

Μαυρομάτης Κωνσταντίνος

**ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗ ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ  
ΨΥΧΡΟΦΙΛΙΚΟΤΗΤΑΣ.**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗΣ  
ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΩΝ C5 ΜΕΘΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΩΝ**

Υπ. Καθ. Μπουριώτης Βασίλης  
Κοκκινίδης Μιχάλης



Ηράκλειο 1997

<b>1</b>	<b>Εισαγωγή</b>	<b>4</b>
1.1	Σκοπός της παρούσας εργασίας.	4
<b>2</b>	<b>Χιτινάσες</b>	<b>5</b>
2.1	Γενικά για τις χιτινάσες.	5
<b>3</b>	<b>Μεθυλάσες</b>	<b>6</b>
3.1	Εισαγωγή	6
3.2	C5 Mtases	6
3.2.1	Οργάνωση της αλληλουχίας	6
3.2.2	Οργάνωση της δομής των μεθυλτρανσφερασών.	7
3.2.3	Η μεθυλτρανσφεράση M.PspPI	9
<b>4</b>	<b>Ψυχρόφιλα ένζυμα</b>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.1	Εισαγωγή	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.1.1	Χαρακτηριστικά των ενζύμων	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.1.2	Μοριακά-δομικά χαρακτηριστικά	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.1.3	Βιοτεχνολογικές εφαρμογές	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<b>5</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>23</b>
5.1	Μελέτη της οργάνωσης της μεταβλητής περιοχής στις μεθυλάσες	23
5.2	Συγκρίσεις της M.PspPI με όλες τις μεθυλάσες, με στόχο την αποκάλυψη ιδιαίτερων ψυχρόφιλων χαρακτηριστικών.	30
5.2.1	Χρήση της ίδιας μεθόδου για την ανάλυση των α-αμυλασών.	31
5.3	Συγκρίσεις της M.PspPI με τις M.HhaI M.HaeIII	32
5.3.1	Μελέτη των αλληλουχιών κατά αμινοξύ	32
5.3.2	Μελέτη της αλληλουχίας με τη χρήση παραθύρου	36
5.3.3	Μελέτη της ευελιξίας των πρωτεϊνών	38
<b>6</b>	<b>Καθαρισμός χιτινάσης από ψυχρόφιλο βακτήριο</b>	<b>10</b>
6.1	Επιλογή του στελέχους που θα χρησιμοποιηθεί.	10
6.2	Κλωνοποίηση του ενζύμου σε φορέα έκφρασης	11
6.3	Κλωνοποίηση του αρχικού τμήματος του γονιδίου της χιτινάσης με τη χρήση PCR.	

6.3.1	Μεταφορά του αρχικού τμήματος του γονιδίου της χιτινάσης στο φορέα pRSET _____	13
6.3.2	Εισαγωγή του υπολοίπου τμήματος του γονιδίου της χιτινάσης _____	14
<b>6.4</b>	<b>Καθαρισμός της χιτινάσης με μεθόδους χρωματογραφίας.</b> _____	<b>15</b>
6.4.1	Ανιοντοανταλλακτική στήλη Q <sub>FF</sub> _____	16
6.4.2	Στήλη υδροξυαπατίτη _____	17
6.4.3	Κατιοντοανταλλακτική στήλη S <sub>FF</sub> _____	18
<b>7</b>	<b>Συμπεράσματα-συζήτηση.</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<b>7.1</b>	<b>Συμπεράσματα για την οργάνωση της μεταβλητής περιοχής των μεθυλασών.</b> _	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<b>7.2</b>	<b>Σύγκριση μεσόφιλων και ψυχροφίλων ενζύμων.</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
7.2.1	Διαφοροποιήσεις στην M.PspPI _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.2.2	Αξιολόγηση της μεθόδου σύγκρισης. _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>8</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
8.1.1	Κλωνοποίηση και καθαρισμός της χιτινάσης _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9</b>	<b>Παράρτημα I. Αξιολόγηση του πίνακα διαφοροποίησης</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<b>9.1</b>	<b>Σύγκριση με τους πίνακες της σειράς Blosum</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<b>9.2</b>	<b>Σύγκριση με τους πίνακες της σειράς PAM.</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<b>10</b>	<b>Παράρτημα II. Μονοψήφιος κώδικας των αμινοξέων.</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<b>11</b>	<b>Βιβλιογραφία</b> _____	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

## 1 Εισαγωγή

## 2 Σκοπός της παρούσας εργασίας.

Στην παρούσα εργασία ξεκίνησε η μελέτη της χιτινάσης από το ψυχρόφιλο βακτήριο *Arthrobacter sp.* (str. TAD20). Η χιτινάση αυτή έγινε προσπάθεια να καθαριστεί ώστε να μελετηθεί και να διαπιστωθεί αν παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά των ψυχροφίλων πρωτεϊνών. Στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί σαν πειραματικό μοντέλο για την μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των ψυχροφίλων μορίων σε μοριακό επίπεδο.

Παράλληλα έγινε μελέτη των χαρακτηριστικών των ψυχροφίλων ενζύμων βασισμένη στη συγκριτική μελέτη της ψυχρόφιλης C5- μεθυλτρανσφεράσης *M.PspPI* με τις μεσόφιλες και ειδικότερα με τις *M.HhaI* και *M.HaeIII* των οποίων η δομή είναι γνωστή, καθώς και των α-αμυλασών με την ψυχρόφιλη α-αμυλάση από *Alteromonas haloplanctis*.

Στην ίδια εργασία μελετήθηκε η μεταβλητή περιοχή των C5- μεθυλτρανσφερασών, και έγινε μία προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών λειτουργίας της μεταβλητής περιοχής αυτών των ενζύμων.

#### 4 Γενικά για τις χιτινάσες.

Η χιτίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές της β-1-4-N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Απαντάται σε αφθονία στη φύση, σε διάφορες ομάδες οργανισμών (διάτομα, μύκητες, πρωτόζωα, αραχνίδια, έντομα, καρκινοειδή, νηματώδεις κ.α. (Καφετζόπουλος, 1994). Αποτελεί τον δεύτερο σε αφθονία πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Η ενζυμική αποικοδόμηση της επιτυγχάνεται με μία ποικιλία χιτινολυτικών ενζύμων. Τέτοια ένζυμα έχουν βρεθεί σε βακτήρια, μύκητες, φυτά και άλλα ασπόνδυλα, αλλά και σε όλα τα σπονδυλόζωα.

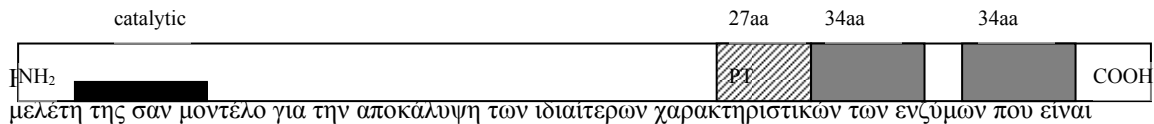
Η μελέτη των χιτινολυτικών ενζύμων έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί φαίνονται να συμμετέχουν στον βιολογικό έλεγχο των φυτοπαθογόνων μυκήτων, μπορούν να παρέχουν ένα μέσο για την αξιοποίηση των αποθεμάτων χιτίνης, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην μετατροπή της χιτίνης σε μορφές με μεγαλύτερη δυνατότητα αξιοποίησης.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια καθαρισμού της χιτινάσης που προέρχεται από το ψυχρόφιλο βακτήριο *Arthrobacter sp.* TAD20 (Τσίγκος, 1997). Το βακτήριο αυτό είναι ένα gram θετικό βακτήριο που απομονώθηκε από θαλάσσια ύδατα της περιοχής της Ανταρκτικής. Στο βακτήριο αυτό έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από μία δραστικότητα χιτινάσης.

Η χιτινάση αυτή κλωνοποιήθηκε από βιβλιοθήκη γονιδιώματος του βακτηρίου. Η μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου έδειξε ότι κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μεγέθους 472 καταλοίπων και μοριακού βάρους 50725 daltons.

Η υπό μελέτη χιτινάση (E.C. 3.2.1.14) κατατάσσεται στην κατηγορία τύπου II των χιτινασών (Henrissat 1991) όπως και όλες οι βακτηριακές χιτινάσες, και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία C των βακτηριακών χιτινασών (Watanabe et.al 1993), όπου κατατάσσονται ετερόκλητες προκαρυωτικές χιτινάσες.

Στο γονίδιο της χιτινάσης ανιχνεύθηκαν περιοχές χαρακτηριστικές για ένζυμα αυτής της κατηγορίας, όπως η καταλυτική περιοχή με μία σειρά καταλοίπων συντηρημένα σε όλες τις προκαρυωτικές χιτινάσες, στα οποία έχει αποδοθεί η καταλυτική ενεργότητα των ενζύμων αυτών (McCarter et.al., 1994), μία περιοχή πλούσια σε P και T με μήκος 27 κατάλοιπα και δυο περιοχές 34 καταλοίπων που είναι σχετικά όμοιες, και αν και εμφανίζονται και σε άλλες χιτινάσες, και λοιπές γλυκοσιδάσες (κυτταρινάσες 1 και 2 από *Bacillus sp.* N4, μαννοσιδάση 2 από *Mus musculus*), δεν τους έχει αποδοθεί κάποιος ρόλος.



**Σχηματική παράσταση του γονιδίου της χιτινάσης. Με μαύρο απεικονίζεται το καταλυτικό κέντρο, με γραμμές η πλούσια σε P και T περιοχή και με γκρι οι περιοχές των 34 αα που παρατηρούνται και σε άλλες γλυκοσυλδρολάσες(Τσίγκος, 1997).**

προσαρμοσμένα σε να λειτουργούν σε χαμηλές θερμοκρασίες

### 6 Εισαγωγή

Η μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται σε πολλούς οργανισμούς (βακτήρια, φυτά, θηλαστικά κ.α.). Η μεθυλίωση γίνεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και καταλύεται από ένζυμα που καλούνται μεθυλτρανσφεράσες. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση της κυτοσίνης και της αδενίνης συμμετέχει κυρίως στο σύστημα περιορισμού-μεθυλίωσης (restriction-modification) και φαίνεται να λειτουργεί ως μηχανισμός άμυνας του κυττάρου έναντι ξένου, συνήθως ιικού DNA (Roberts et.al., 1993). Η μεθυλίωση της αδενίνης συμμετέχει και στον έλεγχο της έναρξης της αντιγραφής του DNA και στην επιδιόρθωση λαθών κατά την αντιγραφή (Noyer-Weidener, 1993). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς φαίνεται επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων, διαφοροποίηση κ.α. (Modrich et.al., 1991, Sanjay et.al., 1994).

Οι μεθυλτρανσφεράσες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο μεθυλίωσης που επιτελούν (Sanjay et.al., 1994, Cheng, 1995).

- Μεθυλίωση στο εξοκυκλικό N της αδενίνης με προϊόν την N6 μεθυλαδενίνη
- Μεθυλίωση στο εξοκυκλικό N της κυτοσίνης με προϊόν την N4 μεθυλκυτοσίνη
- Μεθυλίωση στον άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης με προϊόν την C5 μεθυλκυτοσίνη.

Σε όλες τις περιπτώσεις για την μεθυλίωση χρησιμοποιείται ο συμπαράγοντας S-adenosyl-methionine που είναι και ο δότης της μεθυλομάδας (Sanjay et.al., 1994, Cheng, 1995).

Στην τρίτη κατηγορία (E.C. 2.1.1.37) ανήκει και η μεθυλτρανσφεράση *M.PspPI* (Rina et.al., 1997) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των ψυχρόφιλων χαρακτηριστικών στην εργασία αυτή.

### 7 C5 Mtases

#### 8 Οργάνωση της αλληλουχίας

Οι C5-μεθυλτρανσφεράσες (C5 Mtases, στο εξής μεθυλάσες) παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, είτε προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς είτε από προκαρυωτικούς (Sanjay et.al., 1994, Cheng, 1995b).

Συγκριτική ανάλυση των μεθυλασών δείχνει ότι εμφανίζουν μια ομάδα από δέκα συντηρημένες περιοχές (μοτίβα) που εναλλάσσονται με μη συντηρημένες. Τα μοτίβα αυτά αριθμούνται με λατινικούς αριθμούς από I ως X (Posfai et.al., 1989), και η σειρά τους παραμένει αμετάβλητη σε όλες τις μεθυλάσες που έχουν μελετηθεί ως τώρα.

```

Hhai : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80----- : 22
Psppl : MKFPDNHFSAAIVADTL SVSKRNVEVTQNGKLVPA LDPNIHEKPYTKDQLETFEQFSAMFNSSWCBEHMAVEPSRSYSVVELFACAG : 87
Haeiii : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80----- : 11
                                           Motif I

Hhai : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----*----- : 102
Psppl : CLALCELEQACFRSIVLWNEKDKYACATLRAARPNMNIWIEDI TENVDFTHLGCGV---DLLTCCPCQPFPSYACRDLCEFDLRCITLWF : 170
Haeiii : CLDLCEFRKACFRITICAMEIDRSIMKTYESMHS----AFLIKCDISKHSSDEFKCDCLILGCPQCQSWSECCSLRCHIDDPCKKLYV : 92
Motif I Motif II Motif III Motif IV Motif V

Hhai : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----260----- : 185
Psppl : EMARAIKKEIKPKVFLAENVKGLAENDGERTLSIILKVL EQLCYKLELEWYKAI FYKWPQKRERLIILICVPTDL-YDKIAYEKESDY : 256
Haeiii : EYTRILKQKPIFFLAENVKGLAQRHNRWQBFIQEFDMAQYDDEI-ILLANQYGVVQDRKRVVYIGEPKELNINYP---PIQH : 175
Motif VI Motif VII Motif VIII

Hhai : -----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340----- : 254
Psppl : YKVLTVADALKAGELVDVDVPESTGQIYPERKAEITMSYVPEGCFYRDLPTRIAKEYMKS FYLGGCKTCMAREL-SWDEPSSLTLVCT : 342
Haeiii : LIKPIFFKQVIMD--LRDNPIBALDKNKTNGKRCIYPNHEFYFISSTFPHSRNRVQRWNEPAFTVQASGRQCQLHPQAPVIMKRV-- : 258

Hhai : -----*-----360-----*-----380-----*-----400-----*-----420----- : 327
Psppl : PA---QKQTEKCHPSSE---RPLITREYARIQTFFDDIIEK-CSTVCDIYKQICNAVFWNLALATGKAITIRMLAALKQVFE : 416
Haeiii : -----KRLNRFVECEHLYRRLVREARVQGFPPDFIIFHYESLNDGYRMLCNVFWNLAYEIAKTIKSALEICKGN--- : 330
Motif IX Motif X

```

Τα δέκα μοτίβα μπορούν να αναγνωριστούν σε όλες τις μεθυλάσες. Τα μοτίβα II, III, IX, X πάντως παρουσιάζουν αρκετή ανοχή στις μεταλλάξεις με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται τόσο συντηρημένα όσο τα υπόλοιπα (Posfai et.al., 1989, Sanjay et.al., 1994).

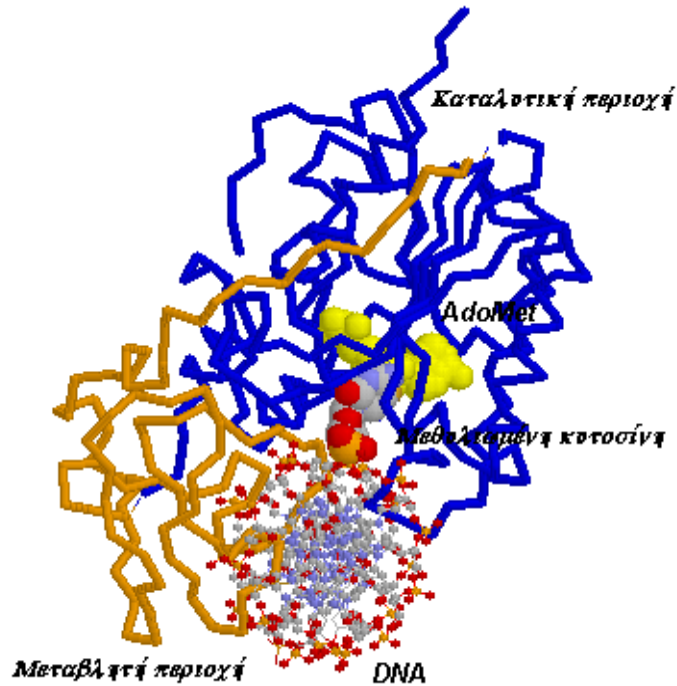
Μεταξύ των μοτίβων VIII-IX εμφανίζεται η μεγαλύτερη μη συντηρημένη περιοχή που χαρακτηρίζεται ως μεταβλητή περιοχή (variable region)(Posfai et.al., 1989, Cheng 1995b).

Οι μεθυλάσες πρέπει να επιτύχουν δύο λειτουργίες α) αναγνώριση του υποστρώματος και της ειδικής αλληλουχίας που μεθυλιώνουν, β) μεθυλίωση της κυτοσίνης.

Η οργάνωση της αλληλουχίας των μεθυλασών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η καθεμία λειτουργία επιτελείται από διαφορετικό τμήμα του ενζύμου. Η καταλυτική ενεργότητα οφείλεται στα συντηρημένα μοτίβα, ενώ η αναγνώριση του υποστρώματος στη μεταβλητή περιοχή. Πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι η παραπάνω υπόθεση ισχύει (Klimasauskas et.al., 1991,).

### 9 Οργάνωση της δομής των μεθυλτρανσφερασών.

Η επίλυση της δομής των μεθυλασών *M.HhaI*, *M.HaeIII* έδωσε περισσότερες πληροφορίες για την οργάνωση των ενζύμων. Τα ένζυμα αποτελούνται από δύο δομικά χωριστές περιοχές (domain). Η πρώτη περιλαμβάνει τα δέκα μοτίβα και είναι υπεύθυνη για την κατάλυση (catalytic domain) ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την μεταβλητή περιοχή. Μεταξύ των δύο περιοχών σχηματίζεται εσοχή (cleft) στην οποία προσαρμόζεται το DNA(Cheng 1995b, Cheng et.al.,1993, Klimasauskas et.al.,1994, Reimisch et.al., 1995).



**ρΗ οργάνωση της μεθυλάσης *M.HhaI*. Με μπλε χρώμα φαίνεται η καταλυτική περιοχή, με πορτοκαλί η μεταβλητή περιοχή. Διακρίνονται το DNA, ο συμπαράγοντας AdoMet, και η κυτοσίνη στόχος που έχει απομακρυνθεί από τον άξονα του DNA.**

Από την σύγκριση των δύο δομών προκύπτει ότι οι μεθυλάσες έχουν κοινή δομή στην καταλυτική περιοχή, ενώ η δομή στην μεταβλητή περιοχή παρουσιάζει μόνο μικρού βαθμού δομική ομοιότητα (Reinisch et.al., 1995). Τα μοτίβα κυρίως βρίσκονται σε περιοχές ελεύθερης δομής (loops) και συνδέουν στοιχειά δευτεροταγούς δομής μεταξύ τους (Cheng et.al., 1993, Klimasauskas et.al., 1994, Reinisch et.al., 1995). Η μεταβλητή περιοχή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του DNA στόχου τόσο στις μεθυλάσες που αναγνωρίζουν μία αλληλουχία στόχο (mono specific) όσο και στις μεθυλάσες που αναγνωρίζουν περισσότερες αλληλουχίες (multi specific). Ειδικά στην τελευταία περίπτωση είναι αρκετή μία σημειακή μεταλλαγή για να χαθεί τελείως η ικανότητα αναγνώρισης μίας αλληλουχίας στόχου (Lange et.al., 1996, Trautner et.al., 1996).

Μέσα στην μεταβλητή περιοχή έχουν αναγνωριστεί περιοχές που φαίνονται να είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση του υποστρώματος και ονομάζονται περιοχές αναγνώρισης στόχου (target recognition domains, TRD). Οι περιοχές αυτές έχουν μήκος περίπου 40 καταλοίπων, δεν επικαλύπτονται και διαχωρίζονται μεταξύ τους με ένα τουλάχιστον κατάλοιπο (Lange et.al., 1996, Trautner et.al., 1996). Η στοίχιση των TRD έδειξε την παρουσία κοινής αλληλουχίας που υπακούει στο μοτίβο T(V/I/L)XXXXXXG(V/L) (Lauster et.al., 1989).

Στη μεταβλητή περιοχή εντοπίζονται και δύο περιοχές ελεύθερης δομής που είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό δεσμών με το DNA

α) 233-240: GKGGQGER,

β) 250-257: TLSAYGGG.

Οι παραπάνω περιοχές έχουν ανιχνευθεί στην *M.HhaI* και όπως φαίνεται η δεύτερη περιοχή είναι απόλυτα συμβατή με την πρόβλεψη από τη στοίχιση για τα TRD (Lange et.al., 1996).



Πειράματα που έχουν γίνει με στόχο την διαφοροποίηση της αλληλουχίας αναγνώρισης, με την δημιουργία χμαιοικων TRD έχουν οδηγήσει στην κατασκευή μεθυσών με διαφοροποιημένη ή εκφυλισμένη ικανότητα αναγνώρισης αλληλουχίας DNA (Lange et.al., 1996, Trautner et.al., 1996).

Στο N άκρο της μεταβλητής περιοχής δεν εμφανίζονται TRD. Η περιοχή αυτή σχηματίζει ένα μίσχο που συνδέει την μεταβλητή περιοχή με την καταλυτική. Η απουσία ενεργότητας όταν μεταλλαχθεί η συγκεκριμένη περιοχή υποδεικνύει ότι η περιοχή αυτή είναι σημαντική για την τοποθέτηση της μεταβλητής περιοχής σε σωστή θέση ως προς την καταλυτική (Trautner et.al., 1996).

Κατά την μεθυσία της κυτοσίνης στόχου, η κυτοσίνη μετακινείται κατά 180° στον άξονα του DNA με αποτέλεσμα να απομακρύνεται από το DNA και να εισέρχεται σε μία κοιλότητα που σχηματίζει το μόριο του ενζύμου. Αποτέλεσμα αυτής της κίνησης είναι η διατάραξη του φωσφορικού άξονα του μορίου, ενώ στην περίπτωση της *M.HaeIII* έχει παρατηρηθεί και διατάραξη των δεσμών Watson Crick μεταξύ των νουκλεοτιδίων και το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ νουκλεοτιδίων που δεν είναι απέναντι. Η μετακίνηση αυτή παρατηρείται μόνο όταν η κυτοσίνη βρίσκεται στην μικρή κοιλότητα του μορίου του DNA: οι ειδικοί δεσμοί πρωτεΐνης – DNA σχηματίζονται στη μεγάλη κοιλότητα του DNA και πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια της μεθυσίας (Klimasauskas et.al., 1994, Reinisch et.al., 1995).

Στην κοιλότητα που εισέρχεται η κυτοσίνη, βρίσκεται και ο συμπαράγοντας S-αδενοσυλομεθειονίνη (AdoMet) που παρέχει τη μεθυλομάδα που μεταφέρεται στην κυτοσίνη στόχο (Klimasauskas et.al., 1994, Reinisch et.al., 1995).

Μόλις δεσμευθεί το DNA στο ένζυμο μία περιοχή ελεύθερης δομής (catalytic loop) που αποτελείται περίπου από 20 κατάλοιπα αλλάζει πλήρως τη δομή της και πλησιάζει την μικρή κοιλότητα του DNA. Η μετακίνηση αυτή επιτρέπει σημαντικές αλλαγές στη δομή του ενζύμου, και τοποθετεί τα καταλυτικά κατάλοιπα κοντά στην κυτοσίνη στόχο που ήδη έχει απομακρυνθεί από την έλικα του DNA (Klimasauskas et.al., 1994, Cheng et.al., 1993, Senjay et.al., 1994,)

## **10 Η μεθυλτρανσφεράση *M.PspPI***

Η *M.PspPI* είναι μία C5 μεθυλτρανσφεράση, και παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά μοτίβα της κατηγορίας (Rina et.al., 1997). Η μεθυσία προέρχεται από το ψυχρόφιλο βακτήριο *Psychrobacter sp.*. Λόγω του υψηλού βαθμού ομολογίας της με τις δύο μεθυλτρανσφεράσες των οποίων η δομή είναι γνωστή, στην καταλυτική περιοχή αποτελεί καλό μοντέλο για την μελέτη των προσαρμογών ενός ψυχρόφιλου μορίου και την σύγκριση με μεσόφιλα μόρια γνωστής δομής.

## 11 Καθαρισμός χιτινάσης από ψυχρόφιλο βακτήριο

### 12 Επιλογή του βακτηριακού στελέχους.

Έγινε έλεγχος σε 4 σειρές κυττάρων E.coli για να βρεθεί η καταλληλότερη σειρά, που θα επέτρεπε την παραγωγή της χιτινάσης με σκοπό τον καθαρισμό της.

Οι σειρές που ελέγχθησαν ήταν οι: B121, XL1, JM109, DH5a.

Όλες οι σειρές ελέγχθησαν ως προς την ικανότητα τους να μεγαλώνουν σε θερμοκρασίες 16, 18, 20 °C.

Παρατηρήθηκε ότι μόνο οι τρεις πρώτες μπορούν να μεγαλώσουν σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες.

Τα κύτταρα XL1 μεγαλώνουν σε 6 ημέρες ενώ τα κύτταρα JM109 σε δύο ημέρες. Επιπλέον τα κύτταρα JM109 είναι απαραίτητο να επαχθούν με IPTG προκειμένου να εκφράσουν ένα γονίδιο που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του T7 υποκινητή. Η παραγωγή μετά από επαγωγή δεν είναι σημαντικά μεγαλύτερη από ότι των κυττάρων B121.

Για τα κύτταρα B121 30 ώρες είναι αρκετές ώστε να έλθουν σε στατική φάση σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες.

Έτσι προτιμήθηκε τα πειράματα να διεξαχθούν σε κύτταρα B121.

## 12.1 Κλωνοποίηση του ενζύμου σε φορέα έκφρασης

Για τον καθαρισμό της χιτινάσης αρχικά χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή pBluescript Bam-Bam σε κύτταρα E.coli B121. Η παραγωγή σε ένζυμο των κυττάρων ήταν πολύ χαμηλή. Η ανίχνευση του ενζύμου με το φθορίζον υπόστρωμα γίνονταν μετά από επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας. Έγινε προσπάθεια να πραγματοποιηθεί κατασκευή που να υπερεκφράσει το γονίδιο της χιτινάσης.

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου επιλέξαμε τον φορέα pRSET. Ο φορέας αυτός φέρει έναν ισχυρό υποκινητή (T7), περιοχές πρόσδεσης στο ριβόσωμα(RBS), καθώς και θέση έναρξης μετάφρασης που περιλαμβάνει κατάλοιπα His ώστε να επιτρέπει τη δημιουργία σύνθετων πρωτεϊνών με His στο N άκρο τους με στόχο τον εύκολο καθαρισμό τους με χρωματογραφία συγγένειας.

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου επιλέξαμε την ακόλουθη στρατηγική.

- Κατασκευάστηκε με PCR το αρχικό τμήμα του γονιδίου αρχίζοντας από τη θέση 0 (ATG) έως ένα σημείο μέσα στο γονίδιο που αντιστοιχεί σε μοναδική θέση αναγνώρισης από περιοριστικό ένζυμο.
- Το τμήμα αυτό του γονιδίου εισήχθη στο φορέα σε τέτοια θέση ώστε να υποκαταστήσει την έναρξη του σύνθετου γονιδίου. Αντικαταστάθηκε δηλαδή το ATG που σημαίνει την έναρξη της μετάφρασης του τμήματος με τις His από το ATG που σημαίνει την έναρξη του γονιδίου της χιτινάσης.
- Στην κατασκευή αυτή κλωνοποιήσαμε το υπόλοιπο γονίδιο της χιτινάσης.
- Η επιτυχία της κατασκευής ελέγχθηκε με μέτρηση της ενεργότητας της παραγόμενης χιτινάσης

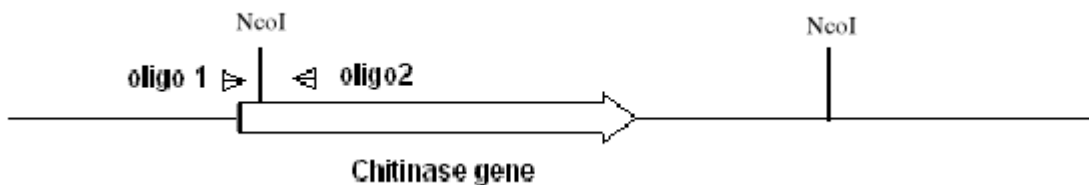
## 13 Κλωνοποίηση του αρχικού τμήματος του γονιδίου της χιτινάσης με τη χρήση PCR.

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές

A) 5' GCTAGCATATGTTTCAGCGGTTAGTGGATG 3'

B) 5' TCCACGTCCGATTCTTGCGC 3'

Τα πρώτα 6 νουκλεοτίδια του εκκινητή A αντιστοιχούν στην θέση αναγνώρισης του περιοριστικού



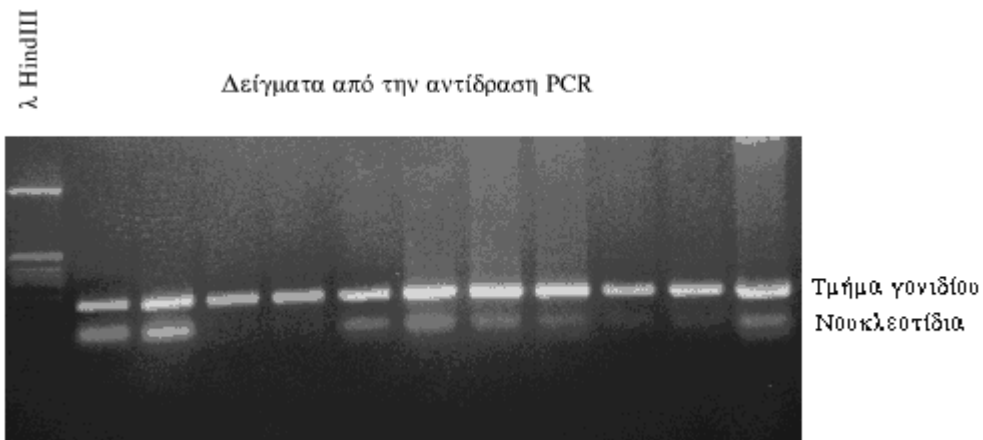
**Διάγραμμα του γονιδίου της χιτινάσης. Διακρίνονται το γονίδιο, οι εκκινητές για την αντίδραση PCR και οι θέσεις του περιοριστικού NcoI.**

ενζύμου NheI ενώ τα νουκλεοτίδια 6-11 στη θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου NdeI. Όπως φαίνεται και από τον χάρτη του πλασμιδίου pRSET η NdeI είναι η περιοχή που περιλαμβάνει την αλληλουχία ATG και βρίσκεται στην θέση έναρξης της μετάφρασης του πλασμιδίου. Επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντικατάσταση του τμήματος που περιλαμβάνει τις His με το τμήμα του γονιδίου της χιτινάσης.

Σαν υπόστρωμα για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε η pBluescript Bam-Bam κατασκευή.

Από την αντίδραση λάβαμε το προϊόν που αντιστοιχεί στο αρχικό τμήμα του γονιδίου που αναμένουμε. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 215 νουκλεοτίδια.

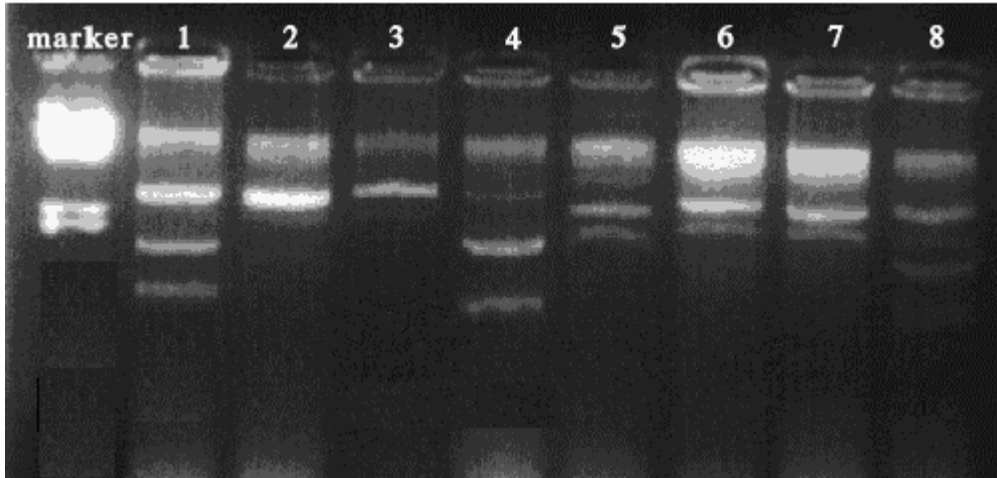
Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο επιθυμητό τμήμα κόβονται και καθαρίζονται από το πήκτωμα αгарόζης και στη συνέχεια υποβάλλονται σε κατεργασία με Klenow. Στη συνέχεια κλωνοποιούνται στο pBluescript.



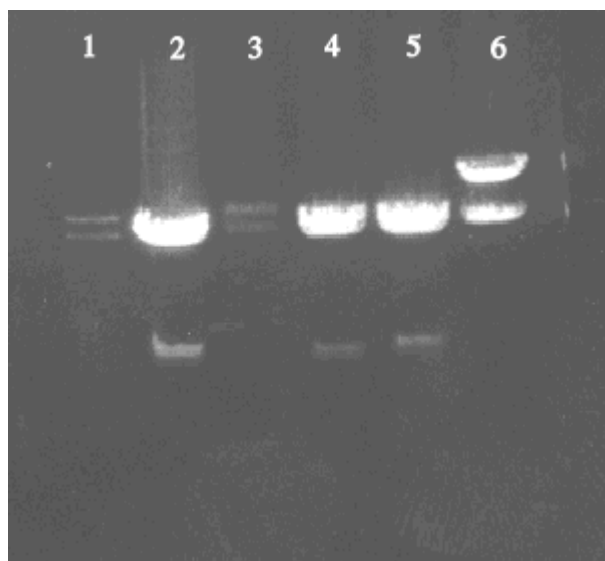
**Πήκτωμα αгарόζης όπου διακρίνονται τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR. Η ζώνη που χαρακτηρίζεται ως «τμήμα γονιδίου» έχει μέγεθος της τάξης των 200bp που αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν.**

#### **14 Μεταφορά του αρχικού τμήματος του γονιδίου της χιτινάσης στο φορέα pRSET**

Από την κατασκευή pBluescript-PCR κόβουμε το τμήμα NdeI-NcoI που αντιστοιχεί στο αρχικό τμήμα του γονιδίου της χιτινάσης, και το εισάγουμε στο pRSET που έχουμε κόψει με τα ίδια ένζυμα. Η κατασκευή που παίρνουμε περιλαμβάνει το pRSET με την έναρξη του γονιδίου της χιτινάσης (pRSET-PCR).

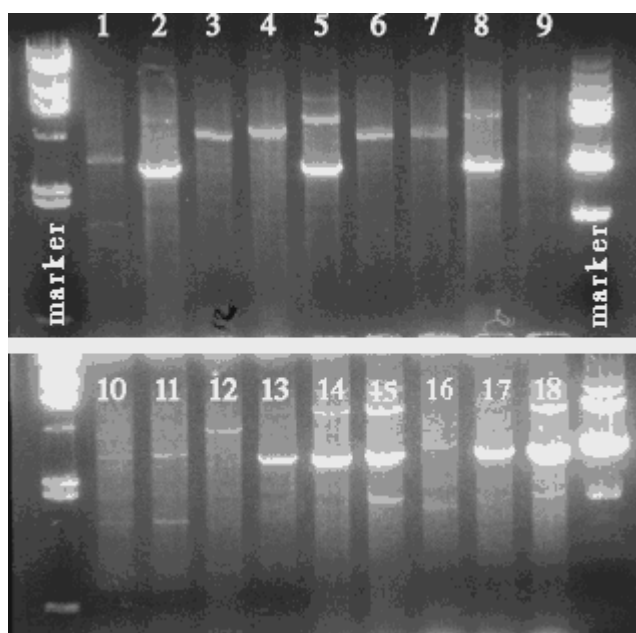


**Πήκτωμα αγαρόζης που φαίνεται DNA από δοκιμαστικές καλλιέργειες (mini preps) για την εύρεση των κλώνων που φέρουν την κατασκευή pBluescript-PCR. Η πέψη έχει γίνει με τα περιοριστικά Scal, NcoI. Στα θετικά αναμένουμε να διακρίνουμε δύο ζώνες ανάλογα με τη φορά του ενθέματος: μία της τάξεως των 1150bp και μία της τάξεως των 2000bp. ή μία της τάξεως των 1300bp και μία της τάξεως των 1850 bp.**



1  
 7  
 π  
 ο  
 δ  
**Πήκτωμα αγαρόζης. Τα δείγματα είναι από μικρές καλλιέργειες για τον έλεγχο της παρουσίας της κατασκευής rRSET-PCR. Η πέψη γίνεται με το περιοριστικό BssAI. Στους θετικούς κλώνους αναμένουμε τρεις ζώνες. Θετικά είναι τα 2, 4, 5.**

ενζυμικά για την παρουσία δράσης χιτινάσης, στο οποίο έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι κλώνοι αυτοί, όταν ελέγχονται ενζυμικά με το φθορίζον υπόστρωμα, δίνουν έντονο θετικό σήμα στα πρώτα 2 λεπτά, έναντι των 60 λεπτών που απαιτούσε η προηγούμενη κατασκευή (pBluescript-Bam-Bam) για να δώσει ανάλογο σήμα.



**Πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο της παρουσίας κλώνων με την κατασκευή rRSET-gene. Η πέψη έγινε με τα περιοριστικά EcoRI, PvuII. Αναμένουμε στους θετικού κλώνους μία ζώνη 4000bp και μία στις 300bp. Θετικά είναι τα 3, 4, 6, 7, 12. Οι κλώνοι αυτοί ελέγχθηκαν ενζυμικά και επίσης ήταν θετικοί.**

## 16 Καθαρισμός της χιτινάσης με μεθόδους χρωματογραφίας.

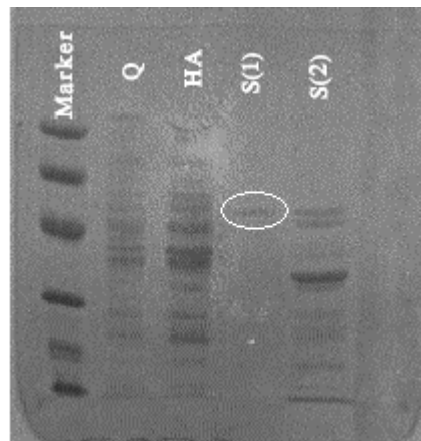
Ο καθαρισμός της χιτινάσης επιτεύχθηκε με ένα σχήμα τριών σταδίων.

Η διαδικασία του καθαρισμού είναι ταχεία, χρησιμοποιεί υλικά χρωματογραφίας κοινά σε εργαστήρια και αντιδραστήρια επίσης κοινά.

Τα στάδια καθαρισμού είναι τα ακόλουθα.

- Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow ( $Q_{ff}$ )
- Χρωματογραφία σε προσροφητή Hydroxyapatite (HA)
- Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow ( $S_{ff}$ ).

Μετά το πέρας του καθαρισμού, η πρωτεΐνη παρουσιάζεται σε πήκτωμα SDS σε μία μόνο έντονη ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (50000), καθώς και μία ελάχιστα ορατή ζώνη σε μικρότερο μοριακό βάρος (35000), το οποίο είναι πιθανά ένα πρωτεολυτικό θραύσμα της υπό εξέταση χιτινάσης.



**Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Διακρίνονται από αριστερά : μάρτυρες χαμηλού μοριακού βάρους,  $Q_{ff}$  δείγμα, HA δείγμα,  $S_{ff}$  δείγμα,  $S_{ff}$  δείγμα II.**

## 17 Ανιοντοανταλλακτική στήλη Qff

Το στέλεχος B121 που φέρει το πλασμίδιο pRSET-gene καλλιεργείται σε θρεπτικό μέσο LB με αμπικιλίνη σε συνολικό όγκο 10l, σε θερμοκρασία 16°C.

Μετά από 24 ώρες η καλλιέργεια έχει κορεσθεί (OD=1,3) και συλλέγεται.

Το στερεό υπόλειμμα της καλλιέργειας διαλύεται σε 150ml ρυθμιστικού διαλύματος QA.

Τα κύτταρα συνθλίβονται με Γαλλική πρέσα (French press).

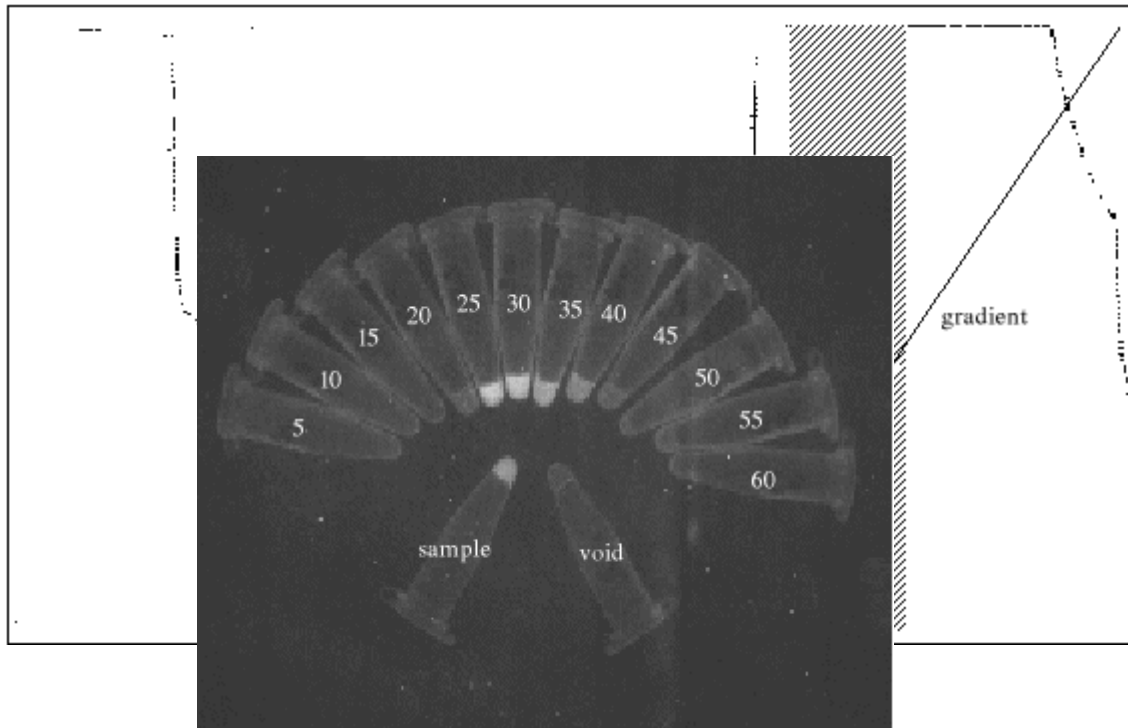
Η στήλη εξισορροπείται σε ρυθμιστικό διάλυμα QA και στη συνέχεια φορτώνεται το δείγμα.

Αφού εκπλυθεί η στήλη με ρυθμιστικό QA εφαρμόζεται σε αυτήν βαθμίδωση συγκέντρωσης QB μέχρι τελικής συγκέντρωσης 100%, και συνολικού όγκου 10 όγκων στήλης.

Συλλέγονται 100 κλάσματα.

Η ενεργότητα εμφανίζεται στα κλάσματα 23-40.

Τα κλάσματα συλλέγονται και στη συνέχεια τοποθετούνται σε μεμβράνη διαπίδυσης μέσα σε ρυθμιστικό



D.

**Χρωματογράφημα από Qff. Στη σκιασμένη περιοχή εμφανίζονται τα κλάσματα με ενεργότητα.**

**Στην εικόνα εμφανίζεται η ενεργότητα των κλασμάτων της στήλης Qff. Ο έλεγχος γίνεται με το φθορίζον υπόστρωμα.**



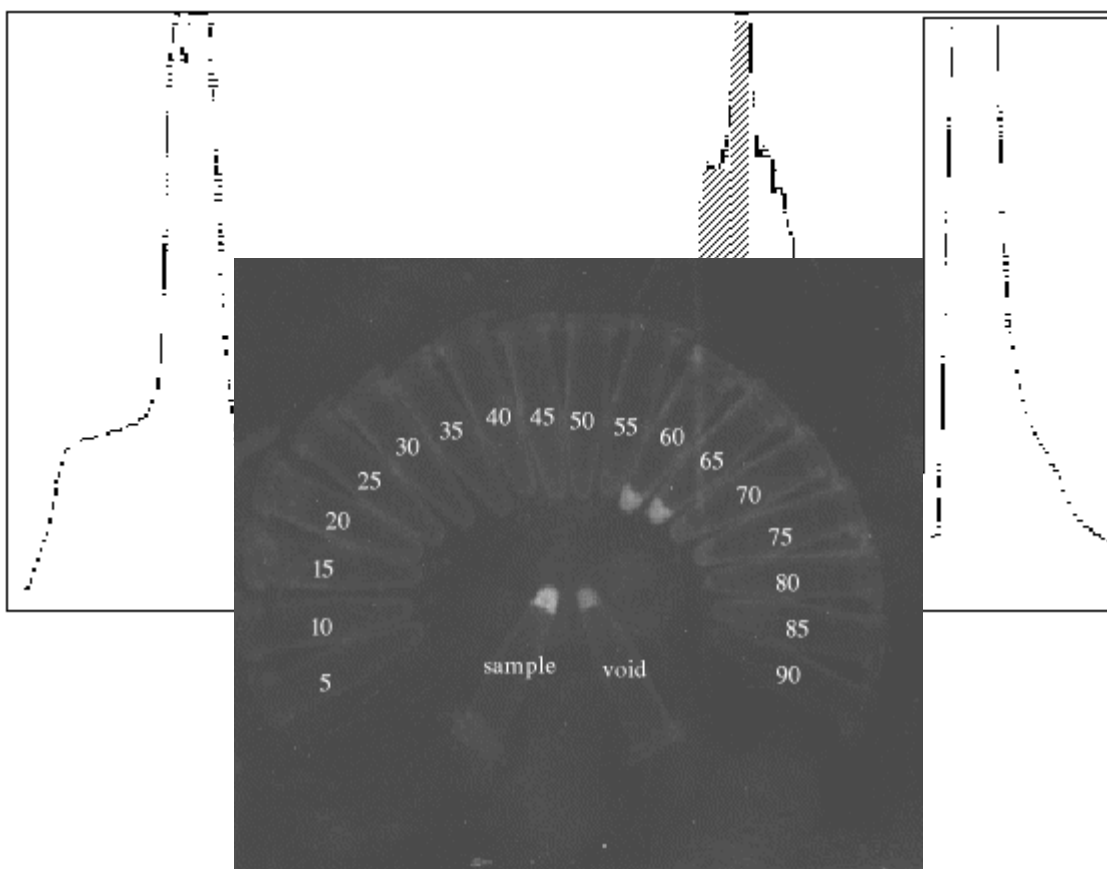
## 18 Στήλη υδροξυαπατίτη

Η στήλη εξισορροπείται σε 5 όγκους (500ml) διαλύματος  $HA_A$ .

Το δείγμα που προέρχεται από τη προηγούμενη στήλη φορτώνεται στην στήλη και ακολούθως η στήλη εκπλένεται με διάλυμα  $HA_A$  και στη συνέχεια εφαρμόζεται βαθμίδωση συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων μέχρι τελικής συγκέντρωσης 100% του διαλύματος  $HA_B$ , και συνολικού όγκου 5 φορές τον όγκο της στήλης.

Ακολουθεί ξέπλυμα της στήλης με διάλυμα  $HA_B$  για 2 όγκους στήλης και με διάλυμα  $HA_C$  για 5 όγκους στήλης.

Συλλέγονται 100 κλάσματα.



Ενεργότητα παρατηρείται στα κλάσματα 57-67 καθώς και στο διάλυμα έκπλυσης της στήλης. Τα κλάσματα 57-67 συλλέγονται και στη συνέχεια τοποθετούνται σε διάλυμα D.

**Στην εικόνα εμφανίζεται η ενεργότητα των κλασμάτων της στήλης  $HA$ . Ο έλεγχος γίνεται με το φθορίζον υπόστρωμα**

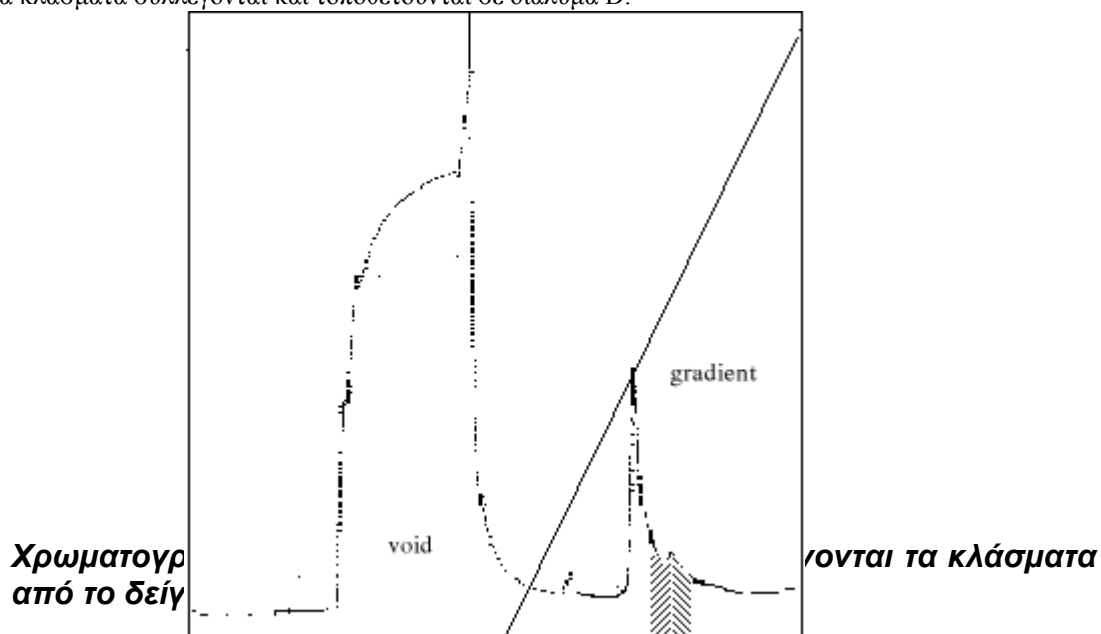
## 19 Κατιοντοανταλλακτική στήλη Sff

Το δείγμα που προέρχεται από τον υδροξυαπατίτη τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδωσης και σε διάλυμα SA για 2 ώρες προκειμένου να αλλάξει το ρυθμιστικό στο οποίο βρίσκεται. Η στήλη εξισορροπείται σε διάλυμα SA και φορτώνεται το δείγμα.

Ακολουθεί έκπλυση της στήλης και στη συνέχεια εφαρμόζεται βαθμίδωση συγκέντρωσης μέχρι τελικής συγκέντρωσης του διαλύματος SB 100%.

Συλλέγονται 100 κλάσματα. Ενεργότητα παρατηρείται στα κλάσματα 37-50.

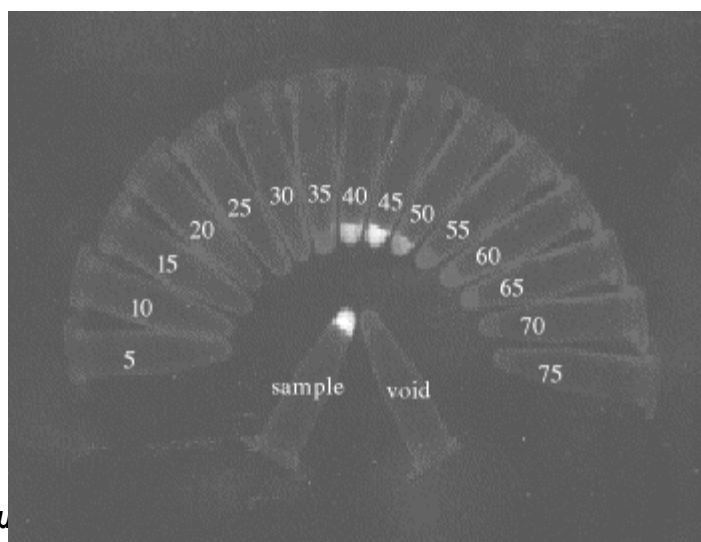
Τα κλάσματα συλλέγονται και τοποθετούνται σε διάλυμα D.



Τα δείγματα που ανήκουν στα 37-43 συλλέγονται χωριστά από τα δείγματα 44-50. Τα τελευταία αποτελούν το δείγμα II.

Σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης φαίνεται ότι στο δείγμα II δεν υπάρχει καθαρή χιτίνηση.

Σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έγινε έλεγχος για την ενζυμική ενεργότητα και διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα βρίσκεται στη ζώνη που αναμένουμε περίπου στις 50000daltons σε όλα τα δείγματα.



Στην εικόνα εμφάνιση γίνεται με το φθορισμό υποστρώμα

στήλης Sff. Ο

## 21 Εισαγωγή

Η μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται σε πολλούς οργανισμούς (βακτήρια, φυτά, θηλαστικά κ.α.). Η μεθυλίωση γίνεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και καταλύεται από ένζυμα που καλούνται μεθυλτρανσφεράσες. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση της κυτοσίνης και της αδενίνης συμμετέχει κυρίως στο σύστημα περιορισμού-μεθυλίωσης (restriction-modification) και φαίνεται να λειτουργεί ως μηχανισμός άμυνας του κυττάρου έναντι ξένου, συνήθως ιικού DNA (Roberts et.al., 1993). Η μεθυλίωση της αδενίνης συμμετέχει και στον έλεγχο της έναρξης της αντιγραφής του DNA και στην επιδιόρθωση λαθών κατά την αντιγραφή (Noyer-Weidener, 1993). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς φαίνεται επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων, διαφοροποίηση κ.α. (Modrich et.al., 1991, Sanjay et.al., 1994).

Οι μεθυλτρανσφεράσες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο μεθυλίωσης που επιτελούν (Sanjay et.al., 1994, Cheng, 1995).

- Μεθυλίωση στο εξοκυκλικό N της αδενίνης με προϊόν την N6 μεθυλαδενίνη
- Μεθυλίωση στο εξοκυκλικό N της κυτοσίνης με προϊόν την N4 μεθυλκυτοσίνη
- Μεθυλίωση στον άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης με προϊόν την C5 μεθυλκυτοσίνη.

Σε όλες τις περιπτώσεις για την μεθυλίωση χρησιμοποιείται ο συμπαράγοντας S-adenosyl-methionine που είναι και ο δότης της μεθυλομάδας (Sanjay et.al., 1994, Cheng, 1995).

Στην τρίτη κατηγορία (E.C. 2.1.1.37) ανήκει και η μεθυλτρανσφεράση *M.PspPI* (Rina et.al., 1997) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των ψυχρόφιλων χαρακτηριστικών στην εργασία αυτή.

## 22 C5 Mtases

### 23 Οργάνωση της αλληλουχίας

Οι C5-μεθυλτρανσφεράσες (C5 Mtases, στο εξής μεθυλάσες) παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, είτε προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς είτε από προκαρυωτικούς (Sanjay et.al., 1994, Cheng, 1995b).

Συγκριτική ανάλυση των μεθυλασών δείχνει ότι εμφανίζουν μια ομάδα από δέκα συντηρημένες περιοχές (μοτίβα) που εναλλάσσονται με μη συντηρημένες. Τα μοτίβα αυτά αριθμούνται με λατινικούς αριθμούς από I ως X (Posfai et.al., 1989), και η σειρά τους παραμένει αμετάβλητη σε όλες τις μεθυλάσες που έχουν μελετηθεί ως τώρα.

```

Hhai : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80----- : 22
Psppl : MKFPDNHFSAAIVADTLVSVKRNVEWTQNGKLVPAIDPNIHEKPYTKDQLETFEQFSAMFNSSWCBEHMAVEPSRSYSWVLFACAG : 87
Haeiii : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80----- : 11
                                           Motif I

Hhai : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----*----- : 102
Psppl : CLALCELEQACFRSSVILNVEKDKYACATLRANRPNMNVIEDIENVDFTHLGCV---DLLTCCPCQPFSSYACRDLCEFDLRGTLWFF : 170
Haeiii : CLDLCEFRKACFRRIICAMEVDRSISMKYYESMHS----AFLIKCDISKSSDEFFKCDCLICGCPQCSWSECSLRCIDDPCKKLVY : 92
Motif I Motif II Motif III Motif IV Motif V

Hhai : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----260----- : 185
Psppl : EMARAIKKEIKPKVFLAENVKGLAENDGERTLSIILKVLKQLCYKLELEWYKAIYKWPQKREBLIILICVPTDL-YDKIAYEKESDY : 256
Haeiii : EYTRILKQKPIFFLAENVKGLAQRHNRWQEFIQEFDMAQYDDEI-ILLANQYVWQDRKRVYIIGRPKELNINYP---PIQH : 175
Motif VI Motif VII Motif VIII

Hhai : -----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340----- : 254
Psppl : YKVLTVADALKAGELVDVDVPESTGQIYPERKAEIHSYVPEGCFYRDLPRIAKRYMKSFLYCGCKTGMAREL-SWDEPSSLTLVCT : 342
Haeiii : LIKPIFFKQVIMD--LRDNPIBALDKNKTNGKRCIYPNHEFYFISSTFHSRNRVQRWNEPAFTVQASGRQCQLHPQAPVIMKRV-- : 258

Hhai : -----*-----360-----*-----380-----*-----400-----*-----420----- : 327
Psppl : PA---QKQTEKCHPSSE---RPLITREYARIQTFPDDIIEK-CSTVCDIYKQICNAVFWNLALATGKAITIRMLAALKQVFE : 416
Haeiii : -----KRLNRFVECEHLYRRLVREARVQGFPPDFIIFHYESLNDGYRMLCNVFWNLAYEIAKTIKSALEICKGN--- : 330
Motif IX Motif X

```

Τα δέκα μοτίβα μπορούν να αναγνωριστούν σε όλες τις μεθυλάσες. Τα μοτίβα II, III, IX, X πάντως παρουσιάζουν αρκετή ανοχή στις μεταλλάξεις με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται τόσο συντηρημένα όσο τα υπόλοιπα (Posfai et.al., 1989, Sanjay et.al., 1994).

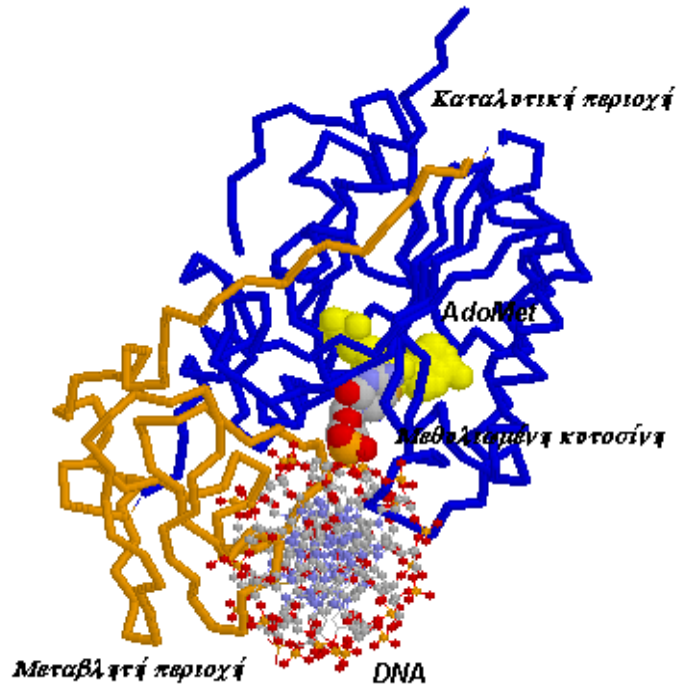
Μεταξύ των μοτίβων VIII-IX εμφανίζεται η μεγαλύτερη μη συντηρημένη περιοχή που χαρακτηρίζεται ως μεταβλητή περιοχή (variable region)(Posfai et.al., 1989, Cheng 1995b).

Οι μεθυλάσες πρέπει να επιτύχουν δύο λειτουργίες α) αναγνώριση του υποστρώματος και της ειδικής αλληλουχίας που μεθυλιώνουν, β) μεθυλίωση της κυτοσίνης.

Η οργάνωση της αλληλουχίας των μεθυσών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η καθεμία λειτουργία επιτελείται από διαφορετικό τμήμα του ενζύμου. Η καταλυτική ενεργότητα οφείλεται στα συντηρημένα μοτίβα, ενώ η αναγνώριση του υποστρώματος στη μεταβλητή περιοχή. Πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι η παραπάνω υπόθεση ισχύει (Klimasauskas et.al., 1991,).

## 24 Οργάνωση της δομής των μεθυλτρανσφερασών.

Η επίλυση της δομής των μεθυσών *M.HhaI*, *M.HaeIII* έδωσε περισσότερες πληροφορίες για την οργάνωση των ενζύμων. Τα ένζυμα αποτελούνται από δύο δομικά χωριστές περιοχές (domain). Η πρώτη περιλαμβάνει τα δέκα μοτίβα και είναι υπεύθυνη για την κατάλυση (catalytic domain) ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την μεταβλητή περιοχή. Μεταξύ των δύο περιοχών σχηματίζεται εσοχή (cleft) στην οποία προσαρμόζεται το DNA(Cheng 1995b, Cheng et.al.,1993, Klimasauskas et.al.,1994, Reimisch et.al., 1995).



**ρΗ οργάνωση της μεθυλάσης *M.HhaI*. Με μπλε χρώμα φαίνεται η καταλυτική περιοχή, με πορτοκαλί η μεταβλητή περιοχή. Διακρίνονται το DNA, ο συμπαράγοντας AdoMet, και η κυτοσίνη στόχος που έχει απομακρυνθεί από τον άξονα του DNA.**

Από την σύγκριση των δύο δομών προκύπτει ότι οι μεθυλάσες έχουν κοινή δομή στην καταλυτική περιοχή, ενώ η δομή στην μεταβλητή περιοχή παρουσιάζει μόνο μικρού βαθμού δομική ομοιότητα (Reinisch et.al., 1995). Τα μοτίβα κυρίως βρίσκονται σε περιοχές ελεύθερης δομής (loops) και συνδέουν στοιχειά δευτεροταγούς δομής μεταξύ τους (Cheng et.al., 1993, Klimasauskas et.al., 1994, Reinisch et.al., 1995). Η μεταβλητή περιοχή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του DNA στόχου τόσο στις μεθυλάσες που αναγνωρίζουν μία αλληλουχία στόχο (mono specific) όσο και στις μεθυλάσες που αναγνωρίζουν περισσότερες αλληλουχίες (multi specific). Ειδικά στην τελευταία περίπτωση είναι αρκετή μία σημειακή μεταλλαγή για να χαθεί τελείως η ικανότητα αναγνώρισης μίας αλληλουχίας στόχου (Lange et.al., 1996, Trautner et.al., 1996).

Μέσα στην μεταβλητή περιοχή έχουν αναγνωριστεί περιοχές που φαίνονται να είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση του υποστρώματος και ονομάζονται περιοχές αναγνώρισης στόχου (target recognition domains, TRD). Οι περιοχές αυτές έχουν μήκος περίπου 40 καταλοίπων, δεν επικαλύπτονται και διαχωρίζονται μεταξύ τους με ένα τουλάχιστον κατάλοιπο (Lange et.al., 1996, Trautner et.al., 1996). Η στοίχιση των TRD έδειξε την παρουσία κοινής αλληλουχίας που υπακούει στο μοτίβο T(V/I/L)XXXXXXG(V/L) (Lauster et.al., 1989).

Στη μεταβλητή περιοχή εντοπίζονται και δύο περιοχές ελεύθερης δομής που είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό δεσμών με το DNA

α) 233-240: GKGGQGER,

β) 250-257: TLSAYGGG.

Οι παραπάνω περιοχές έχουν ανιχνευθεί στην *M.HhaI* και όπως φαίνεται η δεύτερη περιοχή είναι απόλυτα συμβατή με την πρόβλεψη από τη στοίχιση για τα TRD (Lange et.al., 1996).

Πειράματα που έχουν γίνει με στόχο την διαφοροποίηση της αλληλουχίας αναγνώρισης, με την δημιουργία χμαιοικων TRD έχουν οδηγήσει στην κατασκευή μεθυσών με διαφοροποιημένη ή εκφυλισμένη ικανότητα αναγνώρισης αλληλουχίας DNA (Lange et.al., 1996, Trautner et.al., 1996).

Στο Ν άκρο της μεταβλητής περιοχής δεν εμφανίζονται TRD. Η περιοχή αυτή σχηματίζει ένα μίσχο που συνδέει την μεταβλητή περιοχή με την καταλυτική. Η απουσία ενεργότητας όταν μεταλλαχθεί η συγκεκριμένη περιοχή υποδεικνύει ότι η περιοχή αυτή είναι σημαντική για την τοποθέτηση της μεταβλητής περιοχής σε σωστή θέση ως προς την καταλυτική (Trautner et.al., 1996).

Κατά την μεθυσία της κυτοσίνης στόχου, η κυτοσίνη μετακινείται κατά 180° στον άξονα του DNA με αποτέλεσμα να απομακρύνεται από το DNA και να εισέρχεται σε μία κοιλότητα που σχηματίζει το μόριο του ενζύμου. Αποτέλεσμα αυτής της κίνησης είναι η διατάραξη του φωσφορικού άξονα του μορίου, ενώ στην περίπτωση της *M.HaeIII* έχει παρατηρηθεί και διατάραξη των δεσμών Watson Crick μεταξύ των νουκλεοτιδίων και το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ νουκλεοτιδίων που δεν είναι απέναντι. Η μετακίνηση αυτή παρατηρείται μόνο όταν η κυτοσίνη βρίσκεται στην μικρή κοιλότητα του μορίου του DNA: οι ειδικοί δεσμοί πρωτεΐνης – DNA σχηματίζονται στη μεγάλη κοιλότητα του DNA και πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια της μεθυσίας (Klimasauskas et.al., 1994, Reinisch et.al., 1995).

Στην κοιλότητα που εισέρχεται η κυτοσίνη, βρίσκεται και ο συμπαράγοντας S-αδενοσυλομεθειονίνη (AdoMet) που παρέχει τη μεθυλομάδα που μεταφέρεται στην κυτοσίνη στόχο (Klimasauskas et.al., 1994, Reinisch et.al., 1995).

Μόλις δεσμευθεί το DNA στο ένζυμο μία περιοχή ελεύθερης δομής (catalytic loop) που αποτελείται περίπου από 20 κατάλοιπα αλλάζει πλήρως τη δομή της και πλησιάζει την μικρή κοιλότητα του DNA. Η μετακίνηση αυτή επιτρέπει σημαντικές αλλαγές στη δομή του ενζύμου, και τοποθετεί τα καταλυτικά κατάλοιπα κοντά στην κυτοσίνη στόχο που ήδη έχει απομακρυνθεί από την έλικα του DNA (Klimasauskas et.al., 1994, Cheng et.al., 1993, Senjay et.al., 1994,)

## **25 Η μεθυλτρανσφεράση *M.PspPI***

Η *M.PspPI* είναι μία C5 μεθυλτρανσφεράση, και παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά μοτίβα της κατηγορίας (Rina et.al., 1997). Η μεθυσία προέρχεται από το ψυχρόφιλο βακτήριο *Psychrobacter sp.*. Λόγω του υψηλού βαθμού ομολογίας της με τις δύο μεθυλτρανσφεράσες των οποίων η δομή είναι γνωστή, στην καταλυτική περιοχή αποτελεί καλό μοντέλο για την μελέτη των προσαρμογών ενός ψυχρόφιλου μορίου και την σύγκριση με μεσόφιλα μόρια γνωστής δομής.

## 27 Μελέτη της οργάνωσης της μεταβλητής περιοχής στις μεθυλάσες

Η στοίχιση στο χώρο των δύο δομών των μεθυλασών που υπάρχουν στη βάση δεδομένων, της *M.HhaI* και της *M.HaeIII* όπως αναμενόταν έδειξε μεγάλη ομολογία στην καταλυτική περιοχή<sup>1</sup> (rmsd=1,4Å), επιπλέον έδειξε δύο ενδιαφέροντα σημεία στην δομή των μορίων στην μεταβλητή περιοχή. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι δύο τμήματα, μέσα στη μεταβλητή περιοχή που ονομάστηκαν τμήμα A και τμήμα B (segment A, segment B) παρουσιάζουν δομική ομολογία.

---

<sup>1</sup> Η στοίχιση έγινε μόνο με βάση τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου: F79, C81, E119 για την *M.HhaI* και P69, C71, E109 για την *M.HaeIII*.

Haeiii	L.NI.NYLPPIPHLIKPTFKDVIW..DLKDNPIP...ALDKNKTNGNKCIYPNHEYFIG	216
PspPI	LYDKLAYEKPSPYKVLTVADALKAGELYDVDVPESTGQLYPERKAEIMSYVPEGGYWRD	303
Hhai	L.NIQNFQFPKPFELNTFVKDLL...LPDSEVE...HLVIDRKDL...VMTNQEIEQT	222
<b>Περιοχή Α</b>		
Haeiii	.SYST.....IFMSRNRVRQWNEPAFTVQASGRQCQLHPQAPVMLKVSKNLN	262
PspPI	LPIRIAKEYMMKSFYLGGGKTMARRLSWDEPSLTLVCTPAQKQTERCHPSES.....	356
Hhai	TPKTV.....RLGIVGKGGQG.ERIVSTRGIAITLSAYG.....GGIFAKTGGYL.	266
<b>Περιοχή Β</b>		
Haeiii	KFVEGKEHLY	272
PspPI	.....	356
Hhai	..VNGKT...	271

**Η στοίχιση των τριών μεθυσών στην μεταβλητή περιοχή. Με σκίαση εμφανίζονται τα κατάλοιπα που σχηματίζουν τις δύο περιοχές, όπως προκύπτουν από τη δομική στοίχιση.**

Το τμήμα Α εντοπίζεται στο Ν άκρο της μεταβλητής περιοχής, και το τμήμα Β στο C άκρο της μεταβλητής περιοχής. Το τμήμα αυτό αποτελεί το μίσχο που συνδέει την καταλυτική με την μεταβλητή περιοχή, και έχει εντοπιστεί από άλλους ερευνητές ως σημαντικό στοιχείο για την λειτουργία του ενζύμου.

Το τμήμα Β φαίνεται να βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ των δύο περιοχών ελεύθερης δομής που έχουν αναγνωριστεί ότι σχηματίζουν δεσμούς με το DNA και να περιλαμβάνει και το τμήμα της δεύτερης περιοχής που έχει αναγνωριστεί και ως TRD. Η περιοχή αυτή φαίνεται πως παρουσιάζει μία γενική αλληλουχία της μορφής  $RYA_1XXXXXXXXA_2ZXXA_3A_4(XA_5)$ , όπου  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  είναι κατάλοιπα ικανά να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το DNA, X μπορεί να είναι οποιοδήποτε ένζυμο. Το Y και το  $A_1$  μπορούν να αλλάξουν τη θέση τους αμοιβαία. Ειδικότερα το  $A_1$  πρέπει να είναι ένα μακρύ κατάλοιπο π.χ. R, Y, το  $A_2$  είναι T, και ακολουθείται από ένα υδρόφοβο κατάλοιπο (L/I/V) που είναι τοποθετημένο σε ένα ιδιαίτερα υδρόφοβο περιβάλλον. Το  $A_4$  είναι ένα κατάλοιπο με μεγάλη ικανότητα για στροφή π.χ. G, P. Το  $A_5$  συντηρείται στις *M.PspPI*, *M.HaeIII* και είναι Q. Το τμήμα αυτό αποτελεί μία επέκταση του μοτίβου που έχει αναγνωριστεί από άλλους ερευνητές και αναφέρεται στην εισαγωγή. Πρέπει να σημειώσουμε ότι η αναγνώριση των δύο τμημάτων έγινε με μόνο κριτήριο την δομική τους ομοιότητα στα δύο ένζυμα.

Το τμήμα αυτό έχει το σχήμα U και φαίνεται να αγκαλιάζει την έλικα του DNA, ενώ στο άκρο της βρίσκεται η περιοχή αναγνώρισης της ειδικής αλληλουχίας του DNA. Η διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης στο τμήμα αυτό υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο της δεδομένου ότι η υπόλοιπη δομή της μεταβλητής περιοχής, στις δύο πρωτεΐνες είναι τελείως διαφορετική.



GGGKTGMARRLSWDEPSLTLVCTPAQK 345 *M.PsppI* (GGNCC)  
VGKGGQGERIYSTRGIAITLSAYGGGI 258 *M.HhaI* (CGGC)  
SSRYMSRNRVRSWDEVSFTIQAGGRHA 246 *M.MthI* (GGCC)  
STIFMSRNRVRQWNEPAFTVQASGRQC 245 *M.HaeIII* (GGCC)  
SPIFMSRNRVKAWDEQGFTVQASGRQC 260 *M.NgoPII* (GGCC)  
SSIYMSRNRKKSWEQSFTIQASGRQA 319 *M.BsuRI* (GGCC)  
STIFMSRNRKKWTDQSFTIQASGRQA 318 *M.BspRI* (GGCC)  
GEKRQNGRRFKDDGEPFTVNTIDRHG 366 *M.SPRI* (TRD H) (GGCC)  
VKGYHSSYRRIRWDEPAPTTIRNDAI 297 *M.HgaI* ORF1 (GCGTC)  
SRNFKQGNRVIDSNGIATTLHSQSVGG 297 *M.H2I* (TRD B) (GDGCHG)  
PLNISYKPRDIPEKHNGKTLVDREMIK 300 *M.CviJI* (RGCY)  
KGMISHVYRRMHRNEPSKTIIAAGGGG 281 *M.NgoVII* (CGSGC)  
AGKGFYGLFNAESAYTNTLSARYYKD 241 *M.NlaX* (CCWGG)  
SKFNSEGYVYDDPEFTGPTLTASGANS 322 *M.SssI* (CG)  
LFKKTQGNIEVNMNGQAPTIRAEHHGN 316 *M.BepI* (CGCG)  
GWGKCLVKS VFGLEDVSPITKSNANL 243 *M.É3TII* (TCGA)  
GGMGRERNLVIDHRITDFTPTTNIKGE 296 *M.HpaII* (CCGG)  
HPRTYERRAIFSVNEPSPTIRGVNRP 226 *M.HgiDI* (GRCGYC)  
GNMSFEVFKFLDPDSVITLVSSDAHK 354 *M.HgiCI* (GGYRCC)  
GNMSFEVFKFLDPDSISITLVSSDAHK 354 *M.BanI* (GGYRCC)  
KDDGKPSLIDKNTTGAVKTTVSTYHKI 335 *M.MspI* (CCGG)  
KDDGKQIIVDFRCTYQVNTLVASYHKI 333 *M.BsuFI* (CCGG)  
VEYSRKSGLGRELAVSHTLSASDWRG 318 *M.SPRI* (TRD M) (CCGG)  
NGFGYGMVYPPNPQSVTRTLSARYYKD 370 *M.EcoDcm* (CCWGG)  
NGFGFLVNPENKESIARTLSARYYHKG 393 *M.EcoRII* (CCWGG)  
KNGEILTIDTIPKYEKSVTLGEEIESN 273 *M.Sau3AI* (GATC)  
GESYGSVYGRMEWDKVAPTITTCNGY 277 *M.HgiDII* (GTCGAC)  
GKVFSQNNMRPYYPKPCPTVAASFQSN 304 *M.DdeI* (CTNAG)

### **Στοιχισή των αλληλουχιών των μεθυλασών στην περιοχή B. Σκιαζονται όμοια κατάλοιπα που συντηρούνται στην ίδια θέση ή κατάλοιπα που έχουν ανάλογες ιδιότητες και βρίσκονται στην ίδια θέση**

Στα άκρα του τμήματος αυτού υπάρχουν συντηρημένα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με το DNA με μη ειδικό τρόπο (δηλαδή αλληλεπιδρούν με O της φωσφορικής αλυσίδας). Τα κατάλοιπα αυτά R229, T237 στην περίπτωση της *M.HaeIII* δεν είναι τα μοναδικά που ανιχνεύουν μη ειδικά το DNA στην περιοχή αυτή. Και η R227 αναγνωρίζει τη G που βρίσκεται δίπλα στην κυτοσίνη στόχο στην περίπτωση που η αλληλουχία αναγνώρισης περιλαμβάνει το ζευγάρι GC ενώ στην περίπτωση που δεν υπάρχει η γειτονική γουανίνη δεν παρατηρείται R στη θέση αυτή. Παρατηρούμε όμως ότι στη θέση αυτή ή σε άμεσα γειτονικές ακόμα και τότε υπάρχουν κατάλοιπα που είναι αρκετά μεγάλα, και με άτομα που είναι ικανά να σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με τις βάσεις του DNA όπως K, N, Y κ.α.. Μπορούμε λοιπόν να θεωρήσουμε ότι το τμήμα B περιέχει κατάλοιπα που μπορούν να αναγνωρίσουν μη ειδικά το DNA και να σταθεροποιήσουν τη δομή της περιοχής επάνω στο DNA. Το τμήμα B είναι δομικά τοποθετημένο στο σημείο «επαφής» των δύο κομματιών του ενζύμου. Στη θέση που βρίσκεται γειτνιάζει με τα μοτίβα VIII και X, με τα οποία σχηματίζει δεσμούς.

Τα κατάλοιπα που σχηματίζουν δεσμούς με το τμήμα B είναι συντηρημένα στις μεθυλάσες.

Χρησιμοποιώντας ως μοντέλο την *M.HhaI* διαπιστώνουμε τις παρακάτω αλληλεπιδράσεις

P26353	:	V	Q	A	G	K	G	V	A	F	R	I	A	I	D	A	I	R	Q	V	E	R	P	P	E	A	K	A	T	G	L	C	K	D					
P13864	:	V	Q	A	G	K	G	V	A	F	R	I	A	I	D	A	I	R	Q	V	E	R	P	P	E	A	K	A	T	G	L	C	K	D					
P25263	:	V	I	I	P	I	G	I	A	R	I	V	L	E	A	S	Q	I	E	R	R	E	V	A	E	R	V	I	A	S	K								
P23757	:	E	N	S	W	N	Z	V	E	R	R	V	I	D	E	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	K	Y	I	G	S	I								
P39750	:	V	Z	K	A	I	F	K	V	E	R	I	I	D	E	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	L	A	I	G	K	A	I	K						
P09750	:	L	N	S	A	N	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	C	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I			
P39211	:	L	N	S	A	N	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I			
P24600	:	V	L	S	A	S	L	C	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	E	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I
P39211	:	V	L	S	A	L	L	G	L	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I
P15445	:	L	N	S	A	N	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I			
P05101	:	V	L	S	R	K	H	F	L	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I
P25202	:	L	N	S	F	D	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	E	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I		
P25205	:	L	N	S	F	D	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	E	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I		
P25204	:	L	N	S	F	D	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	E	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I		
P35203	:	L	N	S	F	D	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I			
P31977	:	T	I	D	A	H	M	C	T	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I
P16664	:	V	I	K	A	D	P	C	N	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I			
P25208	:	T	I	D	A	H	M	C	T	E	S	V	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I
P15841	:	V	I	K	A	D	P	C	N	A	E	R	R	V	L	I	G	Y	Q	I	E	R	R	E	V	I	A	G	L	A	V	S	A	N	L	I			

Motif VIII

Motif IX

**Η στοίχιση των μοτίβων VIII, X. Διακρίνονται τα χαρακτηριστικά κατάλοιπα για κάθε μοτίβο. Με κόκκινο χρώμα διακρίνονται τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με την περιοχή B**

M.HhaI	M.HaeIII
A248:N → P160:O	
T250:O → K162:O	T237:O → D152:O
A248:O → K162:N	
L251:O → R163:N	A235:N → A150:O
Y254:O → K300:N	V238:O → R163:N
	V238:N → Q151:O
	R229:N → D152:O

Όπως διαπιστώνουμε τα κατάλοιπα που αναφέρονται παραπάνω είναι συντηρημένα στις μεθυλάσες και

## Συγκριτικός πίνακας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μοτίβων VIII,X και της περιοχής B

μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι αλληλεπιδράσεις που αναφέρουμε είναι συντηρημένες, και ενδεχομένως παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία τους.

Στις μεθυλάσες, όπως έχει προαναφερθεί, παρατηρείται μία σημαντική δομική αλλαγή, που συνίσταται στην μετακίνηση μίας περιοχής ελεύθερης δομής, μήκους 20 αμινοξέων, η οποία επιτρέπει στα καταλυτικά κατάλοιπα να λάβουν τη θέση που απαιτείται για να επιτελέσουν τη λειτουργία τους.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του μηχανισμού που μεταφέρει το σήμα από την περιοχή αναγνώρισης του DNA στην καταλυτική περιοχή ώστε να επέλθει αυτή η δομική μεταβολή και να περατωθεί η κατάλυση. Η δομή της *M.HhaI* που υπάρχει τόσο με DNA όσο και χωρίς αυτό αποτέλεσε το μοντέλο για

P26358	:	NRFNST	LEENRNFV	FKRSMVLKLT	RC	VACTPRRAIIL
P13864	:	NRFNST	LEENRNFV	YRRSMVLKLT	RC	VACTPRRAIIL
P25265	:	TK-KSHT	SEENVEVVR	FNRGEVFNMF	QS	IPQQRDLVLF
P06530	:	CP-RLID	VAENVRGMM	LGRGEVLMQI	ED	VPQLPBRVIE
P13906	:	CP-RLVD	VAENVRGMM	LGCCEVFRQI	ED	VPQIPBRVIV
Haeiii	:	CSLRGID	LAENVRGMM	QRHMKAVQEF	QE	VACDPKRVFYI
P08455	:	CALRCID	LAENVSCML	NRHNCAVQNL	DKM	VACDPKRVFYI
P23737	:	CKRRCFA	LEENVRCLV	HDDGKTLVVM	LKV	VACDPKRVVII
Psp1	:	CKQLCFE	LEENVRCLA	NDCCRTLSTI	LKV	VPQKPRRIIII
P09795	:	CKRLGLE	VEENVRCLL	EQPGCVLHYI	IRI	VPQIPBRVIII
P24600	:	CK-RDEG	LEENVE---	ARLSKIHQQACS	SM	VPQLPBRITFVI
P10283	:	CKRRCFD	LEENVRCLV	GDVKDIIQKDF	FN	VACMPBRVIFI
P11408	:	CKRECFE	FEENVRCLI	HDDGNTLKVIT	LET	IPQKPKRVFV
P17044	:	CKRECFE	LEENVRCLL	NDNGNTFRVIT	DDN	LPQKPRRVIV
P05101	:	CVSKKNS	VEENVRKIK	HDKGRKTFKVI	LDT	LPQKPRRVIV
P24581	:	CLKKCF-	LEENVRQLK	HDKCRTLQVIT	LAH	IPQKPRRVIV
Hhai	:	CKQKCFE	FEENVRNFA	HDNGNTLEVVR	KNT	IPQKPRRVIMI
P15446	:	CKRGGFE	FEENVRGLK	HDKCRTLKTI	DMV	VPQKPRRVIV
P25262	:	CKNQAFD	LEENVRCLV	PRNRLCLEIIT	DS	VACMPDRVIV
P25266	:	CKNQAFD	LEENVRCLV	PRNRLCLEIIT	DS	VACMPDRVIV
P25264	:	CKNQAFD	LEENVRCLI	PRNRLCESIIT	DS	VACMPDRVIV
P25263	:	CKQKCFG	LEENVRCLT	HDKGRKTFKTI	LQK	VPQKPRRVIV
P19888	:	CKQKCFG	LEENVRCLV	HDKCRTLKTI	ISK	VPQKPRRVIV
P31974	:	CAQHGM-	LEENVRNLV	PRHRHEWLTIT	LET	TPQKPRRVIV
P16668	:	RSLNCEL	LEENVRRLI	SQRGRDFAVMI	ST	NAQKPRRVIV
P25282	:	CKNRDVS	LEENVRPFL	---DNKLTPIKNI		TPQKPRRAIIR
P36216	:	CSRTCFE	FEENSHML-	-SHTYNLDVV	PKK	AHQKPRRVIV
P15840	:	CIQKCMK	LEENVCALL	KKNEEELNQWK	QK	SSQKPRRVIMI

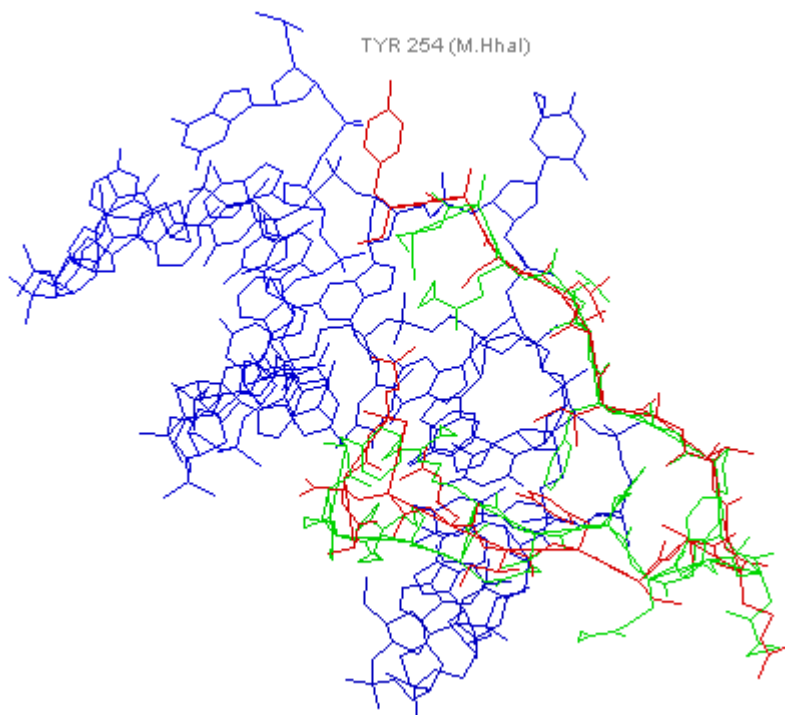
**Στοιχισμός περιοχών των μεθυλασών όπου διακρίνονται τα κατάλοιπα που με την αλληλεπίδραση τους μετέχουν στην μεταγωγή σήματος από την περιοχή αναγνώρισης του DNA και της καταλυτικής περιοχής**

την μελέτη ενός τέτοιου μηχανισμού μεταγωγής σήματος.

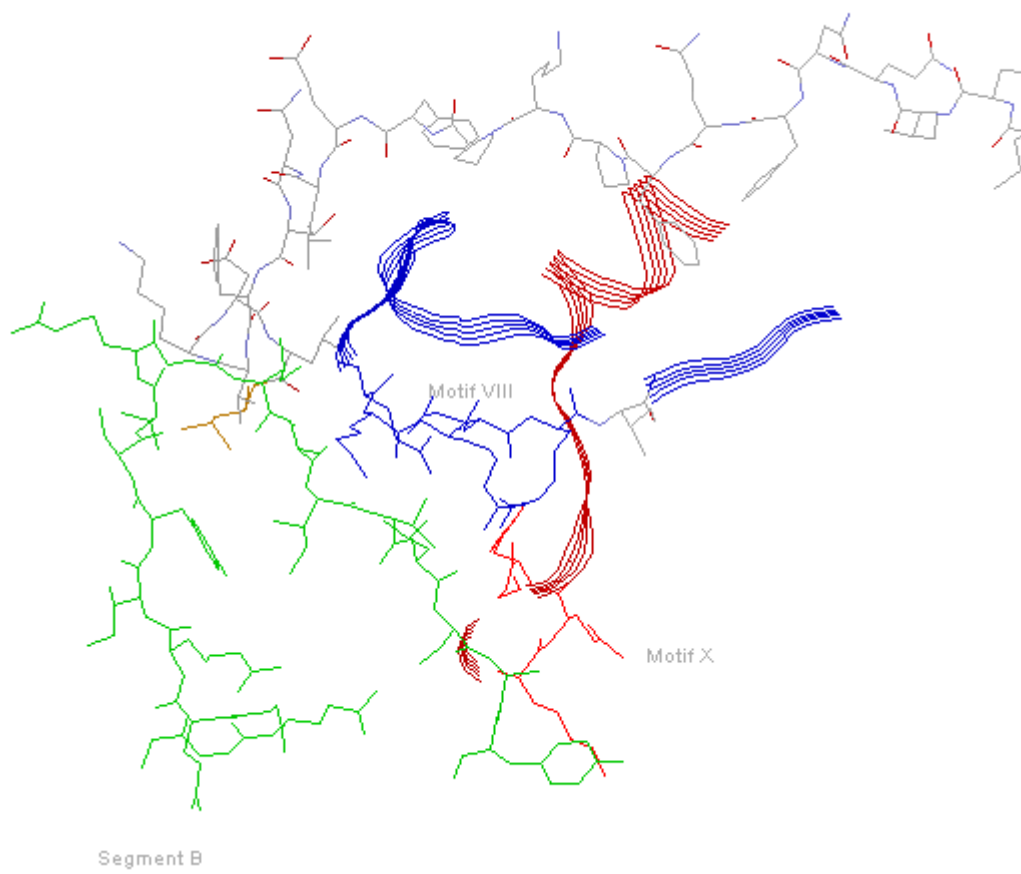
Η περιοχή των 20 καταλοίπων που μετακινείται, όταν δεν υπάρχει προσδεμένο DNA στο ένζυμο βρίσκεται σε μία χαλαρή δομή που δεν σχηματίζει πολλούς δεσμούς με το υπόλοιπο μόριο παρά μόνο ένα δεσμό μεταξύ K91 και N131, φαίνεται δηλαδή να «κολυμπάει» μέσα στο διάλυμα.

Η πρόσδεση του DNA στην περιοχή αναγνώρισης προκαλεί μία μετακίνηση της περιοχής αναγνώρισης και του υποστρώματος. Η μετακίνηση αυτή με τη σειρά της αλλάζει τη θέση της K122 η οποία σχηματίζει δεσμό με το E164 και σταθεροποιείται στη νέα της θέση. Η αλλαγή θέσης της K122 προκαλεί με τη σειρά της μία τοπική αστάθεια στο μόριο που φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ K91 και N131. Στη συνέχεια η περιοχή των 20 καταλοίπων μπορεί να κινηθεί ελεύθερα και να πάρει τη νέα της θέση ευνοώντας την κατάλυση. Η νέα της θέση σταθεροποιείται με τον σχηματισμό αλληλεπιδράσεων R97-DNA, K122-E164.

Τα κατάλοιπα που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά του σήματος όπως περιγράφεται παραπάνω είναι τα K122, E164, K91, N131. Τα K122, E164 φαίνεται να είναι συντηρημένα στα περισσότερα μόρια μεθυλάσων, ενώ δεν ισχύει το ίδιο και για τα άλλα δύο κατάλοιπα. Διαπιστώνουμε, όμως, ότι στην περιοχή που βρίσκονται τα K91 και N131 στην *M.HhaI* στις άλλες μεθυλάσες σε γειτονικές θέσεις βρίσκονται είτε τα ίδια είτε ανάλογα κατάλοιπα που μπορούν να επιτρέψουν τις ίδιες αλληλεπιδράσεις, όπως παραπάνω.



**Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται το τμήμα B. Διακρίνεται η δομική ομοιότητα στις δύο μεθυλάσες (*M.HaeII* με πράσινο, *M.HhaI* με κόκκινο) αλλά και ο τρόπος που περιβάλλει το DNA με μπλε. Στα άκρα του υπάρχουν κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν μη ειδικά με το υπόστρωμα.**



**Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του τμήματος B (πράσινο) και των μοτίβων VIII, X (μπλε και κόκκινο αντίστοιχα).**

## 28 Συγκρίσεις πρωτεϊνών, με στόχο την αποκάλυψη ιδιαίτερων ψυχρόφιλων χαρακτηριστικών.

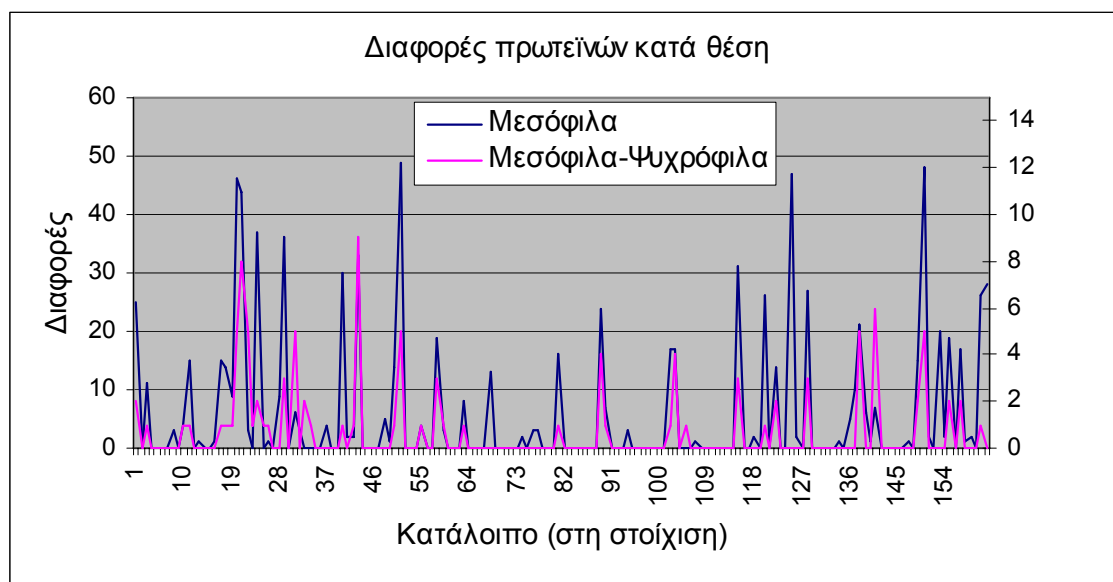
### 29 Συγκρίσεις της *M.PspPI* με όλες τις μεθυλάσες.

Προκειμένου να συγκριθεί η *M.PspPI* με τις υπόλοιπες, μεσόφιλες, μεθυλάσες ακολουθήθηκε η μέθοδος συγκρίσεων που περιγράφεται στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι». Για την σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν όλες οι μεθυλάσες που υπήρχαν στη βάση δεδομένων Swiss Prot. Απομακρύνθηκαν εγγραφές που αναφέρονταν σε τμήματα μορίων που έδειχναν ομοιότητα προς μεθυλάσες.

Από τις συγκρίσεις αυτές προκύπτει ότι ένας σημαντικός αριθμός διαφοροποιήσεων παρατηρείται τόσο μεταξύ των μεσόφιλων, όσο και μεταξύ μεσοφίλων – ψυχρόφιλων ενζύμων.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνεται ακριβώς ότι και στους δύο τύπους συγκρίσεων παρατηρούμε ένα σημαντικό αριθμό διαφοροποιήσεων, και επιπλέον η κατανομή κατά μήκος της στοίχισης δεν είναι διαφορετική.

Αν θέσουμε σαν όριο σημαντικότητας της διαφοροποίηση τα  $2\sigma$ , μπορούμε να μετρήσουμε τον αριθμό των διαφοροποιήσεων σε κάθε σύγκριση.



**Ο αριθμός των διαφοροποιήσεων κατά μήκος της στοίχισης των μεθυλασών. Φαίνεται ότι η κατανομή των διαφοροποιήσεων κατά μήκος της στοίχισης είναι όμοια και στις δύο κατηγορίες συγκρίσεων.**

	Μεσόφιλα-μεσόφιλα	Ψυχρόφιλα-μεσόφιλα
Μέσος όρος διαφοροποιήσεων	0,31	0,54
Διασπορά διαφοροποιήσεων	0,60	0,58
Μέσος όρος αριθμού διαφοροποιημένων ζευγών (>2σ)	6,94	6,41

Μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι μεταξύ των μεσόφιλων και των ψυχρόφιλων ενζύμων παρατηρείται

### **Η διαφοροποίηση μεταξύ των μεσόφιλων, μεσοφίλων-ψυχρόφιλων τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς τον αριθμό των διαφοροποιήσεων για την περίπτωση των μεθυλασών.**

αυξημένη ένταση διαφοροποιήσεων, από ότι μεταξύ των μεσόφιλων. Ο αριθμός των διαφοροποιήσεων είναι περίπου ο ίδιος μεταξύ των δύο κατηγοριών. Και στις δύο περιπτώσεις όμως οι διαφοροποιήσεις φαίνεται να κατανέμονται μέσα στα μόρια με όμοιο τρόπο.

### **30 Χρήση της ίδιας μεθόδου για την ανάλυση των α-αμυλασών.**

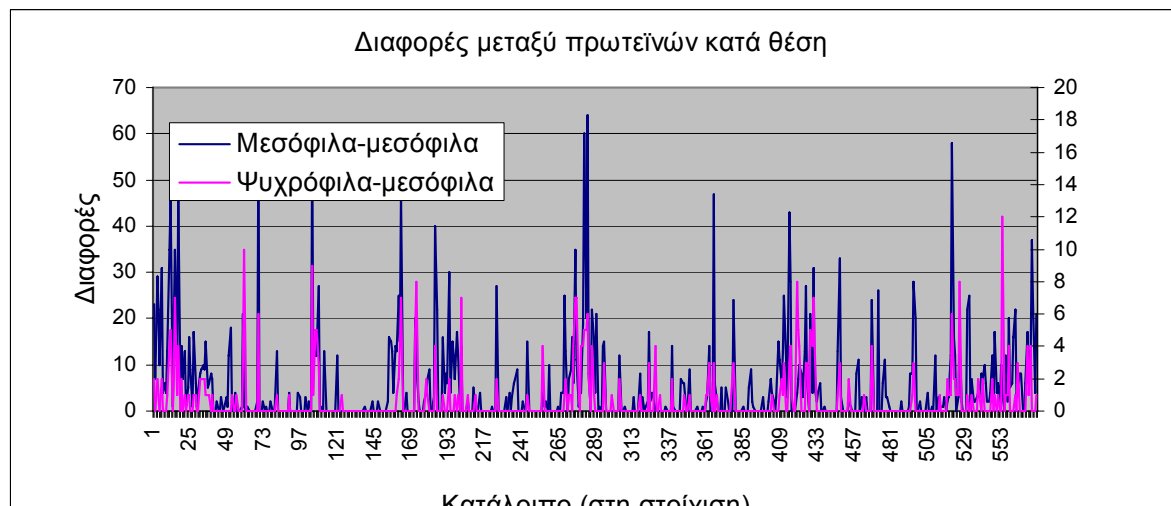
Η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των α-αμυλασών. Σαν δείγμα χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα 20 α-αμυλασών που επιλέγηκαν από την βάση δεδομένων. Στόχος της επιλογής ήταν η χρησιμοποίηση ενός μορίου από κάθε είδος οργανισμού και όχι περισσότερα, και η απομάκρυνση τμημάτων μορίων ή περιοχών μορίων που παρουσιάζουν ομολογία με α-αμυλάσες, χωρίς να ανήκουν σε τέτοια μόρια.

Χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία που περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι» έγινε σύγκριση των μεσοφίλων αμυλασών μεταξύ τους και κατόπιν των μεσοφίλων με την ψυχρόφιλη.

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης εμφανίζεται στον αμέσως επόμενο πίνακα και στα διαγράμματα που ακολουθούν.

	Μεσόφιλα-μεσόφιλα	Ψυχρόφιλα-μεσόφιλα
Μέσος όρος διαφοροποιήσεων	1,05	0,92
Διασπορά διαφοροποιήσεων	0,40	0,30
Μέσος όρος αριθμού διαφοροποιημένων ζευγών (>2σ)	16,37	19,15

### **Η διαφοροποίηση μεταξύ των μεσόφιλων, μεσοφίλων-ψυχρόφιλων τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς τον αριθμό των διαφοροποιήσεων για την περίπτωση των α-αμυλασών.**



**Ο αριθμός των διαφοροποιήσεων κατά μήκος της στοίχισης των α-αμυλασών. Φαίνεται ότι η κατανομή των διαφοροποιήσεων κατά μήκος της στοίχισης είναι όμοια και στις δύο κατηγορίες συγκρίσεων.**

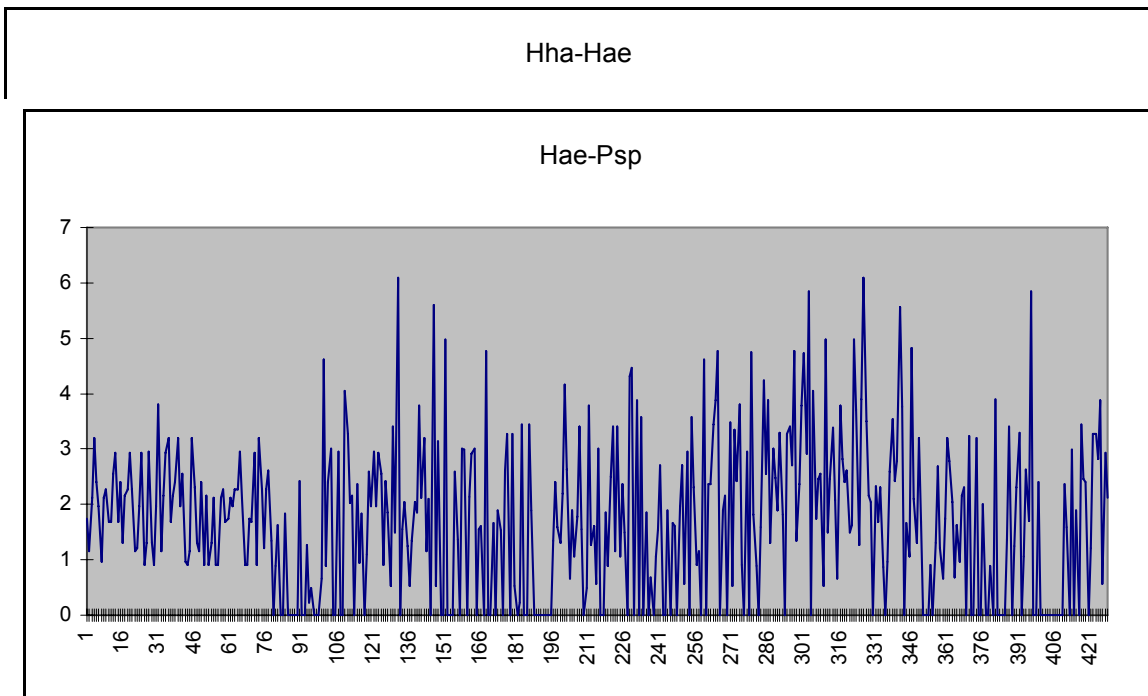
Όπως προκύπτει από το διάγραμμα παραπάνω, και στις αμυλάσες η κατανομή των διαφοροποιήσεων κατά μήκος της στοίχισης είναι ίδια τόσο όταν συγκρίνονται οι μεσόφιλες μεταξύ τους όσο και όταν συγκρίνεται η ψυχρόφιλη αμυλάση με τις μεσόφιλες.

Φαίνεται από τα παραπάνω ότι στην περίπτωση των αμυλασών η ένταση των διαφοροποιήσεων είναι η ίδια μεταξύ των μορίων των διαφόρων κατηγοριών αλλά διαφέρει ο αριθμός των διαφοροποιήσεων.

## 31 Συγκρίσεις της *M.PspPI* με τις *M.HhaI* *M.HaeIII*

### 32 Μελέτη των αλληλουχιών κατά αμινοξύ

Με την ίδια μέθοδο έγινε σύγκριση της ψυχρόφιλης *M.PspPI* με τις μεσόφιλες *M.HhaI* και *M.HaeIII*. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι τιμές της διαφοροποίησης και η κατανομή στις



**Κατανομή των διαφοροποιήσεων στο ζεύγος *M.HaeIII* και *M.PspPI*.**

διάφορες συγκρίσεις.

Από τις συγκρίσεις αναζητήθηκαν τα ζεύγη καταλοίπων με διαφοροποίηση μεγαλύτερη από 2σ.

Τα ζεύγη αυτά συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

( Η αρίθμηση των καταλοίπων γίνεται με βάση την αρίθμηση της αλληλουχίας της *M.HhaI* στη στοίχιση των τριών πρωτεϊνών)



<i>M.HhaI-</i> <i>M.HaeIII</i>	<i>M.HhaI-</i> <i>M.PspPI</i>	<i>M.HaeIII-</i> <i>M.PspPI</i>
	6	
		35
	48	
	52	
57		
	<b>59</b>	<b>59</b>
74		74
79		79
		96

<i>M.HhaI-</i> <i>M.HaeIII</i>	<i>M.HhaI-</i> <i>M.PspPI</i>	<i>M.HaeIII-</i> <i>M.PspPI</i>
		154
	<b>155</b>	<b>155</b>
169	169	
		184
275		
		297
306	306	
	318	
326		

*Τα κατάλοιπα που υποδεικνύονται από την σύγκριση μεταξύ των τριών μεθυσών και τα οποία εμφανίζουν διαφοροποίηση μεγαλύτερη από 2σ ανά ζεύγη.*

Μπορούμε και εδώ να διαπιστώσουμε ότι ο αριθμός των διαφορών μεταξύ των μεσόφιλων είναι μικρότερος από τον αριθμό των διαφορών από τη σύγκριση μεσόφιλες-ψυχρόφιλες, αν και η διαφορά είναι οριακή.

Επιπλέον, όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί η ένταση των διαφορών στη σύγκριση ψυχρόφιλων - μεσόφιλων είναι μεγαλύτερη.

	<i>Hhal-HaeIII</i>	<i>Hhal-PspPI</i>	<i>HaeIII-PspPI</i>
Μέσος όρος τιμής διαφοροποίησης	1,353143	1,670169	1,720254

### **Ένταση των διαφοροποιήσεων μεταξύ των ζευγών των μεθυλασών.**

Από την σύγκριση προκύπτει ο παρακάτω πίνακας των αντιστοιχίσεων των καταλοίπων των πρωτεϊνών

αριθμός καταλοίπου της αλληλουχίας <i>M.Hhal</i>	κατάλοιπο <i>M.Hhal</i>	κατάλοιπο <i>M.PspPI</i>
6	D	V
48	V	N
52	N	I
59	G	V
155	L	F
170	C	G
306	V	P
318	G	I

**Τα κατάλοιπα που προκύπτουν από την σύγκριση των *M.Hhal* και *M.PspPI***

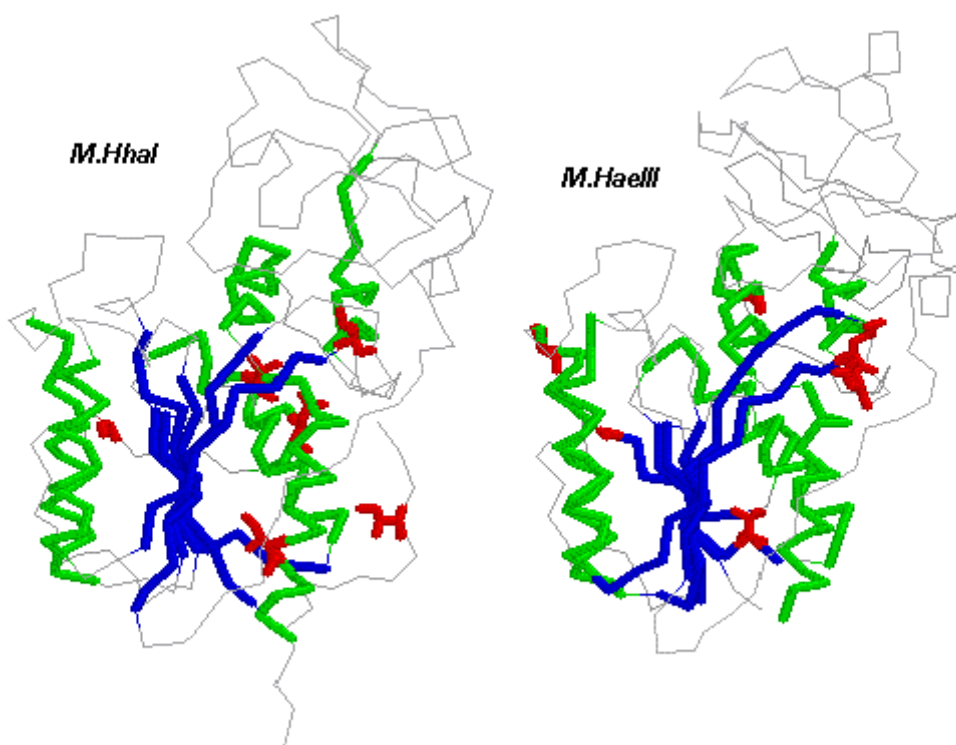
αριθμός καταλοίπου της αλληλουχίας M.HaeIII	κατάλοιπο M.HaeIII	κατάλοιπο M.PspPI
24	C	S
49	G	V
64	G	L
69	P	F
86	S	L
145	N	I
146	D	F
300	G	I

Γενικά αν εντοπίσουμε τα κατάλοιπα που αναφέρονται παραπάνω στις δομές των μεθυλασών, διαπιστώνουμε ότι βρίσκονται σε περιοχές ελεύθερης δομής, που συνδέουν στοιχεία δευτεροταγούς

### **Τα κατάλοιπα που προκύπτουν από την σύγκριση των M.HaeIII και M.PspPI**

δομής.

Επιπλέον διαπιστώνουμε ότι οι μεταλλαγές εντοπίζονται στον περιφερειακό χώρο των μορίων και όχι στο εσωτερικό τους.



**Η θέση των καταλοίπων που εντοπίστηκαν μετά την σύγκριση των τριών μεθυλασών στην δομή της M.HhaI και της M.HaeIII. Με κόκκινο χρώμα είναι τα κατάλοιπα, με μπλε οι β πτυχωτές επιφάνειες στο εσωτερικό του μορίου και με πράσινο οι α έλικες.**

### **33 Μελέτη της αλληλουχίας με τη χρήση παραθύρου**

Για την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής, έγινε προσπάθεια μελέτης της απόστασης στον 5διάστατο χώρο παραθύρων μήκους 9 καταλοίπων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους συντελεστές βαρύτητας που χρησιμοποιούνται και στη μελέτη της ευελιξίας.

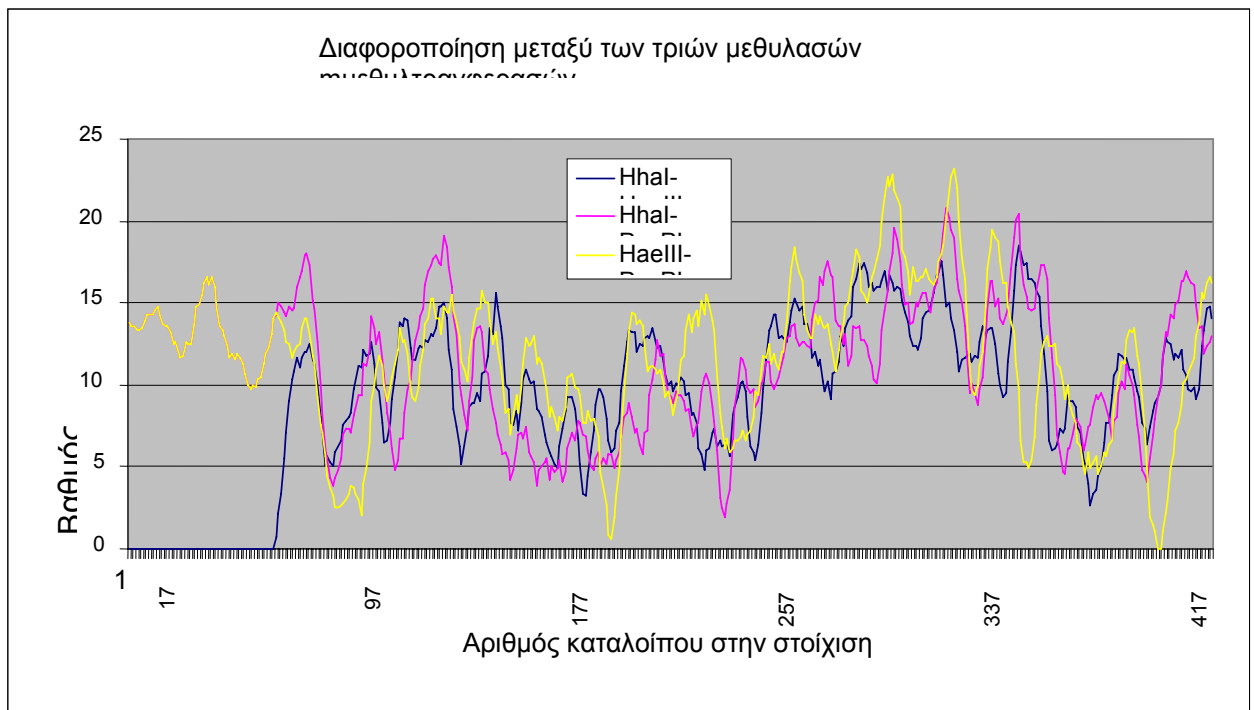
Από την ανάλυση αυτή βλέπουμε ότι αν και υπάρχουν περιοχές μεγάλης διαφοροποίησης, δεν μπορούμε να εντοπίσουμε περιοχές με διαφοροποίηση μεγαλύτερη από το κριτήριο που είχαμε θέσει νωρίτερα ( $MO + 2\sigma$ ).

	HhaI-HaeIII	HhaI-PspPI	HaeIII-PspPI
Μέσος όρος	9,208309	11,2219	11,56095
σ	4,85324	4,068286	4,40515

Παρατηρούμε και εδώ ότι ο μέσος όρος διαφοροποίησης της ψυχρόφιλης από τις μεσόφιλες, συγκριτικά με τη διαφοροποίηση μεταξύ των μεσόφιλων είναι αυξημένος.

**Μέσος όρος και διασπορά των διαφοροποιήσεων μεταξύ των αλληλουχιών των τριών μεθυλασών όταν χρησιμοποιείται παράθυρο που σύρεται στην αλληλουχία του κάθε ενζύμου.**

Αν ελαττώσουμε το κριτήριο ώστε να αρχίσουν να διακρίνονται κάποιες περιοχές με διαφοροποιήσεις καταλήγουμε στο λιγότερο αυστηρό:  $M.O + 1,2\sigma$ . Με το κριτήριο αυτό εντοπίζουμε τα κατάλοιπα 6-10, 49-57, 314-319, για την περίπτωση της HhaI-PspPI. Διαπιστώνουμε ότι τα κατάλοιπα που εντοπίσαμε με την προηγούμενη ανάλυση βρίσκονται μέσα σε περιοχές υψηλής διαφοροποίησης μεταξύ των πρωτεϊνών. Για την περίπτωση της HaeIII δεν μπορούμε να εντοπίσουμε περιοχές που έχουν τιμή διαφοροποίησης μεγαλύτερη από το όριο που θέτουμε. Πάντως μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι και για την περίπτωση αυτή λίγο ως πολύ επιβεβαιώνεται η πρόβλεψη που είχε γίνει με την προηγούμενη μέθοδο, αφού τα κατάλοιπα που είχαμε ξεχωρίσει βρίσκονται σε περιοχές όπου η ψυχρόφιλη *M.PspPI* είναι περισσότερο εύκαμπτη από την μεσόφιλη *M.HaeIII*. Εξαιρέση αποτελούν τα κατάλοιπα 155 για την *M.HhaI* και 24 για την *M.HaeIII* που δεν μπορούμε να τα εντάξουμε σε μία περιοχή έντονης διαφοροποίησης.



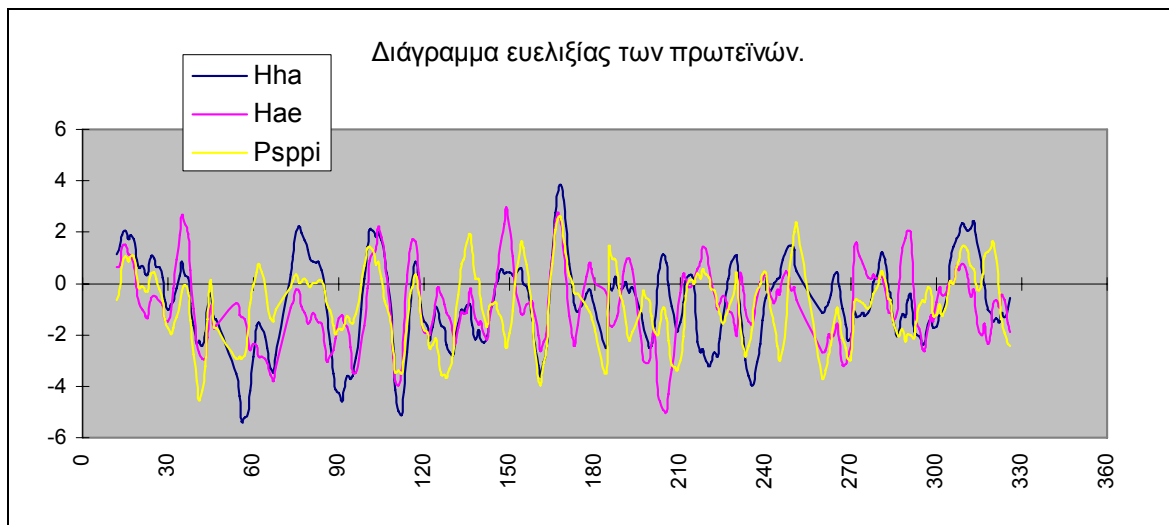
**Η διαφοροποίηση μεταξύ των τριών μεθυλασών όταν χρησιμοποιείται παράθυρο μινίμουμ 9 που σύρεται στην αλληλουχία τους**

### 34 Μελέτη της ευελιξίας των πρωτεϊνών

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι έγινε διάγραμμα της ευελιξίας της κάθε μεθυλτρανσφεράσης που μελετούμε.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα υπάρχει μία ομοιότητα στο πρότυπο ευκαμψίας μεταξύ των τριών πρωτεϊνών και μόνο σε μερικές περιοχές, (και ιδιαίτερα στη variable region, μεταξύ 200-250 στο παραπάνω διάγραμμα), παρατηρούμε ότι υπάρχουν αποκλίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών.

Παρατηρούμε ότι σημαντικές αποκλίσεις εμφανίζονται στις παρακάτω περιοχές.



**Η κατανομή της ευελιξίας των τριών μεθυλασών κατά μήκος της στοίχισης**

Αρχικό κατάλογο στην αρίθμηση της HhaI που παρουσιάζει αυξημένη ευελιξία	Κατάλογο που εντοπίστηκε με άλλη μέθοδο
45	48
58-72	52,59
86-88	
92-98	
132-142	
153-157	155,170
293-300	
317-326	306,318

### **Περιοχές που παρουσιάζουν αυξημένη ευελιξία στην ψυχρόφιλη μεθυλάση έναντι των μεσόφιλων**

Από τον παραπάνω πίνακα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι μεταλλαγές που με την προηγούμενη μεθοδολογία εντοπίστηκαν, επιδρούν με αυξητικό τρόπο στην ευκαμψία του μορίου. Για τα άλλα κατάλοιπα που αρχικά εντοπίστηκαν το 6,170, 306 δεν μπορούμε να το εντάξουμε σε κάποια από τις περιοχές που παρουσιάζουν διαφορά στην ευκαμψία του μορίου ενώ το 52 είναι κοντά στην περιοχή που περιλαμβάνει και το 59. Για την περίπτωση της HaeIII έχουμε τον παρακάτω πίνακα:

Αρχικό κατάλογο στην αρίθμηση της HaeIII	Κατάλογο που εντοπίστηκε με άλλη μέθοδο
34	
48-62	49,64,69
76-78	
82-88	86
122-132	
144-148	145,146
296-303	300
320-330	

Μπορούμε να δούμε ότι κάποια κατάλοιπα που έχουμε εντοπίσει προηγουμένως εμφανίζονται και σε

### **Συγκριτικός πίνακας όπου φαίνονται τα κατάλοιπα που βρίσκονται στις περιοχές με αυξημένη ευελιξία στην ψυχρόφιλη μεθυλάση και τα κατάλοιπα που έχουν εντοπιστεί με τη μέθοδο υπολογισμού της διαφοροποίησης με την ευκλείδεια απόσταση.**

εύκαμπτες περιοχές. Δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για το κατάλογο 24 που δεν είναι σε περιοχές που εντοπίζουμε με την μέτρηση της ευκαμψίας.

Αν συνδυάσουμε τα κατάλοιπα που έχουμε εντοπίσει με τις παραπάνω μεθόδους διαπιστώνουμε ότι ορισμένα κατάλοιπα έχουν εντοπιστεί με όλους τους τρόπους που χρησιμοποιήσαμε. Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται τα κατάλοιπα που έχουν εντοπιστεί και με τις τρεις μεθόδους καθώς και τα αντίστοιχα τους κατάλοιπα στις άλλες πρωτεΐνες.

<i>M.PspPI</i>	100	131	142	164	224,225	239	383	402
<i>M.HhaI</i>	35	59	74	96	155	170	298	318
<i>M.HaeIII</i>	24	49	64	86	146	160	300	321

### **Συνολικός πίνακας όπου καταγράφονται τα κατάλοιπα που έχουν υποδειχθεί από τις προηγούμενες μεθόδους ως άξια μελέτης.**

