταγής δομή του Tudor domain για την ύπαρξη των απαραίτητων χαρακτηριστικών (αρωματικός κλωβός) σύνδεσης με μεθυλιωμένα πολυπεπίδια, ακολούθησε πειραματική διερεύνηση της παραπάνω ιδιότητας. Προς αυτή την κατεύθυνση διάλυμα Tudor domain τιτλοδοτήθηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεθυλιωμένων αμινοξέων (αργινινών και λυσινών) (Πιν. 3.2). Οι αντιδράσεις παρακολούθηθηκαν με ταυτόχρονη καταγραφή του  $^{15}\text{N}$ -HSQC φάσματος του Tudor domain μετά από κάθε προσθήκη μεθυλιωμένου αμινοξέος. Τα φάσματα εξετάστηκαν για διαφορές οι οποίες θα συνιστούσαν ικανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ Tudor domain και μεθυλιωμένου αμινοξέος. Η εξέταση των φασμάτων έδειξε ότι δεν υπήρξαν διαφορές μετά από προσθήκη των διάφορων τύπων μεθυλιωμένων αμινοξέων, ακόμη και σε μεγάλη περίσσεια, κάτι που δείχνει ότι το Tudor domain του LBR δεν συνδέεται με μεθυλιωμένα αμινοξέα, τουλάχιστον όταν αυτά βρίσκονται ελεύθερα ( Εικ. 3.19). Παρόμοια πειραματική προσέγγιση έχει εφαρμοστεί με επιτυχία με άλλα μέλη της οικογένειας των Tudor μοτίβων (Sprangers et al, 2003, Ramos et al, 2006).



Εικόνα 3.19: Επίθεση  $^{15}\text{N}$ -HSQC φασμάτων του Tudor domain κατά την τιτλοδότηση με 3-μέθυλ-λυσίνη. Με μπλε το φάσμα του ελεύθερου Tudor domain και με κόκκινο το αντίστοιχο φάσμα στο τέλος της τιτλοδότησης (1:25 αναλογία σε moles). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα με τους άλλους τύπους των μεθυλιωμένων αμινοξέων.





Τύπος αμινοξέος	Αναλογία σε moles <i>Tudor domain</i> :μεθυλιωμένου αμινοξέος στο τέλος της τιτλοδότησης
λυσίνη	1:25
Μόνο-μέθυλ-λυσίνη	1:25
Δι-μέθυλ-λυσίνη	1:25
Τρι-μέθυλ-λυσίνη	1:25
αργινίνη	1:25
Μόνο-μέθυλ-αργινίνη	1:25
Δι-μέθυλ-αργινίνη (συμμετρικά και μη-συμμετρικά)	1:25

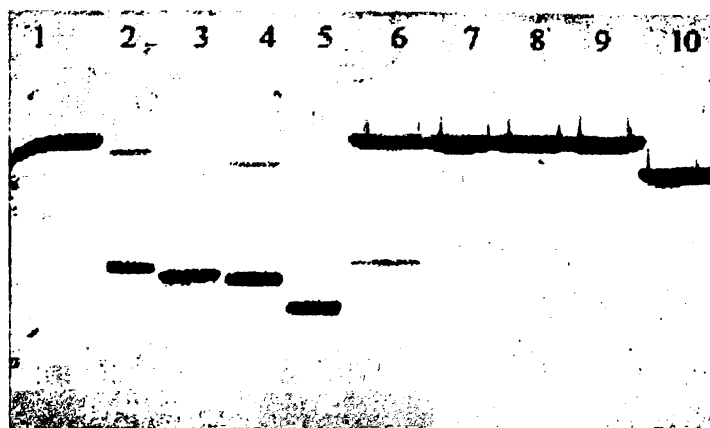
Πίνακας 3.2: Τύποι μεθυλιωμένων αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν στις τιτλοδοτήσεις με  $^{15}\text{N}$ -ισοτοπικά σημασμένου δείγματος *Tudor domain*.

### 3.5 Αλληλεπίδραση του *Tudor domain* με ιστόνες

#### 3.5.1 Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων με φυσικές ιστόνες

Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν οι πυρηνικές ιστόνες ως προς την ικανότητα πρόσδεσης στο *Tudor domain* του LBR. Οι λόγοι που εξ αρχής έστρεψαν το ενδιαφέρον σε αυτές τις πρωτεΐνες σχετίζονται με τη γνωστή ικανότητα του LBR να συνδέεται σε νουκλεοσώματα των οποίων οι ιστόνες αποτελούν κύρια συστατικά (*Makatsori et al, 2004*), αλλά και με τη χαρακτηριστική ιδιότητα των μοτίβων της *Tudor* υπεροικογένειας να αναγνωρίζουν μεθυλιωμένα τμήματα ιστονών (*Taverna et al, 2007*).

Προς αυτή την κατεύθυνση πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συγκατακρήμνισης (GST pull-downs) χρησιμοποιώντας ως δόλωμα την GST-*Tudor* πρωτεΐνη και ως υποψήφιους προσδέτες φυσικές ιστόνες απομονωμένες από θύμο αδένα μοσχαριού. Οι δοκιμές συγκατακρήμνισης έδειξαν ότι το *Tudor domain* έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να προσδένει ειδικά την ιστόνη H3 (*Εικ. 3.20*).



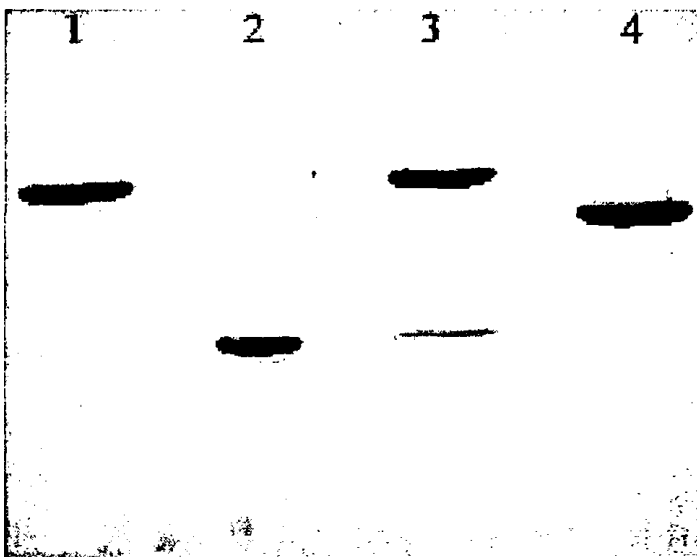
**Εικόνα 3.20:** Αλληλεπίδραση του *Tudor domain* με τη φυσική ιστόνη H3, χρησιμοποιώντας δοκιμές συγκατακρήμνισης. 1. Δείγμα GST-*Tudor* ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης. 2-5. Δείγματα φυσικών ιστονών (H3, H2B, H2A, H4 αντίστοιχα) που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις. 6-9. Εκλούσματα από τη στήλη μετά από επώαση του GST-*Tudor* με τις ιστόνες H3, H2B, H2A και H4 αντίστοιχα. 10. Έκλουση από στήλη που περιείχε ακινητοποιημένη GST (control), η οποία είχε επωαστεί με την ιστόνη H3.

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.



### 3.5.2 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης με την ανασυνδυσασμένη H3

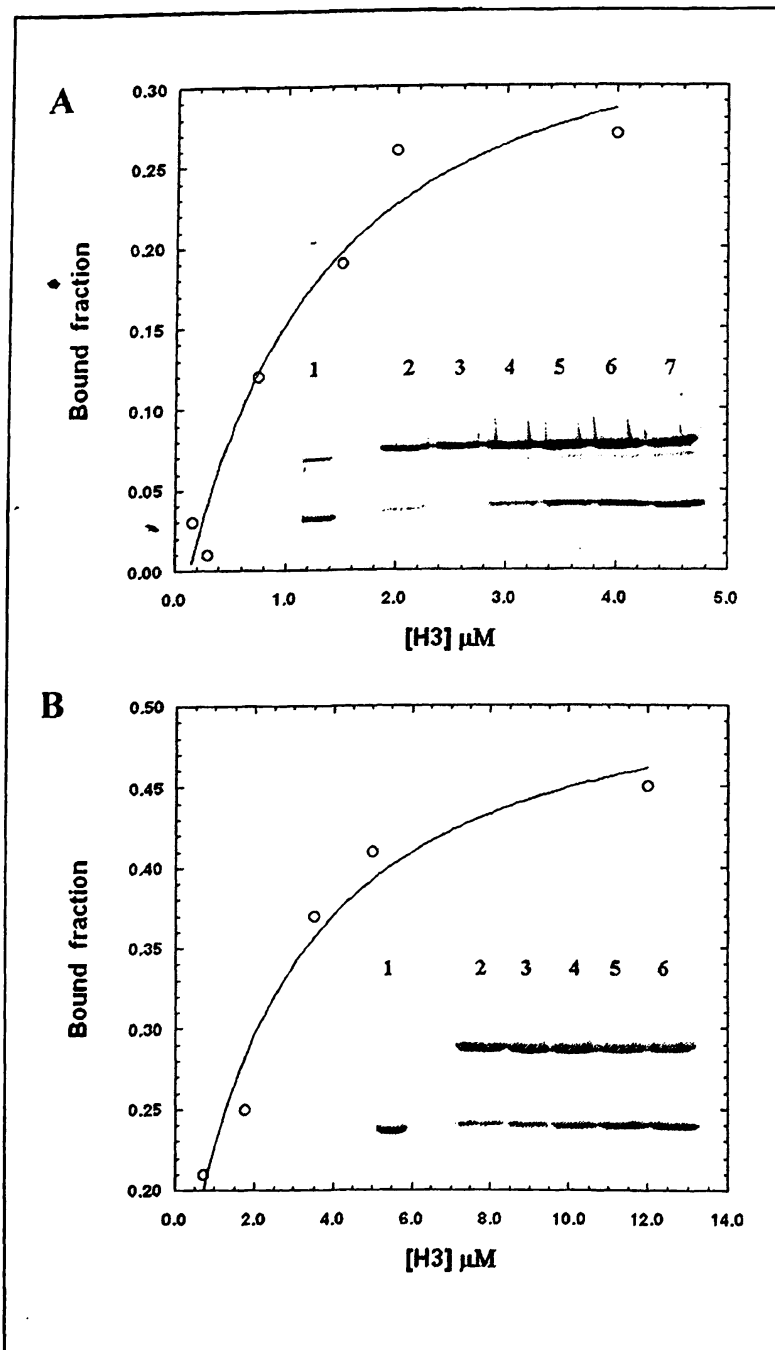
Στο παραπάνω πείραμα ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση του Tudor domain με την ιστόνη H3, η οποία όντας φυσική περιείχε ένα πλήθος μορίων που έφεραν πληθώρα τροποποιήσεων σε διάφορα κατάλοιπα. Σε μία προσπάθεια να διερευνηθεί αν κάποια τροποποίηση και ειδικότερα η μεθυλίωση, παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση, επαναλήφθηκε το πείραμα χρησιμοποιώντας ανασυνδυσασμένη-εκφρασμένη σε βακτήρια ιστόνη H3. Το αποτέλεσμα έδειξε παρόμοια ικανότητα αναγνώρισης της ανασυνδυσασμένης H3 από το Tudor domain, κάτι που δείχνει ότι στην αλληλεπίδραση δεν συμμετέχει, τουλάχιστον με καθοριστικό τρόπο, κάποια τροποποίηση της ιστόνης (Εικ. 3.21).



*Εικόνα 3.21: Αλληλεπίδραση του Tudor domain με την ανασυνδυσασμένη ιστόνη H3, χρησιμοποιώντας δοκιμές συγκατακρήμνισης. 1. Δείγμα GST-Tudor ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης. 2. Δείγμα ανασυνδυσασμένης H3 που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. 3-4. Έκλουση από τη στήλη μετά από επώαση GST-Tudor και GST (control) με την ανασυνδυσασμένη H3 αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.*

### 3.5.3 Διερεύνηση της ειδικότητας της αλληλεπίδρασης μεταξύ Tudor domain και ιστόνης H3

Σε μία προσπάθεια να εξεταστεί η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την ιστόνη H3, πραγματοποιήθηκε ημι-ποσοτική δοκιμή συγκατακρήμνισης (semi-quantitative pull-down) χρησιμοποιώντας τόσο τη φυσική, όσο και την ανασυνδυσασμένη H3. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν ακινητοποιώντας σταθερές ποσότητες GST-Tudor πρωτεϊνών σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης και ακολούθως επώαζοντας με σταθερές ποσότητες φυσικής και ανασυνδυσασμένης H3 σε διαφορετικούς όγκους αντίδρασης. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και για τους δύο τύπους ιστονών και έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση είναι ειδική, καθώς η αντίδραση φτάνει σε κορεσμό (Εικ. 3.22).



**Εικόνα 3.22:** Ημι-ποσοτική δοκιμή συγκατακρήμνισης (*semi-quantitative GST pull-down*). Σταθερές ποσότητες GST-Tudor πολυπεπτιδίων ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης και επωάστηκαν με σταθερές ποσότητες φυσικής και ανασυνδυασμένης ιστόνης H3 (το 20% των ποσοτήτων των δύο τύπων ιστονών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις φαίνονται στις διαδρομές 1 στα δύο ένθετα gels).

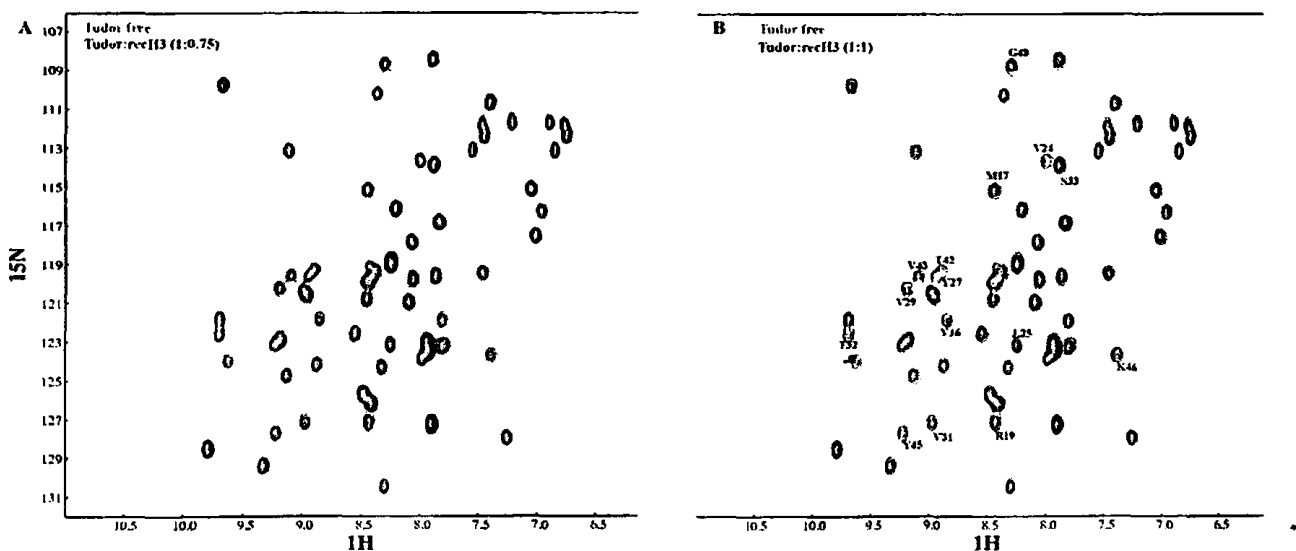
Διαγράμματα ροής του τμήματος της φυσικής (A) και της ανασυνδυασμένης (B) H3 που συνδέθηκε στη σήλη σε σχέση με τις συγκεντρώσεις τους. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Οι όγκοι των αντιδράσεων κυμάνθηκαν από 300μl έως 15ml (διαδρομές 2-7 στα ένθετα gels). Η ποσοτικοποίηση επιτεύχθηκε μετρώντας τις εντάσεις των ζωνών της H3 σε κάθε διαδρομή (διαφορετική συγκέντρωση) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Quantity-1 (Biorad).

### 3.5.4 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain και της H3 με φασματοσκοπία NMR – Χάρτογράφηση της περιοχής σύνδεσης

Στη συνέχεια επιστρατεύτηκε πάλι η φασματοσκοπία NMR, με σκοπό να επιβεβαιώσει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης των δύο πολυπεπτιδίων, αλλά και να παράσχει πληροφορίες για την περιοχή του Tudor domain που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση. Έτσι, σε διάλυμα Tudor σημασμένου με  $^{15}\text{N}$ , προστέθηκαν αυξανόμενες ποσότητες H3 και οι αντιδράσεις παρακολούθηθηκαν καταγράφοντας το  $^{15}\text{N}$ -HSQC φάσμα. Το πείραμα

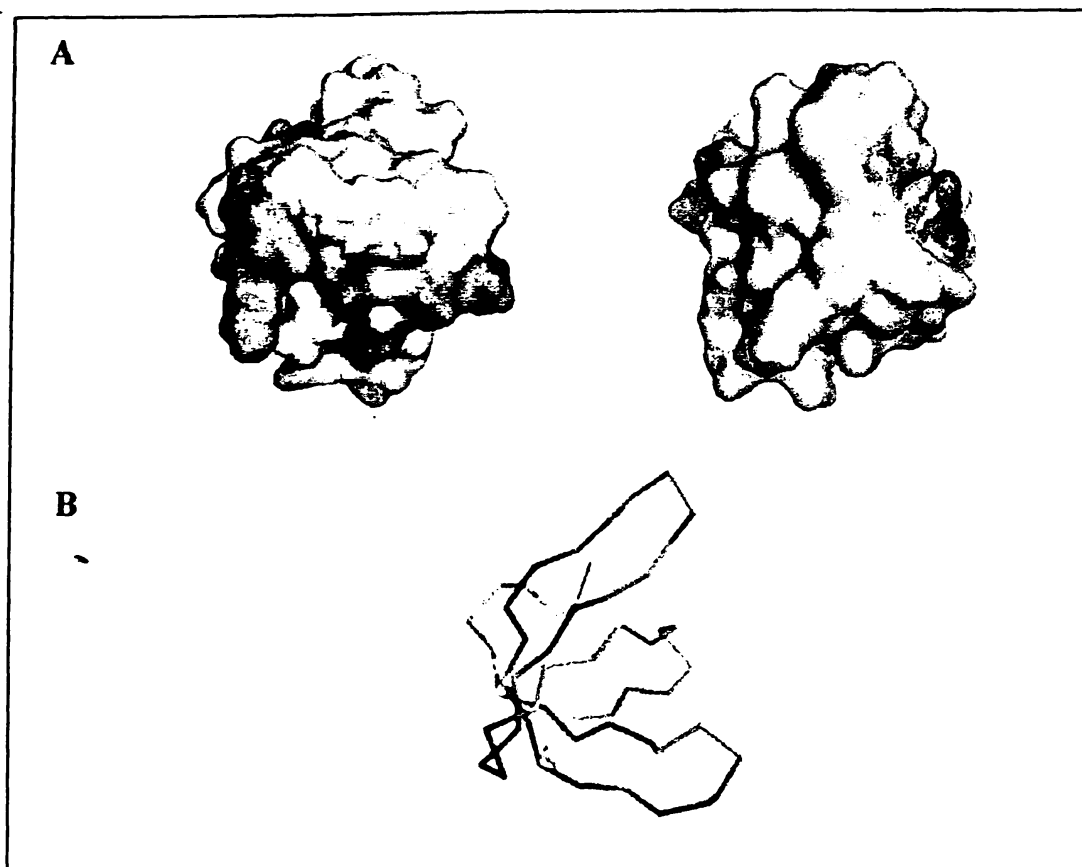


επαναλήφθηκε δύο φορές, τόσο με φυσική όσο και με ανασυνδυασμένη H3. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.23*, επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, καθώς η προσθήκη της H3 είχε ως συνέπεια τη σταδιακή μείωση της έντασης των περισσοτέρων κορυφών του φάσματος. Η παρατηρούμενη μείωση της έντασης των κορυφών υποδηλώνει το σχηματισμό ενός μεγαλύτερου μοριακού βάρους συμπλόκου, το οποίο καθίσταται πλέον πιο βραδυκίνητο. Συνέπειες αυτού είναι η αύξηση του χρόνου μαγνητικής αποδιέγερσης  $T_2$  και αντίστοιχα η ταχύτερη απόσβεση του σήματος NMR. Στην *Εικόνα 3.23B* αναγράφονται τα αμινοξέα των οποίων οι εντάσεις των αντίστοιχων κορυφών μειώθηκαν ισχυρότερα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα αμινοξέα επηρεάζονται άμεσα από την παρουσία και τη πρόσδεση της H3.



**Εικόνα 3.23:** Επίθεση  $^{15}\text{N}$ -HSQC φασμάτων του Tudor domain κατά την τιτλοδότηση με ανασυνδυασμένη H3. Με μπλε το φάσμα του ελεύθερου Tudor domain και με κόκκινο το αντίστοιχο φάσμα μετά από προσθήκη H3 σε μοριακή αναλογία 1:0.75 (A) και 1:1 (B) αντίστοιχα. Στην *Εικόνα B* αναγράφονται τα αμινοξέα των οποίων οι κορυφές υπέστησαν τη μεγαλύτερη μείωση έντασης.

Γνωρίζοντας πλέον την τρισδιάστατη δομή του Tudor domain, ήταν δυνατή η χαρτογράφηση της περιοχής σύνδεσης με την H3. Παρατηρώντας λοιπόν τις θέσεις των εν λόγω αμινοξέων στη δομή, φαίνεται καταρχήν ότι γειτνιάζουν και καλύπτουν μία εκτεταμένη περιοχή, η οποία βρίσκεται στη μία πλευρά του μορίου (*Εικ. 3.24 A*). Χαρακτηριστικό επίσης είναι ότι τα συγκεκριμένα αμινοξέα βρίσκονται και στις δύο β-πτυχωτές επιφάνειες της δομής (*Εικ. 3.24 B*).



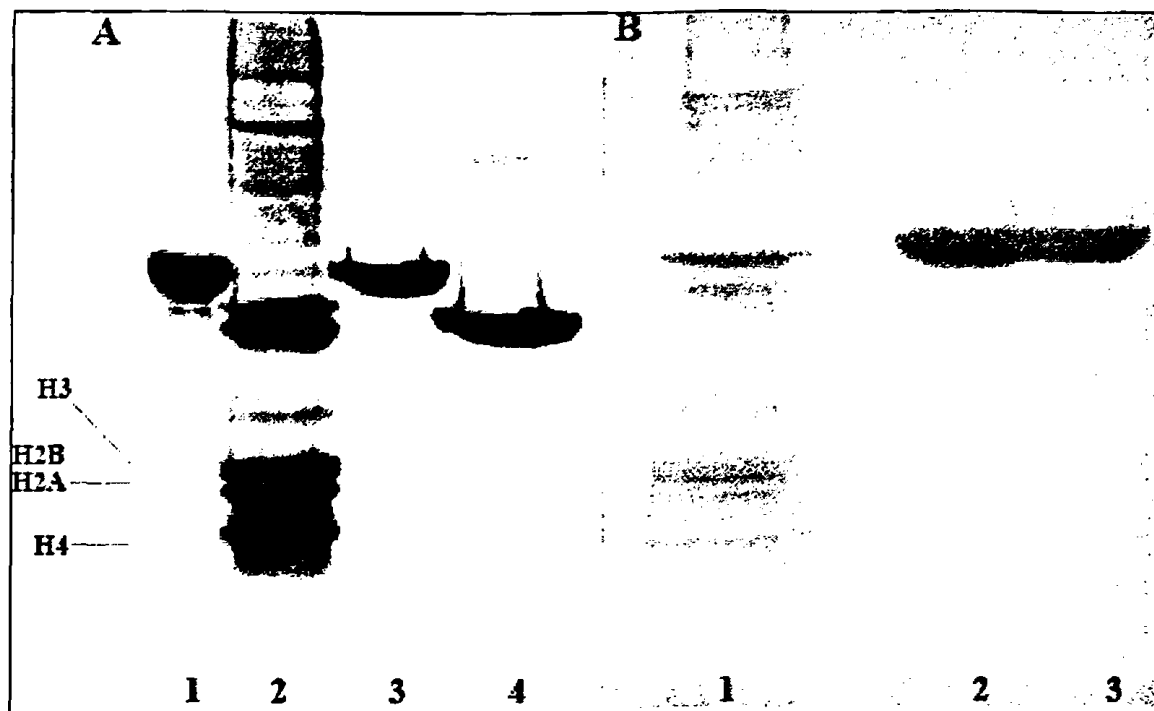
**Εικόνα 3.24:** *A.* Αναπαράσταση της επιφάνειας του Tudor domain σε δύο προσανατολισμούς, οι οποίοι προκύπτουν μετά από περιστροφή κατά  $180^\circ$  ως προς τον οριζόντιο άξονα. *B.* Αναπαράσταση της δομής του Tudor domain όπου φαίνεται το ίχνος του πεπτιδικού κορμού.

Με μωβ φαίνονται οι επιφάνειες που καλύπτουν τα αμινοξέα (*A*) και οι θέσεις τους στη πεπτιδική αλυσίδα (*B*), των οποίων οι εντάσεις των κορυφών στο φάσμα  $^{15}\text{N}$ -HSQC μειώθηκαν ισχυρότερα μετά την τιτλοδότηση με την H3.

### 3.5.5 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την H3 στο πλαίσιο του νουκλεοσώματος

Έχοντας πλέον χαρακτηρίσει την αλληλεπίδραση του Tudor domain του LBR με την H3, προχωρήσαμε στη διερεύνηση αυτής της αλληλεπίδρασης στο πλαίσιο του νουκλεοσώματος, το οποίο αποτελεί το περιβάλλον στο οποίο η H3 βρίσκεται το μεγαλύτερο διάστημα. Για αυτό το λόγο παρασκευάστηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα που προερχόταν από ερυθροκύτταρα πτηνών, τα οποία περιείχαν διαφόρων τύπων νουκλεοσώματα. Συγκεκριμένα, πέψη των πυρήνων με MNase και συλλογή του υπερκειμένου συνετέλεσε στην απομόνωση ενός ολικού πυρηνικού εκχυλίσματος, ενώ εκχύλιση του ιζήματος πυρηνικών φακέλων της παράπρω πέψης και συλλογή του διαλυτού τμήματος, οδήγησε στην απομόνωση νουκλεοσωμάτων που ανήκουν κυρίως σε ετεροχρωματινικές περιοχές. Δοκιμές συγκατακρήμνισης με τα παραπάνω εκχυλίσματα, σε ιοντική ισχύ 300mM NaCl,

χρησιμοποιώντας ως δόλωμα το GST-Tudor πολυπεπίδιο, έδειξαν ότι το Tudor domain του LBR δεν αναγνωρίζει την H3 ( *Εικ 3.25*).

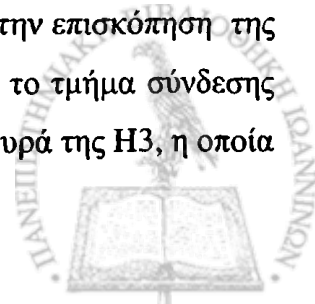


**Εικόνα 3.25:** Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την H3 στο πλαίσιο του νουκλεοσώματος. Δοκιμές συγκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας σαν πηγή νουκλεοσωμάτων ολικό πυρηνικό εκχύλισμα (A) και εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων (B). 1A, 2B. Δείγματα GST-Tudor ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης. 2A, 1B. 20% των δειγμάτων από τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές. 3A, 3B. Έκλουση από τη στήλη μετά από επώαση του GST-Tudor με τα αντίστοιχα πυρηνικά εκχυλίσματα. 4A. Έκλουση από τη στήλη μετά από επώαση GST (control) με ολικό πυρηνικό εκχύλισμα. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε και υπό συνθήκες υψηλής ιοντικής ισχύος (1M), στις οποίες οι ιστονικές ουρές αναμένεται να είναι πιο εκτεταμένες και άρα πιο εκτεθειμένες σε τυχόν αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα με αυτά που προέκυψαν από τα πειράματα συγκατακρήμνισης στα 300mM NaCl. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι στο πλαίσιο του οργανωμένου νουκλεοσώματος, οι δύο πρωτεΐνες (Tudor και H3) αδυνατούν να αλληλεπιδράσουν.

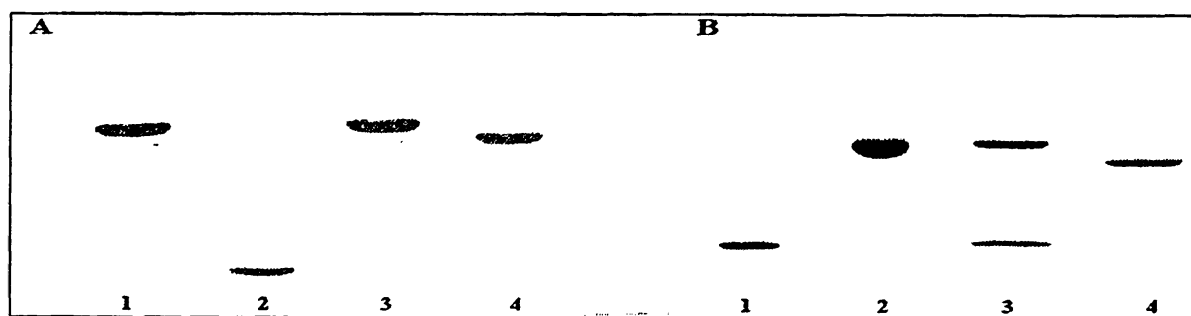
### 3.5.6 Αναγνώριση της περιοχής της H3 που προσδέεται στο Tudor domain

Προσπαθώντας να εξηγήσουμε την αδυναμία του Tudor domain να αναγνωρίσει την H3 στο περιβάλλον του νουκλεοσώματος, έγινε προσπάθεια να ταυτοποιηθεί το τμήμα της H3 που συμμετέχει στη σύνδεση. Η λογική υπόθεση που προέκυπτε από την επισκόπηση της τρισδιάστατης δομής του νουκλεοσώματος (Luger *et al*, 1997), ήταν ότι το τμήμα σύνδεσης της H3 με το Tudor domain πιθανόν να μη βρίσκεται στην αμινοτελική ουρά της H3, η οποία



προεκβάλλει από το πυρήνα του νουκλεοσώματος και γενικώς είναι προσβάσιμη. Άρα, αναμένεται η υπεύθυνη για τη σύνδεση περιοχή της H3 να βρίσκεται κάπου στο δομημένο-κεντρικό τμήμα της (histone fold). Για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν τα δύο τμήματα (tail, fold) της H3, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές συγκατακρήμνισης. Η ουρά της H3 (αμινοξέα 1-46) απομονώθηκε συνεκφρασμένη με τη GST πρωτεΐνη και χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα για καθαρό Tudor πολυπεπίδιο. Αντιθέτως, το κεντρικό τμήμα της H3 (αμινοξέα 27-135) εκφράστηκε και απομονώθηκε χωρίς προσθήκη επιπλέον αμινοξέων και χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές με δόλωμα τη GST-Tudor πρωτεΐνη.

Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.26*, επιβεβαιώθηκε η υπόθεση που υποδεικνύει το κεντρικό τμήμα της H3 ως υπεύθυνο για τη σύνδεση με το Tudor domain.



**Εικόνα 3.26:** Αναγνώριση της περιοχής σύνδεσης της H3 με το Tudor domain χρησιμοποιώντας δοκιμές συγκατακρήμνισης.

**A.** Ανικανότητα αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την ουρά της H3 (H3tail). 1. GST-H3tail πρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, 2. Καθαρό Tudor πολυπεπίδιο που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή, 3,4. Έκλουση από τη στήλη μετά από επώαση GST-H3tail και GST (control) με Tudor.

**B.** Αλληλεπίδραση του Tudor domain με το κεντρικό τμήμα (H3fold) της H3. 1. Δείγμα H3fold που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή, 2. GST-Tudor πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα, 3,4. Έκλουση από τη στήλη μετά από επώαση GST-Tudor και GST (control) με H3fold πολυπεπίδιο. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.

### 3:5.7 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του Tudor domain με την H3 στο πλαίσιο του τετραμερούς H3-H4

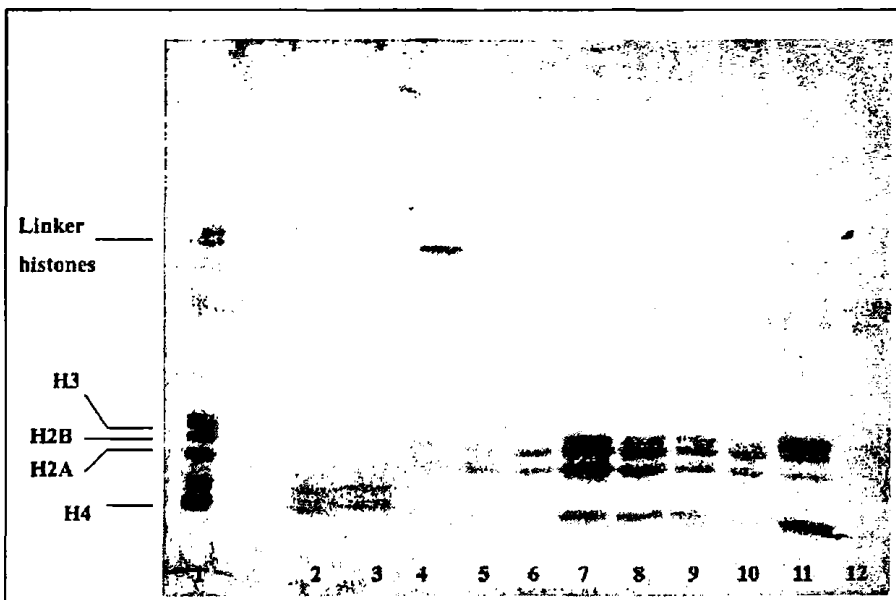
Ένα άλλο υπόστρωμα στο οποίο η H3 βρίσκεται σχεδόν αμέσως μετά τη βιοσύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα μέχρι την ενσωμάτωσή της στο νουκλεόσωμα, είναι το τετραμερές σύμπλοκο H3-H4, το οποίο αποτελείται από δύο μόρια H3 και δύο H4 αντίστοιχα. Το παραπάνω σύμπλοκο αποτελεί το φυσικό περιβάλλον της H3 εκτός νουκλεοσώματος και



παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η διερεύνηση της ικανότητας του Tudor domain να αναγνωρίζει την H3 στο συγκεκριμένο πλαίσιο.

Προς αυτή την κατεύθυνση απομονώθηκε τετραμερές H3-H4 με χρωματογραφία υδροξυ-απατίτη, χρησιμοποιώντας σαν πηγή χρωματίνης ολικό πυρηνικό εκχύλισμα που προήλθε μετά από πέψη πυρήνων πτηνών με MNase. Αρχικά, η χρωματίνη συνδέθηκε στον υδροξυ-απατίτη μέσω του DNA, και ακολούθως εκλούοντας με διαλύματα αυξανόμενης ιονικής ισχύος, επιτεύχθηκε η συλλογή κλάσμάτων εμπλουτισμένα σε τετραμερές H3-H4 (Εικ. 3.27).

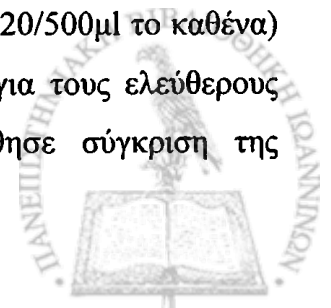
Τα κλάσματα που ήταν εμπλουτισμένα σε τετραμερές H3-H4 (διαδρομή 11, Εικ. 3.27) υπέστησαν διαπίδυση ώστε να προσαρμοστεί η συγκέντρωση NaCl σε επιθυμητά επίπεδα και ακολούθως χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές συγκατακρήμνισης με δόλωμα τη GST-Tudor πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.28, το Tudor domain συνδέθηκε στην H3 του τετραμερούς.



**Εικόνα 3.27:** Απομόνωση τετραμερούς H3-H4 με χρωματογραφία υδροξυ-απατίτη.

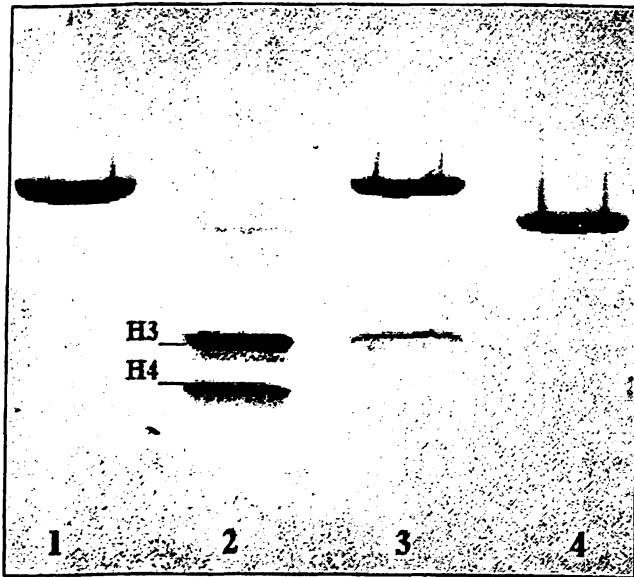
1. Δείγμα ολικού πυρηνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή χρωματίνης, 2. Έκλουσμα με 0.25M NaCl, 3. Έκλουσμα με 0.5M NaCl, 4. Έκλουσμα με 0.75M NaCl, 5-9. Διαδοχικά κλάσματα μετά από έκλουση με 1M NaCl, 10-12. Διαδοχικά κλάσματα μετά από έκλουση με 2M NaCl.

Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω το παραπάνω εύρημα, το οποίο υποδηλώνει μεν μία ικανότητα του Tudor domain να αλληλεπιδρά με την H3 του τετραμερούς, αλλά όχι με όλο το τετραμερές σύμπλοκο, προχωρήσαμε σε πειράματα συγκαταβύθισης σε βαθμίδωση σουκρόζης. Συγκεκριμένα, τετραμερές H3-H4 απομονωμένο με χρωματογραφία υδροξυ-απατίτη, επώαστηκε με καθαρά GST-Tudor ή Tudor πολυπεπίδια. Τα παραπάνω μίγματα αναλύθηκαν σε 5-20% βαθμίδωση σουκρόζης, συλλέχθηκαν κλάσματα (20/500μl το καθένα) και αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τους ελεύθερους παράγοντες (τετραμερές H3-H4, GST-Tudor, Tudor) και ακολούθησε σύγκριση της





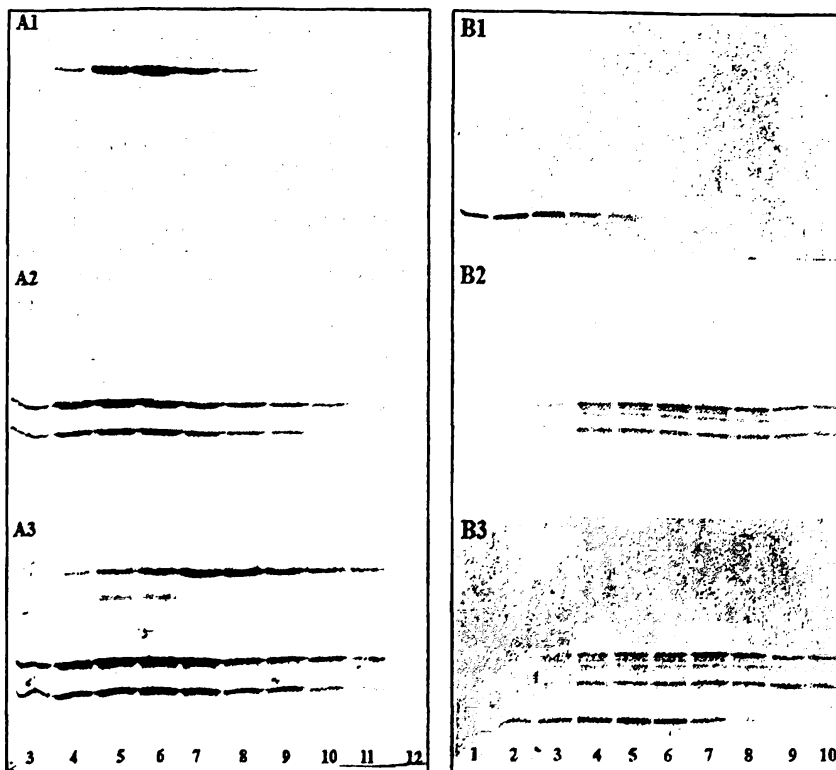
κατανομής των διαφόρων παραγόντων στη βαθμίδωση όταν είναι ελεύθερα και όταν βρίσκονται σε μίγμα.



**Εικόνα 3.28:** Σύνδεση του Tudor domain με την H3 του τετραμερούς H3-H4 χρησιμοποιώντας δοκιμές συγκατακρήμνισης.

1. GST-Tudor πρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, 2. Δείγμα τετραμερούς H3-H4 που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές, 3,4. Εκλούση από τη στήλη μετά από επώαση GST-Tudor και GST (control) με τετραμερές H3-H4.

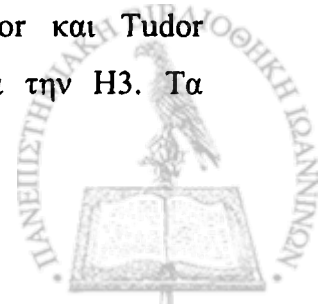
Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.



**Εικόνα 3.29:** Σύνδεση του Tudor domain με την H3 του τετραμερούς H3-H4 χρησιμοποιώντας πειράματα συγκαταβύθισης σε βαθμίδωση σουκρόζης.

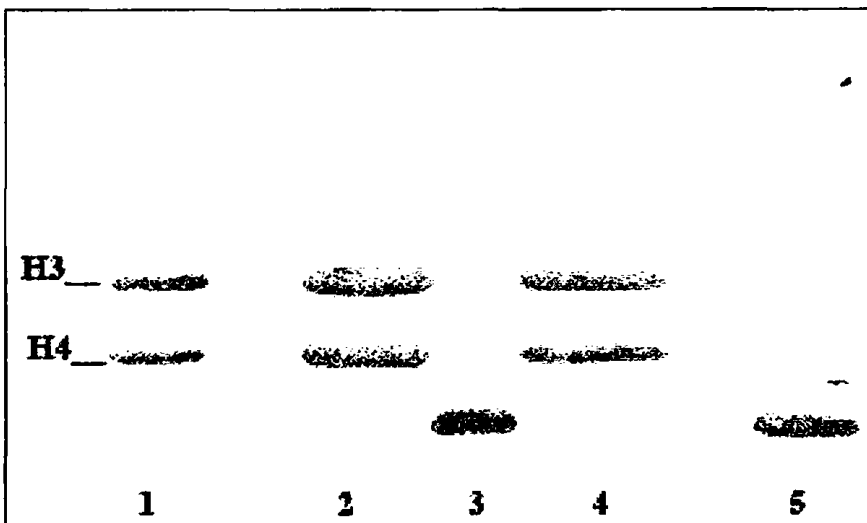
A1,A2,A3. GST-Tudor, τετραμερές H3-H4 και μίγμα αυτών αντίστοιχα, μετά από ανάλυση σε 5-20% βαθμίδωση σουκρόζης. 3-12. Οι διαδρομές αντιστοιχούν στα αντίστοιχα κλάσματα της βαθμίδωσης. B1,B2,B3. Tudor, τετραμερές H3-H4 και μίγμα αυτών αντίστοιχα, μετά από ανάλυση σε 5-20% βαθμίδωση σουκρόζης. 1-10. Οι διαδρομές αντιστοιχούν στα αντίστοιχα κλάσματα της βαθμίδωσης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.29, παρατηρείται μία μετατόπιση της κατανομής των GST-Tudor και Tudor πολυπεπτιδίων, όταν αυτά βρίσκονται σε μίγμα με το τετραμερές H3-H4, προς τα πυκνότερα κλάσματα της βαθμίδωσης. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει το σχηματισμό ενός μεγαλύτερου μοριακού βάρους συμπλόκου μεταξύ του GST-Tudor και Tudor πολυπεπτιδίου με κάποιο τμήμα του ιστονικού τετραμερούς, πιθανότατα την H3. Τα



πειράματα αυτά έρχονται να επιβεβαιώσουν τα πειράματα συγκατακρήμνισης, δείχνοντας ότι το Tudor domain μπορεί να συνδεθεί με την H3 του τετραμερούς H3-H4, άλλα όχι με όλο το τετραμερές σύμπλοκο, καθώς αυτό δεν φαίνεται να μετακινείται στη βαθμίδωση σουκρόζης.

Το ερώτημα που γεννάται λοιπόν, είναι αν το Tudor domain έχει την ικανότητα να διασπά το ιστονικό τετραμερές, αποσπώντας την H3 από αυτό ή η H3 που συνδέεται με το Tudor domain έχει ήδη αποσυνδεθεί από το τετραμερές σύμπλοκο. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα πραγματοποιήθηκε πείραμα συναγωνισμού, όπου ιστονικό τετραμερές ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια ιόντων νικελίου επώαστηκε με καθαρό Tudor πολυπεπίδιο. Το συγκεκριμένο τετραμερές παρασκευάστηκε με ανασύσταση από ανασυνδυασμένες ιστόνες H3 και H4 (Luger et al, 1997b) και η ακινητοποίηση στα σφαιρίδια πραγματοποιήθηκε μέσω της H3 η οποία συνεκφράστηκε με εξαΐστιδινική ουρά. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.30*, το Tudor domain δεν συναγωνίζεται την παρουσία της H4 στο τετραμερές, κάτι που υποδηλώνει ότι η H3 που συνδέεται με αυτό στα πειράματα συγκατακρήμνισης και συγκαταβύθισης σε βαθμίδωση σουκρόζης αποτελεί τμήμα ελεύθερης πρωτεΐνης που έχει ήδη αποσυνδεθεί από το τετραμερές.



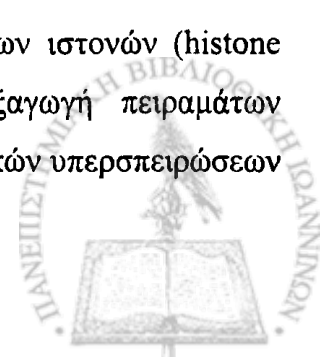
*Εικόνα 3.30: Το Tudor domain δεν συναγωνίζεται την H4 στο τετραμερές H3-H4.*

1. Δείγμα τετραμερούς H3-H4 ανασυσταμένο από ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, 2. Δείγμα τετραμερούς H3-H4 ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια ιόντων νικελίου, 3. Δείγμα καθαρού Tudor πολυπεπίδιου που επώαστηκε με το ιστονικό τετραμερές, 4. Έκλυση από τη στήλη μετά από επώαση του τετραμερούς με το Tudor domain, 5. Δείγμα του διαλύματος του Tudor domain που πέρασε από τη

στήλη (flowthrough). Η αντίδραση έλαβε χώρα για 15h στους 4°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM β-ME.

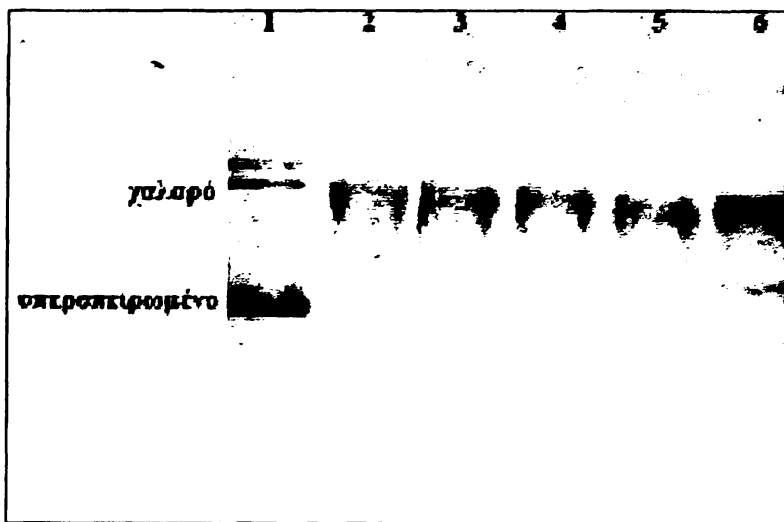
### **3.6 Διερεύνηση της ικανότητας του Tudor domain να επάγει υπερσπειρώσεις στο DNA**

Η κοινή ιδιότητα του Tudor domain με μοριακούς συνοδούς των ιστονών (histone chaperones) να αλληλεπιδρά με ιστόνες, μας οδήγησε στη διεξαγωγή πειραμάτων υπερσπειρώσεως του DNA, δεδομένου ότι η ικανότητα επαγωγής αρνητικών υπερσπειρώσεων



σε προηγουμένως χαλαρό DNA παρουσία ιστονών και η ικανότητα σύνδεσης σε ιστόνες, είναι οι πιο χαρακτηριστικές ιδιότητες των ιστονικών chaperones.

Έτσι, πλασμιδιακό DNA επώαστηκε αρχικά με τοποϊσομεράση I, με αποτέλεσμα να μετατραπεί η υπερσπειρωμένη του μορφή σε χαλαρή. Στη συνέχεια επώαστηκε με αυξανόμενες ποσότητες Tudor domain, παρουσία ιστονικού τετραμερούς. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.31*, η παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων Tudor domain στο μίγμα της αντίδρασης, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή αυξανόμενων ποσών υπερσπειρωμένης μορφής του πλασμιδιακού DNA.



*Εικόνα 3.31: Το Tudor domain επάγει υπερσπειρώσεις σε χαλαρού τύπου DNA παρουσία ιστονικού τετραμερούς.*

*1. 0.5μg pCMV πλασμιδίου, 2. Το ίδιο πλασμίδιο μετά από επώαση με TOPO I, 3. Προσθήκη 1μg τετραμερούς H3-H4, 4-6. Περαιτέρω προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων Tudor domain (1,3,6 μg αντίστοιχα).*

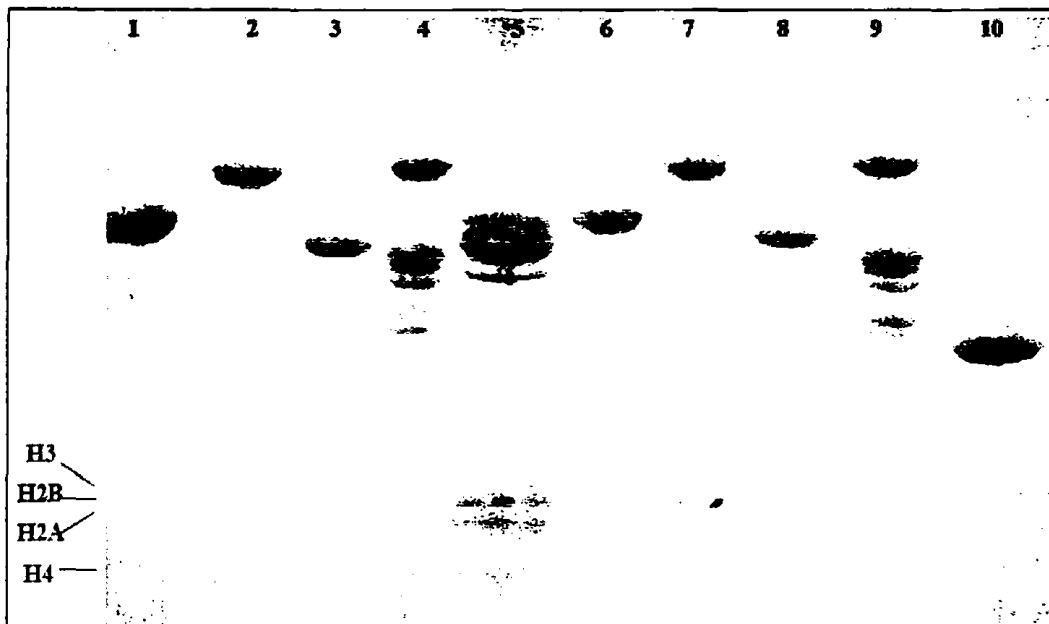
### 3.7 Διερεύνηση του ρόλου των άλλων περιοχών του αμινοτελικού τμήματος του LBR

#### 3.7.1 Σύνδεση του LBR με τη χρωματίνη

Όπως φάνηκε παραπάνω το Tudor domain αλληλεπιδρά με την H3, αλλά όχι όταν αυτή βρίσκεται στο πλαίσιο του νουκλεοσώματος. Παρόλα αυτά, η ικανότητα ολόκληρου του αμινοτελικού τμήματος του LBR να αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη είναι πολύ καλά εξακριβωμένη καθώς έχειδειχθεί με ποικίλους τρόπους. Σε μία από αυτές τις προσεγγίσεις είχαν χρησιμοποιηθεί εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων, από τα οποία το αμινοτελικό τμήμα του LBR είχε την ικανότητα να συγκρατεί ολόκληρα νουκλεοσώματα σε δοκιμές συγκατακρήμνισης (*Makatsori et al, 2004*). Ακολουθήσαμε την ίδια προσέγγιση, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά ως δολώματα στις δοκιμές συγκατακρήμνισης, τα διακριτά τμήματα της αμινοτελικής περιοχής του LBR. Εκτός λοιπόν από το Tudor domain που ήδη δοκιμάστηκε, χρησιμοποιήθηκαν η RS περιοχή (αμινοξέα 63-100) και η δεύτερη αυτόνομη

περιοχή (SG, αμινοξέα 101-208). Το πυρηνικό εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε, προήλθε από πέψη πυρήνων ερυθροκυττάρων πτηνών με DNase I, και εκχύλιση των παραγομένων πυρηνικών φακέλων με διάλυμα ιονικής ισχύος 300mM (NaCl). Οι δοκιμές έδειξαν ότι στη σύνδεση του LBR με τη χρωματίνη βασικό ρόλο διαδραματίζει η περιοχή RS, που συνδέεται σε ακέραια νουκλεοσώματα ( *Εικ. 3.32*).

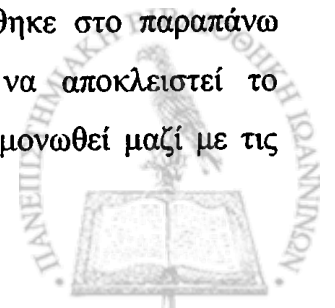
Καθώς λοιπόν αναδεικνύεται ο ρόλος της RS περιοχής στη σύνδεση του LBR με τη χρωματίνη, εγείρονται ερωτήματα που σχετίζονται με το ποια συστατικά της χρωματίνης συμμετέχουν σε αυτή τη σύνδεση.



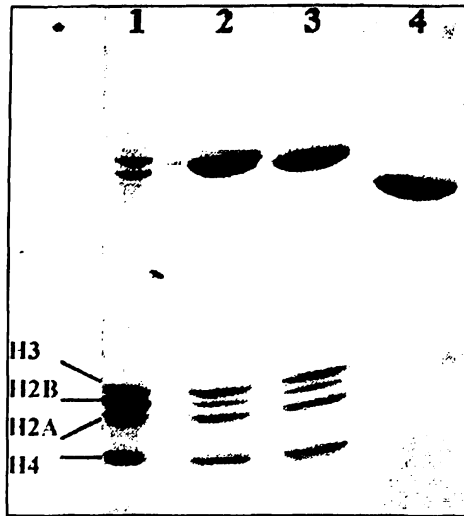
**Εικόνα 3.32:** Η περιοχή RS του αμινοτελικού τμήματος του LBR είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με τη χρωματίνη.

1,2,3,4. GST-Tudor, GST-TDRS, GST-RS, GST-SG πρωτεΐνες ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, 5. Δείγμα 20% του εκχυλίσματος πυρηνικών φακέλων που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές, 6,7,8,9,10. Έκλυση από τη στήλη μετά από επώαση GST-Tudor, GST-TudorRS, GST-RS, GST-SG, GST (control) με το εκχύλισμα. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.

Αρχικά, ελέγχθηκαν τα κύρια πρωτεϊνικά συστατικά της χρωματίνης, οι ιστόνες. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.33*, το GST-RS πολυπεπτίδιο μπορεί και συγκαταβυθίζει ένα μίγμα φυσικών ιστονών. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε αν το DNA συμμετέχει στην αλληλεπίδραση, καθώς είχε δειχθεί στο παρελθόν ότι πολλές πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης (ανάμεσά τους και ο LBR) συνδέονται με τη χρωματίνη μέσω του DNA (*Ulbert et al, 2006*). Παρότι το μίγμα των φυσικών ιστονών που χρησιμοποιήθηκε στο παραπάνω πείραμα, αποτελείται από καθαρές πρωτεΐνες, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να υπήρχε κάποιο τμήμα DNA, το οποίο να είχε συναπομονωθεί μαζί με τις



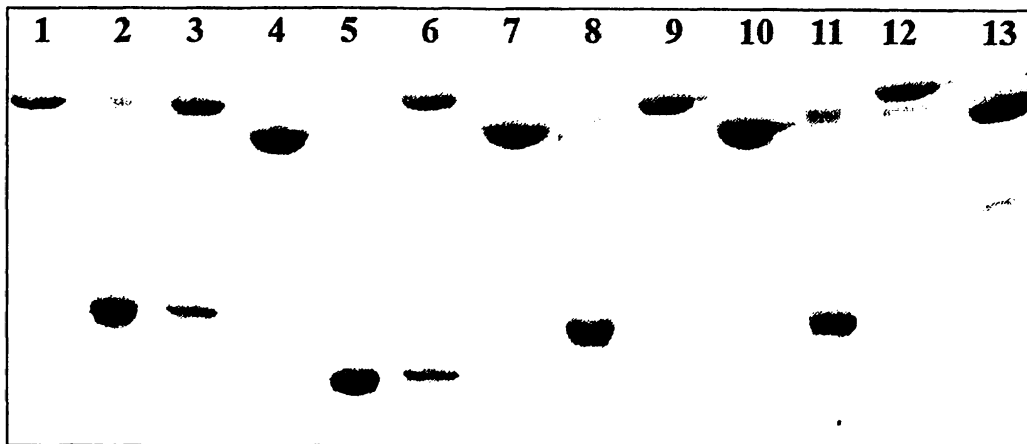
ιστόνες, λόγω της συγγενείας του με αυτές. Έτσι, επαναλήφθηκε η δοκιμή συγκατακρήμνισης, με τη διαφορά ότι στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε DNase I σε συγκέντρωση 0.5 mg/ml. Η παρουσία της όμως δεν επηρέασε τη σύνδεση της RS με τις ιστόνες, κάτι που δείχνει ότι η RS περιοχή αλληλεπιδρά απ'ευθείας με τις ιστόνες ( *Εικ. 3.33, διαδρομή 3*).



**Εικόνα 3.33:** Αλληλεπίδραση της RS περιοχής με καθαρές ιστόνες.

1. Δείγμα φυσικών ιστονών από θύμο αδένος μόσχου που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις, 2,3. Έκλυση της στήλης μετά από επώαση GST-RS πολυπεπτιδίου με το μίγμα των ιστονών, απουσία και παρουσία DNase I, αντίστοιχα, 4. Έκλυση της στήλης μετά από επώαση GST (control) με το μίγμα των ιστονών.

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.



**Εικόνα 3.34:** Η περιοχή RS του αμινοτελικού τμήματος του LBR αλληλεπιδρά με τις ιστόνες H3 και H4 και όχι με τις H2B και H2A.

1. GST-RS πολυπεπτιδίο ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, 2,5,8,11. Δείγματα

των φυσικών ιστονών (H3, H4, H2A, H2B αντίστοιχα) από θύμο αδένος μόσχου που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές, 3,6,9,12. Έκλυση από τη στήλη μετά από επώαση GST-RS πολυπεπτιδίου με τις H3, H4, H2A και H2B αντίστοιχα, 4,7,10,13. Τα αντίστοιχα control πειράματα, χρησιμοποιώντας GST πρωτεΐνη.

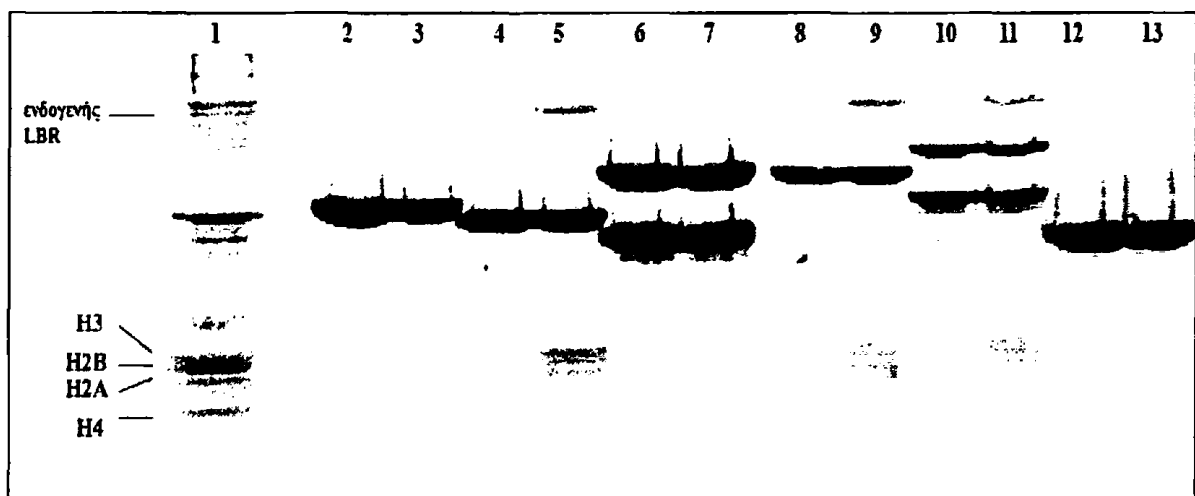
Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 10% sucrose, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF.

Επειδή οι ιστόνες έχουν τη τάση να συνδέονται μεταξύ τους και να σχηματίζουν σύμπλοκα, με το παραπάνω πείραμα δεν είναι δυνατή η αναγνώριση της ιστόνης που συνδέεται στην RS περιοχή. Για να γίνει κάτι τέτοιο, επαναλήφθηκε το ίδιο πείραμα, αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας απομονωμένες φυσικές ιστόνες. Στην *Εικόνα 3.34* φαίνεται ότι υπεύθυνες για τη σύνδεση του νουκλεοσώματος με την RS περιοχή, είναι οι ιστόνες H3 και H4.



### 3.7.2 Η RS περιοχή ευθύνεται για τον ολιγομερισμό του LBR

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, σημαντικό χαρακτηριστικό του LBR είναι η ιδιότητά του να ολιγομερίζεται, χαρακτηριστικό που πιθανώς να παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση του. Προσπαθώντας να αναγνωρίσουμε τη περιοχή που ευθύνεται για αυτή την ιδιότητα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συγκατακρήμνισης με τα διάφορα τμήματα του αμινοτελικού άκρου του LBR (Tudor, RS, SG) ως δολώματα, τα οποία δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να καταβυθίζουν τον φυσικό LBR. Ως πηγή του τελευταίου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων που προήλθε από πέψη πυρήνων πτηνών με MNase. Το διάλυμα της εκχύλισης περιείχε απορρυπαντικό (Triton), ώστε να εκχυλιστούν και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου, ανάμεσά τους και ο LBR. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.35*, η περιοχή RS είναι το ελάχιστο τμήμα του αμινοτελικού τμήματος του LBR, που εκτός από νουκλεοσώματα, καταβυθίζει και την ενδογενή πρωτεΐνη.



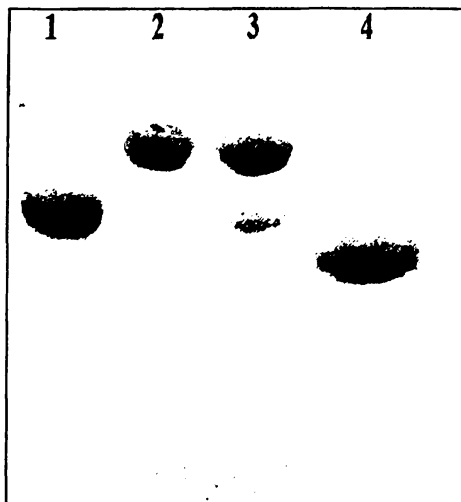
*Εικόνα 3.35:* Η περιοχή RS είναι το μικρότερο κομμάτι του αμινοτελικού τμήματος του LBR που καταβυθίζει τόσο νουκλεοσώματα, όσο και τον ενδογενή LBR.

1. Δείγμα 20% του εκχυλίσματος πυρηνικών φακέλων που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές, 2,4,6,8,10,12. GST-Tudor, GST-RS, GST-SG, GST-TudorRS, GST-RSSG και GST πολυπεπτιδία, ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, 3,5,7,9,11,13. Εκλούσματα από τη στήλη μετά από επώαση GST-Tudor, GST-RS, GST-SG, GST-TudorRS, GST-RSSG και GST (control) πολυπεπτιδίων με το εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων.

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5, 300mM NaCl, 1% Triton, 10% sucrose, 1mM EGTΑ, 1mM DTT, 1mM PMSF.

Παρόλα αυτά, το παραπάνω πείραμα είναι απλά ενδεικτικό όσον αφορά το ρόλο της RS περιοχής στον ολιγομερισμό του LBR. Αυτό συμβαίνει διότι η αλληλεπίδραση που ανιχνεύεται μεταξύ της ενδογενούς πρωτεΐνης και των πολυπεπτιδίων που περιέχουν την RS περιοχή, θα μπορούσε να είναι έμμεση, καθώς δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο ο ενδογενής LBR να είναι ήδη συνδεδεμένος με τα νουκλεοσώματα που καταβυθίζονται επίσης από την

RS περιοχή. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε μία άμεση δοκιμή συγκατακρήμνισης, στην οποία GST-RS πολυπεπίδιο επώαστηκε με καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Η τελευταία αντιστοιχούσε στο αμινοτελικό άκρο του ανθρώπινου LBR, το οποίο εκφράστηκε και απομονώθηκε με χρήση της ουράς δέκα ιστιδινών που περιείχε. Η Εικόνα 3.36 δείχνει ότι τα δύο πολυπεπίδια μπορούν και αλληλεπιδρούν, κάτι που αποδεικνύει την ικανότητα της RS περιοχής να συνδέεται σε ολόκληρο το αμινοτελικό τμήμα του LBR, γεγονός που τη καθιστά υπεύθυνη για τον ολιγομερισμό του μορίου.



*Εικόνα 3.36: Η RS περιοχή αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο του LBR.*

*1. Δείγμα αμινοτελικού άκρου ανθρώπινου LBR που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση, 2. GST-RS πολυπεπίδιο ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, 3,4. Εκλούσματα της στήλης μετά από επώαση GST-RS και GST (control) πολυπεπιδίων με το αμινοτελικό άκρο του LBR.*

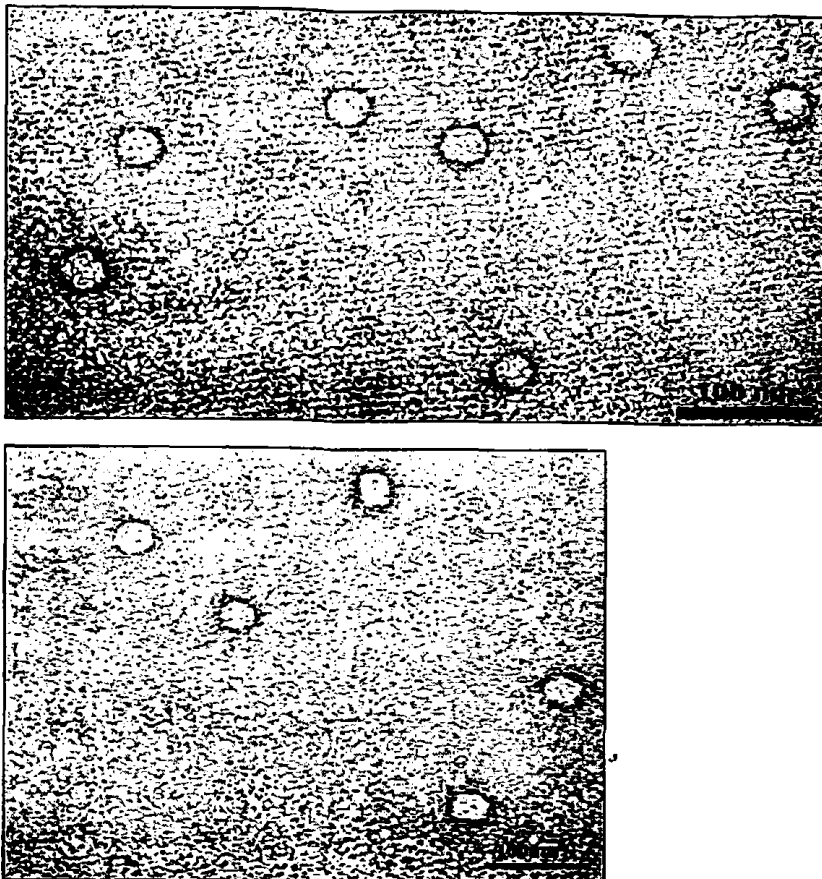
*Η αντίδραση έλαβε χώρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris pH7.5 200 mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF.*

### **3.8 Απεικόνιση των ολιγομερών σωματιδίων του LBR και εκτίμηση του βαθμού ολιγομερισμού του**

Στη προηγούμενη παράγραφο αναδείχτηκε ο ρόλος της RS περιοχής στον ολιγομερισμό του LBR. Λόγω του χαρακτηριστικού της πρωτεΐνης να συγκεντρώνεται σε μεγάλες νησίδες στη περιφέρεια του πυρηνικού φακέλου (*Makatsori et al, 2004*), αναμένεται να σχηματίζει σχετικά μεγάλα ολιγομερή σωματίδια. Στόχος μας ήταν να αναπαρασταθούν αυτά τα σωματίδια, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξή τους και στη συνέχεια να εκτιμηθεί ο βαθμός ολιγομερισμού τους.

Για την αναπαράσταση των σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία και συγκεκριμένα η τεχνική της αρνητικής χρώσης (negative staining) σε δείγμα αμινοτελικού τμήματος ανθρώπινου LBR. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι η ίδια που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα συγκατακρήμνισης με την RS περιοχή (*Εικ. 3.36, διαδρομή 1*). Μετά την κατεργασία του δείγματος με διάλυμα οξικού ουρανίου και εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη σωματιδίων που φαίνονται στην *Εικόνα*

3.37. Δεδομένου ότι το δείγμα περιείχε μόνο καθαρή πρωτεΐνη, καθίσταται σαφές ότι τα ομοιόμορφα σωματίδια που παρατηρούνται, προέρχονται από το αμινοτελικό άκρο του LBR και το μεγάλο σχετικά μέγεθός τους (~ 30nm), επιβεβαιώνει την υπόθεση του σχηματισμού ευμεγεθών ολιγομερών συμπλόκων.

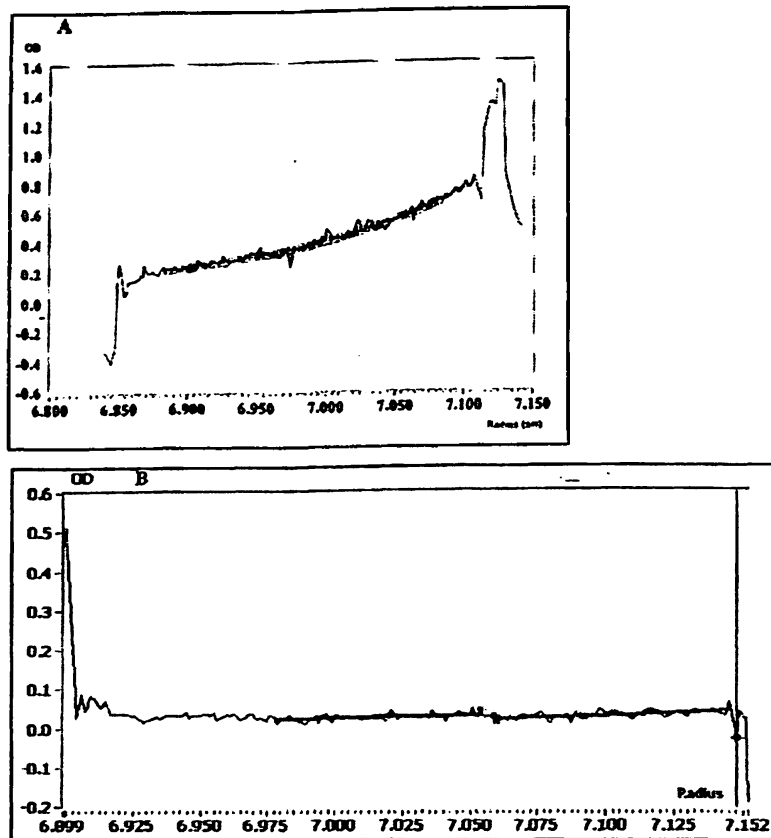


*Εικόνα 3.37: Χαρακτηριστικές εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100X, σε δείγμα αμινοτελικής περιοχής του LBR, μετά από χρώση με διάλυμα 2% οξικού ουρανίου, pH 4.5. Το δείγμα βρισκόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM HEPES-KOH pH 7.5, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl, 10% sucrose, 0.1mM EGTA, 1mM DTT.*

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί ο αριθμός των μορίων πρωτεΐνης που συνδέονται και σχηματίζουν τα ολιγομερή σωματίδια. Η αναλυτική υπερφυγοκέντρηση χρησιμοποιήθηκε για να απαντήσει αυτό το ερώτημα. Συγκεκριμένα, έγινε μέτρηση σε κατάσταση ισορροπίας σε δείγμα του αμινοτελικού τμήματος του LBR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης βρισκόταν σε μονομερή μορφή. Παρόλα αυτά, ανιχνεύθηκαν και πληθυσμοί, των οποίων τα μοριακά βάρη αντιστοιχούσαν σε ολιγομερή σωματίδια αποτελούμενα από 12 και 24 μόρια (Εικ. 3.38). Η δυσκολία ανίχνευσής τους σχετιζόταν με τη μικρή συγκέντρωσή τους, η οποία πλησίαζε τα όρια ανίχνευσης της τεχνικής.





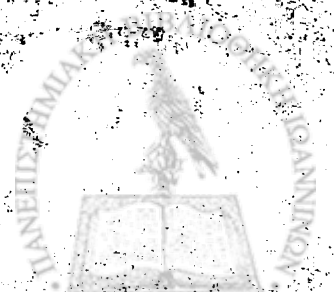


**Εικόνα 3.38:** Κατανομή του αμινοτελικού τμήματος του LBR στον άξονα της γραμμικής κίνησης μετά από φυγοκέντρηση και επίτευξη ισορροπίας (equilibrium).

**A.** Ανίχνευση της μονομερούς μορφής ( $M.W.=21$  kDa), παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 226nm, μετά από φυγοκέντρηση στις 20000rpm για 16h, **B.** Ανίχνευση ολιγομερών σωματίων ( $M.W.1=300$  kDa,  $M.W.2=596$  kDa), παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 277nm μετά από φυγοκέντρηση στις 6400rpm για 19h.

Φαίνεται λοιπόν ότι εγκαθίσταται μία ισορροπία μεταξύ μονομερούς και μιας ασταθούς ολιγομερούς μορφής της πρωτεΐνης, η οποία είναι μετατοπισμένη προς τη μονομερή μορφή. Αυτό μπορεί να οφείλεται και σε αποπολυμερισμό, που διευκολύνεται από τις συνθήκες του πειράματος.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ



#### 4.1 Σύντομη επισκόπηση των αποτελεσμάτων της πειραματικής μελέτης

Αν και εξ ορισμού ο πυρηνικός φάκελος αποτελεί το 'τείχος' που διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από το πυρηνόπλασμα, γίνεται πλέον όλο και πιο σαφές ότι ο ρόλος του δεν είναι απλά αρχιτεκτονικός. Πρόσφατες μελέτες έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι ο πυρηνικός φάκελος μπορεί να λειτουργεί ως «πλατφόρμα ανασυγκρότησης» για χρωματινικές περιοχές που βρίσκονται στην περιφέρεια του πυρήνα και να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής (Shaklai et al, 2007, Kalverda et al, 2008). Οι πρωτεΐνες που είναι αγκυροβολημένες στον πυρηνικό φάκελο συμμετέχουν σε διαδικασίες γονιδιακής ρύθμισης είτε μέσω σύνδεσής τους απ' ευθείας σε ρυθμιστικούς παράγοντες (Wilkinson et al, 2003, Haragushi et al, 2004) είτε προκαλώντας επιγενετικές τροποποιήσεις σε ιστόνες (Somech et al, 2005). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές ο LBR φαίνεται να έχει πρωταγωνιστικό ρόλο, τόσο σαν μόριο που οργανώνει τη δομή του πυρηνικού φακέλου όταν αυτός σχηματίζεται, όσο και σαν στοιχείο που ρυθμίζει τη σχετική θέση της κάθε περιοχής του γονιδιώματος ως προς άλλους ενδοπυρηνικούς σχηματισμούς, καθώς συνδέεται σε συγκεκριμένες χρωματινικές περιοχές και, πιθανότατα, συμμετέχει στη δημιουργία τους.

Βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας του LBR υπέδειξε ότι τα πρώτα 62 κατάλοιπα μπορεί να συγκροτούν ένα πρωτεϊνικό μοτίβο τύπου Tudor. Από τους κύριους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν η επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης με προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής της περιοχής αυτής του LBR. Παρότι, όταν είχε ξεκινήσει η παρούσα μελέτη η λειτουργία των Tudor domains ήταν σχεδόν άγνωστη, η δομική τους ομολογία με την οικογένεια των chromodomains είχε ήδη οδηγήσει στην υπόθεση ότι μπορεί να συμμετέχουν στην αναγνώριση επιγενετικών ιστονικών τροποποιήσεων (Maurer-Stroh et al, 2003). Μελέτες των τελευταίων ετών απέδειξαν και πειραματικά την τάση που έχουν τα μοτίβα αυτά να συνδέονται σε μεθυλιωμένα κατάλοιπα αργινίνης ή λυσίνης, που βρίσκονται κατά κύριο λόγο στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών (Huyen et al, 2004, Botuyan et al, 2006, Huang et al, 2006). Δεδομένης και της ικανότητας του LBR να συνδέεται με νουκλεοσώματα και ολιγομερή ιστονών H3/H4 (Polioudaki et al, 2001, Makatsori et al, 2004), υπήρχε το ενδεχόμενο να αλληλεπιδρά ο LBR με τις ιστόνες μέσω των τροποποιημένων τους καταλοίπων. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε αυτή η πιθανότητα και επιχειρήθηκε ο εντοπισμός της(ων) περιοχής(ών) του LBR που ευθύνε(ον)ται για τη σύνδεση με τις ιστόνες, μια και συσσωρεύονται τελευταία οι ενδείξεις



ότι τέτοιου είδους μηχανισμοί μοριακής αναγνώρισης παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης και τη γονιδιακή ρύθμιση.

Η δομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε απέδειξε ότι ο LBR περιέχει όντως μια περιοχή με τριτοταγή δομή τύπου Tudor domain και με δομική και λειτουργική αυτοτέλεια. Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της περιοχής αυτής έδειξε ότι το Tudor domain του LBR αλληλεπιδρά *in vitro* με την H3 και με καμία από τις άλλες ιστόνες. Η σύνδεση αυτή είναι ανεξάρτητη της παρουσίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην H3 και διαμεσολαβείται από το κεντρικό της τμήμα, χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί το Tudor domain του LBR από τα άλλα Tudor domains των οποίων η λειτουργία είναι γνωστή. Επίσης, όπως αποκάλυψαν τα πειράματα χαρτογράφησης της επιφάνειας αλληλεπίδρασης, στην αναγνώριση της H3 συμμετέχει μία εκτεταμένη επιφάνεια και όχι ο χαρακτηριστικός αρωματικός κλωβός των Tudor domains. Επιπλέον, σε αντίθεση με άλλα Tudor domains, αυτό του LBR φαίνεται να μην αναγνωρίζει ούτε απλά μεθυλιωμένα κατάλοιπα Lys ή Arg όπως προέκυψε από πειράματα τιτλοδότησης με τα αντίστοιχα αμινοξέα.

Πειράματα συγκατακρήμνισης με πυρηνικά εκχυλίσματα και με καθαρές πρωτεΐνες έδειξαν ότι το Tudor domain δεν συνδέεται με νουκλεοσώματα και ολιγομερή H3/H4, αλλά μόνο με ελεύθερη H3. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει μία παροδική αλληλεπίδραση μεταξύ LBR και H3 που λαμβάνει χώρα πιθανότατα κατά τα πρωταρχικά στάδια του σχηματισμού ή κατά την αναδιοργάνωση της περιφερικής χρωματίνης, όταν η H3 δεν έχει τροποποιηθεί και πιθανώς ούτε έχει αναδιπλωθεί ακόμα. Αντίθετα, η διερεύνηση της σύνδεσης των υπολοίπων περιοχών του αμινοτελικού άκρου του LBR με νουκλεοσώματα και ολιγομερή H3/H4 οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπεύθυνη για τη σταθερή σύνδεση του LBR με νουκλεοσώματα είναι η περιοχή που είναι πλούσια σε RS διπεπτίδια (RS περιοχή), η οποία αλληλεπιδρά και με τις απομονωμένες ιστόνες H3 και H4. Παρότι λοιπόν τόσο το Tudor domain, όσο και η RS περιοχή του LBR, συνδέονται σε χρωματινικά συστατικά, φαίνεται ότι η τελευταία αντιπροσωπεύει την κύρια περιοχή σύνδεσης σε οργανωμένες χρωματινικές δομές.

Η RS περιοχή αναδεικνύεται επίσης υπεύθυνη για τον ολιγομερισμό του LBR, καθώς μπορεί να αναγνωρίσει τόσο τον φυσικό LBR όσο και το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό του άκρο. Τα ολιγομερή του LBR είναι σχετικά μεγάλου μεγέθους και αποτελούνται από 12-24 υπομονάδες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης.



## 4.2 Σύγκριση με *Tudor domains* γνωστής δομής και λειτουργίας

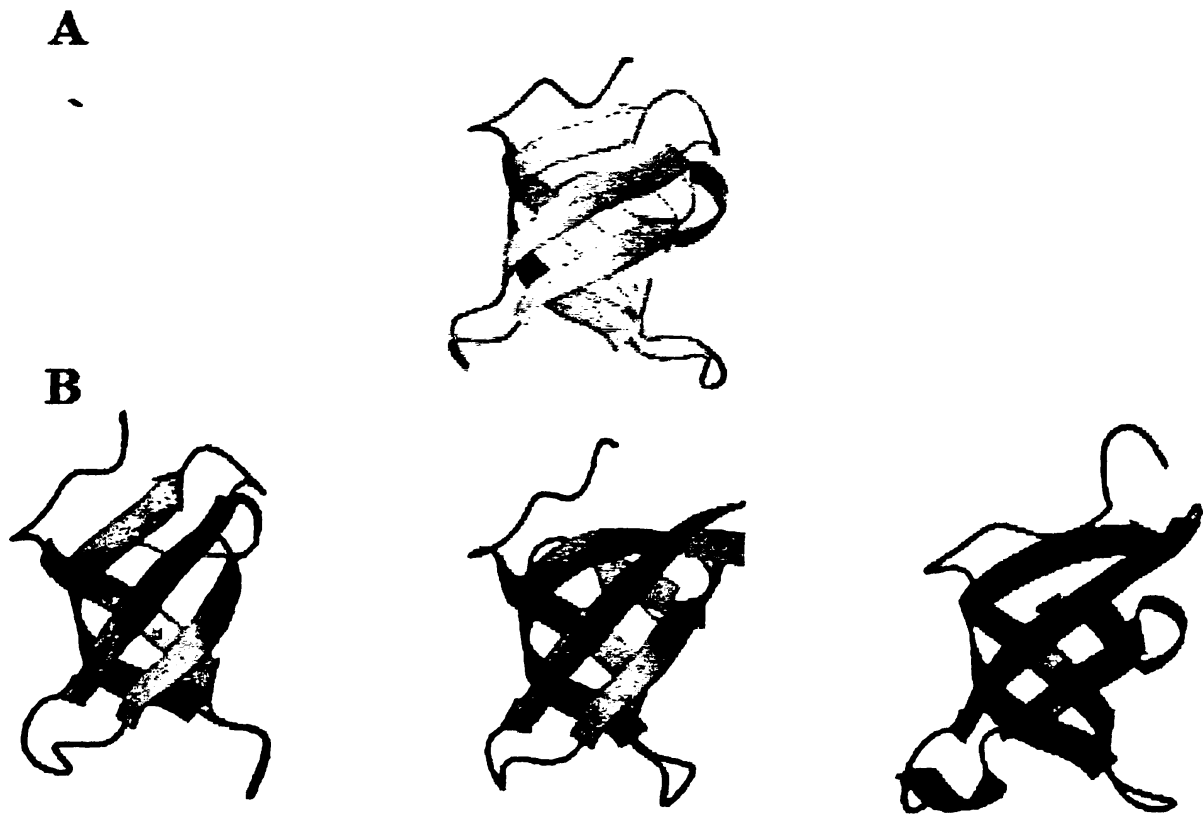
Η δομική μελέτη που έγινε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής απέδειξε ότι ο LBR περιέχει στο αμινοτελικό του άκρο μια περιοχή (LBR-TD) που μπορεί να καταταγεί στην ευρύτερη δομική οικογένεια «Royal family» και ειδικότερα στην υποκατηγορία των *Tudor domains*. Η βιοχημική ανάλυση που ακολούθησε όμως αποκάλυψε χαρακτηριστικά του LBR-TD που το διαφοροποιούν από άλλα μέλη της οικογένειας αυτής, με κυριότερο την απουσία αλληλεπίδρασης με μεθυλιωμένα κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης, που σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία θεωρείται «σήμα κατατεθέν» για *domains* αυτού του τύπου. Γεννάται λοιπόν το ερώτημα αν η διαφορετική συμπεριφορά του LBR-TD μπορεί να προβλεφθεί ή να ερμηνευθεί επί τη βάση της τριτοταγούς δομής του. Για να διερευνήσουμε το ερώτημα αυτό προχωρήσαμε σε μια λεπτομερή σύγκριση της δομής του LBR-TD με αυτές των δομικά ομολόγων του. Τα δομικά ομόλογα εντοπίστηκαν με χρήση του λογισμικού DALI (Holm and Sander, 1995), το οποίο συγκρίνει την τριτοταγή διάταξη των στοιχείων δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης με το σύνολο των επιλυμένων πρωτεϊνικών δομών που είναι κατατεθειμένες στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB (Protein Data Bank, 49205 δομές μέχρι 6/9/2008). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση με DALI υπέδειξαν ως πιο ομόλογες δομές: (α) το *Tudor domain* της πρωτεΐνης SMN (Survival of Motor Neuron) με Z score=7.9, (β) το πρώτο από τα δύο *Tudor domains* της απομεθυλάσης JMJD2A με Z score=7.6 και (γ) το *Chromo-barrel domain* του μεταγραφικού παράγοντα MRG15 με Z score=7.0 (Εικ.4.1).

Οι λειτουργικές ιδιότητες των ομολόγων πρωτεϊνικών περιοχών έχουν μελετηθεί και μπορούν να συνοψισθούν ως εξής: (α) το *Tudor domain* της SMN έχει δειχθεί να συνδέεται σε συμμετρικά διμεθυλιωμένες αργινίνες οι οποίες βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε διπεπτίδια αργινίνης-γλυκίνης (RG repeats) στις Sm πρωτεΐνες (Spliceosomal proteins). Η περιοχή σύνδεσης των μεθυλιωμένων αργινινών βρίσκεται στον αρωματικό κλωβό του *Tudor domain* της SMN (Sprangers et al, 2003). Αντιθέτως, για το πρώτο *Tudor domain* της JMJD2A δεν είναι γνωστό κάποιο λειτουργικό χαρακτηριστικό. Το μόνο που έχει αναφερθεί είναι ότι δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την αμινοτελική ουρά της H3 που είναι τριμεθυλιωμένη στη λυσίνη 4, η οποία όμως συνδέεται με το δεύτερο *Tudor domain* της JMJD2A (Huang et al, 2006). Τέλος το *Chromo-barrel domain* της MRG15 έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με H3 η οποία είναι διμεθυλιωμένη στη λυσίνη 36 (Zhang et al, 2006), η θέση



πρόσδεσης της οποίας παραμένει όμως άγνωστη, παρότι το συγκεκριμένο domain διαθέτει αρωματικό κλωβό.

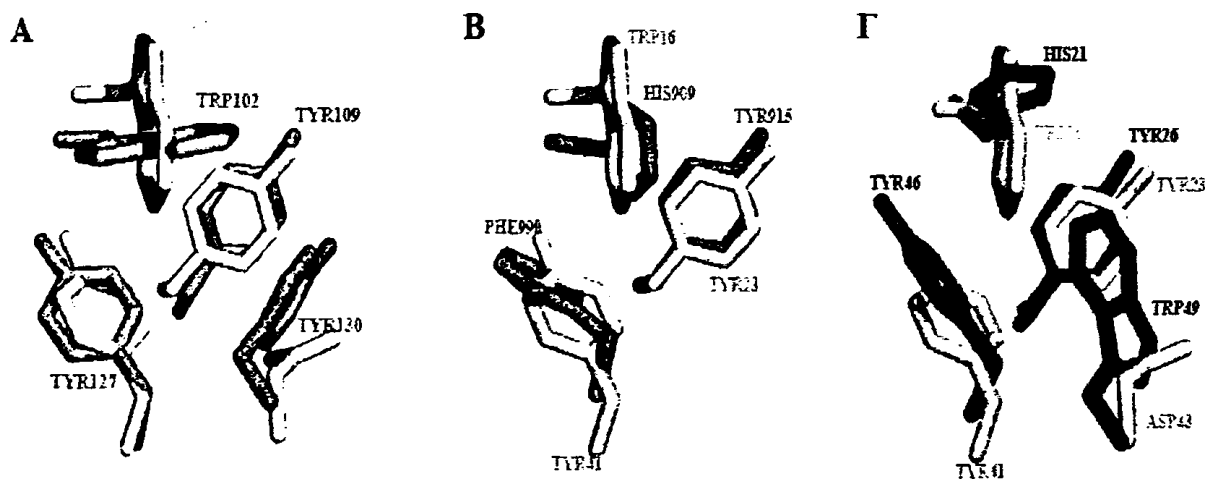
Στη συνέχεια έγινε μία λεπτομερής σύγκριση του αρωματικού κλωβού του LBR-TD με αυτούς των ομόλογων πρωτεϊνών. Η σύγκριση αποκάλυψε ενδιαφέροντα στοιχεία που αφορούν τη σχετική διάταξη των πλευρικών αλυσίδων της περιοχής αυτής σε κάθε περίπτωση. Αυτό που διακρίνει τον κλωβό των LBR-TD από αυτούς των SMN και MRG15



*Εικόνα 4.1: Α. Τρισδιάστατη δομή του Tudor domain του LBR, Β. Τρισδιάστατες δομές του Tudor domain της SMN (γκρι), του πρώτου Tudor domain της JMJD2A (κόκκινο), του Chromo-barrel domain της MRG15 (μπλε).*

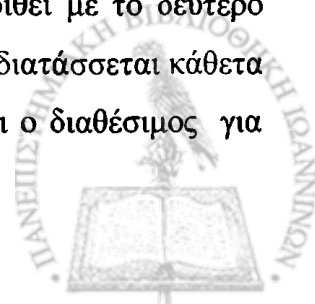
είναι η αισθητή διαφορά στη διάταξη της μίας αρωματικής πλευρικής αλυσίδας. Έτσι, στον LBR ο αρωματικός δακτύλιος της TRP16 διατάσσεται κάθετα σε σχέση με τους δακτυλίους της TRP102 στην SMN και της HIS21 στην MRG15 (Εικ. 4.2 Α,Γ). Χαρακτηριστική επίσης είναι η παρουσία του ASP43 στο LBR-TD στην ίδια θέση που υπάρχει το τέταρτο αρωματικό κατάλοιπο στους αρωματικούς κλωβούς της SMN και της MRG15 (TYR130 και TRP49

αντίστοιχα). Αντιθέτως, η σύγκριση με το πρώτο Tudor domain της JMJD2A, το οποίο δέν συνδέεται με το μεθυλιωμένο πεπτιδίο της H3, δείχνει πλήρη ταύτιση των τριών αρωματικών πλευρικών αλυσίδων που σχηματίζουν τους αρωματικούς κλωβούς (Εικ. 4.2 Β).

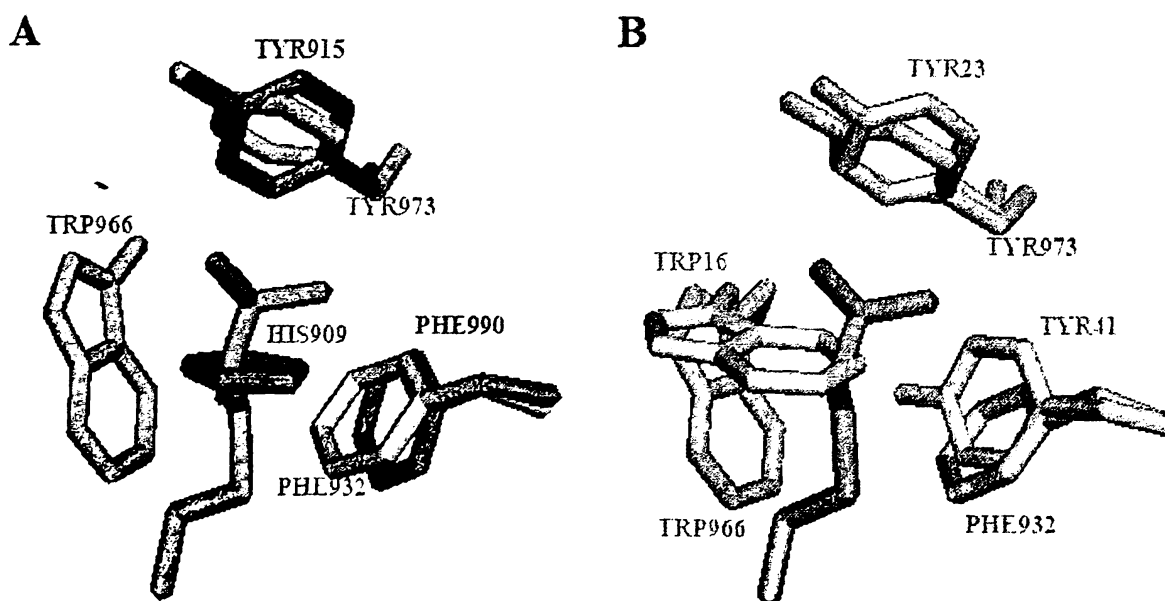


Εικόνα 4.2: Επίθεση του αρωματικού κλωβού του Tudor domain του LBR με τους αρωματικούς κλωβούς του Tudor domain της SMN (Α), του πρώτου Tudor domain της JMJD2A (Β), του Chromo-barrel domain της MRG15 (Γ). Με πράσινο φαίνονται οι πλευρικές αλυσίδες στον LBR, με μωβ στην SMN, με κόκκινο στην JMJD2A και με μπλε στην MRG15.

Θα μπορούσε όμως αυτή η διαφορά στη διάταξη τής μίας πλευρικής αλυσίδας στο Tudor domain του LBR σε σχέση με τα αντίστοιχα της SMN και της MRG15 να ευθύνεται για την αδυναμία των μεθυλιωμένων καταλοίπων να συνδεθούν σε αυτό; Μια απάντηση στο ερώτημα αυτό μπορεί να δοθεί αν εξετασθεί ο αρωματικός κλωβός του δεύτερου Tudor domain της JMJD2A, του οποίου η τρισδιάστατη δομή έχει λυθεί παρουσία πεπτιδίου της H3 που φέρει τριμεθυλιωμένη τη λυσίνη 4. Συγκρίνοντας τους αρωματικούς κλωβούς των δύο Tudor domains της JMJD2A, παρατηρούμε ότι υπάρχει πάλι μία διαφορά στη διάταξη του ενός από τους τρεις πλευρικούς δακτυλίους. Συγκεκριμένα, η HIS909 του πρώτου Tudor domain δεν συνεντοπίζεται με την TRP966 του δεύτερου Tudor domain και ο προσανατολισμός της στο χώρο δεν επιτρέπει λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης τη διείσδυση της πλευρικής ομάδας της τριμεθυλιωμένης λυσίνης στον αρωματικό κλωβό (Εικ. 4.3 Α). Σε αυτή τη διαφορά έχει άλλωστε αποδοθεί και η σύνδεση του μεθυλιωμένου πεπτιδίου στο δεύτερο και όχι στο πρώτο Tudor domain της JMJD2A (Huang et al, 2006). Ακριβώς το ίδιο συμβαίνει και όταν το Tudor domain του LBR συγκριθεί με το δεύτερο Tudor domain της JMJD2A. Σε αυτή την περίπτωση η TRP16 στον LBR διατάσσεται κάθετα σε σχέση με την TRP966 στην JMJD2A, με αποτέλεσμα να περιορίζεται ο διαθέσιμος για



την πλευρική ομάδα της τριμεθυλιωμένης λυσίνης «ελεύθερος» χώρος στο εσωτερικό του κλωβού και να μην είναι δυνατή η σύνδεσή της (Εικ. 4.3 Β). Με αυτή τη λογική λοιπόν, ο σχετικός προσανατολισμός στο χώρο των πλευρικών αλυσίδων των TRP16, TYR23 και TYR41 θα μπορούσε να ερμηνεύσει την αδυναμία αναγνώρισης τροποποιημένων καταλοίπων από το LBR-TD.

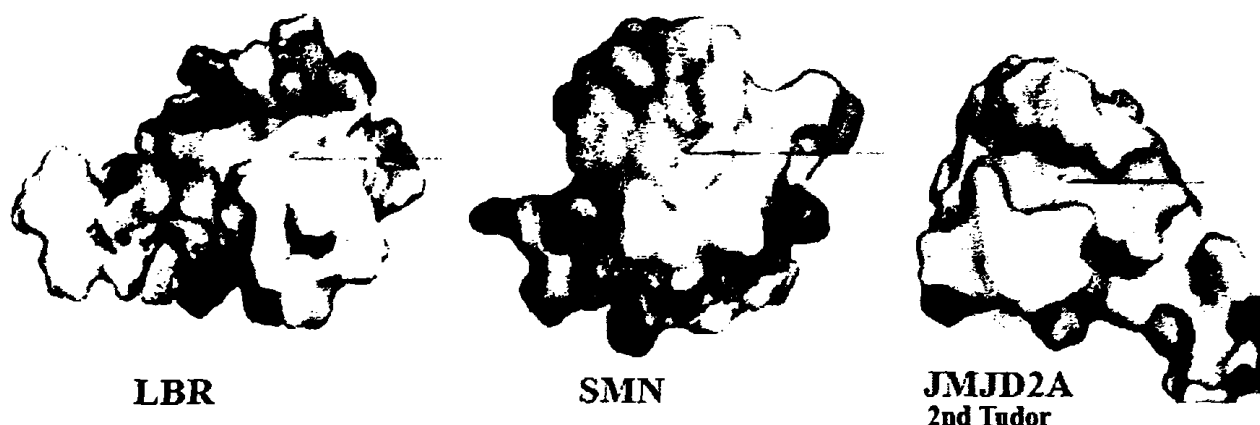


Εικόνα 4.3: Επίθεση του αρωματικού κλωβού του δεύτερου Tudor domain της JMJD2A με τους αρωματικούς κλωβούς του πρώτου Tudor domain της JMJD2A (Α) και του Tudor domain του LBR (Β). Με πράσινο φαίνονται οι πλευρικές αλυσίδες στον LBR, με κόκκινο και ροζ στο πρώτο και δεύτερο αντίστοιχα Tudor domain της JMJD2A και με πορτοκαλί φαίνεται η τριμεθυλιωμένη πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 4 στην H3.

Σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων έχουν οι ηλεκτροστατικές έλξεις που παρατηρούνται μεταξύ των θετικά φορτισμένων πλευρικών αμινομάδων των καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης και του απεντοπισμένου ηλεκτρονιακού νέφους (π-σύστημα) των αρωματικών δακτυλίων, καθώς και των πλευρικών αλυσίδων αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων στην ευρύτερη περιοχή γύρω από τους αρωματικούς κλωβούς (Taverna et al, 2007). Έτσι, στην πλειοψηφία των Tudor domains παρατηρείται η συγκέντρωση αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια περιφερικά των αρωματικών κλωβών. Αυτό είναι εμφανές στην περίπτωση του Tudor domain της SMN και του δεύτερου Tudor domain της JMJD2A. Αντιθέτως, η αντίστοιχη περιοχή του LBR-TD παρουσιάζει μία ποικιλομορφία ως προς την κατανομή φορτίου και σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να



χαρακτηρισθεί αρνητικά φορτισμένη (Εικ. 4.4). Αυτός είναι ένας δεύτερος λόγος στον οποίο ίσως να οφείλεται η απουσία αλληλεπίδρασης του LBR-TD με μεθυλιωμένες αργινίνες και λυσίνες.

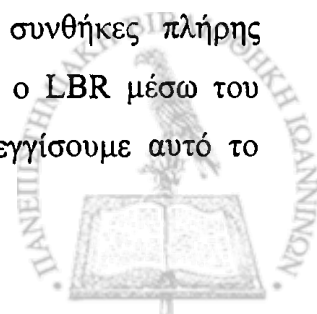


*Εικόνα 4.4: Κατανομή φορτίου στην επιφάνεια των Tudor domains των πρωτεϊνών LBR, SMN και JMJD2A (δεύτερο Tudor domain). Το μπλε και το κόκκινο υποδηλώνουν συγκέντρωση θετικού και αρνητικού φορτίου αντίστοιχα. Τα βέλη υποδεικνύουν τις περιοχές στις οποίες βρίσκονται οι αρωματικοί κλωβοί.*

### 4.3 Συνθήκες αναγνώρισης της H3 από το Tudor domain του LBR-

#### *Ομοιότητες και διαφορές με τη δράση των ιστονικών σαπερονών*

Όπως φάνηκε από τη παρούσα μελέτη η αλληλεπίδραση του Tudor domain του LBR με την ιστόνη H3 συμβαίνει κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες. Βασική προϋπόθεση για την αλληλεπίδραση αυτή είναι να μην είναι η H3 ενσωματωμένη στο νουκλεόσωμα ή και ευρύτερα σε μια οργανωμένη χρωματινική δομή. Βέβαια είναι γνωστό ότι η χρωματίνη είναι μία πολύ δυναμική δομή και αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σωστή ρύθμιση διαδικασιών, όπως η αντιγραφή και η επιδιόρθωση του DNA. Σε αυτό το πλαίσιο παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στη δομή της χρωματίνης που κυρίως αφορούν την απομάκρυνση των ιστονών από τα νουκλεοσώματα (αποδιοργάνωση της χρωματίνης) ή την εναπόθεση των ιστονών στο γυμνό DNA (συναρμολόγηση της χρωματίνης). Στις παραπάνω διαδικασίες αποκαλύπτονται περιοχές των ιστονών που κάτω από συνθήκες πλήρους οργάνωσης του νουκλεοσώματος παραμένουν απρόσιτες. Θα μπορούσε ο LBR μέσω του Tudor domain να εμπλέκεται σε παρόμοιες διαδικασίες; Για να προσεγγίσουμε αυτό το



ερώτημα αναζητήσαμε τυχόν ομοιότητες του LBR-TD με άλλες πρωτεΐνες που έχουν κεντρικό ρόλο στις παραπάνω διαδικασίες.

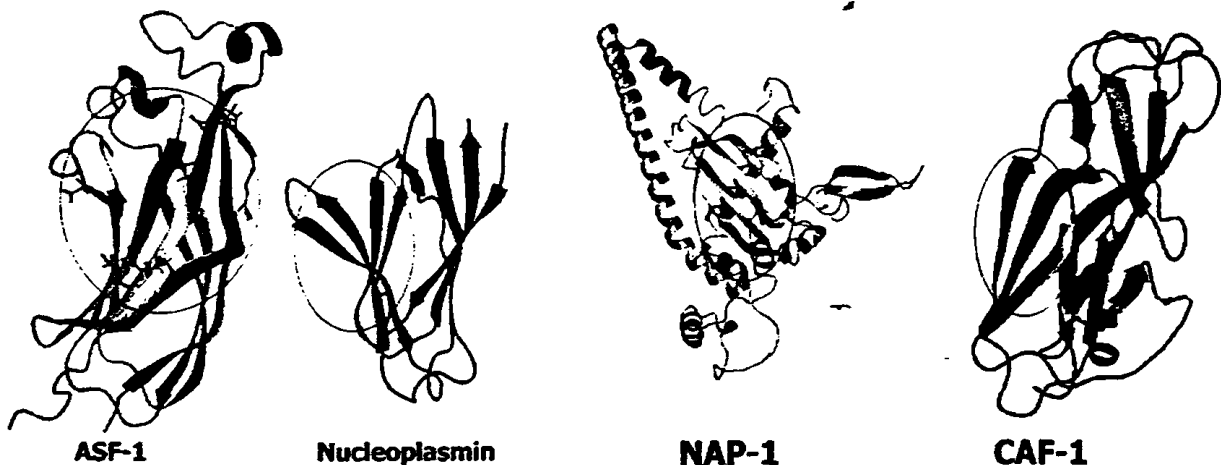
Οι πρωτεΐνες αυτές κατά κύριο λόγο ανήκουν στην κατηγορία των ιστονικών σαπερών (histone chaperones). Έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με τις ιστόνες και να συνδράμουν στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μόρια. Έτσι, συνδέονται με τις νεοσυντιθέμενες ιστόνες, τις μεταφέρουν στο κύτταρο και συμμετέχουν στην εναπόθεσή τους, στην απομάκρυνσή τους και στην ανταλλαγή τους με διάφορες ισομορφές κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης-αποσυναρμολόγησης της χρωματίνης (*Loyola and Almouzni, 2004, De Koning et al, 2007*). Επιπλέον, οι ιστονικές σαπερόνες λειτουργούν και ως μέσα αποθήκευσης των ιστονών, περιορίζοντας την ανεξέλεγκτη κυκλοφορία τους στο κυτταρικό περιβάλλον. Κάτι τέτοιο άλλωστε θα ήταν καταστροφικό, καθώς οι ιστόνες, λόγω του πολύ βασικού χαρακτήρα τους, έχουν τη τάση να δημιουργούν συσσωματώματα, ο σχηματισμός των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Φαίνεται έτσι ότι όλος ο κύκλος ζωής των ιστονών εξαρτάται από πρωτεΐνες οι οποίες τις μεταφέρουν, τις εναποθέτουν στη χρωματίνη, τις παραλαμβάνουν από αυτή, όταν χρειάζεται να αποσυρθούν και τις αποθηκεύουν, όταν βρίσκονται σε πλεόνασμα.

Μέχρι στιγμής είναι γνωστές οι τρισδιάστατες δομές αρκετών ιστονικών σαπερονών και η μελέτη αυτών των δομών έχει δώσει ενδιαφέροντα στοιχεία για τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης τους. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας όχι μόνο δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη ομολογία στις αλληλουχίες τους, αλλά διαφέρουν και στις τρισδιάστατες δομές τους. Παρόλα αυτά, σε όλες τις γνωστές τρισδιάστατες δομές παρατηρείται η ύπαρξη μίας χαρακτηριστικής β-αντιπαράλληλης πτυχωτής επιφάνειας η οποία είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη. Τέτοιες επιφάνειες παρατηρούνται στις δομές των πιο αντιπροσωπευτικών ιστονικών σαπερονών, όπως ο ASF1 (*Mousson et al, 2005*), η NAP1 (*Park and Luger, 2006*), η nucleoplasmin (*Namboodiri et al, 2004*), ο CAF1 (*Kaufman et al, 1995*) και η HIRA (*Desilva et al, 1998*) (Εικ. 4.5). Αυτό το κοινό δομικό χαρακτηριστικό θεωρήθηκε ότι μπορεί να αποτελεί την επιφάνεια σύνδεσης των ιστονικών σαπερονών με τις ιστόνες. Πρόσφατα, η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε για την ιστονική σαπερόνη ASF1, της οποίας η τρισδιάστατη δομή επιλύθηκε παρουσία των ιστονών H3 και H4 με τις οποίες ο ASF1 αλληλεπιδρά. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η β-αντιπαράλληλη επιφάνεια του ASF1 σχηματίζει εκτεταμένες επαφές, τόσο με την α3 έλικα της H3, όσο και με τα τελευταία δέκα κατάλοιπα της H4 (*English et al, 2006*).



Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής διαπιστώσαμε ότι η H3 συνδέεται σε μία εκτεταμένη επιφάνεια του LBR-TD, η οποία περιλαμβάνει τμήματα και των δύο β-αντιπαράλληλων πτυχωτών επιφανειών του. Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει ένα κοινό χαρακτηριστικό στο τρόπο με τον οποίο το Tudor domain του LBR και οι ιστονικές σαπερόνες αναγνωρίζουν τις ιστόνες.

Εκτός όμως από τις δομικές ομοιότητες παρατηρούνται και λειτουργικές ομοιότητες μεταξύ του LBR-TD και των ιστονικών σαπερονών στη δυνατότητα εισαγωγής αρνητικών υπερσπειρώσεων σε χαλαρής μορφής DNA παρουσία ιστονών. Η συγκεκριμένη δοκιμή χρησιμοποιείται κατά κόρον σε περιπτώσεις χαρακτηρισμού πρωτεϊνών ως ιστονικών σαπερονών (*Okunaki et al, 2001, Muto et al, 2007*), καθώς παρέχει ένα μέτρο της ικανότητας μίας πρωτεΐνης να επάγει την συναρμολόγηση νουκλεοσωμάτων. Φάνηκε λοιπόν ότι το Tudor domain του LBR έχει μία τέτοια ιδιότητα, καθώς μπορούσε να επάγει αρνητικές υπερσπειρώσεις σε DNA το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί κατεργασία με τοποϊσομεράση I παρουσία ιστονικού τετραμερούς H3/H4.



*Εικόνα 4.5: Τρισδιάστατες δομές των ιστονικών σαπερονών ASF1, Nucleoplasmin, NAP1 και CAF1. Με κύκλο δείχνονται οι β-αντιπαράλληλες πτυχωτές επιφάνειες που πιθανώς να εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις με τις ιστόνες.*

Παρόλα αυτά το LBR-TD δεν μπορεί, τουλάχιστον επί του παρόντος, να χαρακτηριστεί ιστονική σαπερόνη, καθώς, όπως έδειξαν τα πειράματα συγκατακρήμνισης και συγκαταβύθισης σε βαθμίδωση σουκρόζης, αδυνατεί να αναγνωρίσει το τετραμερές H3/H4,

σε αντίθεση με τις ιστονικές σαπερόνες, για τις οποίες σχεδόν όλα τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι αναγνωρίζουν είτε τετραμερή H3/H4 είτε διμερή H2A/H2B (*Muto et al, 2007*). Αντιθέτως το LBR-TD συνδέεται με την ελεύθερη H3, αλλά δεν την αναγνωρίζει στο πλαίσιο του τετραμερούς H3/H4. Αυτές οι αντικρουόμενες παρατηρήσεις επιτρέπουν μεν να θεωρηθεί το LBR-TD ένα πρωτεϊνικό μοτίβο που έχει την ικανότητα σύνδεσης με ιστόνες (histone binding module), όχι όμως και ιστονική σαπερόνη.

#### 4.4 Αλληλεπίδραση του LBR με τη χρωματίνη

Παρότι η αλληλεπίδραση του LBR με τη χρωματίνη έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν, πολλά ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο και τις περιοχές που συμμετέχουν σε αυτή την αλληλεπίδραση παραμένουν αναπάντητα. Αυτό έως ένα σημείο είναι αναμενόμενο λόγω κυρίως της πολυπλοκότητας της χρωματίνης. Όταν ταυτοποιήθηκε η αμινοξική αλληλουχία του LBR παρατηρήθηκε ότι στο αμινοτελικό του άκρο περιέχεται σε τρία αντίγραφα το μοτίβο Ser/Thr-Pro-X-X, το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για σύνδεση σε DNA (*Worman et al, 1990*). Στη συνέχεια με τη χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και ανασυσταθέντων νουκλεοσωμάτων φάνηκε ότι ο LBR μπορεί να αλληλεπιδρά αρχικά με ελεύθερο DNA και στη συνέχεια με το συνδετικό DNA των νουκλεοσωμάτων, αλλά όχι με αυτό του νουκλεοσωμικού πυρήνα, παρόμοια με τον τρόπο που οι συνδετικές ιστόνες συνδέονται στο DNA (*Duband-Goulet and Courvalin, 2000*). Πρόσφατα, με τη χρήση πυρηνικών μεμβρανών και γραμμικού πλασμιδιακού DNA, ερευνητές έδειξαν ότι πολλές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου -ανάμεσά τους και ο LBR- αλληλεπιδρούν με το DNA. Μάλιστα έγινε συσχέτιση του πολύ βασικού χαρακτήρα που έχουν τα αμινοτελικά-πυρηνοπλασματικά άκρα αυτών των πρωτεϊνών και της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με το αρνητικά φορτισμένο DNA (*Ulbert et al, 2006*). Αν και η αλληλεπίδραση LBR-DNA μπορεί να έχει ένα σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του LBR με τη χρωματίνη, εγείρονται ερωτήματα για την ειδικότητα των συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων, καθώς τα περισσότερα πειράματα διεξήχθησαν υπό συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος, κάτι που ίσως να επάγει συνδέσεις μη ειδικές.

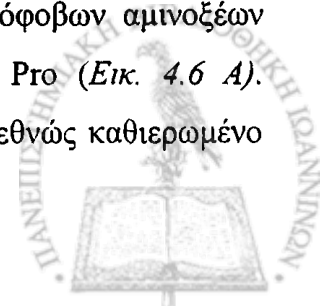
Εκτός από το DNA, η αλληλεπίδραση LBR-χρωματίνης έχει αποδοθεί και στην ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1). Η HP1 ως βασικό συστατικό της ετεροχρωματίνης έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο του LBR. Έχουν αναφερθεί δύο διαφορετικές εκδοχές για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών. Η μία υποστηρίζει ότι ο LBR και η HP1 αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους (*Ye et al, 1997*), ενώ η δεύτερη αναφέρει ότι η



αλληλεπίδραση είναι έμμεση, καθώς ένα oligομερές σύμπλοκο των ιστονών H3 και H4 μεσολαβεί και λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος για τον LBR και την HP1 (Polioudaki et al, 2001).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν το μοντέλο της άμεσης αλληλεπίδρασης LBR-ιστονών, αφού δείχνουν σαφώς ότι, τόσο ολόκληρο το νουκλεοπλασματικό άκρο του LBR, όσο και τμήματά του που περιέχουν την RS περιοχή, συγκατακρημνίζουν ολόκληρα νουκλεοσώματα από πυρηνικά εκχυλίσματα ερυθροκυττάρων γαλοπούλας, που δεν περιέχουν όμως HP1. Στην παρατηρούμενη αλληλεπίδραση από πλευράς χρωματίνης εμπλέκονται οι ιστόνες H3 και H4, γεγονός που επιβεβαιώνει την ικανότητα του LBR να συνδέεται σε oligομερή H3/H4. Επίσης φαίνεται ότι κάτω από τις παρούσες πειραματικές συνθήκες το νουκλεοσωματικό DNA δεν συμμετέχει στην αλληλεπίδραση, καθώς κατεργασία των δειγμάτων με DNaseI δεν επηρέασε την αλληλεπίδραση LBR-νουκλεοσωμάτων.

Από τη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε επίσης ότι: (α) Το LBR-TD δεν συνδέεται με νουκλεοσώματα και oligομερή H3/H4, αλλά μόνο με ελεύθερη H3. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει μία παροδική αλληλεπίδραση μεταξύ LBR και H3 που λαμβάνει χώρα πιθανότατα κατά τα πρωταρχικά στάδια του σχηματισμού ή κατά την αναδιοργάνωση της περιφερικής χρωματίνης, όταν η H3 δεν έχει τροποποιηθεί και πιθανώς ούτε έχει αναδιπλωθεί ακόμα. (β) Υπεύθυνη για τη σταθερή σύνδεση του LBR με νουκλεοσώματα είναι η περιοχή που είναι πλούσια σε RS διπεπτίδια (RS περιοχή), η οποία αλληλεπιδρά και με τις απομονωμένες ιστόνες H3 και H4. Αυτή η παρατήρηση εγείρει ενδιαφέροντα ερωτήματα για το πώς συμβαίνει η αλληλεπίδραση σε μοριακό επίπεδο, καθώς τόσο η RS περιοχή, όσο και οι ιστόνες H3 και H4 είναι βασικές πρωτεΐνες με ισχυρό θετικό φορτίο. Επίσης στην αμινοξική αλληλουχία της RS περιοχής μπορεί κανείς να διακρίνει όλα τα χαρακτηριστικά μιας κατηγορίας πρωτεϊνών (intrinsically disordered proteins, IDPs) που, ενώ από μόνες τους δεν έχουν μια συγκεκριμένη τριτοταγή δομή, στη λειτουργική τους κατάσταση μπορούν να υιοθετούν περισσότερες της μιας διαμορφώσεις, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον και τους παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρούν (Dunker and Obradovic, 2001, Dyson and Wright, 2005, Fink, 2005, Nikolakaki et al, 2008). Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η χαμηλή πολυπλοκότητα της αλληλουχίας, ο μεγάλος αριθμός υδρόφιλων, φορτισμένων και τροποποιήσιμων αμινοξέων (Arg, Lys, Ser), η παντελής απουσία υδρόφοβων αμινοξέων (Cys, Ile, Leu, Trp, Tyr, Phe, Val) και η παρουσία 3 καταλοίπων Pro (Εικ. 4.6 Α). Βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας της περιοχής αυτής με το διεθνώς καθιερωμένο



αλγόριθμο PONDR-VXLT (Li et al, 1999) επιβεβαιώνει μια τέτοια πρόβλεψη (Εικ. 4.6 Β). Υπάρχει λοιπόν η πιθανότητα σχηματισμού στοιχείων δευτεροταγούς δομής στην περιοχή αυτή όταν ο LBR συνδέεται στις ιστόνες, που θα άξιζε να διερευνηθεί στο μέλλον.

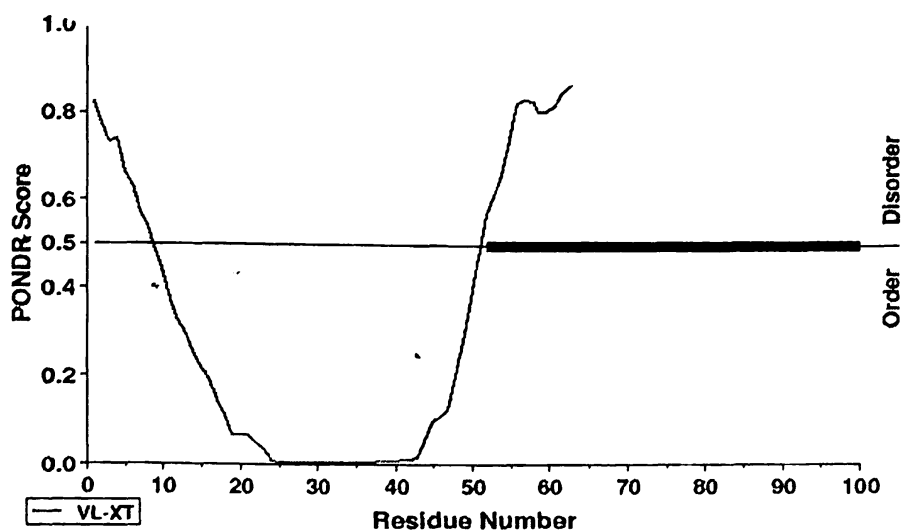
Δεν έχει επίσης πλήρως διαλευκανθεί μέχρι σήμερα, αν και έχει μελετηθεί, ο ρόλος της φωσφορυλίωσης των καταλοίπων Ser στην αλληλεπίδραση του LBR με τη χρωματίνη, με τα μέχρι στιγμής δεδομένα να δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση από την cdc2 κινάση στην Ser71 επηρεάζει την αλληλεπίδραση LBR-χρωματίνης και μάλιστα έχει ανασταλτικό χαρακτήρα (Takano et al, 2004). Αντίθετα, η παρουσία τυχόν μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στα κατάλοιπα Arg, στα οποία είναι πλούσια η RS περιοχή, και η επίδρασή τους στη σύνδεση με τη χρωματίνη δεν έχουν εξετασθεί καθόλου, παρόλο που θα μπορούσαν να αποτελούν ένα μηχανισμό ελέγχου για τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, όπως έχει βρεθεί σε άλλες περιπτώσεις.

Ένας επιπλέον παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει το μηχανισμό αλληλεπίδρασης του LBR με τη χρωματίνη είναι η γνωστή σύνδεσή του με τη λαμίνη Β, η

**A**

**RKSQSSSSPSRRRSRRRSRSPGRPAKGRRRSSSHSR**

**B**

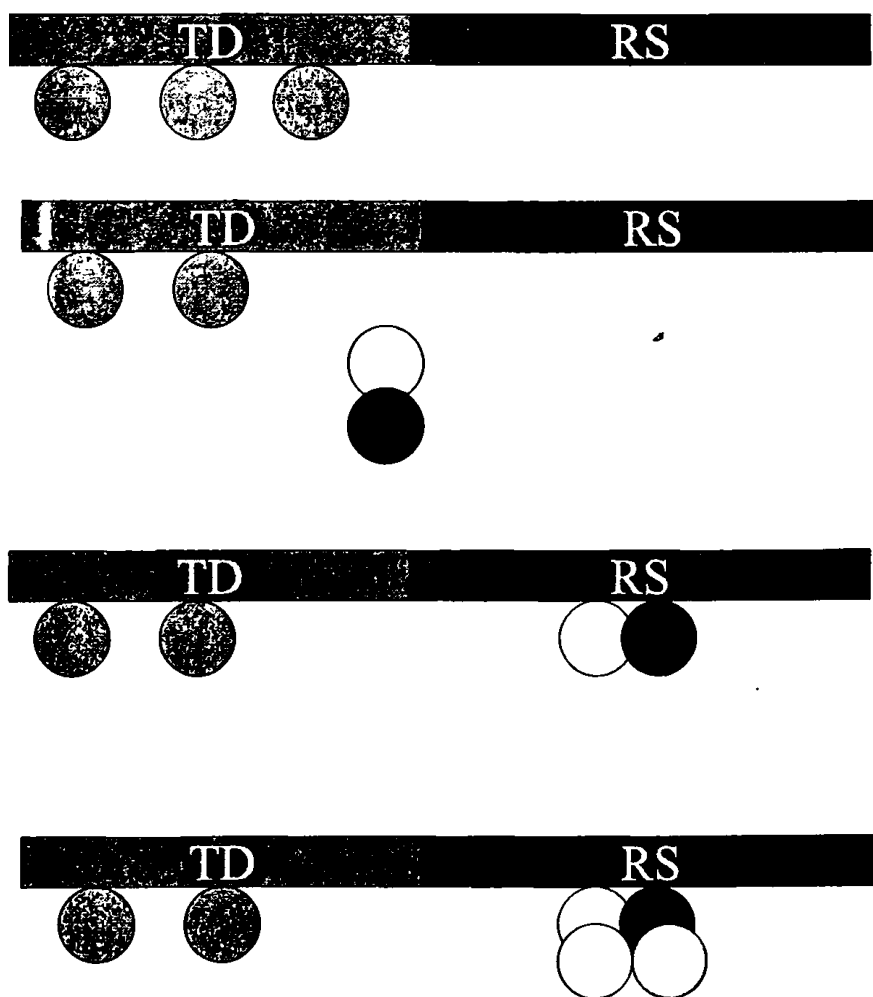


**Εικόνα 4.6:** Α. Αλληλουχία της RS περιοχής. Β. Αποτελέσματα της ανάλυσης με PONDR-VXLT για την περιοχή TUDOR-RS του LBR (αμινοξέα 1-100) υπό μορφή γραφήματος που παριστά την πιθανότητα να έχει τα χαρακτηριστικά των IDPs μια πρωτεϊνική περιοχή σαν συνάρτηση της αλληλουχίας της. Όσο πλησιέστερα προς την τιμή 1 είναι η πιθανότητα τόσο πιο αξιόπιστη είναι η πρόβλεψη. Η μαύρη γραμμή δηλώνει την περιοχή της αλληλουχίας που είναι σχεδόν βέβαιο ότι συγκαταλέγεται στην κατηγορία των IDPs.



οποία παρουσιάζει και αυτοτελώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μια και σχετίζεται άμεσα με την οργάνωση και τη δυναμική του πυρηνικού φακέλου. Οι λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης αυτής παραμένουν άγνωστες και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, η οποία όμως ξεφεύγει από το πλαίσιο της παρούσας διατριβής που εστιάσθηκε στη μελέτη της σύνδεσης LBR-χρωματίνης.

Το μοντέλο αλληλεπίδρασης LBR-χρωματίνης που προέκυψε από την παρούσα διατριβή συνοψίζεται διαγραμματικά στην *Εικόνα 4.7* σαν ένας μηχανισμός που περιλαμβάνει δύο στάδια. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η συνδεδεμένη στο LBR-TD H3 σχηματίζει με την ελεύθερη H4 διμερές που με τη σειρά του μεταφέρεται και συγκρατείται από την RS περιοχή του LBR σχηματίζοντας έτσι τον πυρήνα οργάνωσης των ιστονών σε νουκλεοσώματα.



*Εικόνα 4.7: Μοντέλο αλληλεπίδρασης LBR-χρωματίνης με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Με κύκλους παριστάνονται οι ιστόνες (με κόκκινο η συνδεδεμένη στο LBR-TD H3, με μπλε η ελεύθερη H4, με φαιό η συνδεδεμένη στο διμερές H3, με γκριζο και άσπρο οι H3, H4 στο πλαίσιο του τετραμερούς)*



#### 4.5 Ολιγομερισμός του LBR

Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν την τάση του LBR να συσσωρεύεται σε διακριτές νησίδες στην έσω πυρηνική μεμβράνη (Makatsori et al, 2004). Τα ολιγομερή που πιθανότατα σχηματίζει ο LBR και ο τρόπος με τον οποίο αυτά σχηματίζονται δεν έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα. Για να απαντηθεί το πρώτο ερώτημα δείγματα ανασυνδυασμένης ανθρώπινης LBR πρωτεΐνης υπέστησαν κατεργασία με διάλυμα οξικού ουρανίου και εξετάστηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η μεγάλη διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου θα επέτρεπε να ανιχνευτούν ολιγομερή σωματίδια σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους, εφόσον αυτά σχηματίζονταν. Πράγματι, παρατήρηση των δειγμάτων αποκάλυψε το σχηματισμό ομοιόμορφων σωματιδίων διαμέτρου ~30nm, τα οποία κατά πάσα πιθανότητα αντιστοιχούν σε ολιγομερή σύμπλοκα του LBR. Το μεγάλο τους μέγεθος υποδηλώνει ότι σχηματίζονται από μεγάλο αριθμό υπομονάδων, ο οποίος έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί με τη χρήση αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης. Τα αποτελέσματα μετά από φυγοκέντρωση σε ισορροπία έδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης βρισκόταν σε μονομερή μορφή –η οποία λόγω του μικρού μοριακού της βάρους δεν αναμένεται να φανεί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο- ενώ ανιχνεύτηκαν και σωματίδια που αντιστοιχούσαν σε 12μερή και 24μερή σύμπλοκα αντίστοιχα. Η πολύ μικρή συγκέντρωση των τελευταίων που έφτανε στα όρια ανίχνευσης της τεχνικής δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για το μέγεθός τους. Παρόλα αυτά, το μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων, όπως αυτά φάνηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αλλά και η μορφολογία των χαρακτηριστικών νησίδων που σχηματίζει η ενδογενής πρωτεΐνη περιφερικά του πυρηνικού φακέλου (Εικ. 1.4) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα ολιγομερή σύμπλοκα του LBR αποτελούνται από τουλάχιστον δώδεκα υπομονάδες.

Όσον αφορά το τρόπο σχηματισμού των ολιγομερών συμπλόκων του LBR, οι δοκιμές συγκατακρήμνισης με πυρηνικά εκχυλίσματα και με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έδειξαν ότι κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διαδραματίζει η RS περιοχή. Αυτό το εύρημα αναδεικνύει πλέον τη συγκεκριμένη περιοχή ως σημαντικό ρυθμιστή της δράσης του LBR, καθώς αναμένεται ο ολιγομερισμός της πρωτεΐνης να παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της. Ο ολιγομερισμός του LBR μέσω της RS περιοχής εκτός από τις πειραματικές παρατηρήσεις, υποστηρίζεται και από τη γνώση που υπάρχει γύρω από άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν RS περιοχές. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας συναντώνται κατά κύριο λόγο και έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία ματίσματος του RNA (RNA splicing)





(Graveley, 2000). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μηχανισμός δράσης αυτών των παραγόντων ματίσματος, ο οποίος αν και δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, φαίνεται να βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των RS περιοχών τους. Αρχικά επικράτησε η αντίληψη ότι οι RS περιοχές των παραγόντων ματίσματος λειτουργούν ως ενεργοποιητές της διαδικασίας συγκρότησης του συμπλόκου του ματίσματος (spliceosome) μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους παράγοντες που περιέχουν παρόμοια τμήματα (Amrein et al, 1994, Labourier et al, 1999). Οι παρατηρήσεις αυτές φωτογραφίζουν τις RS περιοχές σαν τμήματα που έχουν την ικανότητα να συνδέονται μεταξύ τους. Ρυθμιστικό ρόλο στη σύνδεση αυτή παίζουν οι φωσφορυλίωσεις καταλοίπων σερίνης των RS περιοχών, που επιπλέον καθορίζουν και την κυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών (Colwill et al, 1996, Xiao and Manley, 1998). Τα τελευταία όμως χρόνια αρχίζει να διαφαίνεται ότι οι RS περιοχές των παραγόντων ματίσματος αλληλεπιδρούν άμεσα με συγκεκριμένες περιοχές του mRNA και μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων επάγεται η διαδικασία του ματίσματος (Shen et al, 2004, Shen and Green, 2006). Για κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές, ανάμεσά τους και για τον LBR, υποστηρίχθηκε πρόσφατα ότι η μη ειδική σύνδεσή τους με βακτηριακό RNA αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους, με τον ίδιο τρόπο που την αναστέλλει και η φωσφορυλίωσή τους (Nikolakaki et al, 2008).

Εν ολίγοις ο ολιγομερισμός του LBR διαμεσολαβείται μεν από την RS περιοχή του, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αλλά είναι πιθανόν να επηρεάζεται άμεσα από τη φωσφορυλίωση της περιοχής αυτής. Πολύτιμη για τη διερεύνηση μιας τέτοιας πιθανότητας θα ήταν η λεπτομερής και ποσοτική σύγκριση, με πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, τρισδιάστατης ανασύστασης και αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης, ολιγομερών LBR και μεταλλαγμένων μορφών του σε διαφορετικές καταστάσεις φωσφορυλίωσης. Μια προσέγγιση αυτού του είδους θα μπορούσε να οδηγήσει στον ακριβή χαρακτηρισμό του τρόπου οργάνωσης του LBR σε ολιγομερή.



## 4.6 Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή είναι:

- Η δομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε απέδειξε ότι ο LBR περιέχει όντως μια περιοχή με τριτοταγή δομή τύπου Tudor domain και με δομική και λειτουργική αυτοτέλεια
- Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της περιοχής αυτής έδειξε ότι το Tudor domain του LBR αλληλεπιδρά *in vitro* με την H3 και με καμμία από τις άλλες ιστόνες ή με νουκλεϊκά οξέα
- Το Tudor domain δεν συνδέεται με νουκλεοσώματα και ολιγομερή H3/H4, αλλά μόνο με ελεύθερη H3
- Η σύνδεση του Tudor domain του LBR είναι ανεξάρτητη της παρουσίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην H3
- Από πλευράς H3 η σύνδεση γίνεται μέσω του κεντρικού τμήματός της
- Στην αναγνώριση της H3 από το Tudor συμμετέχει μία εκτεταμένη επιφάνεια και όχι ο χαρακτηριστικός αρωματικός κλωβός των Tudor domains
- Σε αντίθεση με άλλα Tudor domains, αυτό του LBR φαίνεται να μην αναγνωρίζει ούτε απλά μεθυλιωμένα κατάλοιπα Lys ή Arg
- Υπεύθυνη για τη σταθερή σύνδεση του LBR με νουκλεοσώματα είναι η περιοχή που είναι πλούσια σε RS διπεπίδια (RS περιοχή), η οποία αλληλεπιδρά και με τις απομονωμένες ιστόνες H3 και H4
- Η RS περιοχή αναδεικνύεται επίσης υπεύθυνη για τον ολιγομερισμό του LBR
- Τα ολιγομερή του LBR αποτελούνται από 12-24 υπομονάδες



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[The following text is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a list of references or a bibliography.]



- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science (2002) 4<sup>th</sup> edition
- Amrein H, Hedley ML, Maniatis T. *The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2*. *Cell* (1994) 76: 735-746
- Bax A, Ikura M. *An efficient NMR technique for correlating the proton and <sup>15</sup>N backbone amide resonances with the alpha-carbon of the preceding residue in uniformly <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C enriched proteins*. *J. Biomol. NMR* (1991) 1:99-104
- Bax A, Clore GM, Gronenborn AM. *J. Magn. Reson.* (1990) 425
- Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JA, Thompson JR, Chen J, Mer G. *Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair*. *Cell* (2006) 127:1361-1373
- Brahms H, Meheus L, de Brabandere V, Fischer U, Luhrmann R. *Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with SMN protein*. *RNA* (2001) 7:1531-1542
- Brener A, Haner M, Aebi U. *Negative staining*. *Cell Biology: a laboratory handbook* (1998) 2<sup>nd</sup> edition, vol. 3:277-283
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges N, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. *Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination*. *Acta Cryst.* (1998) D54, 905-921
- Burke B, Gerace L. *A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis*. *Cell* (1986) 44:639-652
- Cairns BR. *Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies*. *Nature Struct. Mol. Biol.* (2007) 14:989-996
- Charier G, Couprie J, Alpha-Bazin B, Meyer V, Quemeneur E, Guerois R, Callebaut I, Gilquin B, Zinn-Justin S. *The Tudor tandem of 53BP1: A new structural motif involved in DNA and RG-rich peptide binding*. *Structure* (2004) 12:1551-1562
- Colwill L, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI. *The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution*. *EMBO J.* (1996) 15: 265-275
- Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. *Regulated nucleosome mobility and the histone code*. *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) 11:1037-1043
- Cote J, Richard S. *Tudor domains bind symmetrically dimethylated arginines*. *J. Biol. Chem.* (2005) 280:28476-28483
- Craig JM. *Heterochromatin-many flavors, common themes*. *BioEssays* (2004) 27:17-28
- De Koning L, Corpet A, Haber JE, Almouzni G. *Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic*. *Nature Struct. Mol. Biol.* (2007) 14: 997-1007
- DeLano WL. *The Pymol molecular graphics system* (2002) <http://www.pymol.org>
- Desilva H, Lee K, Osley MA. *Functional dissection of yeast Hir1p, a WD repeat-containing transcriptional corepressor*. *Genetics* (1998) 148: 657-667
- Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ. *Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail*. *J. Mol. Biol.* (2003) 327:85-96
- Duband-Goulet I, Courvalin JC. *Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker*. *Biochemistry* (2000) 39: 6483-6488
- Dunker, AK, Obradovic, Z. *The protein trinity—linking function and disorder*. *Nature Biotechnol.* (2001)19: 805–806



- Dyson, HJ, Wright, PE. *Intrinsically unstructured proteins and their functions*. **Nature Rev. Mol. Cell. Biol.** (2005) 6: 197-208
- Ellenberg J, Siggia DE, Moreira JE, Smith CL, Presley JF, Worman HJ, Lippincott-Schwartz J. *Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis*. **J. Cell Biol.** (1997) 138: 1193-1206
- English CM, Adkins MW, Carson JJ, Churchill MEA, Tyler JK. *Structural basis for the histone chaperone activity of ASF1*. **Cell** (2006) 127: 495-508
- Fink, AL. *Natively unfolded proteins*. **Curr. Opin. Struct. Biol.** (2005) 15: 35-41.
- Franke W. *Structure, biochemistry and functions of the nuclear envelope*. **Init. Rev. Cytol.** (1974) Suppl.
- Freitas MA, Sklenar AR, Parthun MR. *Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications*. **J. Cell. Biochem.** (2004) 92:691-700
- Georgatos SD, Blobel G. **J. Cell Biol.** (1987) 105:117-125
- Glenn LE, Searles LL. *Distinct domains mediate the early and late functions of the Drosophila ovarian tumor proteins*. **Mech. Dev.** (2001) 102:181-191
- Graveley BR. *Sorting out the complexity of SR protein functions*. **RNA** (2000) 6: 1197-1211
- Grzesiek S, Bax A. **J. Am. Chem. Soc.** (1992a) 201
- Grzesiek S, Bax A. **J. Am. Chem. Soc.** (1992b) 6291
- Guntert P, Mumenthaler C, Wuthrich K. *Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA*. **J. Mol. Biol.** (1997) 273:283-298
- Haragushi T, Holaska JM, Yamane M, Koujin T, Hashigushi N, Mori C, Wilson KL, Hiraoka Y. *Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. **Eur. J. Biochem.** (2004) 271: 1035-1045
- Henikoff S. *Histone modifications: Combinatorial complexity or cumulative simplicity?* **PNAS** (2005) 102:5308-5309
- Holm L, Sander C. *Dali: a network tool for protein structure comparison*. **Trends Biochem. Sci.** (1995) 20: 478-480
- Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM. *Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A*. **Science** (2006) 312:748-751
- Hutchison CL. *Lamins: building blocks or regulators of gene expression?* **Nature reviews/Molecular Cell Biology** (2002) 3:848-858
- Huyen Y, Zgheib O, DiTullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi E, Halazonetis TD. *Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks*. **Nature** (2004) 432: 406-411
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S. *Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail*. **Science** (2002) 295:2080-2083
- Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JL, Kusch T. *In and out: histone variant exchange in chromatin*. **TIBS** (2005) 30:680-687
- Johnson BA, Blevins RA. *NMR View-a computer program for the visualization and analysis of NMR data*. **J. Biomol. NMR** (1994) 4:603-614
- Kalverda B, Röling MD, Fornerod M. *Chromatin organization in relation to the nuclear periphery*. **FEBS Lett.** (2008) 582:2017-2022.
- Kaufman PD, Kobayashi R, Kessler N, Stillman B. *The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor 1: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication*. **Cell** (1995) 81: 105-1114



- Kim J, Daniel J, Esposito A, Lake A, Krishna M, Xia L, Zhang Y, Bedford MT. *Tudor, MBT and chromodomains gauge the degree of lysine methylation*. **EMBO Rep.** (2006) 7:397-403
- Kirkpatrick S, Gelatt CD, Vecchi MP. *Optimization by simulated annealing*. **Science** (1983) 220:671-680
- Koradi R, Billeter M, Wuthrich KJ. *MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures*. **J. Mol. Graph** (1996) 14:51-55
- Labourier E, Bourbon HM, Gallouzi IE, Fostier M, Allemand E, Tazi J. *Antagonism between RSF1 and SR proteins for both splice-site recognition in vitro and Drosophila development*. **Genes and Dev.** (1999) 13: 740-753
- Laskowski RA, Rullmann JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. *AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR*. **J. Biomol. NMR** (1996) 8:477-486
- Li, X., Romero, P, Rani, M, Dunker, AK, Obradovic, Z. *Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions*. **Genome Informatics** (1999) 10: 30-40.
- Lin F, Noyer CM, Ye Q, Courvalin JC, Worman HJ. *Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear protein LBR*. **Hepatology** (1996) 23:57-61
- Loyola A, Almouzni G. *Histone chaperones, a supporting role in the limelight*. **BBA** (2004) 1677: 3-11
- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molecular Cell Biology* (2000) 4<sup>th</sup> edition, W.H. Freeman
- Luger K, Maeder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. **Nature** (1997) 389:251-259
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Wayne MJ, Richmond TJ. *Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria*. **J. Mol. Biol.** (1997b) 272:301-311
- Luger K. *Dynamic nucleosomes*. **Chromosome Research** (2006) 14:5-16
- Majumdar A, Wang H, Morshauer RC, Zuiderweg ERP. **J. Biomol. NMR** (1993) 387
- 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*. **TIBS** (2003) 28:69-74
- Makatsori D, Kourmouli N, Polioudaki H, Shultz LD, McLean K, Theodoropoulos PA, Singh PB, Georgatos SD. *The inner nuclear membrane protein-lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope*. **J. Biol. Chem.** (2004) 279:25567-25573
- Mousson F, Lautrette A, Thuret JY, Agez M, Courbeyrette R, Amigues B, Becker E, Neumann JM, Guerois R, Mann C, Ochsenbein F. *Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications*. **PNAS** (2005) 102: 5975-5980
- Muto S, Senda M, Akai Y, Sato L, Susuki T, Nagai R, Senda T, Horikoshi M. *Relationship between the structure of SET/TAF- $\beta$ /INHAT and its histone chaperone activity*. **PNAS** (2007) 104: 4285-4290
- Namboodiri VMH, Akey IV, Schmidt-Zachmann MS, Head JF, Akey CW. *The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus*. **Structure** (2004) 12: 2149-2160
- Nikolakaki E, Simos G, Georgatos SD, Giannakouros T. *A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins*. **J. Biol. Chem.** (1996) 271:8365-8372



- Nikolakaki E, Drosou V, Sanidas I, Peidis P, Papamarcaki T, Iakoucheva LM, Giannakouros T. *RNA association or phosphorylation of the RS domain prevents aggregation of RS domain-containing proteins.* **Biochim. Biophys. Acta** (2008) 1780: 214-225
- Noma K, Allis CD, Grewal SI. *Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries.* **Science** (2001) 293:1150-1155
- Oganesyan N, Kim SH, Kim R. *On-column refolding for crystallization.* **J. Struct. Funct. Genomics** (2005) 6:177-182
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. *Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein as a histone chaperone.* **FEBS Lett.** (2001) 506: 272-276
- Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P, Travers AA. *The structural basis for the recognition of acetylated H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p.* **EMBO J.** (2000) 19:6141-6149
- Pan SH, Malcolm BA. *Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21(DE3).* **Biotechniques** (2000) 29:1234-1238
- Park YJ, Luger K. *The structure of nucleosome assembly protein 1.* **PNAS** (2006) 103: 1248-1253
- Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, Giannakouros T, Georgatos SD. *Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear protein LBR and heterochromatin protein 1.* **EMBO Rep.** (2001) 2:920-925
- Ponting CP. *Tudor domains in proteins that interact with RNA.* **TIBS** (1997) 22:51-2
- Ramos A, Hollingworth D, Adinolfi S, Castets M, Kelly G, Frenkiel TA, Bardoni B, Pastore A. *The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: A platform for protein-protein interaction.* **Structure** (2006) 14:21-31
- Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular cloning: A laboratory manual.* **Cod Spring Harbor Laboratory Press** (1989) 2<sup>nd</sup> edition
- Sattler M, Schleucher J, Griesinger C. *Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients.* **Prog. Nucl. Magn. Res. Spectr.** (1999) 34:93-158
- Sayer PJ, Goble ML, Oram M, Mark L. *DNA topoisomerase protocols.* **Methods Mol. Biol.** (2001) 95:25-33
- Schuler E, Lin F, Worman HJ. *Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane.* **J. Biol. Chem.** (1994) 269:11312-11317
- Seet BT, Dikic I, Zhou MM, Pawson T. *Reading protein modifications with interaction domains.* **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** (2006) 7:473-483
- Selenko P, Sprangers R, Stier G, Buhler D, Fischer U, Sattler M. *SMN Tudor domain structure and its interaction with Sm proteins.* **Nature Struct. Mol. Biol.** (2001) 8:27-31
- Shaklai S, Amariglio N, Rechavi G, Simon AJ. *Gene silencing at the nuclear periphery.* **FEBS J.** (2007) 274:1383-1392
- Shen H, Kan JL, Green MR. *Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly.* **Molecular Cell** (2004) 13: 367-376
- Shen H, Green MR. *RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through mammals.* **Genes and Dev.** (2006) 20: 1755-1765
- Silve S, Dupuy PH, Ferrara P, Loison G. *Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*.* **Biochim. Biophys. Acta** (1998) 1392:233-244
- Simon RH, Felsenfeld G. *A new procedure for purifying histone pairs H2A+H2B and H3+H4 from chromatin using hydroxylapatite.* **Nucleic Acids Res.** (1979) 6:689-696



- Simos G, Georgatos SD. *The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins.* **EMBO J.** (1992) 11:4027-4036
- Somech R, Shaklai S, Geller O, Amariglio N, Simon AJ, Rechavi G, Gal-Yam EN. *The nuclear envelope protein and transcriptional repressor LAP-2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery and induces histone H4 deacetylation.* **J. Cell Sci.** (2005) 118: 4017-4025
- Sprangers R, Groves MR, Sinning I, Sattler M. *High-resolution x-ray structures of the SMN Tudor domain: Conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues.* **J. Mol. Biol.** (2003) 327: 507-520
- Strahl BD, Allis CD. *The language of covalent histone modifications.* **Nature** (2000) 403:41-45
- Takano M, Koyama Y, Ito H, Hoshiro H, Onogi H, Hagiwara M, Furukawa K, Horigome T. *Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in xenopus egg extracts.* **J. Biol. Chem.** (2004) 279:13265-13271
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel D. *How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers.* **Nature Struct. Mol. Biol.** (2007) 14:1025-1040
- The QIAexpressionist: *A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.* (2003) 5<sup>th</sup> edition
- Ulbert S, Platani M, Boue S, Mattaj IW. *Direct membrane protein-DNA interactions required early in nuclear envelope assembly.* **J. Cell Biol.** (2006) 173:469-476
- Vriend G. *WHAT IF: A molecular modeling and drug design program.* **J. Mol. Graph.** (1990) 8:52-56
- Wilkinson WL, Holaska JM, Zhang Z, Sharma A, Manilal S, Holt I, Stamm S, Wilson KL, Morris GE. *Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor Yt521-B.* **Eur. J. Biochem.** (2003) 270: 2459-2466
- Wolffe AP, Hayes JJ. *Chromatin disruption and modification.* **Nucleic Acids Res.** (1999) 27:711-720
- Worman HJ, Yuan J, Blobel G, Georgatos SD. *A lamin B receptor in the nuclear envelope.* **PNAS** (1988) 85:8531-8534
- Worman HJ, Evans KD, Blobel G. *The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: A polytopic protein with eight potential transmembrane domains.* **J. Cell. Biol.** (1990) 111:1535-1542
- Wuthrich K. *NMR of protein and nucleic acids.* Wiley:New York (1986)
- Xia B, Tsui D, Case DA, Dyson HJ, Wright PE. *Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulations in vacuum, with a generalized Born model and with explicit water.* **J. Biomol. NMR** (2002) 2:317-331
- Xiao SH, Manley JL. *Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2.* **EMBO J.** (1998) 17: 6359-6367
- Yamazaki T, Julie D, Kay L. *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) 115:11054-11055
- Ye Q, Worman HJ. *Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane.* **J. Biol. Chem.** (1994) 269:11306-11311
- Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC, Worman HJ. *Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR.* **J. Biol. Chem.** (1997) 272:14983-14989-





Zhang P, Du J, Sun B, Dong X, Xu G, Zhou J, Huang Q, Liu Q, Hao Q, Ding J. *Structure of human MRG15 chromo domain and its binding to lys36-methylated histone H3*. *Nucleic Acids Res.* (2006) 34: 6621-6628



# ΠΕΡΙΛΗΨΗ



## **Δομικός-λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης του πυρηνικού φακέλου- LBR**

### **Σταμάτιος Λιοκάτης**

Ο υποδοχέας της λαμίνης B (Lamin B Receptor, LBR) είναι μία συντηρημένη σε όλους τους ανώτερους οργανισμούς πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης. Αναγνωρίστηκε από την ικανότητά της να συνδέεται στη λαμίνη B. Είναι πλέον γνωστό ότι ο LBR συμμετέχει σε μεγάλα πολυδύναμα σύμπλοκα, τα οποία συμμετέχουν στον επανασχηματισμό του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της μίτωσης, συνδέουν τον πυρηνικό φάκελο και την πυρηνική λάμινα με την περιφερική ετεροχρωματίνη κατά τη μεσόφαση και πιθανώς λειτουργούν ως ‘παγίδες συγγένειας’ για συστατικά του πυρήνα που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στην ενεργοποίηση-απενεργοποίηση της μεταγραφής.

Ο ανθρώπινος LBR περιέχει 615 αμινοξέα και αποτελείται από ένα υδρόφιλο αμινοτελικό άκρο που κείται προς το πυρηνόπλασμα και πιθανολογείται ότι ευθύνεται για τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης, από πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα που παρουσιάζουν ομολογία με αναγωγάσες των στερολών και από ένα μικρό καρβοξυτελικό άκρο. Αναλύσεις με εργαλεία βιοπληροφορικής έδειξαν ότι το αμινοτελικό άκρο του LBR αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές: α) από ένα domain που με βάση την αλληλουχία του μπορεί να ανήκει στην κατηγορία των Tudor domains (αμινοξέα 1-60), β) ένα τμήμα 110 αμινοξέων που δεν παρουσιάζει ομοιότητες στην αλληλουχία του με άλλες πρωτεΐνες, και γ) μία ισχυρά φορτισμένη περιοχή 40 αμινοξέων, πλούσια σε διπεπτίδια σερίνης-αργινίνης, η οποία υπόκειται σε φωσφορυλιώσεις από τις κινάσες SRPK1 και cdc2 και έχει όλα τα χαρακτηριστικά των ‘intrinsically unstructured’ πρωτεϊνών.

Τα Tudor domains είναι σχετικά μικρά (50-70 αμινοξέα) πρωτεϊνικά μοτίβα, τα οποία πήραν το όνομά τους από τη πρωτεΐνη Tudor της *drosophila*. Επειδή βρέθηκαν αρχικά κυρίως σε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούσαν με RNA, θεωρήθηκαν μοτίβα που συνδέονται σε RNA. Παρόλα αυτά, δεν υπήρξαν έως τώρα πειραματικές ενδείξεις που να επιβεβαιώνουν τη παραπάνω υπόθεση. Πρόσφατα, μετά από εκτεταμένη σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών και δομών, φάνηκε ότι τα Tudor μαζί με άλλα μοτίβα (PWWP, chromodomain, MBT, Agenet) που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη σχηματίζουν μια υπεροικογένεια μοτίβων με κοινά δομικά χαρακτηριστικά.

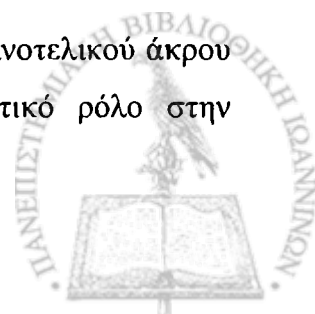


- Παρά τις εκτεταμένες μελέτες των τελευταίων ετών ο ακριβής ρόλος των Tudor domains παραμένει αδιευκρίνιστος. Οι έως τώρα δομικές μελέτες αναφέρουν ότι πιθανώς τα συγκεκριμένα μοτίβα αλληλεπιδρούν με πρωτεϊνικούς παράγοντες και υπάρχουν ενδείξεις ότι μεθυλιωμένες λυσίνες ή αργινίνες αποτελούν τους φυσιολογικούς προσδέτες τους. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν αναδείχθηκε ο ρόλος του αρωματικού κλωβού ως δομικό χαρακτηριστικό στην επιφάνεια των Tudor domains στον οποίο εισέρχονται τα μεθυλιωμένα κατάλοιπα, παρόμοια με το τρόπο αναγνώρισης των τροποποιημένων ιστονικών αμινοτελικών ουρών από τα chromodomains. Οι τροποποιήσεις των ιστονών θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση, καθώς σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.

Σε μία προσπάθεια να διερευνήσουμε σε μοριακό επίπεδο τις αλληλεπιδράσεις του LBR με τη χρωματίνη και τον τρόπο οργάνωσης του μορίου του, μελετήσαμε ξεχωριστά τα τρία διακριτά τμήματα της αμινοτελικής του περιοχής.

Αρχικά, υπολογίστηκε σε ατομική λεπτομέρεια η τρισδιάστατη δομή του Tudor domain με φασματοσκοπία NMR και μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του με βιοχημικές και βιοφυσικές τεχνικές. Το Tudor domain του LBR αναδιπλώνεται σε μία δομή β-βαρελιού, παρόμοια με αυτή που αποκτούν και τα άλλα μέλη της Tudor υπερικογένειας. Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών με πυρηνικά εκχυλίσματα, φυσικές και ανασυνδυνασμένες ιστόνες έδειξαν ότι το Tudor domain του LBR αλληλεπιδρά ειδικά με το κεντρικό τμήμα της ιστόνης H3, ανεξάρτητα από τη παρουσία τροποποιήσεων. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα όταν η H3 βρίσκεται ελεύθερη, ενώ δεν παρατηρείται όταν η H3 βρίσκεται ενσωματωμένη στο νουκλεόσωμα, κάτι που υποδεικνύει μία παροδική αλληλεπίδραση μεταξύ LBR και H3 σε πρωταρχικά στάδια του σχηματισμού της περιφερικής χρωματίνης ή μία αλληλεπίδραση με τη χρωματίνη να βρίσκεται σε στάδιο αναδιοργάνωσης όπου η H3 δεν έχει τροποποιηθεί και πιθανώς ούτε έχει αναδιπλωθεί ακόμα. Τα δομικά χαρακτηριστικά της παραπάνω αλληλεπίδρασης δείχνουν ότι το Tudor domain του LBR αλληλεπιδρά με την H3 διαφορετικά από το καθιερωμένο τρόπο που χρησιμοποιούν άλλα Tudor domains, τα οποία αναγνωρίζουν μεθυλιωμένα κατάλοιπα. Ο τρόπος αναγνώρισης της H3 από το Tudor domain του LBR δείχνει ότι στην αλληλεπίδραση συμμετέχουν αμινοξέα που βρίσκονται και στις δύο β-πτυχωτές επιφάνειες και σχηματίζουν μία εκτεταμένη επιφάνεια στη μία πλευρά του μορίου.

Βιοχημικές δοκιμές χρησιμοποιώντας και τις άλλες περιοχές του αμινοτελικού άκρου του LBR έδειξαν ότι η περιοχή με τα SR διπεπτίδια παίζει σημαντικό ρόλο στην



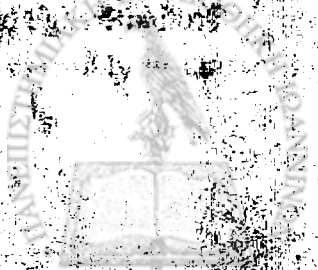
αλληλεπίδραση του LBR με τη χρωματίνη, καθώς συνδέεται σε απομονωμένα νουκλεοσώματα και σε απομονωμένες ιστόνες H3 και H4.

Η περιοχή RS φάνηκε επίσης να ευθύνεται για τον ολιγομερισμό του LBR, καθώς μπορεί και αλληλεπιδρά με ολόκληρη τη φυσική πρωτεΐνη αλλά και με το ανασυνδυασμένο αμινοτελικό τμήμα της. Χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική μικροσκοπία και αναλυτική υπερφυγοκέντρωση επιτεύχθηκε η αναπαράσταση των ολιγομερών σωματιδίων του LBR και η εκτίμηση του μεγέθους τους.



## SUMMARY

[The following text is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a multi-paragraph summary or report.]



# ***Structural and functional characterization of the nuclear protein LBR***

**Stamatios Liokatis**

LBR is a ubiquitous integral protein of the inner nuclear membrane and was initially characterized by virtue of its ability to associate with nuclear lamin B. This protein is thought to participate in a variety of nuclear functions, including tethering of the nuclear lamina to the nuclear envelope and “trapping” of nuclear components that are involved in chromatin remodeling and transcriptional inactivation.

Human LBR is composed of 615 amino acids, comprising a hydrophilic N-terminal domain of ~210 residues that faces the nucleoplasm and is believed to mediate binding to nuclear lamina and peripheral heterochromatin, multiple transmembrane segments homologous to yeast sterol C-14 reductase and a short C-terminal tail. Biocomputing analysis suggests that the N-terminal nucleoplasmic part contains three distinct regions: (a) a small globular domain which spans the first 60 residues and is a putative Tudor domain; (b) a 110-amino acid segment with no apparent sequence kinship to other proteins; and (c) a highly charged 40-residue hinge region that is rich in Arg-Ser dipeptide motifs (RS region). The latter segment has features of a “natively disordered” protein and is punctuated by multiple RSPK1 phosphorylation sites.

Tudor domains are 50-70 amino acid modules, named after the synonymous *Drosophila* protein, which harbors 11 such copies. They were initially thought to be RNA-binding motifs, mainly because they were mostly identified in RNA-binding proteins. However, a combination of sequence- and structure-dependent approaches, has recently shown that Tudor, along with PWWP, chromodomain, MBT and Agenet, comprise a protein structural superfamily, called the ‘Royal family’. The members of this superfamily occur in a variety of chromatin-associated proteins and are thought to originate from a common ancestor.

Despite extensive studies in the last years, the exact role of Tudor domains remains elusive, and it is, most likely, quite diverse. Structural studies of the Tudor domains from several proteins provided evidence that methylated arginine or lysine could represent physiological ligands for these modules. In all reported cases of Tudor interactions the modified bulky side-chains of the ligand’s Arg or Lys residues are accommodated by an aromatic cage on the surface of the domain, which is highly reminiscent of the one present in



several chromodomains and known to comprise the binding site for modified histone tails. Modifications of histones are believed to play a major role in gene regulation and are related, directly or indirectly, with chromatin-remodeling.

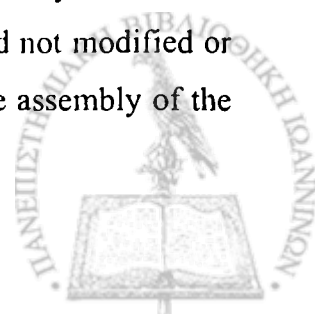
In an attempt to elucidate the molecular basis of LBR interactions with chromatin and its *in situ* organization at the nuclear envelope we dissected LBR into structurally-functionally relevant domains and studied their interactions with chromatin components and their role in the oligomerization of the molecule, using a variety of biochemical and biophysical methods. Electron microscopy and analytical ultracentrifugation experiments confirmed the previously suggested oligomerization of LBR and led to an estimation of the mass of the oligomeric particles. Biochemical experiments suggested that the region of LBR responsible for its oligomerization is the RS segment.

We also determined the atomic structure of the putative Tudor domain by NMR spectroscopy, and showed that it adopts a  $\beta$ -barrel fold, which is similar to that of all the other members of the Tudor superfamily and is made-up by five  $\beta$ -strands that are organized in two, 3-stranded anti-parallel  $\beta$ -sheets. We also identified an aromatic cluster on the surface of the domain which is reminiscent of the aromatic cages found in several chromodomains and is formed by the side chains of highly conserved aromatic residues.

Our biochemical experiments suggested a specific interaction between LBR-Tudor and non-assembled H3 that is mediated by the core domain of H3 and does not depend on H3 modifications. This work also indicated that the aromatic cluster of LBR-Tudor does not exhibit the "binding pocket" features of other Tudor domains, at least as far as its interaction with H3 is concerned. Mapping experiments of the binding interface between LBR-Tudor and H3 pointed to an extended surface on one side of the domain, which is formed by residues from both of its  $\beta$ -sheets and not by the residues of the aromatic cluster.

Furthermore, biochemical binding assays using the other parts of LBR suggested that the stable interaction between LBR and chromatin is mediated by its RS region, which binds not only to isolated H3 and H4 histones, but also to fully assembled nucleosomes.

Based on our results and considering the highly dynamic nature of chromatin, the interaction of LBR with histones could involve temporally distinct steps. Binding of LBR-Tudor to unmodified and non-assembled H3 could result either from a transient interaction between LBR and H3 at the very early stages of peripheral chromatin assembly or from an interaction with a chromatin state 'in transition', in which H3 is exposed and not modified or even not folded yet, while the RS region could serve as a "platform" for the assembly of the





H3/H4 tetramer. This scenario is compatible with the presumed role of nuclear envelope as a platform for peripheral heterochromatin assembly and chromatin remodeling.

