

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας

Μελέτη του συμπλοκου
Polarized growth
Chromatin - associated Controller
«PCC complex»

Διπλωματική Εργασία

Ιωάννης Γιαννιός

Λαρίσα 2004

*Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

*Μελέτη του συμπλόκου Polarized growth
Chromatin - associated Controller
(PCC complex)*

Διπλωματική εργασία

Ιωάννης Γιαννιός

Λάρισα 2004

*Μελέτη του συμπλόκου Polarized growth
Chromatin - associated Controller
(PCC complex)*

*Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

*Μελέτη του συμπλόκου Polarized growth
Chromatin - associated Controller
(PCC complex)*

Διπλωματική εργασία

Ιωάννης Γιαννιός

Λάρισα 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4069/1
Ημερ. Εισ.: 09-11-2004
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2004
ΓΙΑ



Ευχαριστίες

Η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Επιστημονικής Έρευνας (*Centre National de la Recherche Scientifique, C.N.R.S.*) της Γαλλίας, στα πλαίσια του προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών *Socrates-Erasmus* ανάμεσα στο πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και το *Universite de Paris XI* της Γαλλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια του Ινστιτούτου *Rauster* και του πανεπιστημίου *Universite de Paris VI* της Γαλλίας, κυρία *Baudin-Baillieu Agnès* για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση κατά τη διεξαγωγή της ερευνητικής διαδικασίας, όπως και τον κύριο *Libri Domenico*, υπεύθυνο εργαστηρίου στο κέντρο μοριακής γενετικής (*Centre de Génétique Moléculaire, C.G.M.*) για την αμέριστη βοήθειά του σε όλα τα στάδια του προγράμματος. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επίκουρο καθηγητή βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κύριο *Σταθόπουλο Κωνσταντίνο*, για τη πραγματοποίηση του προγράμματος και τις πολύτιμες συστάσεις του. Τέλος, είμαι ευγνώμων στα μέλη του εργαστηρίου “*RNA, informational molecule and tool*” του τμήματος RNA, του κέντρου μοριακής γενετικής του Εθνικού Κέντρου Επιστημονικής Έρευνας της Γαλλίας, *Kisseleva-Romanova Elena, Illan Laila, Boulay Jocelyne* και *Rougemaille Mathieu* για τη πολύτιμη βοήθειά τους.

Η διπλωματική εργασία υπεβλήθη στο τμήμα βιοχημείας και βιοτεχνολογίας της σχολής επιστημών υγείας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και αξιολογήθηκε από τριμελή επιτροπή, αποτελούμενη από τους κ.κ.: *Μαμούρη Ζήση*, Αναπληρωτή καθηγητή Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών, *Μαρκουλάτο Παναγιώτη*, Αναπληρωτή καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, *Σταθόπουλο Κωνσταντίνο*, Επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας με έμφαση τη μεταβολική ρύθμιση, τους οποίους θερμά ευχαριστώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ABSTRACT	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
<u>Ο ρόλος του PCC1 γονιδίου</u>	4
<u>Ο ρόλος της Esa1p πρωτεΐνης κατά την ακετυλίωση των ιστονών</u>	10
<u>Ο ρόλος της Sir2p πρωτεΐνης κατά τη μεταγραφική αποσιώπηση στο Saccharomyces cerevisiae</u>	12
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	
<u>Ορισμοί</u>	19
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
<u>Υλικά</u>	21
<u>Μέθοδοι</u>	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
<u>Ανεύρεση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων του PCC2 γονιδίου</u>	36
<u>Αλληλεπίδραση των PCC1 και ESA1 γονιδίων in vivo</u>	49
<u>Πρόσδεση της Sir2p στο GAL1 γονίδιο, στα τελομερή, τη rDNA περιοχή και στις διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος του Saccharomyces cerevisiae</u>	53
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
<u>Συνεισφορά της Pcc2p πρωτεΐνης στην απομόνωση πρωτεϊνών στόχων-δράσης του PCC συμπλόκου</u>	57
<u>Ο ρόλος των PCC1 και ESA1 γονιδίων κατά τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου</u>	59
<u>Η δράση της Sir2p πρωτεΐνης κατά τη μεταγραφική αποσιώπηση και τη λειτουργία του PCC1 γονιδίου στο Saccharomyces cerevisiae</u>	61
<u>Σύνοψη</u>	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντιγόνα καρκίνου/ όρχεων (CT antigens) αποτελούν μια κατηγορία ογκογόνων δεικτών των οποίων η φυσιολογική έκφραση περιορίζεται στους όρχεις και η έκφρασή τους σχετίζεται με την πρόοδο του όγκου. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί περίπου είκοσι CT αντιγόνα, με το NY-ESO-1 να αποτελεί ένα από τα πιο ανοσογόνα. Ένα παρόμοιο γονίδιο έχει απομονωθεί από το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο έχει αποδοθεί το όνομα PCC1 (Polarized growth Chromatin-associated Controller 1) και το οποίο ενδέχεται να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο του NY-ESO-1 παράγοντα. Ο PCC1 παράγοντας δρα ως σύμπλοκο (PCC complex) με τρεις πρωτεΐνες, τις Pcc2p, Pcc3p και Bud32p. Στόχος της ερευνητικής προσπάθειας αποτέλεσε η ταυτοποίηση πρωτεϊνών-στόχων του PCC συμπλόκου, με κύριο μέλημα την ανεύρεση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων του PCC2 γονιδίου. Παράλληλα, διαπιστώθηκε η *in vivo* αλληλεπίδραση του Pcc1 παράγοντα με την ακετυλοτρανσφεράση, Esa1p. Τέλος, μέσω πειραμάτων ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης, επιβεβαιώθηκε ότι η Sir2p πρωτεΐνη προσδένεται στις rDNA και τις τελομερικές περιοχές του γονιδιώματος του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ σε αντίθεση με τη Pcc1p, δεν προσδένεται στο GAL1 γονίδιο.

ABSTRACT

Cancer/Testis antigens (CT) are a category of tumoral markers whose normal expression is restricted at testicles and their expression is related to the tumoral progression. Approximately, twenty CT antigens have been identified to date, among which NY-ESO-1 is one of the most immunogenic. A similar gene was isolated from Saccharomyces cerevisiae, named PCC1 (Polarized growth Chromatin-associated Controller 1). Functional studies of this factor provide important information about the role of NY-ESO-1. PCC1 factor acts as a complex (PCC complex) with three proteins, Pcc2p, Pcc3p and Bud32p. Aim of this study was to identify proteins that are targets of the PCC complex, and especially to recover dominant negative alleles of PCC2 gene. In addition, the genetic interaction between the PCC1 factor and the acetyltransferase Esa1p was ascertained. Finally, we confirmed through chromatin immunoprecipitation assays that Sir2p is recruited to rDNA array and telomeres, whereas, in comparison to Pcc1p, Sir2p is not recruited to GAL1 gene.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ρόλος του *PCCI* γονιδίου

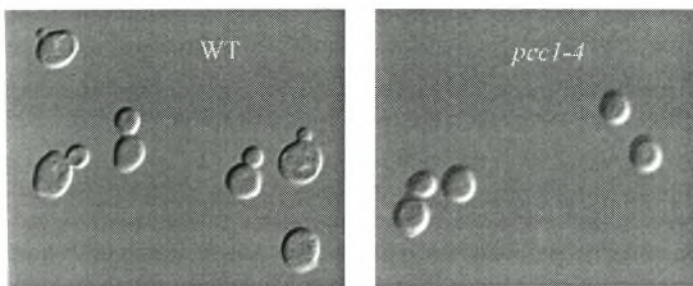
Τα αντιγόνα καρκίνου/ όρχεων (cancer testis antigens, CT αντιγόνα) είναι μια κατηγορία ογκογόνων δεικτών των οποίων η φυσιολογική έκφραση περιορίζεται στους όρχεις και τα γενετικά κύτταρα. Αυτά τα αντιγόνα εκφράζονται σε μια αναλογία όγκων διαφορετικής προέλευσης αλλά όχι στους φυσιολογικούς σωματικούς ιστούς. Η έκφρασή τους σχετίζεται με την πρόοδο του όγκου και γενικά επάγει μια αυθόρμητη ανοσολογική αντίδραση στους ασθενείς, η οποία αποτελεί στην πραγματικότητα τον κύριο στόχο για τη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου. Περίπου είκοσι CT αντιγόνα έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα. Το NY-ESO-1 είναι ένα από τα πιο ανοσογόνα, ικανό να επάγει μια ανοσολογική και κυτταρική αντίδραση σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών. Ωστόσο, παρόλο το μεγάλο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για αυτό το παράγοντα, πολύ λίγα είναι γνωστά όσον αφορά τη λειτουργία, τη ρύθμιση και την εμπλοκή του στη διαδικασία της ογκογένεσης. Ένα παρόμοιο γονίδιο έχει απομονωθεί από το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο έχει αποδοθεί το όνομα *PCCI* (Polarized growth Chromatin-associated Controller 1). Η μελέτη της λειτουργίας αυτού του παράγοντα σε ένα σύστημα-μοντέλο, ενδέχεται να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο του NY-ESO-1 παράγοντα κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης. ^(1, 2, 3, 4)

Ο *Pcc1* παράγοντας απομονώθηκε κατά τη διάρκεια ενός ελέγχου για καταστολείς μιας *U1snRNP* μετάλλαξης, οι οποίοι υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα (high-copy number suppressor screen). Αποτελεί ένα μικρό ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF), το οποίο περιέχει ένα ιντρόνιο με μη κανονική 5' θέση ματίσματος *GUAaGU* (το *PCCI* ιντρόνιο έχει μία σπάνια 5' θέση ματίσματος, η οποία περιέχει στη θέση 4 αδενίνη αντί της φυσιολογικής ουρακίλης). Ο *Pcc1* παράγοντας είναι σχεδόν απαραίτητος αλλά πιθανώς δεν εμπλέκεται στη διαδικασία ματίσματος. Το *PCCI* ή *YKR095W* γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα XI του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και η πρωτεΐνη *Pcc1p* αποτελείται από 88 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 9,99Da και εντοπίζεται στον πυρήνα. ^(5, 6)

Σύγκριση της αλληλουχίας της *Pcc1p* πρωτεΐνης με διάφορες βάσεις δεδομένων αποκάλυψε ότι αυτό το γονίδιο ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, η οποία έχει διατηρηθεί από τα αρχαιοβακτήρια έως τον άνθρωπο. Τέσσερα θεωρούμενα (putative) ομόλογα είναι παρών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, με σημαντικότερο το NY-ESO-1

καρκινικό αντιγόνο. Σύγκριση αυτών των γονιδίων επέτρεψε την αναγνώριση δυο διατηρημένων περιοχών άγνωστης λειτουργίας. Έλλειψη της πιο διατηρημένης N-τελικής περιοχής της Pcc1p ή μετάλλαξη των συντηρημένων καταλοίπων της σε αλανίνες οδήγησε σε απενεργοποίηση αυτής της πρωτεΐνης. Αντίθετα, αντικατάσταση της N-τελικής περιοχής με την αντίστοιχη περιοχή της ανθρώπινης NY-ESO-1 ή με την αλληλουχία της ITBA-2, ενός άλλου μέλους της οικογένειας, δεν επηρέασε τη λειτουργία της Pcc1p, κάτι το οποίο υποδεικνύει τη διατήρηση της λειτουργίας αυτών των πρωτεϊνών. ^(1, 2, 5)

Pcc1 ανενεργά κύτταρα (null cells) παρουσιάζουν πολύ μικρή ανάπτυξη σε όλες τις θερμοκρασίες και δεν είναι βιώσιμα πάνω από τους 37°C. Για τη μελέτη της λειτουργίας της Pcc1p, κατασκευάστηκε ένα δυνητικά μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, το *pcc1-4*, μέσω μεταλλαξιγένεσης με PCR (εικόνα 1). ⁽⁵⁾



Εικόνα 1: Ο φαινότυπος του *pcc1.4* μεταλλάγματος στους 37°C. Το *pcc1.4* μετάλλαγμα είναι θερμο-ευαίσθητο από τους 37°C και δεν σχηματίζει προεκβολές ζευγαρώματος.

Για να μελετηθεί η επίδραση του Pcc1 παράγοντα στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιήθηκε το *pcc1* αλληλόμορφο και βρέθηκε ότι η λειτουργία της Pcc1p απαιτείται για τη διαδικασία εκβλάστησης και τη κυττοκίνηση κατά τη διάρκεια του κύκλου εκβλάστησης του ζυμομύκητα. Η εμπλοκή της Pcc1p στον έλεγχο της πολωμένης αύξησης (polarized growth) επιβεβαιώθηκε γενετικά, από το γεγονός ότι τα θερμοευαίσθητα αλληλόμορφα σε συνδυασμό με μεταλλάξεις σε έναν από τους κύριους φορείς πολωμένης αύξησης, *cdc24* και *cdc42*, δεν επιβιώνουν. Επιπρόσθετα, FACS ανάλυση των *pcc1-4* κυττάρων έδειξε ότι αυτά συγκεντρώνονται με 1C DNA περιεχόμενο στη μη επιτρεπτή θερμοκρασία των 37°C. Τελικά, έλεγχοι βιωσιμότητας δείχνουν ότι τα *pcc1-4* κύτταρα μπορούν και επανακτούν τη κανονική πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, σε επιτρεπτή θερμοκρασία μετά από επώαση για τουλάχιστον 8 ώρες σε μη επιτρεπτή θερμοκρασία. Συνεπώς, ο Pcc1 παράγοντας απαιτείται για τη φυσιολογική πρόοδο των κυττάρων διαμέσω των G1/S και M/G1 μεταπτώσεων.

Η συσχέτιση της Pcc1p με το σχηματισμό των προεκβολών ζευγαρώματος ('shmoo') ως απόκριση στη φερομόνη έχει επίσης μελετηθεί. Τα αγρίου τύπου κύτταρα σχηματίζουν προεκβολές ζευγαρώματος ως απόκριση στη φερομόνη, ενεργοποιώντας ένα σετ γονιδίων το οποίο οδηγεί σε μορφολογικές αλλαγές (σχηματισμός των "shmoo") και καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, κυττολογικές αναλύσεις των *pcc1-4* κυττάρων έδειξαν ότι τα τελευταία ανταποκρίνονται μερικώς στον άλφα παράγοντα (alpha factor), επειδή ο κυτταρικός κύκλος παρουσιάζει καθυστέρηση, ενώ τα κύτταρα είναι ελαττωματικά στο σχηματισμό προεκβολών ζευγαρώματος.

Ακόμη, έχειδειχθεί ότι η Pcc1p απαιτείται για την αποτελεσματική μεταγραφή των γονιδίων που επάγονται από τον άλφα παράγοντα, αλλά και των γονιδίων τα οποία εκφράζονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου εκβλάστησης. Για να ελεγχθεί αν τα *pcc1* μεταλλάγματα μπορούσαν να ανταποκριθούν στον άλφα παράγοντα, εξετάστηκαν τα mRNA επίπεδα μιας σειράς γονιδίων (*FUS1*, *STE2*, *FAR1*), των οποίων η έκφραση ενεργοποιείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK. Σε όλες τις περιπτώσεις, η επαγωγή του mRNA ήταν σημαντικά μειωμένη. Λαμβάνοντας υπόψη το πυρηνικό εντοπισμό της Pcc1p, τις επιδράσεις στην έκφραση των γονιδίων και τις γενετικές αλληλεπιδράσεις, εξετάστηκε η πιθανότητα η Pcc1p να στοχεύει στο DNA. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης με PCC1-TAP σε μη ενεργές και ενεργές συνθήκες (επαγωγή με άλφα παράγοντα), οι οποίες έδειξαν ότι η Pcc1p μπορούσε να ενωθεί με τα *FUS1*, *STE2* και *FAR1* γονίδια κατά την ενεργοποίησή τους ως απόκριση στον άλφα παράγοντα. Για να εξεταστεί αν ο Pcc1 επηρεάζει ένα διαφορετικό φυσιολογικό μονοπάτι, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα για γονίδια τα οποία ενεργοποιούνται από γαλακτόζη (*GAL1* και *GAL10*). Καταρχήν, βρέθηκε ότι τα επίπεδα των *GAL1* και *GAL10* μεταγραφημάτων ήταν σημαντικά μειωμένα στα θερμοευαίσθητα κύτταρα μετά από επώαση σε μέσο που περιέχει γαλακτόζη. Στη συνέχεια, η ανάκτηση του PCC1-TAP στα *GAL1* και *GAL10* γονίδια εξετάστηκε κάτω από μη ενεργές (μέσο που περιέχει ραφινόζη), ενεργές (μέσο που περιέχει γαλακτόζη) και κατασταλτικές συνθήκες (μέσο που περιέχει γλυκόζη). Το PCC1-TAP ChIP σήμα ήταν χαμηλό στις ενεργές συνθήκες, αυξήθηκε κατά την επαγωγή με γαλακτόζη και μειώθηκε δραστικά σε background επίπεδα κατά την μεταχείριση με γλυκόζη, δείχνοντας ότι η ανάκτηση της Pcc1p στα *GAL* γονίδια εξαρτάται από τη γαλακτόζη. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Pcc1p προσδένεται σε διάφορα ανεξάρτητα μεταξύ τους ρυθμιζόμενα γονίδια και μάλιστα με μεταγραφικά εξαρτώμενο τρόπο, με προτιμώμενη πρόσδεση για τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες των γονιδίων.

Επιπρόσθετα, προκαταρκτικές έρευνες δείχνουν αλληλεπίδραση της Pcc1p με περιοχές του γενώματος οι οποίες είναι μεταγραφικά ανενεργές, κάτι το οποίο δηλώνει ότι ίσως η πρωτεΐνη έχει ένα πιο γενικό ρόλο στην επαναδιοργάνωση ή τις τροποποιήσεις της χρωματίνης και μια ειδική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην πολωμένη ανάπτυξη ή/ και τον κυτταρικό κύκλο. ⁽⁵⁾

Τέλος, για να μελετηθεί η μοριακή δράση της Pcc1p, οι πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με τη Pcc1p αναλύθηκαν με βιοχημική απομόνωση του σχηματιζόμενου συμπλόκου και φασματομετρία μάζας. Το απομονωμένο σύμπλοκο περιέχει τρεις πρωτεΐνες ενωμένες με τη Pcc1p: τις Pcc2p, Pcc3p και Bud32p. Η Pcc2p ή Ykr038p είναι μια Ο-σιαλο-γλυκοπρωτεάση/ ενδοπεπτιδάση (O-sialo-glycoprotease/ endopeptidase) η οποία έχει διατηρηθεί στον άνθρωπο, τη *Drosophila* και το ποντίκι, και ανήκει στην οικογένεια των M22 μεταλλοπρωτεασών. Η Pcc3p δεν έχει καμία γνωστή λειτουργική περιοχή μέχρι στιγμής και φαίνεται ότι είναι ορθόλογη μόνο με πρωτεΐνες των μυκήτων. Η τρίτη πρωτεΐνη, Bud32p, απομονώθηκε όταν η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε σε ελαφρά χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων, πιθανώς λόγω χαλαρότερης σύνδεσής της με το σύμπλοκο. Βρέθηκε ότι είναι μια κινάση σερίνης/ θρεονίνης, ομόλογη της ανθρώπινης PRPK (η οποία ενώνεται και πιθανώς φωσφορυλιώνει την p53), η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία εκβλάστησης του *Saccharomyces cerevisiae*. Πολλαπλές γενετικές και επιπρόσθετες φυσικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε αυτές τις τρεις πρωτεΐνες έχουν βρεθεί: έχουν παραχθεί δυνητικά *pcc2* και *pcc3* μεταλλάγματα, τα οποία παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο με αυτό των *pcc1* μεταλλάγμάτων. Οι Pcc2p και Pcc3p συνδέονται με τη Pcc1p σε ένα σύστημα διπλών υβριδίων και τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα τους είναι μη βιώσιμα σε συνδυασμό με τα *pcc1* μεταλλάγματα. Επίσης, έχει δειχθεί μέσω ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης ότι αυτές οι πρωτεΐνες (Pcc2p και Pcc3p) είναι κοντά στο DNA κατά την μεταγραφική επαγωγή, όπως συμβαίνει και με τη Pcc1p. Αυτά τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι η λειτουργία των Pcc1/2/3p βασίζεται στην ακεραιότητα του συμπλόκου. Επιπλέον, η διατήρηση αυτών των παραγόντων (με 60% ομοιότητα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τη *Drosophila* στη περίπτωση της Pcc2p) δείχνει ότι η λειτουργία του συμπλόκου είναι διατηρημένη στους ανώτερους ευκαρυώτες, ενώ η παραγωγή λειτουργικών χμαιρικών γονιδίων με ανθρώπινα ορθόλογα (Pcc1p) ή ολόκληρο το ανθρώπινο γονίδιο (Pcc2p, Bud32p) στο ζυμομύκητα έδειξε ότι η λειτουργία του συμπλόκου πιθανώς να είναι διατηρημένη στα μετάζωα. Τέλος, η παρουσία μια δομής

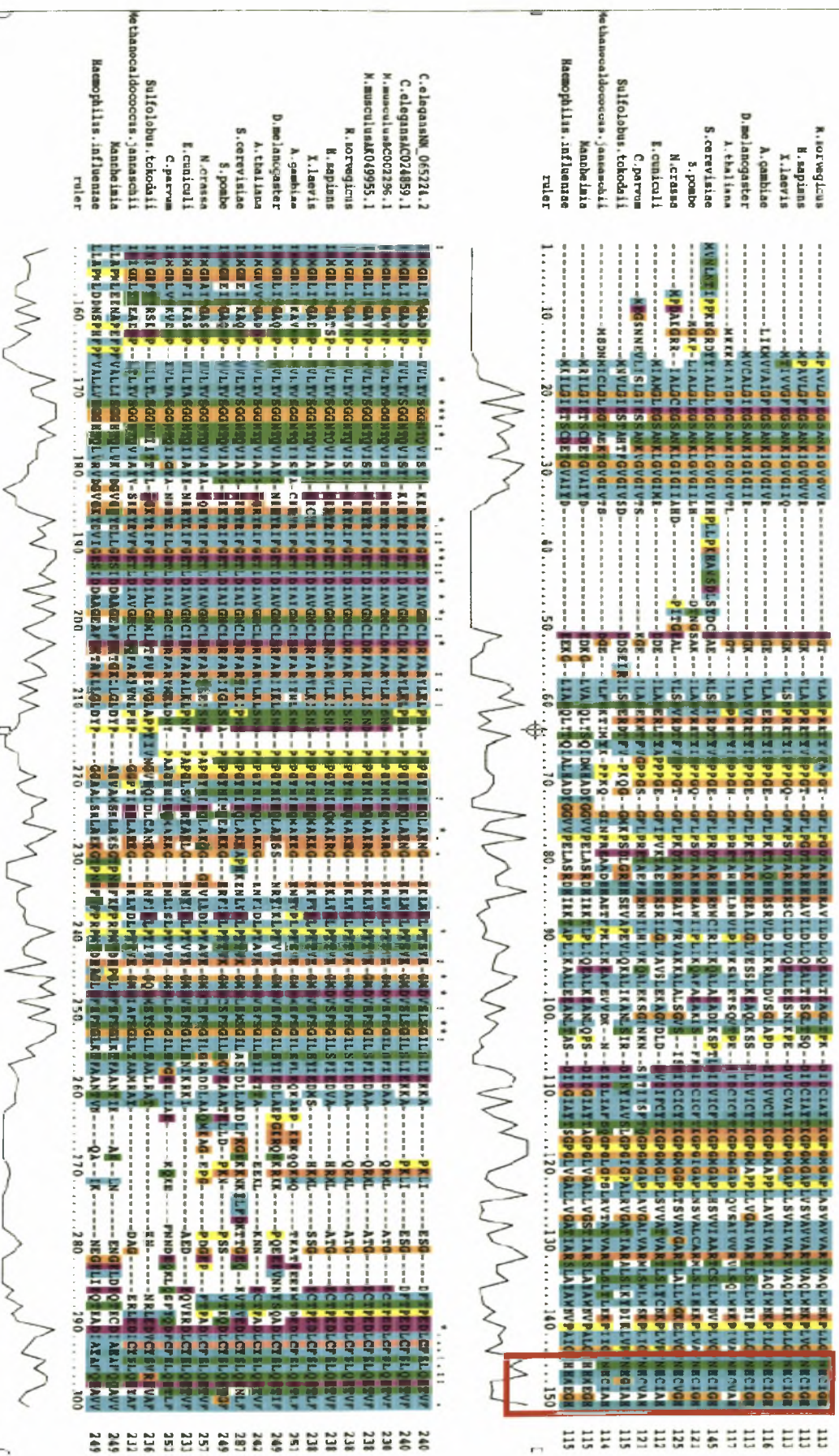
κινάσης και μιας πρωτεάσης στο εσωτερικό του συμπλόκου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη πρόβλεψη του τρόπου δράσης του. ⁽⁵⁾

Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της Pcc2p (το *YKR038c/ KAE1* γονίδιο υπάρχει στο χρωμόσωμα XI του *S. cerevisiae*, κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη 386aa) περιέχει ένα μοτίβο πρόσδεσης ψευδαργύρου, το οποίο είναι καθολικά διατηρημένο και η ακεραιότητα του οποίου αναμένεται να απαιτείται για τη καταλυτική δράση αυτής της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών (εικόνα 2). ^(5, 6)

Στο *Saccharomyces cerevisiae*, η ακεραιότητα του *PCC2* γονιδίου είναι ουσιώδης για τη ζωή του κυττάρου, καθώς η απενεργοποίησή του είναι θανάσιμη. Επιπρόσθετα, ο φαινότυπος των *pcc2* null κυττάρων είναι πολύ όμοιος αυτό των *pcc1* null κυττάρων, παρουσιάζοντας πολύ μικρή αύξηση και θερμοευαισθησία πάνω από τους 32°C. Για να μελετηθεί αν οι φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο πρωτεϊνών (Pcc1p και Pcc2p) αντανακλούν μια κοινή λειτουργία, το *pcc1-4* μετάλλαγμα διασταυρώθηκε με ένα *pcc2-18* μετάλλαγμα. Το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος ήταν μη βιώσιμο, υποδεικνύοντας ότι κάθε μετάλλαγμα από μόνο του εκθέτει μερικώς μόνο τη λειτουργία του PCC συμπλόκου. Για να διαπιστωθεί αν η Pcc1p προσδέεται σε μεταγραφικά ενεργά γονίδια, ως μέρος του συμπλόκου, πειράματα ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης έδειξαν ότι η Pcc2-TAP πρωτεΐνη μπορούσε να συνδεθεί σε γονίδια τα οποία επάγονται από τον άλφα παράγοντα, όπως επίσης και στο *GAL1* γονίδιο. Η *pcc2-18* μετάλλαξη επηρέασε επίσης την έκφραση του *GAL1* γονιδίου, αν και σε μικρότερο βαθμό συγκρινόμενη με την επίδραση του *pcc1-4* αλληλόμορφου. Τέλος, χρωμοσωμική επισήμανση (GFP-chromosomal tagging) αποκάλυψε πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης. ^(7, 8)

Αξιοσημείωτα, η Pcc2p βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τη Bud32 κινάση. Η λειτουργική σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης τονίζεται από τη παρατήρηση ότι σε μερικά είδη του *Methanococcus* (Archaea), ένα μόνο γονίδιο κωδικοποιεί ένα πολυπεπίδιο το οποίο αποτελείται από μια N-τελική περιοχή όμοια με την Pcc2p πρωτεΐνη και μια C-τελική περιοχή όμοια της Bud32p πρωτεϊνικής κινάσης (εικόνα 3). Συνεπώς, η αλληλεπίδραση που παρατηρείται στο ζυμομύκητα ανάμεσα στις δυο πρωτεΐνες υποδεικνύει ένα εξελικτικό μηχανισμό διαχωρισμού των γονιδίων και τη διατήρηση της λειτουργικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα προϊόντα αυτών. ^(7, 9)

Εικόνα 2: Τα δύο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης στο μοτίβο πρόσδεσης ψευδαργύρου της Pcc2p πρωτεΐνης, η ακεραιότητα του οποίου απαιτείται για τη καταλυτική δράση των M22 μεταλλοπρωτεϊνών.



Ykr038 MMSRVTFTSCNDAYIYLLREGNSQAFPNVAVGSKMVLNLTIPKNGRDYYIALGLEGSANKLGVGIV
MJ1130 MTCLEGRGTAFKTVGVGIV

Ykr038 KHPLILPFHANSDLSDYDCEAEMLSNIRDYVTEFEGEFLPRDTNRHHRNWCIRLIKQALAEADIKSP
MJ1130 -----TSDGVEVLFNKTIMYKPKQGINPREAKDHHASTFPKLIKFAFEVVDKN--

Ykr038 TLDIDVICETKGGCMGAPLHSSVVIAAATCSLWDVFLVGVNHCICHIEMGREITKACQNFVVLVYSGGN
MJ1130 --EIDLIAESQGGELGPSLRVTATVARTLSBTLKKETIGVNHCIANIEIGKLTTEAEDELTLVYSGGN

Ykr038 TQVIAYVSEKRYRIFSEETLDIATGNCIDPFARTLKIENKPSDCYNIROLAKKAPHKENLVLVPTVKGM
MJ1130 TQVIAYVSEKRYRVEGETIDIAVGNCLDGFARYVNLPHPGGE-YIEE-LARKG---KKLVDLVPYTVKGM

Ykr038 DLSMSGI:IASIDLLAKQILFKGNKKNKILFDKTTGQKQVTEDELQVSLQENLFAMHVEITERAMAHVNS
MJ1130 DIAFSGI:ITAAMPAY-DAGER-----LEDTCYBIQRYAFSHLVEITERAJANTNK

Ykr038 NQVLLVGGVGCNVRIOENMAGKCKDRANGQVHATDNREGIDNGVHIAQAGLLEYRGGGIVKDYJETVV
MJ1130 GEVMLVGGVAANNRLRENKAMCEGQ-IVDFYVPPKEEGCDNGAMIAWGLLPMKHGR-WMSLDETKI

Ykr038 TQKPRTEDEVYAAIRD
MJ1130 IPHYRTDMEVNVNIEKIEKGGKKK-----I PSHLIGAGAEADIKRD
Bud32 MTQCFIDKVSSYLTPDQVDIAPISCGAERIVFTT

MJ1130 -----SYLDFDVYIKERVVKGYRDERLDENIRKSKTAREAVYALVKDFGI PAPIYFDVDLQNK
Bud32 TTHPYLFRANDSQQNYEINYEPKAYRHPQIECALTIQHTLNESELEAKLYLIPGLQVPLIACDFYN

MJ1130 RIMMSYINGKLAK-----IVIEDNL-DIAYKIGEIVGKLNKNDVINDLTTSHIVL
Bud32 GFVWLEFLGEDLPGGHGFNSLNKNFLWMDQDPYSDLVATTLKRVGRQIGLLHWNDYCHDELTSNFIF

MJ1130 DKDL-----YIIEFGGGRISNLEEDQWDEIVFKKAVLSTHHEKFDENRFLGYSVYORNEITIE
Bud32 VRIGARWPHLIDFGLGSEVSNLEEDKGVDEYVLEPAIISTHSHKHAEKYNAWIMEGPEEVYREQGANGA

MJ1130 LMKDVE--RRARYVE
Bud32 KKLKEVTKRFEVRLRGRKRSMLG

Εικόνα 3: Δομή της γλυκοπρωτεάσης MJ1130 του *Methanococcus jannaschi*. Η MJ1130 πρωτεΐνη μπορεί να διαιρεθεί σε δυο περιοχές: μια N-τελική περιοχή, όμοια της Pcc2p πρωτεΐνης του *Saccharomyces cerevisiae* και μια C-τελική περιοχή, όμοια της Bud32p πρωτεΐνης. Τα ταυτόσημα αμινοξέα υποδηλώνονται με γκρι χρώμα.

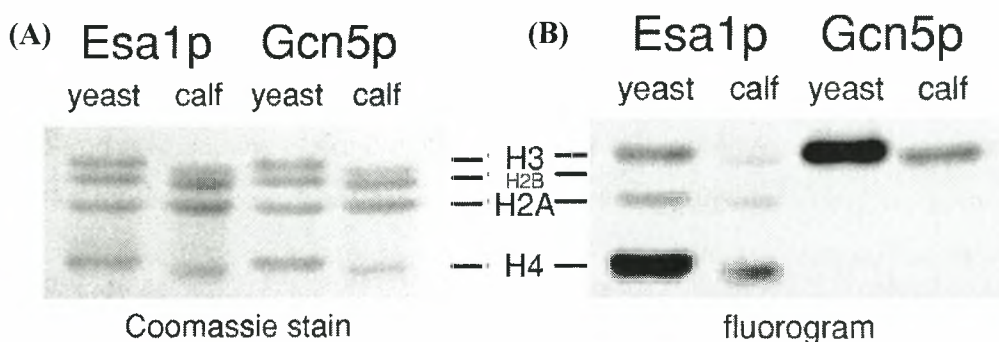
Ο ρόλος της Esa1p πρωτεΐνης κατά την ακετυλίωση των ιστονών

Ποικίλες κυτογενετικές και βιοχημικές διαφορές ανάμεσα στη μεταγραφικά ενεργή και ανενεργή χρωματίνη έχουν αναγνωριστεί εδώ και πολύ καιρό. Προηγούμενες βιοχημικές και γενετικές μελέτες και η πρόσφατη δομή του νουκλεοσώματος υποστηρίζουν ότι τα αμινοτελικά άκρα των διατηρημένων ιστονών είναι οι κύριοι παράγοντες αυτής της ρύθμισης. Απομακρυνόμενοι από το νουκλεόσωμα, τα άκρα αυτά συμμετέχουν σε ενδο-νουκλεοσωμικές αλληλεπιδράσεις και ίσως τροποποιούνται μεταμεταφραστικά, οδηγώντας σε τοπικές διαφορές στη δομή της χρωματίνης λειτουργώντας μέσω επαγωγής των πολυμερασών και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Ανάμεσα στις παρατηρούμενες τροποποιήσεις των ιστονών, η ακετυλίωση είναι ίσως η πιο μελετημένη,

και ίσως συνεισφέρει τόσο στην συγκρότηση της χρωματίνης αλλά και στην εγκαθίδρυση μεταγραφικών καταστάσεων σε συγκεκριμένες περιοχές ή σε ολόκληρα χρωμοσώματα. Αναλύσεις προσδιορισμού της αλληλουχίας έχουν ταυτοποιήσει μια υπερ-οικογένεια άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες είναι γνωστές ή προβλέπεται να δρουν ως ακετυλοτρανσφεράσες. Για κάποιες από αυτές οι λειτουργίες τους είναι άγνωστες, ενώ άλλες έχουν “εμφανείς” αλληλεπιδράσεις με τη χρωματίνη. Τα *SAS* (something about silencing) γονίδια της MYST οικογένειας έχουν αναγνωριστεί κατά κύριο λόγο για το ρόλο τους στη μεταγραφική “αποσιώπηση” (transcriptional silencing) στο *Saccharomyces cerevisiae*. Η MYST οικογένεια περιλαμβάνει δυο γονίδια-σιωπής (*SAS2* και *SAS3*), ανθρώπινα γονίδια τα οποία συσχετίζονται με τη λευχαιμία και με την ανθρώπινη ιϊκής ανοσοανεπάρκειας τύπου1, Tat πρωτεΐνη, και το γονίδιο *mof* της *Drosophila*, ένα γονίδιο απαραίτητο για την αντιστάθμιση δόσης στα αρσενικά άτομα. Ένα μέλος της οικογένειας είναι και το *ESAI* γονίδιο (essential SAS family acetyltransferase) το οποίο κωδικοποιεί μια απαραίτητη ακετυλοτρανσφεράση. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) *YOR244w* βρίσκεται στο χρωμόσωμα XV και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 445 αμινοξέων, η οποία περιλαμβάνει μια δομή ακετυλοτρανσφεράσης και μια αμινοτελική χρωμοπεριοχή, ένα μοτίβο το οποίο υπάρχει σε πολλές πρωτεΐνες οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν τη μεταγραφή μέσω σύνδεσής τους με τη χρωματίνη. ^(8, 10)

Το *ESAI* γονίδιο κωδικοποιεί μια ακετυλοτρανσφεράση με διαφορετική εξειδίκευση υποστρωμάτων από τις άλλες, το οποίο ίσως δείχνει ότι έχει νέες ή πιθανώς πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες. Έχει βρεθεί ότι η *Esa1p* ακετυλιώνει τις ιστόνες με διαφορετικό τρόπο από τα άλλα ένζυμα του ζυμομύκητα και δρα ως η καταλυτική υπομονάδα του 1.3-MDa NuA4 συμπλόκου το οποίο ακετυλιώνει τόσο ελεύθερες ιστόνες όσο και τη χρωματίνη και αξιοσημείωτα, μπορεί να προάγει την μεταγραφή *in vitro*. Η *Esa1p* ακετυλιώνει κατά κύριο λόγο την ιστόνη H4 και σε μικρότερο βαθμό τις ιστόνες H3 και H2A. Επιπλέον, η *Lys5* της ιστόνης H4 αποτέλεσε την κύρια περιοχή ακετυλίωσης από τη πρωτεΐνη στο ζυμομύκητα (εικόνα 4). Οι λυσίνες στις θέσεις 8, 12 και 16 ακετυλιώνονται επίσης αλλά λιγότερο αποτελεσματικά, υποδεικνύοντας ότι καθεμία από τις εν δυνάμει ακετυλιωμένες λυσίνες της ιστόνης H4 είναι πιθανός στόχος δράσης της *Esa1p*.

Θερμοευαίσθητα *esa1* μεταλλάγματα χάνουν την ενζυμική δράση τους in vitro, δεν παρουσιάζουν ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης (Lys5) στην ιστόνη H4 in vivo και κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες δεν παρουσιάζουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης τόσο in vitro όσο και in vivo. ⁽¹⁰⁾



Εικόνα 4: Η *Esa1p* πρωτεΐνη ακετυλιώνει συγκεκριμένες ιστόνες. Μελέτες της HAT δραστηριότητας, χρησιμοποίησαν ιστόνες από ζυμομύκητα ή μοσχάρι ως υπόστρωμα, και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-18% πολυακρυλαμίδης, το οποίο βάφηκε με *Coomassie brilliant blue* (A) και αναλύθηκε με φλουορογραφία (B). Η δράση της ανασυνδυσασμένης *Esa1p* συγκρίθηκε με αυτή ανασυνδυσασμένης *Gcn5p*. Ενώ η *Esa1p* πρωτεΐνη ακετυλιώνει εξειδικευμένα την ιστόνη H4, η *Gcn5p* δρα στην ιστόνη H3.

Ο ρόλος της Sir2p πρωτεΐνης κατά τη μεταγραφική αποσιώπηση στο *Saccharomyces cerevisiae*

Η αποσιώπηση στο *Saccharomyces cerevisiae* περιλαμβάνει το σχηματισμό μιας ειδικής δομής της χρωματίνης, η οποία μπλοκάρει την έκφραση των περισσοτέρων γονιδίων εντός της σιωπηλής χρωματίνης, ανεξάρτητα από το ποιος ενεργοποιητής ή ποια RNA-πολυμεράση χρησιμοποιείται. ⁽⁸⁾

Η σιωπηλή χρωματίνη στο *S. cerevisiae* είναι παρόμοια με την ετεροχρωματίνη σε οργανισμούς όπως ο αραβόσιτος, τα έντομα και τα θηλαστικά. Η ανακάλυψη ότι οι N-τελικές ουρές της ιστόνης H4 απαιτούνται για τη διαδικασία αποσιώπησης αποκάλυψε ότι η αποσιώπηση στο *S. cerevisiae* περιλαμβάνει επίσης και μια εξειδικευμένη δομή χρωματίνης. Οι N-τελικές ουρές των ιστονών H3 και H4 είναι υπο-ακετυλιωμένες στη σιωπηλή χρωματίνη. Οι περιοχές αυτές αποτελούνται από συνεχείς κατανομές των Sir πρωτεϊνών, οι οποίες μαζί με τα υπο-ακετυλιωμένα νουκλεοσώματα, πιστεύεται ότι σχηματίζουν μια διατεταγμένη, συμπαγή δομή, η οποία υπόκειται περιορισμούς όσον αφορά τη μεταγραφή. Οι σιωπηλές περιοχές είναι λιγότερο προσβάσιμες στις

περιοριστικές νουκλεάσες καθώς και στις DNA μεθυλάσες, παρουσιάζουν ομαλά διατεταγμένα στο χώρο νουκλεοσώματα, και έχουν αλλοιωμένη τοπολογία. Η ικανότητα της σιωπηλής χρωματίνης να μπλοκάρει τα περιοριστικά ένζυμα και τις μεθυλάσες υποδεικνύει ότι ίσως εμποδίζει και τη πρόσβαση της μεταγραφικής συσκευής στους προαγωγείς. (5, 8)

Γενετικές μελέτες έχουν υποδείξει διάφορες περιοχές στο γένωμα του *S. cerevisiae* οι οποίες υπόκεινται αποσιώπηση. Αυτές οι περιοχές είναι οι δυο σιωπηλές φυλοκαθοριστικές περιοχές (silent mating type), τα τελομερή και το rRNA-κωδικοποιόν DNA (rDNA). Στο *S. cerevisiae*, τα απλοειδή κύτταρα μπορεί να είναι δύο ειδών *a* ή *α*. Το κάθε φύλο καθορίζεται από το αλληλόμορφο που υπάρχει στη φυλοκαθοριστική περιοχή MAT. Τα MAT_a και MAT_α κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζοντας την έκφραση άλλων γονιδίων, είναι υπεύθυνες για τη διαφορά ανάμεσα στα δυο φύλα. Επιπρόσθετα με τη περιοχή MAT, όλα τα στελέχη *S. cerevisiae* έχουν μη εκφραζόμενα αντίγραφα των φυλοκαθοριστικών γονιδίων σε δυο άλλες περιοχές, τις HML και HMR, οι οποίες βρίσκονται κοντά στα δυο τελομερή του χρωμοσώματος όπου βρίσκονται τα MAT γονίδια (εικόνα 5). Στα περισσότερα στελέχη, η HML περιοχή περιέχει ένα “μυστικό” αντίγραφο του MAT_a γονιδίου και η HMR περιέχει ένα “μυστικό” αντίγραφο του MAT_α γονιδίου. Μερικά στελέχη *S. cerevisiae*, γνωστά ως ομοθαλικά (homothallic strains), μπορούν να αλλάζουν το φύλο τους από *a* σε *α* ή από *α* σε *a* μέχρι και μια φορά ανά γενιά. Αυτή η αλλαγή καταλύεται από μια χωρο-ειδική ενδονουκλεάση, κωδικοποιούμενη από το HO γονίδιο, η οποία κόβει τις φυλοκαθοριστικές περιοχές. Η επιδιόρθωση αυτού του κοψίματος (the repair of the cleavage) γίνεται με έναν μηχανισμό παρόμοιο με τη γονιδιακή μετατροπή, όπου ένα αντίγραφο των γονιδίων είτε στη HML ή στη HMR μεταφέρεται στη MAT περιοχή. Αν και τα περισσότερα εργαστηριακά στελέχη δεν περιέχουν ένα ενεργό γονίδιο της ενδονουκλεάσης (ho), και συνεπώς δεν μπορούν να αλλάζουν το φύλο τους, όλα περιέχουν “μυστικά” φυλοκαθοριστικά γονίδια στις HML και HMR περιοχές.

Τα τελομερή είναι σύμπλοκα πρωτεϊνών με DNA τα οποία σχηματίζονται στις άκρες των χρωμοσωμάτων και τα οποία είναι σημαντικά για τη σταθερότητα των άκρων των χρωμοσωμάτων και τη σωστή οργάνωσή τους μέσα στο πυρήνα. Στο *S. cerevisiae*, το DNA των τελομερών αποτελείται από C₁₋₃A/TG₁₋₃ επαναλήψεις οι οποίες έχουν μήκος 300bp. Αυτές οι επαναλήψεις οργανώνονται σε μη νουκλεοσωμικές χρωματινικές δομές τα οποία καλούνται τελοσώματα (telosome). Τα τελομερή περιέχουν πολλαπλές θέσεις ένωσης της Rap1 πρωτεΐνης, οι οποίες προσδένουν το Sir-σύμπλοκο. Όταν έχουν

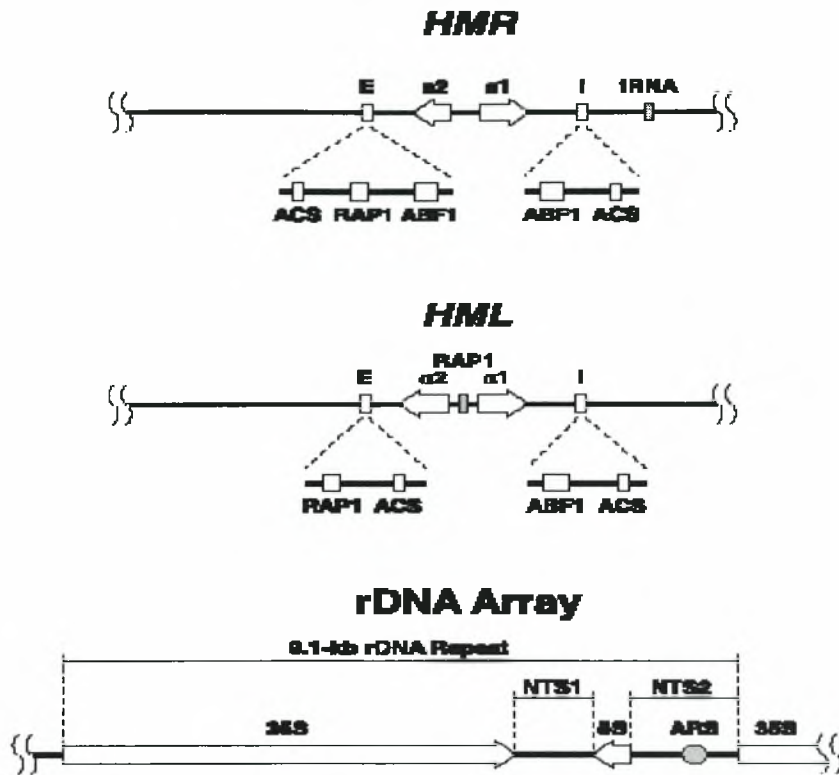
συγκεντρωθεί στα τελομερή, οι Sir πρωτεΐνες διαδίδονται κατά μήκος του νουκλεοσώματος για να σχηματιστεί μια δομή σιωπηλής χρωματίνης.

Το rDNA του *S. cerevisiae* αποτελείται από μια αλληλουχία 9.1-κιλοβάσεων, η οποία επαναλαμβάνεται διαδοχικά 100 με 200 φορές. Κάθε rDNA επανάληψη κωδικοποιεί το 35S rRNA, το οποίο είναι πρόδρομος των 25S, 18S και 5.8S rRNAs και μεταγράφεται από τη pol I, και το 5S rRNA το οποίο μεταγράφεται από τη pol III/RNAPIII. Αυτά τα δυο γονίδια διαχωρίζονται από τα μη μεταγραφόμενα τμήματα, NTS1 και NTS2 (εικόνα 5). Μόνο ένα τμήμα των 35S γονιδίων μεταγράφεται από τη pol I σε μια δεδομένη στιγμή. Σε αντίθεση με το επαναλαμβανόμενο DNA των περισσότερων ευκαρυωτών, οι rDNA επαναλήψεις μεταγράφονται σε υψηλά ποσοστά από τις RNAPI και RNAPIII. Ωστόσο, όταν γονίδια αναφοράς της RNAPII εισάγονται στην rDNA περιοχή, αυτά εκφράζονται σε χαμηλότερο ποσοστό από την περίπτωση που βρίσκονται στη φυσιολογική τους χρωμοσωμική περιοχή. Μια ουσιώδη διαφορά ανάμεσα στην αποσιώπηση της rDNA περιοχής και τις δυο άλλες περιοχές είναι ότι η αποσιώπηση των γονιδίων στο rDNA απαιτεί τη Sir2p, αλλά δεν απαιτεί κανένα άλλο SIR γονίδιο. Μελέτες γενώματος και ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης υποδεικνύουν ότι το υπόλοιπο γονιδίωμα του *S. cerevisiae* δεν υφίσταται αποσιώπηση επαγόμενη από τις Sir πρωτεΐνες. ^(5, 8)

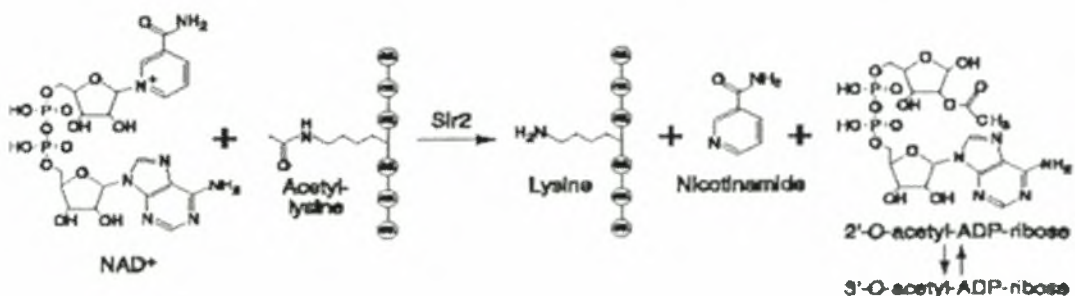
Μελέτες ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης αποκάλυψαν ότι οι Sir πρωτεΐνες εξαπλώνονται από τα τελομερή προς το εσωτερικό των χρωμοσωμάτων και διανέμονται στις HMR και HML περιοχές του γενώματος. Σε αυτές τις περιοχές οι ουρές των ιστονών H3 και H4 είναι υπο-ακετυλιωμένες σε όλες τις θέσεις οι οποίες έχουν εξεταστεί. Η συγκέντρωση των Sir πρωτεϊνών στη σιωπηλή χρωματίνη δημιουργεί μια υψηλής οργάνωσης δομή, όπως αποκαλύπτεται από μελέτες προστασίας μικροκοκκικής νουκλεάσης (micrococcal nuclease protection). Συγκεκριμένα, η HMR αποτελείται από δώδεκα νουκλεοσώματα, διαταγμένα σε έξι ζεύγη στενά συσχετιζόμενων νουκλεοσωμάτων τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους με μεγαλύτερες συνδετικές αλληλουχίες. Η HML είναι οργανωμένη σε τουλάχιστον εικοσιτρία νουκλεοσώματα, τα περισσότερα από τα οποία είναι επακριβώς διατεταγμένα στο χώρο και διατεταγμένα σε ζεύγη. Κάθε HM περιοχή πλαισιώνεται από καταστολείς (silencers), γνωστούς ως E και I (εικόνα 5). Και οι τέσσερις καταστολείς δρουν ως αυτόνομα αντιγραφόμενες αλληλουχίες σε πλασμίδια, αλλά μόνο οι HMR-E και HMR-I είναι ικανές να αποτελέσουν αρχικά σημεία διπλασιασμού στο χρωμόσωμα.

Μεταλλάξεις οι οποίες ενεργοποιούν τα σιωπηλά φυλοκαθοριστικά γονίδια έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση τεσσάρων *SIR* γονιδίων. Οι Sir2p, Sir3p, και Sir4p είναι απαραίτητες για την αποσιώπηση, εξαιτίας του ρόλου τους ως δομικά συστατικά της σιωπηλής χρωματίνης. Οι Sir2p και Sir4p σχηματίζουν ένα διαλυτό σύμπλοκο. Σε αντίθεση, η Sir3p δεν συν-απομονώνεται με τις άλλες πρωτεΐνες σε στοιχειομετρικές ποσότητες. Από τη στιγμή που και οι τρεις Sir πρωτεΐνες προσδέονται στον καταστολέα, αλληλεπιδράσεις-συνεργασίας τις καθιστούν ικανές να εξαπλώνονται διαμέσω των σιωπηλών περιοχών, με τις Sir3p και Sir4p να ενώνονται στις απακετυλιωμένες ουρές των ιστονών H3 και H4. Η Sir2p είναι μια NAD⁺-εξαρτώμενη απακετυλοτρανσφεράση των ιστονών, η οποία τροποποιεί τις ουρές των ιστονών H3 και H4 για να δημιουργήσει υψηλής συγγένειας περιοχές πρόσδεσης για τις Sir3p και Sir4p και απαιτείται για την αποσιώπηση και των τριών γενωμικών περιοχών. Σε αντίθεση με τις άλλες Sir πρωτεΐνες, η Sir1p συνεισφέρει αλλά δεν είναι απαραίτητη για την αποσιώπηση. Η Sir1p δρα στην εγκαθίδρυση της αποσιώπησης διευκολύνοντας τη συνένωση των άλλων Sir πρωτεϊνών. (5, 8)

Η Sir2p είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών, η οποία είναι διατηρημένη από τα βακτήρια έως τους ανθρώπους (SIR2-όμοιες αλληλουχίες έχουν αναγνωριστεί σε ευκαρυώτες, όπως ο *Caenorhabditis elegans* και ο άνθρωπος, αλλά και στο *Staphylococcus aureus*) και συνδέει μια αντίδραση απακετυλίωσης με την υδρόλυση του NAD⁺ (εικόνα 6). Σε αυτή την αντίδραση, ένα μόριο NAD⁺ διασπάται σε ADP-ριβόζη και νικοτινάμιδο νουκλεοτίδιο για κάθε ακετυλομάδα που αφαιρείται. Η ακέτυλο-ομάδα μεταφέρεται στην ADP-ριβόζη, σχηματίζοντας το προϊόν 2'-O- ακέτυλο-ADP-ριβόζη. Η ελεύθερη ενέργεια της υδρόλυσης του γλυκοσιδικού δεσμού ανάμεσα στο νικοτινάμιδο νουκλεοτίδιο και τη ριβόζη είναι -8.2 kcal/mol, συγκρινόμενη με την ελεύθερη ενέργεια υδρόλυσης του ATP. Έτσι, απελευθερώνεται αξιοσημείωτη ελεύθερη ενέργεια κατά την αποσιώπηση μιας περιοχής, όπως η HMR, η οποία ίσως απαιτείται για να επάγει αλλαγές της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και του DNA, απαραίτητες για το σχηματισμό της σιωπηλής χρωματίνης. Ένα αδιευκρίνιστο θέμα είναι ότι η Sir2p στοχεύει ειδικά στις λυσίνες 9 και 14 της ιστόνης H3 και στη λυσίνη 16 της ιστόνης H4 *in vitro*, ενώ *in vivo* όλες οι εν δυνάμει ακετυλιωμένες λυσίνες των ιστονών H3 και H4 είναι πλήρως απακετυλιωμένες στις σιωπηλές περιοχές. (8, 11)



Εικόνα 5: Οι HM και rDNA περιοχές. Οι HM περιοχές (άνω και μεσαίο τμήμα της εικόνας). Υποδηλώνονται οι E και I καταστολείς (E, I), τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια των $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 1$, $\alpha 2$ φυλοκαθοριστικών γονιδίων, και το tRNA γονίδιο που βρίσκεται στην HMR περιοχή και εμπλέκεται στο σχηματισμό του ορίου αποσιώπησης. Ο HMR-E καταστολέας έχει μήκος 140 bp και περιοχές πρόσδεσης για τρεις απαραίτητους παράγοντες: ORC, Rap1p και Abf1p. Οι Rap1p και Abf1p είναι δυο από τους πιο γνωστούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές στο *S. Cerevisiae*. Το ORC είναι ένα σύμπλοκο αναγνώρισης του σημείου έναρξης της αντιγραφής, το οποίο είναι διατηρημένο στους ευκαρυώτες και είναι απαραίτητο για την αρχή διπλασιασμού του DNA. Αυτοί οι παράγοντες ενώνονται με τους E και I καταστολείς και δρουν στην επαγωγή της συγκρότησης του Sir συμπλόκου. Η rDNA περιοχή (κάτω τμήμα της εικόνας). Η 9.1-kb επαναλαμβανόμενη μονάδα περιέχει τα 35S και 5S γονίδια, τα οποία διαχωρίζονται από μη μεταγραφόμενες περιοχές, NTS1 και NTS2. Η αρχή της αντιγραφής αποτελεί το σημείο ARS.

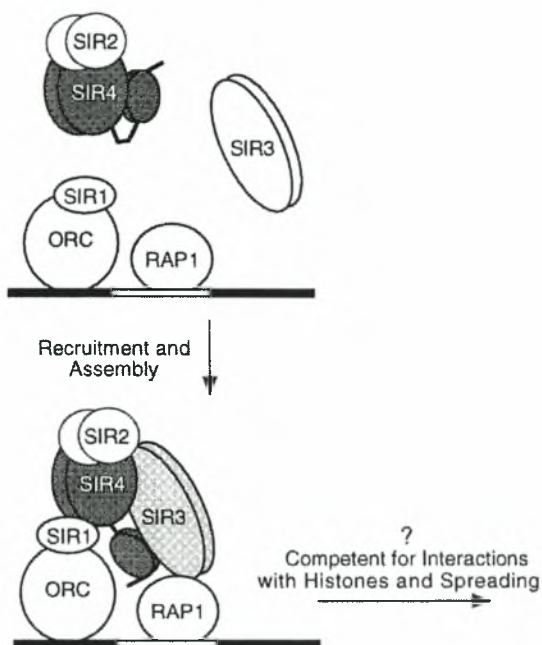


Εικόνα 6: Η NAD⁺-εξαρτώμενη αντίδραση απακετυλίωσης, της πρωτεΐνης Sir2p.

Ο σχηματισμός της σιωπηλής χρωματινής πραγματοποιείται σε διακριτά στάδια. Καταρχήν, οι Sir πρωτεΐνες προσδένονται στους καταστολείς ή τα τελομερή μέσω μιας σειράς αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με ιεραρχικό τρόπο. Η Sir1p μπορεί να προσδεθεί σε ένα καταστολέα απουσία οποιασδήποτε άλλης Sir πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προσδένεται η Sir4p μέσω των αλληλεπιδράσεών της με τις Sir1p και Rap1p. Η πρόσδεση της Sir4p δεν απαιτεί τις Sir2p ή Sir3p. Η Sir4p πιθανώς φέρει μαζί της τη Sir2p, ως μέλος ενός Sir2p-Sir4p συμπλόκου. Η Sir4p απαιτείται για τη πρόσδεση της Sir3p στο καταστολέα. Επίσης η καταλυτική δράση της Sir2p δεν απαιτείται για τη πρόσδεσή της ή για τη πρόσδεση οποιασδήποτε άλλης Sir πρωτεΐνης (εικόνα 7). Από τη στιγμή που οι Sir πρωτεΐνες έχουν προσδεθεί στον καταστολέα, εξαπλώνονται προς το γονίδιο το οποίο προορίζεται προς αποσιώπηση. Αν και οι Sir2p και Sir3p δεν απαιτούνται για τη πρόσδεση άλλων Sir πρωτεϊνών, ωστόσο φαίνεται ότι απαιτούνται για τη σταθερή εξάπλωση του Sir συμπλόκου. Η ικανότητα των Sir πρωτεϊνών να ενώνονται με τις ουρές των ιστονών H3 και H4 στα νουκλεοσώματα, τις καθιστά ικανές να εξαπλώνονται καθόλο το μήκος του χρωμοσώματος. Η NAD⁺-εξαρτώμενη δράση απακετυλοτρανσφεράσης της Sir2p απαιτείται για την εξάπλωση των Sir πρωτεϊνών. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζει ένα μηχανισμό εξάπλωσης των Sir πρωτεϊνών, ο οποίος περιλαμβάνει τη διαδοχική απακετυλίωση των άκρων των ιστονών στα νουκλεοσώματα κατά μήκος του χρωμοσώματος. Σε αυτό το μοντέλο, κατά τη πρόσβαση των Sir πρωτεϊνών στους καταστολείς, η Sir2p φέρεται σε κοντινή απόσταση από το υπόστρωμά της, τις ακετυλιωμένες λυσίνες στα άκρα των ιστονών H3 και H4 γειτονικών νουκλεοσωμάτων. Η επακόλουθη απακετυλίωση αυτών των άκρων δημιουργεί μια υψηλής συγγένειας θέση σύνδεσης των Sir3p και Sir4p (και της Sir2p), καθιστώντας ικανή με αυτόν τον τρόπο τη σύνδεση επιπλέον Sir πρωτεϊνών στα νουκλεοσώματα που πλαισιώνουν τους καταστολείς. Αυτή η διαδικασία τοποθετεί νέα μόρια Sir2p κοντά στα ακετυλιωμένα άκρα των H3 και H4 στο γειτονικό νουκλεόσωμα. Με αυτό τον τρόπο, η αλληλοδιάδοχη διαδικασία απακετυλίωσης γειτονικών νουκλεοσωμάτων και προσθήκης νέων ποσοτήτων Sir πρωτεϊνών επιτρέπει τις Sir πρωτεΐνες να εξαπλώνονται σε μήκος μερικών κιλοβάσεων του DNA. Ωστόσο, η εξάπλωση της σιωπηλής χρωματινής πρέπει να περιορίζεται από καλά καθορισμένα όρια. Στη HMR περιοχή, η αποσιώπηση είναι πιο εύρωστη ανάμεσα στους HMR-E και HMR-I καταστολείς, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία δυο αμφίπλευρων καταστολέων ίσως σταθεροποιεί τη δομή. Το όριο προς τη πλευρά των τελομερών στη HMR περιοχή βρίσκεται σε ένα tRNA γονίδιο, ενώ το όριο προς το κεντρομερές είναι λιγότερο καλά διευκρινισμένο, και δεν είναι γνωστό αν

υπάρχει ένα μόνο περιοριστικό στοιχείο ή αν τα τελικά άκρα της σιωπηλής χρωματίνης ποικίλουν από κύτταρο σε κύτταρο μέσα σε ένα πληθυσμό. Αντίθετα με τη HMR αποσιώπηση, μελέτες στη HML περιοχή έχουν δείξει ότι ίσως δεν υπάρχουν διακριτά περιοριστικά τμήματα, αν και η αποσιώπηση εδώ είναι επίσης πιο εύρωστη ανάμεσα στους καταστολείς. (8, 11, 12)

Εικόνα 7: Ένα μοντέλο για την διαδοχική συγκρότηση του SIR συμπλόκου. Το SIR2/SIR4 σύμπλοκο και η SIR3p προσδένονται ανεξάρτητα στον καταστολέα (ασπρόμαυρη λωρίδα) μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες οι οποίες είναι ενωμένες με τον καταστολέα. Αλληλεπιδράσεις στον καταστολέα αποκαλύπτουν μια περιοχή αλληλεπίδρασης της SIR3p στη SIR4p και προάγουν τη συγκρότηση του SIR2/SIR3/SIR4 συμπλόκου, το οποίο ίσως είναι ικανό να αλληλεπιδρά με ιστόνες και να εξαπλώνεται κατά μήκος της χρωματίνης. Οι SIR2p, SIR3p και SIR4p πρωτεΐνες παραθέτονται ως διμερή.



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σε αυτή την εργασία παρουσιάζονται μερικά προκαταρκτικά αποτελέσματα σχετικά με το *PCCI* γονίδιο και τις αλληλεπιδράσεις του. Καταρχήν, κύριος στόχος αυτής της έρευνας ήταν η ανίχνευση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων του *PCC2* γονιδίου, με απώτερο σκοπό την ταυτοποίηση του στόχου του PCC συμπλόκου. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν αν το *PCCI* γονίδιο αλληλεπιδρά με παράγοντες οι οποίοι τροποποιούν τη χρωματίνη. Προς αυτή την κατεύθυνση, θέλαμε να καθορίσουμε τη σχέση μεταξύ της Pcc1p πρωτεΐνης και της ακετυλοτρανσφεράσης Esa1p, ενώ στο τελευταίο μέρος αυτής της εργασίας παρουσιάζονται κάποια στοιχεία σχετικά με τη πρωτεΐνη απακετυλίωσης των ιστονών, Sir2p, και τη πρόσδεσή της σε ορισμένες περιοχές του γενόματος του *Saccharomyces cerevisiae*.

Ορισμοί

Ως **κεντρομερές πλασμίδιο (centromeric plasmid)** αναφέρεται το πλασμίδιο εκείνο το οποίο υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο στο κύτταρο και το εκφραζόμενο ποσό της πρωτεΐνης είναι σταθερό κάθε φορά. Σε αντίθεση, ο όρος πλασμίδιο σε πολλαπλά αντίγραφα (**multicopy plasmid**) χρησιμοποιείται όταν περισσότερα από ένα αντίγραφα του πλασμιδίου υπάρχουν στο κύτταρο (≈ 40 αντίγραφα / κύτταρο).

Αρνητικά επικρατής (dominant negative) μετάλλαξη ορίζεται η μετάλλαξη κατά την οποία το προϊόν του γονιδίου επηρεάζει αντίθετα τη φυσιολογική, αγρίου - τύπου πρωτεΐνη στο ίδιο κύτταρο, συνήθως μέσω διμερισμού (ένωσης της) με αυτή. ⁽¹³⁾

Η καταστολή ενός μεταλλαγμένου φαινοτύπου λόγω υπερ-έκφρασης ενός γονιδίου είναι γνωστή ως φαινόμενο καταστολής πολλαπλών αντιγράφων (**multicopy suppressor effect**). Οι καταστολείς πολλαπλών αντιγράφων (multicopy suppressors) ίσως στοχεύουν σε downstream σηματοδοτικές πρωτεΐνες, γονίδια τα οποία ενεργοποιούν “ανταγωνιστικά” μονοπάτια, ή γονίδια που απενεργοποιούν ανασταλτικά μονοπάτια για τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη.

Μια πρωτεΐνη με **ενεργότητα Ο-σιαλο-γλυκοπρωτεάσης/ ενδοπεπτιδάσης** είναι υπεύθυνη για τη κατάλυση της υδρόλυσης των Ο-σιαλο-γλυκοπρωτεϊνών. Διασπά το δεσμό -Arg31-Asp32- στην γλυκοφορίνη Α, αλλά δεν διασπά μη γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες που τους έχει αφαιρεθεί η σιαλο-ομάδα ή γλυκοπρωτεΐνες που είναι μόνο Ν-γλυκοσυλιωμένες. ⁽⁶⁾

Ο όρος **συνθετικά θανάσιμο (synthetic lethality)** αναφέρεται στην κατάσταση ενός στελέχους, το οποίο έχει μια μετάλλαξη στο γονίδιο Α ή το γονίδιο Β και είναι βιώσιμο, αλλά όταν και τα δυο γονίδια είναι μεταλλαγμένα, το στέλεχος πεθαίνει. ⁽¹⁴⁾

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

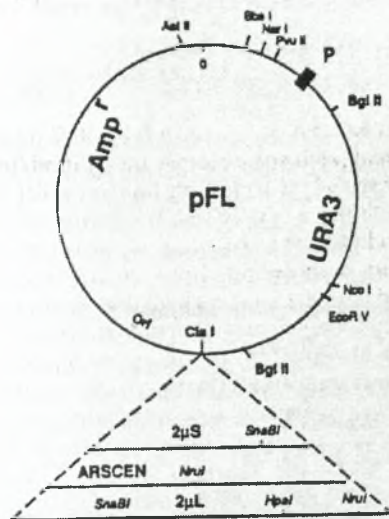
Πλασμίδια, στελέχη ζυμών και βακτηρίων

Τα χρησιμοποιούμενα πλασμίδια σε αυτή την εργασία είναι: pFL38, pFL39, pFL45S, pFL46L, pFL46S (εικόνα 8).

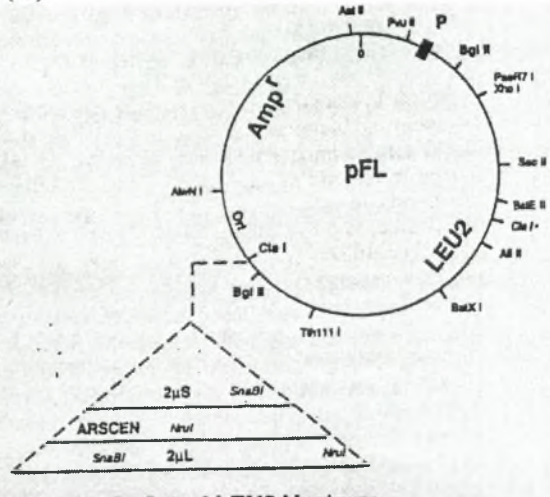
Το στέλεχος Ykr038-18 mat α (DLY365) του ζυμομύκητα *S. Cerevisiae* προέρχεται από μια μετάλλαξη του αγρίου τύπου στελέχους W303 mat α στο *PCC2* γονίδιο και είναι θερμοευαίσθητο στους 37°C. Τα στελέχη ΔYkr038::His και ΔYkr038::His + pCM188(URA+)/Ykr038c είναι παράγωγα του Ykr038-18 mat α στελέχους, τα οποία έχουν έλλειψη στο *PCC2* γονίδιο. Ωστόσο, στο δεύτερο στέλεχος το φυσιολογικό γονίδιο έχει εισαχθεί μέσω του πλασμιδίου pCM188. Το στέλεχος CY1851 είναι όμοιο με αυτό του CY184 (MAT α , ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, can1-100, rDNA::ADE2, το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως αγρίου-τύπου στέλεχος) με την εξαίρεση ότι έχει μια χρωμοσωμική μετάλλαξη στο *ESAI* γονίδιο (esa1-1851::KI_URA). Ακόμη χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη Pcc1.4::His mat α και Pcc1.4::His + pCM188/ADE8/LM1, τα οποία φέρουν τη *pcc1.4* μετάλλαξη. Ωστόσο, το δεύτερο στέλεχος φέρει το πλασμίδιο pCM188 με το φυσιολογικό *PCCI* γονίδιο. Επιπλέον, για τα πειράματα ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια Sir2 σε YPDA μέσο.

Τέλος, συμβατά *E.coli* (XL2-blue) βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση των πλασμιδίων.

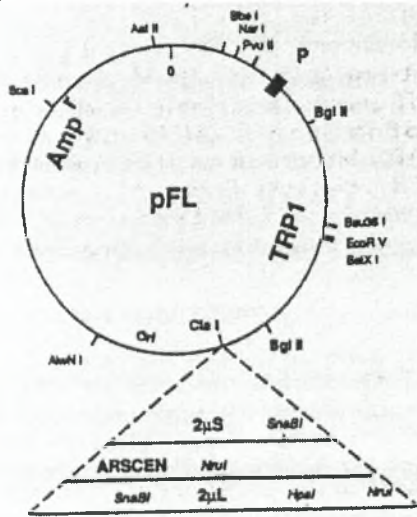
(A)



(B)



(Γ)



Εικόνα 8: Χάρτες πέψης και κύρια χαρακτηριστικά των *pFL* πλασμιδίων. Το σκούρο κουτί με το γράμμα *P*, αναπαριστά την αλληλουχία του πολυσυνδέτη (polylinker sequence) του *pUC19*. Οι θέσεις κοπής που φαίνονται στους χάρτες είναι μοναδικές θέσεις για όλους τους φορείς κάθε ομάδας. Η *a-complementation* έχει διατηρηθεί σε όλες τις περιπτώσεις εκτός των *pFL45L* και *pFL46L*, όπου η θέση *NotI* έχει αντικαταστήσει τη *EcoRI* θέση στο πολυσυνδέτη. Σε κάθε πλασμιδίο, η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων ξεκινάει από τη πρώτη *T* της αλληλουχίας *TCGCGCGTTT* και προχωρά κατά τη φορά των ρολογιών. Α) χάρτης των *URA3* φορέων (*pFL38*). Β) χάρτης των *LEU2* φορέων (*pFL46S* και *pFL46L*). Γ) χάρτης των *TRP1* φορέων (*pFL39*, *pFL45S* και *pFL45L*). Η *TRP1* αλληλουχία του *pFL39* φορά είναι αντίστροφη αυτής του χάρτη.⁽¹⁵⁾

Φορέας	Μέγεθος (bp)	Μοναδικές θέσεις πέψης πολυσυνδέτη	Χαρακτηριστικά του φορέα
pFL38	4610	EcoRI, SacI, PstI, BamHI, HindIII	Κεντρομερής
pFL39	4357	EcoRI, XmaI, BamHI, HincII, HindIII	Κεντρομερής
pFL45S	4066		Πολλαπλών αντιγράφων
pFL45L	5810	NotI, SacI, SmaI, BamHI	Πολλαπλών αντιγράφων
pFL46S	6078	SacI, SmaI, XmaI, BamHI, HindIII	Πολλαπλών αντιγράφων
pFL46L	7822	NotI, SacI, SmaI, XmaI, BamHI, SphI	Πολλαπλών αντιγράφων

Αντιδραστήρια

<i>Buffers P1, P2, P3, QBT, QC, QF</i>	<i>Qiagen</i>
<i>Buffers QC, PE</i>	<i>Qiagen</i>
<i>DNA ladder</i>	<i>New England Biolabs</i>
<i>FA/ Pefabloc</i>	<i>Roche</i>
<i>FastStart Taq DNA polymerase</i>	<i>Roche</i>
<i>GYBR Green I</i>	<i>Roche</i>
<i>Oligonucleotides</i>	<i>Sigma</i>
<i>Peroxidase-Anti-peroxidase soluble complex (PAP)</i>	<i>Sigma</i>
<i>Pfy DNA polymerase</i>	<i>Stratagene</i>
<i>Pronase</i>	<i>Roche</i>
<i>T4 DNA ligase</i>	<i>Stratagene</i>
<i>Taq DNA polymerase</i>	<i>Stratagene</i>
<i>TBE-BET buffer</i>	<i>Sigma</i>
<i>Ένζυμα περιορισμού</i>	<i>New England Biolabs</i>
<i>Σφαιρίδια σεφαρόζης</i>	<i>Convance Research Products</i>

Μέθοδοι

Πέψη και ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Όλες οι πέψεις με ένζυμα περιορισμού πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα χρήσης της εταιρίας *New England Biolabs*. Επιπλέον, τα πηκτώματα ηλεκτροφόρησης είχαν συγκέντρωση 0,6-0,8% αγαρόζης σε διάλυμα TBE 1X-BET. Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης ήταν επίσης TBE-1x-BET. Για την πραγματοποίηση των ηλεκτροφορήσεων, 20μl δείγματος εισήχθησαν μαζί με 4μl bleu de change 6X στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, ενώ 6μl DNA ladder 1Kb χρησιμοποιήθηκαν ως κοντρόλ.

Συνένωση πλασμιδίων

Κατάλληλες ποσότητες των πλασμιδίων προστίθενται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης με 2μl 10x buffer σύνδεσης (250mM NaCl, 1mM ATP, 50mM Tris), 5μl νερό και 1μl λιγάζης, μέχρι τελικού όγκου 20μl. Το μείγμα επωάζεται στους 14°C για μια νύχτα ή για μια-δυο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί ένα στάδιο διαπίδυσης ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα του ρυθμιστικού διαλύματος. Στην επιφάνεια μιας μεμβράνης νιτροσελλουλόζης εφαρμόζονται τρεις-

τέσσερις σταγόνες δείγματος, για περίπου μια ώρα. Κατά τη διάρκεια αυτή και εξαιτίας της ημι-περατότητας της μεμβράνης, τα άλατα απομακρύνονται από το δείγμα. Στη συνέχεια το δείγμα των πλασμιδίων υφίσταται ηλεκτροφόρηση ως συνήθως.

Εξαγωγή τμημάτων DNA από πηκτώματα αγαρόζης

Η εξαγωγή των τμημάτων DNA από τα πηκτώματα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο το οποίο έχει περιγραφεί. ⁽¹⁶⁾ Συγκεκριμένα, το DNA συνδέεται με μεμβράνη από διοξείδιο του πυριτίου, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων ενώ οι μολύνσεις διέρχονται χωρίς να ενώνονται. Οι προσμειξείς απομακρύνονται αποτελεσματικά και το καθαρό DNA εκλούεται με χρήση Tris buffer ή νερού. Η προσκόλληση των νουκλεϊκών οξέων από τις επιφάνειες του διοξειδίου του πυριτίου πραγματοποιείται μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χαοτροπικών αλάτων, τα οποία τροποποιούν τη δομή του νερού. Η προσκόλληση αυτή εξαρτάται επίσης και από το pH, με τη πρόσδεση να κυμαίνεται στο 95% όταν το pH είναι $\leq 7,5$, και να μειώνεται δραστικά σε υψηλότερα pH. Η όλη διαδικασία έχει ως εξής: τα τμήματα DNA αποκόπτονται από το πηκτώμα αγαρόζης με καθαρό κοπίδι και ζυγίζονται σε άχρωμο σωλήνα. Τρεις όγκοι buffer QG προστίθενται σε ένα όγκο πηκτώματος και επωάζονται στους 50°C για δέκα λεπτά, αναμιγνύοντας το σωλήνα κάθε δύο-τρία λεπτά. Μετά τη πλήρη διαλυτοποίηση του πηκτώματος, προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης και το δείγμα αναμιγνύεται. Μια στήλη QIAquick τοποθετείται σε έναν σωλήνα 2ml, το δείγμα εφαρμόζεται στη στήλη και φυγοκεντρείται για ένα λεπτό. Το υγρό-εκροής απορρίπτεται και 0,75ml buffer PE προστίθενται στη στήλη, η οποία και φυγοκεντρείται για ένα λεπτό, ώστε να ξεπλυθεί το DNA. Το νέο υγρό-εκροής απορρίπτεται και η στήλη φυγοκεντρείται για ένα επιπλέον λεπτό. Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιούνται στις 13000rpm (17900x g) σε συμβατική συσκευή μικροφυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια, η QIAquick στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης, 50μl νερού προστίθενται στο κέντρο της μεμβράνης (με σκοπό να εκλουστεί το DNA) και η στήλη φυγοκεντρείται για ένα λεπτό.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Την πρώτη ημέρα, μια 2ml υγρή καλλιέργεια LBA (με τελική συγκέντρωση αμπικιλίνης Amp 100μg/ml) ετοιμάστηκε για κάθε αποικία βακτηρίων και επώαστηκε

για μια ημέρα στους 37°C ανακινούμενη. Την δεύτερη ημέρα η εξαγωγή των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως: η LBA καλλιέργεια βακτηρίων αναμείχθηκε και φυγοκεντρήθηκε σε μέγιστη ταχύτητα. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100μl TE (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris pH8) και 200μl φρέσκου διαλύματος NaOH 0,2M, SDS 1% προστίθενται, με το ίζημα να παραμένει σε πάγο για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια, 150μl διαλύματος οξικού καλίου (AcK 5M, pH 5,3) προστίθενται και το δείγμα επωάζεται στους 4°C για δέκα λεπτά. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για δέκα λεπτά στις 14000rpm, το πλασμίδιο (υπερκείμενο) καθιζάνει με αιθανόλη 100% και φυγοκεντρείται για δέκα λεπτά. Το ίζημα που σχηματίζεται ξεπλένεται με αιθανόλη 80%, ξηραίνεται σε Speedvac και επαναιωρείται σε 30μl νερό/ Rnase (20μg/ml).

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Η απομόνωση πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίων της εταιρίας *QIAGEN*.⁽¹⁷⁾ Αυτή η μέθοδος στηρίζεται σε μια διαδικασία αλκαλικής λύσης, η οποία ακολουθείται από ένωση του πλασμιδιακού DNA σε ανιο-ανταλλακτική ρητίνη κάτω από κατάλληλες συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων και pH. Το RNA, οι πρωτεΐνες, οι χρωστικές και οι χαμηλού μοριακού βάρους ακαθαρσίες αφαιρούνται με διάλυμα μέτριας αλατότητας. Το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης αλάτων και εν συνεχεία καθιζάνει με ισοπροπανόλη. Την πρώτη ημέρα, 2ml υγρής LBA καλλιέργειας (μέσο Luria Bertani τελικής συγκέντρωσης σε αμπικιλίνη 100μg/ml) παρασκευάζονται για κάθε αποικία αναπτυγμένων βακτηρίων και επωάζεται για μια νύχτα στους 37°C ανακινούμενη. Την δεύτερη ημέρα, η απομόνωση των πλασμιδίων πραγματοποιείται ως εξής: τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 4000x g για δεκαπέντε λεπτά στους 4°C. Το ίζημα βακτηρίων επαναιωρείται σε 10ml buffer P1 (50mM Tris-Cl pH8,0, 10mM EDTA, 100μg/ml Rnase A) και κατόπιν προστίθενται 10ml buffer P2 (200mM NaOH, 1% w/v SDS), ενώ το μείγμα αναμιγνύεται ελαφρά και πάρα πολύ καλά και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια, 10ml ψυχρού buffer P3 (3,0M οξικού καλίου pH5,5) προστίθενται και το διάλυμα αναμιγνύεται αμέσως ελαφρά και επωάζεται σε πάγο για είκοσι λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 120000rpm σε Beckman JA-17 ρότορα για τριάντα λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA απομακρύνεται άμεσα. Το τελευταίο επαναφυγοκεντρείται στις $\geq 20000x$ g για ένα λεπτό στους 4°C και

το νέο υπερκείμενο απομακρύνεται. Μια στήλη QIAGEN-tip 500 καλιμπράρεται με εφαρμογή 10ml buffer QBT (750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7,0, 15%w/v isopropanol, 0,15%w/v Triton X-100) και το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρωσης εφαρμόζεται στη στήλη, αφήνοντάς το να εισέλθει στη ρητίνη λόγω της βαρύτητας. Η στήλη QIAGEN-tip ξεπλένεται με 2x30ml buffer QC (1mM NaCl, 50mM MOPS pH7,0, 15%w/v isopropanol) και το DNA εκλύεται με 15ml buffer QF (1,25M NaCl, 50mM Tris-Cl pH8,5, 15%w/v isopropanol). Το προκύπτον DNA καταβυθίζεται με προσθήκη 10,5ml ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου, αναμιγνύεται και φυγοκεντρείται άμεσα στις $\geq 15000x$ g για τριάντα λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα (DNA) ξεπλένεται με 5ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται στις $\geq 15000x$ g για δέκα λεπτά. Το σχηματιζόμενο ίζημα ξηραίνεται σε αέρα για πέντε-δέκα λεπτά και το DNA επαναιωρείται σε 200μl αποστειρωμένο νερό.

Μετασχηματισμός συμβατών βακτηρίων μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Κατάλληλη ποσότητα συμβατών βακτηρίων (XL2-Blue, 40μl), η οποία λαμβάνεται από τους -72°C, και πλασμιδιακού DNA προστίθενται σε κατάλληλους γυάλινους σωλήνες σε πάγο. Οι παράμετροι της ηλεκτροδιάτρησης είναι: ηλεκτρικό δυναμικό 2,5 KV, χωρητικότητα 25μF και αντίσταση 200 Ohm. Μετά το μετασχηματισμό των βακτηρίων, $\approx 1\mu\text{l}$ buffer 2TY προστίθεται στο διάλυμα και επωάζεται στους 37°C για μια ώρα. Τα βακτήρια φυγοκεντρώνονται, επαναιωρούνται σε 50μl νερό, επιστρώνονται σε LBA τριβλία και επωάζονται στους 37°C για μια ημέρα.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*

300μl TE (pH 7,6), 24 μl NaCl 5M, 15 μl EDTA 0,5M, $\frac{1}{2}$ του σιφωνίου γυάλινα σφαιρίδια και περίπου 10^8 κύτταρα φρέσκης καλλιέργειας ζυμομύκητα προστέθηκαν σε 1,5ml σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης, αναμείχθηκαν για ένα λεπτό και φυγοκεντρήθηκαν σε γρήγορη ταχύτητα. Το υπερκείμενο υπέστη εξαγωγή με φαινόλη/ χλωροφόρμιο και το DNA καταβυθίστηκε με αιθανόλη 100% και φυγοκεντρήθηκε για δέκα λεπτά. Το προκύπτον ίζημα ξεπλύθηκε με αιθανόλη 70%, και επαναδιαλύθηκε σε 20μl νερό.

Απομόνωση πρωτεϊνών από στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*

Σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρησης που περιέχει επαρκή ποσότητα απομονωμένων αποικιών ζυμομύκητα, προστίθενται 60μl uree 8M μαζί με 20μl διαλύματος 4x Laemli (200mM Tris-HCl pH 6,8, 8%SDS, 40%glycerol, 0,08% bromophenol bleu) και επωάζονται στους 95°C για δέκα λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε υψηλή ταχύτητα και το προκύπτον υπερκείμενο τοποθετείται σε πάγο. 10-15μl της εξαγόμενης πρωτεΐνης “φορτώνονται” σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

Μετασηματισμός στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*

Οι μετασηματισμοί των στελεχών του ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις υπάρχουσες τεχνικές μετασηματισμού υψηλής απόδοσης (High-Efficiency transformation Protocol) και γρήγορου μετασηματισμού (Rapid transformation Protocol).⁽¹⁸⁾ Την πρώτη ημέρα, το στέλεχος εμβολιάστηκε σε 5ml υγρού μέσου (YPDA) και επώαστηκε κατά τη διάρκεια της νύχτας σε ανακινούμενο επωαστήρα (200rpm) στους 30°C. Τη δεύτερη ημέρα, καθορίστηκε η ισχύς της καλλιέργειας, με μέτρηση της απορρόφησης της καλλιέργειας στα 600nm, ώστε να ληφθεί απορρόφηση της τάξεως των $OD_{600} \approx 1$. Τα κύτταρα του ζυμομύκητα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 3000g σε θερμοκρασία δωματίου για πέντε λεπτά, ξεπλύθηκαν σε 25ml αποστειρωμένο νερό και εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν ξανά, όπως προηγουμένως, και επαναιωρήθηκαν σε 1ml αποστειρωμένο νερό. Το εναιώρημα κυττάρων μεταφέρθηκε σε 1,5ml σωλήνα μικροφυγοκέντρησης, φυγοκεντρήθηκε για 30sec και το ίζημα διαλύθηκε σε νερό μέχρι τελικού όγκου 1ml. 100μl δείγματος τοποθετούνται σε νέο 1,5ml σωλήνα μικροφυγοκέντρησης (ένα για κάθε μετασηματισμό), φυγοκεντρούνται στις 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 30sec και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Επαρκής ποσότητα T mix για το προγραμματισμένο αριθμό μετασηματισμών ετοιμάζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Αντιδραστήρια	Αριθμός προγραμματισμένων μετασηματισμών l
PEG 3350 (50%w/v)	240μl
Lithium acetate 1M	36μl
Boiled SS-carrier DNA (10mg/ml)	10μl
Συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA	1μg/μl
Νερό	73μl

360μl T-mix προστίθενται σε κάθε σωλήνα μετασχηματισμού και τα κύτταρα διαλυτοποιούνται με ανάμειξη. Οι σωλήνες επωάζονται σε λουτρό 42°C για είκοσι λεπτά, φυγοκεντρώνονται στις 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 30sec και το T-mix αφαιρείται με μικροπιπέτα. 100μl αποστειρωμένου νερού προστίθενται σε κάθε σωλήνα, το ίζημα αναμιγνύεται μέχρι τη πλήρη διαλυτοποίησή του και επιστρώνεται σε κατάλληλο μέσο επιλογής. Τέλος, τα τριβλία μετασχηματισμού επωάζονται στους 30°C για τρεις έως τέσσερις ημέρες μέχρι να αναπτυχθεί ένας επαρκής αριθμός μετασχηματισμένων αποικιών.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος όπου μια ελάχιστη ποσότητα DNA μπορεί να ενισχυθεί *in vitro* και να δώσει πολλαπλές όμοιες αλληλουχίες. Είναι μια γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη διαδικασία, η οποία στηρίζεται στη βιολογική δράση των DNA πολυμερασών, οι οποίες έχουν απομονωθεί από θερμοφιλα βακτήρια σε υψηλές θερμοκρασίες. Η πιο γνωστή DNA πολυμεράση είναι αυτή η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε κύκλους, με κάθε κύκλο να διακρίνεται σε φάσεις. Οι φάσεις της τεχνικής είναι: (1) στάδιο αποικοδόμησης: το μόριο του DNA αποδιατάσσεται μέσω θερμότητας και το δίκλωνο μόριο DNA μετασχηματίζεται σε μονόκλωνο (ssDNA). (2) στάδιο αναδιάταξης: η θερμοκρασία μειώνεται ώστε να προστεθούν οι εκκινητές, οι οποίοι ενώνονται με τις δυο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία αναδιάταξης πρέπει να κυμαίνεται 5 με 10°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m) του dsDNA. (3) στάδιο πολυμερισμού: η παρουσία της Taq πολυμεράσης και των dNTPs συνεισφέρει στο σχηματισμό νέου DNA και το διπλασιασμό του αρχικού.

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα συμβατικά πρωτόκολλα και τις παραμέτρους που περιγράφονται στο τμήμα των αποτελεσμάτων.

Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας/ Sequencing

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε στο αντίστοιχο εργαστήριο του Εθνικού Κέντρου Επιστημονικής Έρευνας της Γαλλίας, σύμφωνα με το οικείο πρόγραμμα.

Tap-tagging/ επισημάνση επιλογής

Το tap-tagging της απαιτούμενης πρωτεΐνης (Sir2p) έγινε σύμφωνα με τεχνικές οι οποίες έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία. ⁽¹⁹⁾ Η μέθοδος Tap περιλαμβάνει την ένωση του Tap tag με τη πρωτεΐνη-στόχο και την εισαγωγή του κατασκευάσματος στο κύτταρο ξενιστή. Το Tap tag αποτελείται από δυο IgG περιοχές σύνδεσης της πρωτεΐνης A (ProtA) του *Staphylococcus aureus* και ένα πεπτίδιο πρόσδεσης καλμοδουλίνης (CBP), τα οποία διαχωρίζονται από μία θέση κοπής TEV πρωτεάσης. Η ProtA ενώνεται ισχυρά με μια IgG μήτρα, απαιτώντας τη χρήση της TEV πρωτεάσης για να εκλουστεί το υλικό κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Το έκλουσμα αυτού του πρώτου βήματος καθαρισμού συγγένειας επωάζεται εν συνεχεία με σφαιρίδια καλυμμένα με καλμοδουλίνη παρουσία ασβεστίου (εικόνα 9). Μετά από ένα βήμα ξεπλύματος, το οποίο αφαιρεί μολύνσεις και την TEV πρωτεάση που απομένει μετά το πρώτο στάδιο επιλεκτικής συγγένειας, το συνδεδεμένο υλικό απελευθερώνεται κάτω από ήπιες συνθήκες με EGTA. Η αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενσωματώσει το Tap tag άμεσα στο γονιδίωμα. Για το σκοπό αυτό συνθέτονται εκκινητές, οι οποίοι περιέχουν μια περιοχή όμοια με το γονιδίωμα του ζυμομύκητα και μια σταθερή περιοχή εκκινητή. Ο εκκινητής A υβριδοποιείται με το 5' άκρο της CBP κωδικοποιώντας αλληλουχίας και ο εκκινητής B στη περιοχή του φορέα που έπεται του δείκτη επιλογής. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν το Tap tag μέσω της PCR αντίδρασης. Εν συνεχεία, το προϊόν της PCR εξάγεται, καθιζάνει και χρησιμοποιείται για να μετασηματίσει τα απαιτούμενα στελέχη ζυμών. Η σωστή ενσωμάτωση της κασέτας πιστοποιείται με ηλεκτροφόρηση και Western blot.

Στην περίπτωση μας, τα πλασμίδια που περιείχαν τη Tap κασέτα είχαν την εξής ακολουθία: Tap – TER (αλληλουχία λήξης) – PR (προαγωγέας) – δείκτης, και ειδικότερα ως δείκτη επιλογής είχαν τρυπτοφάνη και καναμυκίνη (pFA6a TAP-tag TRP και pFA6a TAP-tag KAN αντίστοιχα, συνολικού μεγέθους περίπου 20KDa). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για να ενσωματώσει το Tap tag στην εξεταζόμενη αλληλουχία. Συγκεκριμένα, το τελευταίο κωδικόνιο του SIR2 γονιδίου είναι TAA και αντιστοιχεί σε κωδικόνιο λήξης. Συνεπώς, ο εκκινητής A σχεδιάστηκε ώστε να περιέχει συμπληρωματικές βάσεις με την αλληλουχία του SIR2 (ακριβώς πριν από το κωδικόνιο λήξης), ενώ ο εκκινητής B είχε αλληλουχίες συμπληρωματικές με την περιοχή μετά το κωδικόνιο λήξης του SIR2. Τα ολιγονουκλεοτίδια που αποκτήθηκαν από την εταιρία *Sigma* είχαν τις ακόλουθες αλληλουχίες:

Ολιγονουκλεοτίδιο 526 (5'εκκινητής):

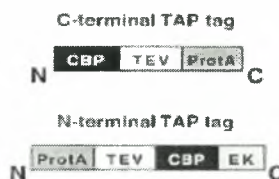
AAGGGCGTGTATGTCGTTACATCAGATGAACATCCCAAACCCCTCcggatcccggt
taatt.

Ολιγονουκλεοτίδιο 527 (3'εκκινητής):

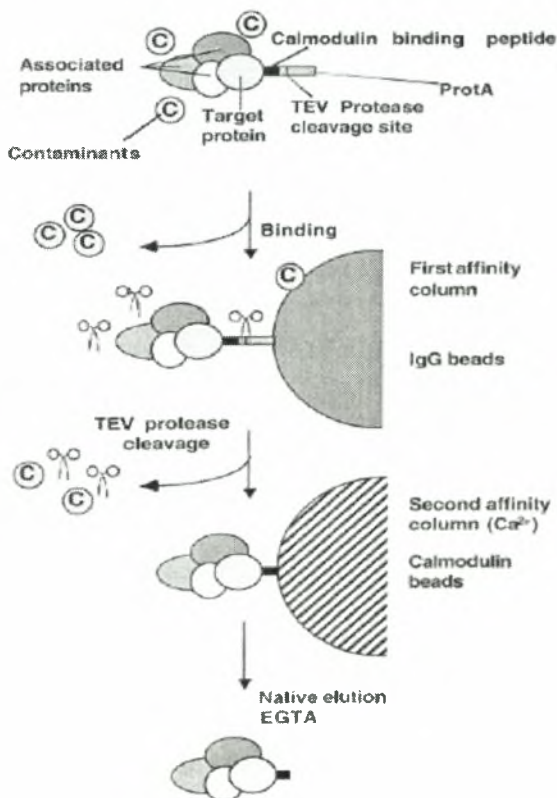
ATTGATATTAATTTGGCACTTTTAAATTATTAATTTGCCTTCTACgaattcgagctcggt
taaac (τα κεφαλαία γράμματα αντιστοιχούν στην αλληλουχία του SIR2 ORF).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση της Taq πολυμεράσης ως εξής: Ένας κύκλος αποδιάταξης στους 94°C για δυο λεπτά, τριάντα κύκλοι υβριδοποίησης στους 53°C για 30sec και τέλος, επιμήκυνση στους 72°C για πέντε λεπτά. Το προϊόν της PCR εξήχθηκε ως ακολούθως: σε 100μl PCR προϊόντος, προστέθηκαν 4μl NaCl 5M και 300μl αιθανόλης 100% και φυγοκεντρήθηκαν για δέκα λεπτά. Το ίζημα ξεπλύθηκε με αιθανόλη 80%, ξηράθηκε σε Speedvac και επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο νερό. Μετέπειτα, το αγρίου τύπου στέλεχος του ζυμομύκητα W303 mat α μετασχηματίστηκε με το προϊόν της PCR όπως περιγράφεται ανωτέρω.

(A)



(B)

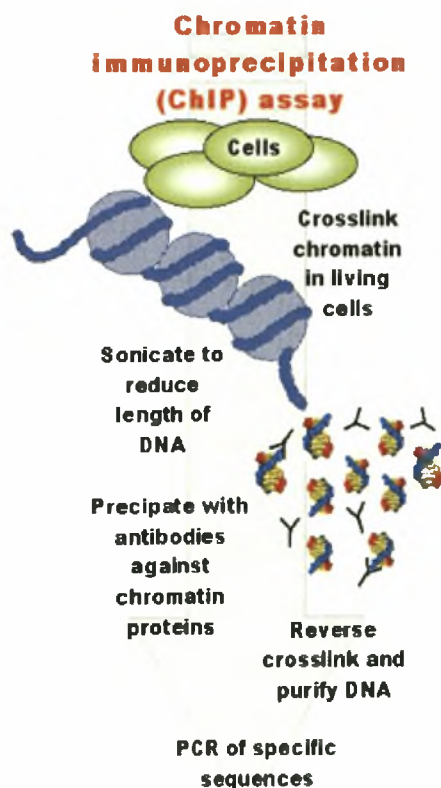


Εικόνα 9: Α) Σχηματική αναπαράσταση των C- και N-τελικών tap tags.

Β) Σύνοψη της διαδικασίας απομόνωσης μέσω επιλεκτικής επισήμανσης (TAP purification).

Western blot

Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τεχνικές, οι οποίες έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία. ⁽²⁰⁾ Ο όγκος της πήκτλης που περιέχει την απαιτούμενη συγκέντρωση ακρυλαμίδης για το πήκτωμα διαχωρισμού καθορίστηκε με βάση το μέγεθος της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Η Sir2p αποτελείται από 563 αμινοξέα και το μέγεθός της είναι 62KDa. Συνεπώς, παρασκευάστηκε πήκτωμα ακρυλαμίδης 8%, το οποίο εφαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε Tris-glycine buffer ηλεκτροφόρησης [25mM Tris, 250mM glycine (ηλεκτροφορητικής κλίμακας pH8,3), 0,1%SDS]. 10-15μl δείγματος τοποθετήθηκαν στο κάτω μέρος από κάθε πηγαδάκι, όπως και 1xSDS gel-loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε δυναμικό 120Volt και ποσότητα ρεύματος 47mA. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ηλεκτρομεταφορά των δειγμάτων για ενενήντα λεπτά σε δυναμικό 120Volt και 0,23A. Μετέπειτα, η μεμβράνη επώαστηκε σε 1x PBS buffer (150mM NaCl, 40mM Na₂HPO₄, 8mM NaH₂PO₄), tween buffer (T-TBS) 0,1% και σκόνη γάλακτος 5% στους 20°C. Η μεμβράνη επώαστηκε με το αντιγόνο ανίχνευσης PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase soluble Complex), ξεπλύθηκε δυο-τρεις φορές με T-TBS buffer και πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των μπάντων.



Εικόνα 10: Σύνοψη της διαδικασίας ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP assay).

Πρωτόκολλο ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation protocol, ChiP)

Προετοιμασία των διασυνδεδεμένων εκχυλισμάτων χρωματίνης

Μια υγρή καλλιέργεια Sir2 σε YPDA μέσο με ραφινόζη επώαστηκε στους 30°C κατά τη διάρκεια της νύχτας μέχρι όπου ληφθεί απορρόφηση $OD_{600} \approx 1$. Από αυτή τη καλλιέργεια ελήφθησαν 2ml για εξαγωγή RNA, τα οποία και φυγοκεντρήθηκαν, ξεπλύθηκαν με 1ml νερό και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Στην υπόλοιπη καλλιέργεια προστέθηκαν 1,5ml διαλύματος φορμαλδεΐδης (36%w/v υδατικό διάλυμα σταθεροποιημένο με 9% μεθανόλη) και η καλλιέργεια επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για δέκα λεπτά. 10ml 2,5 M γλυκίνης προστέθηκαν και η επώαση συνεχίστηκε για επιπλέον πέντε λεπτά. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για δέκα λεπτά και το ίζημα ξεπλύθηκε με 20mM Tris-HCl (pH8), φυγοκεντρήθηκε όπως προηγουμένως και ξεπλύθηκε με κρύο FA-150/1mM Pefabloc. Ένα ακόμη στάδιο φυγοκέντρωσης ακολούθησε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 500μl κρύου FA-150/1mM Pefabloc και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης. Ταυτόχρονα, η καλλιέργεια μεταφέρθηκε από ραφινόζη σε γαλακτόζη ως μέσο ανάπτυξης πριν τη προσθήκη φορμαλδεΐδης, με χρήση πορώδους φίλτρου. 2ml από τη καλλιέργεια σε γαλακτόζη κρατήθηκαν επίσης για έλεγχο μεταγραφής, ενώ η υπόλοιπη υποβλήθηκε στη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως. Επιπρόσθετα, μια κοντρόλ καλλιέργεια (W303) ετοιμάστηκε με σκοπό να ελεγχθεί η επαγωγή ή όχι της μεταγραφής και από την οποία 2ml χειρίστηκαν κατάλληλα για ανίχνευση RNA, ενώ η υπόλοιπη υποβλήθηκε στην ίδια διαδικασία όπως και το δείγμα.

Τα επαναιωρημένα κύτταρα σε FA-150/ Pefabloc, προστίθενται σε γυάλινα σφαιρίδια και αναμειγνύονται για δεκαπέντε λεπτά. Ο πάτος του σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης τρυπιέται, τοποθετείται σε νέο σωλήνα falcon και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2000rpm για τρία λεπτά, ώστε να συλλεχθεί το προϊόν της κυτταρολύσεως. 1ml κρύου FA-150/1mM Pefabloc προστίθεται για να ξεπλυθούν τα σφαιρίδια και η τελευταία φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Το κυτταρόλυμα μεταφέρεται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης 2ml και φυγοκεντρείται για είκοσι λεπτά στις 12000rpm σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, επαναιωρείται (όσο το δυνατό καλύτερα) σε FA-150/1mM Pefabloc, επώάζεται για μια-δυο ώρες στους 4°C σε περιστροφέα και φυγοκεντρείται στις 12000rpm για είκοσι λεπτά

στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρείται σε FA-150/1mM Pefabloc και υφίσταται έξι στάδια κατεργασίας με υπερήχους για 40sec το καθένα (50% δραστηκότητα του κάθε κύκλου) ώστε να ληφθούν κατά μέσο όρο τμήματα DNA μήκους 400bp. Το μείγμα ακολούθως επωάζεται για μισή-μια ώρα στους 4°C σε περιστροφέα και φυγοκεντρείται στις 10000rpm για τριάντα λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης τοποθετείται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύεται στους -80°C.

Ανοσοκαθίζηση, αποσύνδεση της χρωματίνης και μέτρηση του σήματος

Τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια είναι: IgG σφαιρίδια σεφαρόζης (TAP-tag), σφαιρίδια σεφαρόζης πρωτεΐνης G (RPB3), σφαιρίδια σεφαρόζης πρωτεΐνης A (POL II) και IgM anti-mouse agarose (H5). Τα σφαιρίδια υφίστανται φυγοκέντρωση στις 2000rpm για ένα λεπτό, ξεπλένονται με FA-150mM NaCl και επαναιωρούνται σε FA-150mM NaCl. 0,5ml διαλύματος χρωματίνης επωάζονται με τα αντιγόνα που είναι ενωμένα με τα σφαιρίδια σεφαρόζης για μια-δυο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστροφέα. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρώνονται και ξεπλένονται με τα ακόλουθα διαλύματα για πέντε-δέκα λεπτά κάθε φορά σε θερμοκρασία δωματίου: 2x σε FA-150, 2x σε FA-500mM NaCl, 1x σε buffer πλύσης (10mM Tris-HCl pH8, 250mM LiCl, 1mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,5% NA-deoxycholate), 1x σε TE.

Τα σφαιρίδια επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (25mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 0,5%SDS) και τα ανοσοκατακρημνισμένα σωματίδια εκλούονται από τα σφαιρίδια με θέρμανση στους 80°C για δέκα-είκοσι λεπτά. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρώνονται και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα όπου έχουν προστεθεί 6,75μl Pronase (1mg/ml τελικής συγκεντρώσεως). Το DNA καθαρίζεται με χρήση μιας στήλης QIAquick, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000rpm για ένα λεπτό, ξεπλένεται με διάλυμα PE και αφήνεται να στεγνώσει. Τελικά, το DNA εκλούεται με 2x 50μl νερό και αναλύεται με PCR ποσοτικοποίησης (quantitative PCR) (εικόνα 10).

Αντίστροφη μεταγραφή – PCR ποσοτικοποίησης (Quantitative PCR)

Τα δείγματα καλλιέργειας όγκου 2ml που ελήφθησαν κατά τη προετοιμασία των εκχυλισμάτων διασυνδεδεμένης χρωματίνης και αποθηκεύτηκαν στους -80°C, υποβλήθηκαν σε αντίστροφη μεταγραφή με σκοπό να παραχθεί DNA το οποίο και θα ελέγχονταν με PCR ποσοτικοποίησης. Σε 5μl δείγματος RNA προστίθενται 4μl Tr 5X,

2μl DTT 0,1M, 1μl dNTPs 10mM, 6μl τυχαίων εκκινητών 50ng/μl, 1μl ολιγονουκλεοτιδίου dT (50pm) και νερό μέχρι τελικού όγκου 20μl. Ακολουθούν δυο στάδια επώασης στους 70°C και 25°C για δέκα λεπτά. 2μl από κάθε δείγμα φυλάσσονται ως κοντρόλ στους -20°C. Στην υπόλοιπη ποσότητα δείγματος (18μl) προστίθενται 1μl Rnase OUT και 1μl RT και επωάζονται στους 25°C για δέκα λεπτά και στους 45°C για τριάντα λεπτά. Για τη πραγματοποίηση της PCR ποσοτικοποίησης, παρασκευάζεται μια σειρά αραιώσεων (τυφλό, δείγμα και αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000). Η συγκεκριμένη PCR πραγματοποιήθηκε ως εξής: θερμοκρασία αποικοδόμησης στους 95°C, υβριδοποίησης στους 55°C και επιμήκυνσης στους 72°C, σύμφωνα με το πρωτόκολλο *The LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*.⁽²¹⁾ Αυτό το πρωτόκολλο στηρίζεται στη χρήση μιας FastStart Taq DNA πολυμεράσης και μιας ειδικής για δίκλωνο DNA χρωστικής, τη SYBR Green I, για ανίχνευση. Η FastStart Taq DNA πολυμεράση είναι ένας τροποποιημένος τύπος της θερμοσταθερής ανασυνδυασμένης Taq DNA πολυμεράσης, η οποία ενεργοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ η SYBR Green I χρωστική ενώνεται στα ενισχυμένα προϊόντα της PCR, κατά τη διάρκεια κάθε σταδίου σύνθεσης DNA, και το ενισχυμένο προϊόν ανιχνεύεται μέσω εκπομπής φωτός. Τα αποτελέσματα καταγράφονται σε μορφή καμπυλών ενίσχυσης (τιμές φθορισμού έναντι αριθμού κύκλου), όπου οι αριθμοί που λαμβάνονται αντιστοιχούν στο κύκλο όπου ανιχνεύθηκε το DNA.

Έλεγχος για αρνητικά επικρατή αλληλόμορφα

Για την ανίχνευση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: μετά τον μετασχηματισμό των κατάλληλων στελεχών ζυμομύκητα με τα αλληλόμορφα, δυο αποικίες από κάθε τριβλίο μετασχηματισμού επιστρώθηκαν στο ίδιο μέσο και επώαστηκαν στους 30°C για μια νύχτα. Εν συνεχεία, μια μικρή ποσότητα αποικιών επιστρώθηκε σε πλήρες και ελάχιστο μέσο και επώαστηκε στους 30°C, 34°C και 37°C για δυο ημέρες. Μετά τη παρέλευση του αναφερόμενου χρόνου επώασης, οι αποικίες συγκρίθηκαν ως προς την ανάπτυξή τους (σύγκριση του μεγέθους των αποικιών των αλληλόμορφων με τα στελέχη-κοντρόλ).

Έλεγχος λειτουργικότητας αλληλόμορφων

Για να ελέγξουμε αν κάποιο αλληλόμορφο είναι λειτουργικό, οι αποικίες που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του στελέχους του ζυμομύκητα με το αντίστοιχο αλληλόμορφο απομονώθηκαν και μια μικρή ποσότητα επιστρώθηκε σε 5-FOA τριβλία. Η ανάπτυξη αποικιών, μετά από επώαση δυο ημερών στους 24°C, ελέγχθηκε, με την αύξηση αποικιών να υποδηλώνει ότι το αλληλόμορφο ήταν λειτουργικό.

Τα 5-FOA τριβλία περιέχουν το συστατικό 5-φλουοροοροτικό οξύ [$C_5H_3FN_2O_4$] το οποίο χρησιμοποιείται για τη θετική επιλογή των *ura3* μεταλλαγμάτων του *Saccharomyces cerevisiae*. Το URA3 γονίδιο κωδικοποιεί μια orotidine 5'-phosphate decarboxylase, ένα ένζυμο το οποίο απαιτείται για τη βιοσύνθεση της ουρακίλης. Το 5-φλουοροοροτικό οξύ μετατρέπεται μάλλον σε ένα τοξικό προϊόν, τη 5-φλουοροουρακίλη, με τη δράση της αποκαρβοξυλάσης, σκοτώνοντας τα URA3 κύτταρα, ενώ τα *ura3* κύτταρα είναι ανθεκτικά στο 5-FOA. Αυτό το φάρμακο χρησιμοποιείται για να ελέγξουμε αν ένα γονίδιο αγρίου τύπου μπορεί να χαθεί από ένα στέλεχος ζυμομύκητα, όταν το χρωμοσωμικό γονίδιο αγρίου τύπου είναι απών και το στέλεχος περιέχει πλασμίδια με γονίδια αγρίου τύπου αλλά και μεταλλαγμένα. ^(22, 23)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανέυρεση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων του *PCC2* γονιδίου

Όπως έχει αναφερθεί, η Pcc1p πρωτεΐνη σχηματίζει σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες Pcc2p (ή Ykr038p), Pcc3p και Bud32p, με τις λειτουργίες αυτών να εξαρτώνται άμεσα από την ακεραιότητα του συμπλόκου. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, εκτός των πρωτεϊνών αυτών, δεν έχει απομονωθεί καμία άλλη πρωτεΐνη, μέσω tap tag απομόνωσης, η οποία προσδέεται στο PCC σύμπλοκο. Για την εύρεση υποψήφιων πρωτεϊνών-στόχων του PCC συμπλόκου, θεωρήθηκε προσοδοφόρο η ανίχνευση ενός αρνητικά επικρατούς αλληλόμορφου του *PCC2* γονιδίου, ένα γεγονός που θα βοηθούσε στην καθίζηση του συμπλόκου. Για το λόγο αυτό, δυο σειρές μεταλλαγμένων αλληλόμορφων του γονιδίου εισήχθησαν στα pFL38 και pFL39 πλασμίδια. Εν συνεχεία, τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κατάλληλων στελεχών ζυμομύκητα και ελέχθησαν για την επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου, όσο και για τη λειτουργικότητά τους.

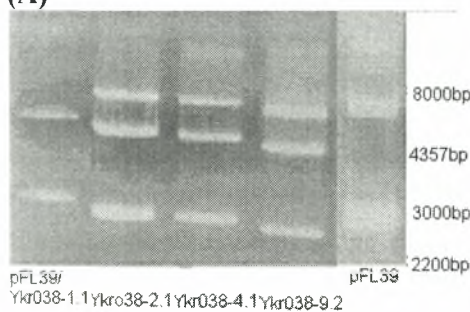
Η πρώτη σειρά μεταλλαγμένων αλληλόμορφων του *PCC2* γονιδίου κατασκευάστηκε από την Elena Kissileva-Romanova μέσω τυχαίας μεταλλαξιγένεσης και όλα τα μεταλλάγματα ήταν λειτουργικά αν και θερμοευαίσθητα. Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα pFL39/Ykr038-1, pFL39/Ykr038-2, pFL39/Ykr038-4, pFL39/Ykr038-5, pFL39/Ykr038-7, pFL39/Ykr038-9, pFL39/Ykr038-10 και pFL39/Ykr038-11, εισήχθησαν στο πλασμίδιο pFL39 και εν συνεχεία στο στέλεχος ΔYkr038::His του ζυμομύκητα. Τα πλασμιδιακά DNA εξήχθησαν και συμβατά *E.coli* βακτήρια μετασχηματίστηκαν με αυτά. Δυο αποικίες από κάθε βακτήριο υποβλήθηκαν σε απομόνωση DNA και τα προκύπτοντα δείγματα υποβλήθηκαν σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα (restriction control).

Ο έλεγχος με τα BstXI και BamHI περιοριστικά ένζυμα πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ενθέματος (insert) στο πλασμίδιο. Τόσο τα πλασμιδιακά δείγματα, όσο και ο φορέας-κοντρόλ χωρίς ένθεμα, pFL39, επωάστηκαν με τα ένζυμα BamHI στους 37°C και BstXI στους 55°C για μια ώρα και εν συνεχεία ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι αναμενόμενες μπάντες στο πήκτωμα για τη πέψη με το BamHI ένζυμο είναι δυο μπάντες στις 2200bp και 4357bp, ενώ για τη πέψη με το BstXI ένζυμο, δυο μπάντες στις 1582bp και 4951bp (εικόνα 11). Επιπρόσθετα, τα δείγματα DNA υπέστησαν καθαρισμό με φαινόλη/ χλωροφόρμιο για να

πραγματοποιηθεί χαρτογράφηση της αλληλουχίας τους (sequencing) ώστε να εντοπιστεί η ακριβής θέση των μεταλλάξεων.

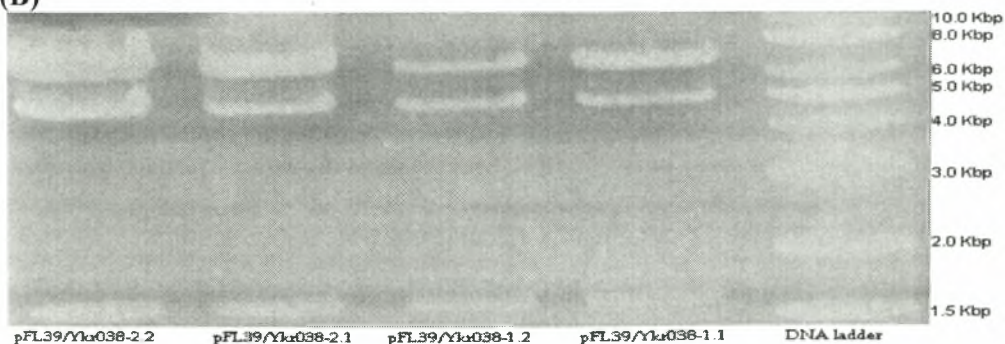
Εν συνεχεία, το Ykr038-18 mat α στέλεχος μετασχηματίστηκε με τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα pFL39/Ykr038-1.1, pFL39/Ykr038-2.1, pFL39/Ykr038-4.1, pFL39/Ykr038-7.1, pFL39/Ykr038-9.2, pFL39/Ykr038-10, pFL39/Ykr038-11.2 και τα pFL39, pFL39/WTYkr038, pFL39/Ykr038c+, pFL39#2.1 v18, pFL39/Ykr038c clone 12^a (0.2μg/μl) ως κοντρόλ. Τα μετασχηματισμένα στελέχη επιστρώθηκαν σε CSM-TRP μέσο, επωάστηκαν για τρεις-τέσσερις ημέρες στους 30°C και τελικά δυο αποικίες από κάθε μετασχηματισμό απομονώθηκαν σε νέο τριβλίο και επωάστηκαν στους 30°C για μια ημέρα. Εν συνεχεία, οι αναπτυγμένες αποικίες ελέγχθηκαν για την επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου, επωάζοντας αυτές σε YPDA και CSM-TRP τριβλία στους 30°C, 34°C και 37°C. Μετά την πάροδο δυο ημερών, τα τριβλία εξετάστηκαν ως προς το μέγεθος των αναπτυγμένων αποικιών. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω: στα YPDA τριβλία η αύξηση των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων ήταν ίδια με αυτή του αρνητικού-κοντρόλ pFL39 και συνεπώς κανένα από τα αλληλόμορφα δεν συμπεριφέρεται ως αρνητικά επικρατές. Στα CSM-TRP τριβλία, η ανάπτυξη των αλληλόμορφων ήταν ίδια περίπου με το αρνητικό-κοντρόλ, κάτι το αναμενόμενο αφού τα αλληλόμορφα έχουν μεταλλάξεις σε περιοχές εκτός του καταλυτικού κέντρου της πρωτεΐνης. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η πρώτη σειρά μεταλλαγμένων αλληλόμορφων δεν επάγει έναν αρνητικά επικρατή φαινότυπο (εικόνα 12).

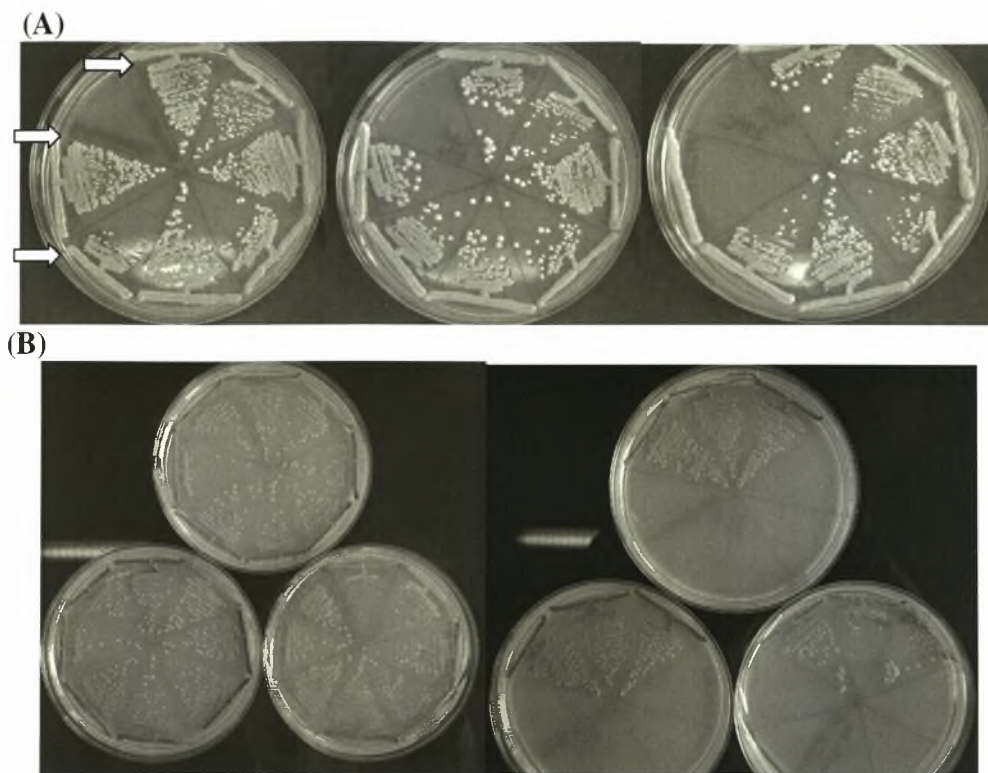
(A)



Εικόνα 11: Πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και BstXI ορισμένων rcc2 μεταλλαγμένων αλληλόμορφων, τα οποία κατασκευάστηκαν από την Elena Kissileva-Romanova, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία ενθέματος στα πλασμίδια. Α) Η πέψη με το ένζυμο BamHI έδωσε δυο μπάντες στις 2200bp και 4357bp, ενώ Β) από τη πέψη με το ένζυμο BstXI ελήφθησαν δυο μπάντες στις 1582bp και 4951bp.

(B)





Εικόνα 12: Έλεγχος για εύρεση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων του *PCC2* γονιδίου. Το στέλεχος *Ykr038-18 mat a* του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με τα οκτώ μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, τα οποία δημιουργήθηκαν από την *Elena Kissileva-Romanova* μέσω τυχαίας μεταλλαξιγένεσης και εξετάστηκαν σε *YPDA* και *CSM-Trp* μέσο. Α) Έλεγχος σε *YPDA* μέσο. Τα αλληλόμορφα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως κοντρόλ *pFL39WTYkr038*, *pFL39Ykr038#2.1*, *pFL39/Ykr038c** και *pFL39* εμφανίζονται με άσπρα βέλη. Το τριβλίο στα δεξιά επωάστηκε στους 30°C, το μεσαίο τριβλίο στους 34°C, ενώ το τριβλίο στα αριστερά στους 37°C. Β) Έλεγχος των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων σε *CSM-TRP* μέσο. Τα άνω τριβλία επωάστηκαν στους 30°C, τα κάτω-αριστερά τριβλία στους 34°C και τα κάτω-δεξιά τριβλία στους 37°C. Η σειρά των αλληλόμορφων της αριστερής εικόνας είναι: *pFL39*, *pFL39/Ykr038-1*, *pFL39/Ykr038-9*, *pFL39/Ykr038-4*, *pFL39/Ykr038-2*, *pFL39/Ykr038-7*, *pFL39/Ykr038-11* και *pFL39/Ykr038-10*, ενώ της δεξιάς εικόνας: *pFL39/WTYkr038*, *pFL39/Ykr038#2.1*, *pFL39/Ykr038c**. Κανένα από τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα στο *YPDA* ή *CSM-TRP* μέσο, δεν έδωσε αρνητικά επικρατή φαινότυπο.

Η δεύτερη σειρά μεταλλαγμάτων κατασκευάστηκε από τη *Laila Illan* μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης. Η *Pcc2p* πρωτεΐνη διαθέτει μια περιοχή πρόσδεσης ψευδαργύρου με δυο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης, η οποία και είναι ουσιώδης για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα. Μεταλλάξεις σε αυτά τα κατάλοιπα πραγματοποιήθηκαν μέσω PCR με χρήση ως εκκινήτη ενός μεταλλαγμένου ολιγονουκλεοτιδίου (No 422).

Το *Ykr038-18 mat a* στέλεχος του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα *pFL38/Ykr038-1*, *pFL38/Ykr038-2*, *pFL38/Ykr038-3*, *pFL38/Ykr038-4*, *pFL38/Ykr038-5*, *pFL38/Ykr038-6*, *pFL38/Ykr038-7*, *pFL38/Ykr038-*

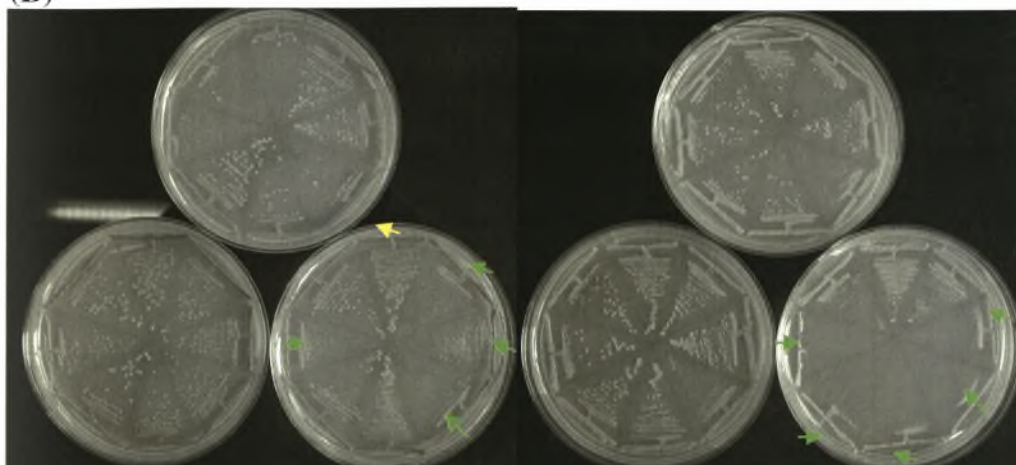
8, pFL38/Ykr038-9, pFL38/Ykr038-10, pFL38/Ykr038-11, pFL38/Ykr038-12, pFL38/Ykr038-13, pFL38/Ykr038-14, pFL38/Ykr038-15, pFL38/Ykr038-16, pFL38/Ykr038-17, pFL38/Ykr038-18, pFL38/Ykr038-19, pFL38/Ykr038-20, pFL38/Ykr038-21, pFL38/Ykr038-22, pFL38/Ykr038-23, pFL38/Ykr038-24, pFL38/Ykr038-25 και pFL38/Ykr038-26 και επωάστηκε σε CSM-URA τριβλία στους 30°C για τρεις ή τέσσερις ημέρες. Οι αναπτυχθείσες αποικίες ελέγχθηκαν για την επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου σε YPDA και CSM-URA μέσω ανάπτυξης. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα ήταν: (1) ένα *pcc2* αλληλόμορφο, το pFL38/Ykr038-11, παρουσίασε καλύτερη ανάπτυξη από το κοντρόλ και στα δυο μέσα ανάπτυξης και (2) δυο σειρές/ σύνολα αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων ανιχνεύθηκαν: (A) τα αλληλόμορφα pFL38/Ykr038-3, pFL38/Ykr038-8, pFL38/Ykr038-9, pFL38/Ykr038-14, pFL38/Ykr038-15, pFL38/Ykr038-17, pFL38/Ykr038-26 και (B) τα pFL38/Ykr038-4, pFL38/Ykr038-7, pFL38/Ykr038-13, pFL38/Ykr038-20 και pFL38/Ykr038-21 (εικόνα 13).

Επιπλέον, τα αρνητικά επικρατή αλληλόμορφα pFL38/Ykr038-3, pFL38/Ykr038-8, pFL38/Ykr038-9, pFL38/Ykr038-14, pFL38/Ykr038-15, pFL38/Ykr038-17 και pFL38/Ykr038-26 υποβλήθηκαν σε έλεγχο της αλληλουχίας τους. Χρησιμοποιώντας κατάλληλη ποσότητα από κάθε δείγμα ώστε να υπάρχουν 2x700=1400ng DNA η ανάλυση της αλληλουχίας των αλληλόμορφων πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές 453 και 497, στο αντίστοιχο εργαστήριο του εθνικού επιστημονικού κέντρου της Γαλλίας (εικόνα 14).

(A)



(B)



Εικόνα 13: Έλεγχος της δεύτερης σειράς *rsc2* αλληλόμορφων για την επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου. Τα αλληλόμορφα τα οποία κατασκευάστηκαν από τη Laiila Illan εισήχθησαν στο *Ykr038-18 mat a* στέλεχος του ζυμομύκητα και τα στελέχη ελέγχθηκαν σε *YPD*A και *CSM-URA* μέσο. Α) Έλεγχος σε *YPD*A μέσο. Τα αλληλόμορφα που χρησιμοποιήθηκαν ως κοντρόλ *pFL39/WTYkr038*, *pFL39/Ykr038#2.1* και *pFL39/Ykr038c** είναι όμοια με αυτά της εικόνας 12Α. Το τριβλίο στα δεξιά επωάστηκε στους 30°C, το μεσαίο τριβλίο στους 34°C και το τριβλίο στα αριστερά στους 37°C. Β) Έλεγχος σε *CSM-URA* μέσο. Τα άνω τριβλία επωάστηκαν στους 30°C, τα κάτω-αριστερά τριβλία στους 34°C και τα κάτω-δεξιά τριβλία στους 37°C. Τα χρησιμοποιούμενα αλληλόμορφα-κοντρόλ, *pFL39/WTYkr038*, *pFL39/Ykr038#2.1*, *pFL39/Ykr038c** και *pFL39* είναι όμοια με αυτά της εικόνας 12Β. Ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, το *pFL38/Ykr038-11*, παρουσίασε καλύτερη ανάπτυξη από το φορέα και στα δυο μέσα ανάπτυξης (κίτρινο βέλος). Δώδεκα αλληλόμορφα ασκούν αρνητικά επικρατές προφίλ στο *Ykr038-18* στέλεχος και χωρίστηκαν σε δυο ομάδες (πράσινα βέλη).

Εικόνα 14: Ανάλυση αλληλουχίας των αμινικών επικρατιών αλληλόμορφων pFL38/Υκρ038-3, pFL38/Υκρ038-8, pFL38/Υκρ038-9, pFL38/Υκρ038-14, pFL38/Υκρ038-15, pFL38/Υκρ038-17 και pFL38/Υκρ038-26, με χρήση των εκκινητιών 453 και 497. Τα ουτηρημένα κατάλοιπα ισοτινής του μοτίβου πρόδεσης ψευδαργύρου της Pcc2p πρωτεΐνης, τα οποία αποτέλεσαν το κύριο στόχο των μεταλλάξεων, εντοπίζονται στις θέσεις 143 και 147 της αλληλουχίας.

```

14 MNLWLTIPPKNGRDVTYIALGIGLSAARLGLVGIYVSHPLPFRANSOLSTDCSAEMLSNIRLTVNPPGGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 150
15 -----MFLNTRLPTVPPGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 97
17 MNLWLTIPPKNGRDVTYIALGIGLSAARLGLVGIYVSHPLPFRANSOLSTDCSAEMLSNIRLTVNPPGGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 150
3 MNLWLTIPPKNGRDVTYIALGIGLSAARLGLVGIYVSHPLPFRANSOLSTDCSAEMLSNIRLTVNPPGGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 150
9 MNLWLTIPPKNGRDVTYIALGIGLSAARLGLVGIYVSHPLPFRANSOLSTDCSAEMLSNIRLTVNPPGGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 150
8 MNLWLTIPPKNGRDVTYIALGIGLSAARLGLVGIYVSHPLPFRANSOLSTDCSAEMLSNIRLTVNPPGGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 150
WT MNLWLTIPPKNGRDVTYIALGIGLSAARLGLVGIYVSHPLPFRANSOLSTDCSAEMLSNIRLTVNPPGGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 150
26 MNLWLTIPPKNGRDVTYIALGIGLSAARLGLVGIYVSHPLPFRANSOLSTDCSAEMLSNIRLTVNPPGGGFLERPARHRRNCIRLTKQALADIKSPFLDI VIGTWPGRGAPLHSVIAARVCGLLM VPLVGNVCIQIIMGR 150
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150

```

```

14 ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 300
15 ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 247
17 ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 300
3 ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 300
9 ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 300
8 ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 300
WT ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 300
26 ITPAQNEVVLVNSGGVTVVNASSEKRYRITFGETLDAIIGNCLRFRANTLKIIPNEPBGVNIISQAKKAPHRKSLVLELPTVTKGM LSMGGIIASI ILAA LTKGNQNRKILFPTVNGEDVTVVSLCYSLDQNLPAKLV ITRRAVAE 300
ruler .....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

```

```

14 VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVV----- 363
15 VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVKQFSEVV----- 298
17 VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVKQFSEVV----- 370
3 VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVKQFSEVV----- 367
9 VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVKQFSEVV----- 370
8 VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVKQFSEVV----- 366
WT VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVKQFSEVV----- 386
26 VNSNQVLLIVGGVGNVRLQEMMAQMKDRANGVHAIDNRFQCIINGVMITADAGILLETYRMGGIVKQFSEVV----- 366
ruler .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....

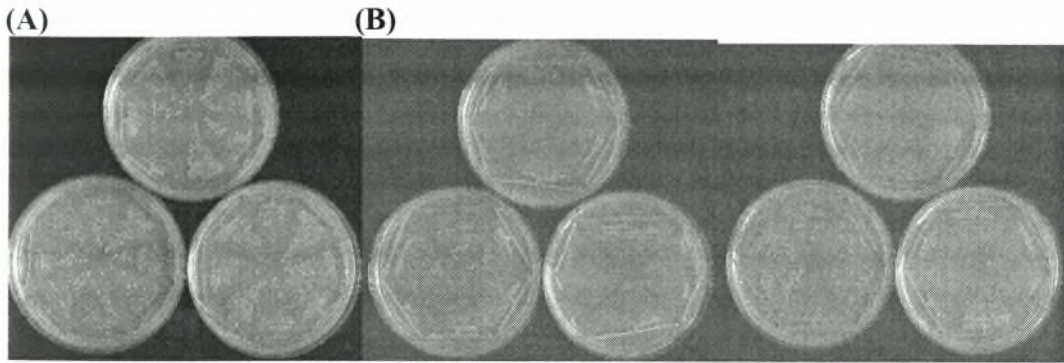
```

Ωστόσο, επειδή το Ykr038-18 mat α στέλεχος του ζυμομύκητα είναι θερμοευαίσθητο στους 37°C, θεωρήθηκε απαραίτητο να εξετάσουμε τη συμπεριφορά των *pcc2* αλληλόμορφων και σε ένα αγρίου τύπου στέλεχος. Για το λόγο αυτό, οι δυο σειρές αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων, οι οποίες εντοπίστηκαν στο Ykr038-18 mat α στέλεχος, χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του W303 mat α στελέχους. Τα προκύπτοντα μετασχηματισμένα στελέχη επώστηκαν σε CSM τριβλία και εξετάστηκαν ως προς ανάπτυξή τους. Από τα δώδεκα συνολικά αλληλόμορφα, η πρώτη σειρά αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων (pFL38/Ykr038-3, pFL38/Ykr038-9, pFL38/Ykr038-14, pFL38/Ykr038-15, pFL38/Ykr038-17, pFL38/Ykr038-20 και pFL38/Ykr038-26) δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη του στελέχους, ενώ η δεύτερη σειρά αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων (pFL38/Ykr038-4, pFL38/Ykr038-7, pFL38/Ykr038-13, pFL38/Ykr038-20, pFL38/Ykr038-21) παρουσίασε μικρές και μεγάλες αποικίες στα τριβλία μετασχηματισμού, με τις μικρές αποικίες να επάγουν αρνητικά επικρατή φαινότυπο και ιδιαίτερα το αλληλόμορφο pFL38/Ykr038-20 να εμφανίζει αρνητικά επικρατές προφίλ από τη θερμοκρασία των 30°C. Αντίθετα, οι μεγάλες αποικίες παρουσίασαν ίδια ανάπτυξη με αυτή του αρνητικού κοντρόλ υποδηλώνοντας ότι τα αλληλόμορφα δεν συμπεριφέρονται ως αρνητικά επικρατή (εικόνα 15). Ωστόσο, το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν αποικίες με διαφορετικό προφίλ ανάπτυξης, δεν ταυτοποίησε ένα “ισχυρά” αρνητικά επικρατές αλληλόμορφο, με τη παρουσία αποικιών διαφορετικού μεγέθους να αποδίδεται σε πιθανό πολλαπλασιασμό του γονιδίου (insert) στις μεγάλες αποικίες, λόγω χαμηλής αποδοτικότητας του μετασχηματισμού. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, αποφασίστηκε να κλωνοποιηθούν μερικά αρνητικά επικρατή αλληλόμορφα στο φορέα pFL45S.

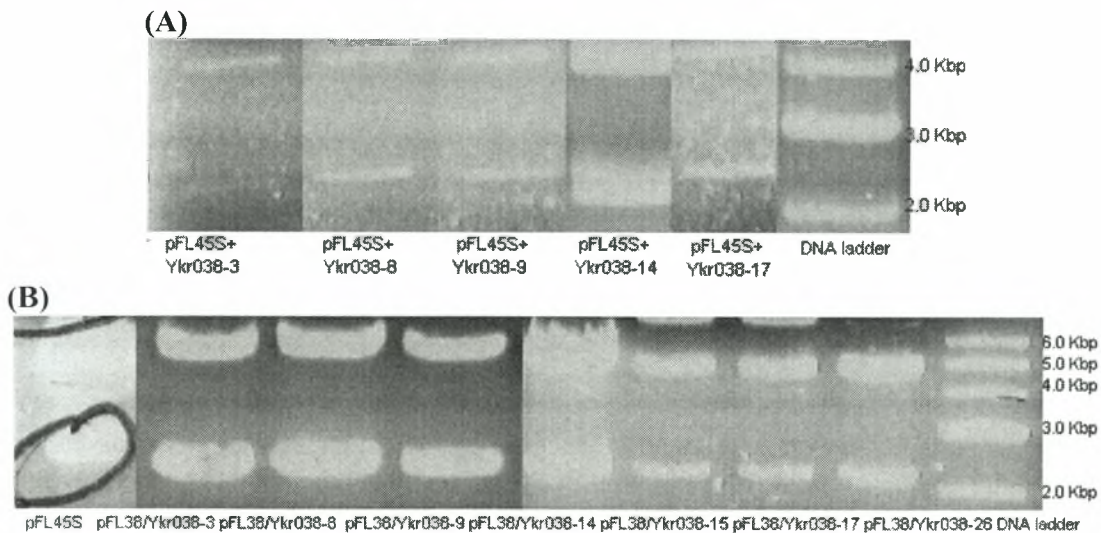
Για τη πραγματοποίηση της κλωνοποίησης των *pcc2* αλληλόμορφων στο πλασμίδιο pFL45S, τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα και ο φορέας υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI. Όσον αφορά το πλασμίδιο pFL45S, 5μl του πλασμιδίου προστέθηκαν σε 2μl ενζύμου και 1μl Shriump phosphatase (για αποφωσφορυλίωση των άκρων, ώστε να ληφθεί ευθύγραμμη αλυσίδα του πλασμιδίου) και επώστηκαν στους 37°C για μια ώρα. Η αναμενόμενη μπάντα αντιστοιχεί στις 4063bp (εικόνα 16). Για τη πέψη των *pcc2* αλληλόμορφων, 10μl από το καθένα επώστηκαν στους 37°C για μια ώρα παρουσία 1 μl ενζύμου, αναμένοντας δυο μπάντες στις 4350bp (αντιστοιχεί στο πλασμίδιο) και 2175bp (αντιστοιχεί στο γονίδιο) (εικόνα 16). Στη συνέχεια, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και οι μπάντες στις 4063bp για το φορέα και 2175bp για τα αλληλόμορφα απομονώθηκαν από το

πήκτωμα, με 5μl από τα προκύπτοντα δείγματα να υποβάλλονται σε νέα ηλεκτροφόρηση για ποσοτικοποίηση. Ακολούθως, ο φορέας και το κάθε *pcc2* αλληλόμορφο ενώθηκαν με τη βοήθεια λιγάσης. Τα δείγματα σύζευξης (ligation samples) επωάστηκαν στους 14°C και εφαρμόστηκαν σε φίλτρο νιτροσελλουλόζης. Συμβατά *E.coli* βακτήρια μετασχηματίστηκαν με 2μl από κάθε δείγμα σύζευξης και τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε LBA τριβλία μαζί με 50μl IPTG και 100μl X-Gal (100mg/ml). Τα τριβλία επωάστηκαν στους 37°C για μια ημέρα και οι αποικίες που περιείχαν το γονίδιο απομονώθηκαν (άσπρες αποικίες). Από τα δείγματα που εξετάστηκαν μόνο τα δείγματα pFL45S+Ykr038-3, pFL45S+Ykr038-8, pFL45S+Ykr038-9, pFL45S+Ykr038-14 και pFL45S+Ykr038-17 έδωσαν άσπρες αποικίες. LBA καλλιέργειες για τρεις αποικίες από τα ανωτέρω δείγματα προετοιμάστηκαν για απομόνωση του DNA και υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI, ώστε να ελεγχθεί η παρουσία του ενθέματος στο φορέα, επωάζοντάς τα στους 37°C για μια ώρα (εικόνα 16). Το W303mat α στέλεχος του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με τα στελέχη πλασμιδίων pFL45S+Ykr038-3, pFL45S+Ykr038-8, pFL45S+Ykr038-9, pFL45S+Ykr038-14, pFL45S+Ykr038-17 και pFL45S ως κοντρόλ, και επωάστηκε στους 30°C για τρεις ημέρες. Δυο αποικίες από κάθε τριβλίο απομονώθηκαν (μια μικρή και μια μεγάλη) και ελέγχθηκαν για την επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου. Όλα τα μετασχηματισμένα στελέχη παρουσίασαν μικρές και μεγάλες αποικίες, με τις πρώτες να παρουσιάζουν αρνητικά επικρατή φαινότυπο, και τις μεγάλες αποικίες όχι. Λόγω αυτού του γεγονότος, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση ενός “ισχυρά” αρνητικά επικρατούς αλληλόμορφου του *PCC2* γονιδίου. Επειδή, η υπερ-έκφραση των υποψήφιων αρνητικών αλληλόμορφων σε πλασμίδιο πολλαπλών αντιγράφων, με τα αλληλόμορφα υπό τον έλεγχο του ίδιου τους του προαγωγέα, δεν επέφερε επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου στο W303 στέλεχος, αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε/ υπερ-εκφράσουμε μερικά από τα αλληλόμορφα σε έναν επαγωγίμο φορέα, όπου θα ήταν δυνατή η επαγωγή ή όχι της μεταγραφής του γονιδίου.

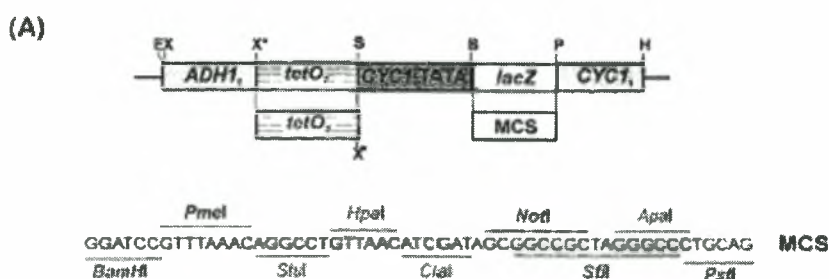
Για να επιτευχθεί η κλωνοποίηση των αλληλόμορφων σε έναν επαγωγίμο φορέα, πρωταρχικό βήμα αποτέλεσε η επιλογή του κατάλληλου φορέα. Κατά τη προσπάθειά μας χρησιμοποιήσαμε ένα φορέα με tetO2 προαγωγέα, πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (multiple cloning site, MCS) και tTA* εκκινητή, και συγκεκριμένα το κεντρομερές πλασμίδιο pCM185 με δείκτη επιλογής Trp (εικόνα 17).



Εικόνα 15: Έλεγχος για άσκηση αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου στο W303 mat a στέλεχος του ζυμομύκητα, των δυο ομάδων αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων που εντοπίστηκαν στο Ykr038-18 στέλεχος. Τα άνω CSM-URA τριβλία επώαστηκαν στους 30°C, τα κάτω-αριστερά στους 34°C και τα κάτω-δεξιά τριβλία στους 37°C. Α) Έλεγχος της πρώτης σειράς υποψήφιων αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων. Η σειρά των αλληλόμορφων είναι: pFL38, pFL38/Ykr038-26, pFL38/Ykr038-20, pFL38/Ykr038-17, pFL38/Ykr038-15, pFL38/Ykr038-14, pFL38/Ykr038-9 και pFL38/Ykr038-3. Όπως παρατηρείται από την ανάπτυξη των αλληλόμορφων, κανένα από αυτά δεν συμπεριφέρεται ως αρνητικά επικρατές. Β) Έλεγχος της δεύτερης σειράς υποψήφιων αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων. Η εικόνα στα αριστερά αναπαριστά τον έλεγχο των μικρών αποικιών στα τριβλία μετασχηματισμού, ενώ τα τριβλία στα δεξιά τον αντίστοιχο έλεγχο για τις μεγάλες αποικίες. Η σειρά των αλληλόμορφων είναι: pFL38, pFL38/Ykr038-4, pFL38/Ykr038-7, pFL38/Ykr038-13, pFL38/Ykr038-20 και pFL38/Ykr038-21.



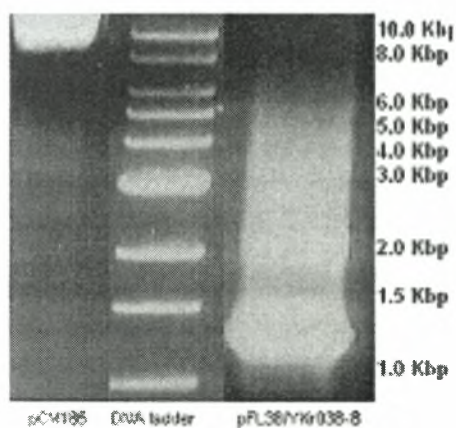
Εικόνα 16: Κλωνοποίηση των rcc2 αλληλόμορφων στο φορέα pFL45S. Α) Τόσο ο φορέας όσο και τα rcc2 αλληλόμορφα υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI. Οι προκύπτοντες μπάντες αντιστοιχούν στις 4063bp για το φορέα και στις 4350bp και 2175bp για τα αλληλόμορφα. Β) Μετά τη σύζευξη των αλληλόμορφων στο φορέα, τα δείγματα σύζευξης ελέγχθησαν με πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI, ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία του ένθετου στο φορέα. Η μπάντα στις 2175bp αντιστοιχεί στο ένθετο και στις 4063bp στο φορέα.



Εικόνα 17: A) Σχηματική αναπαράσταση των δομών με *tetO* προαγωγέα. Τα συστατικά της ρυθμιστικής περιοχής: *ADH1t*, *ADH1* περιοχή τερματισμού, *tetO2* και *tetO7*, περιοχή του προαγωγέα η οποία σχηματίζεται αντίστοιχα από δυο ή επτά *tetO* μονάδες σε επανάληψη (κάθε *tetO* μονάδα αντιστοιχεί στη παλινδρομική αλληλουχία TCCCTATCAGTGTAGAGA), *CYC1 TATA*, *TATA box* από το *CYC1*, *CYC1t*, *CYC1* περιοχή τερματισμού. Οι θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα είναι: B: *BamHI*, E: *EcoRI*, H: *HindIII*, P: *PstI*, S: *SphI*, X: *XhoI*. X* δηλώνει μια απενεργοποιημένη *XhoI* θέση. MCS (multiple cloning site region) περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης στη τελική δομή του φορέα. B) Το πλασμίδιο που περιέχει προαγωγείς ρυθμιζόμενους από τη τετρακυκλίνη και το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία. ^b αριθμός των *tetO* παλινδρομικών μονάδων που υπάρχουν στο προαγωγέα. ^c MCS: περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης. ^d *E. coli* κλωνοποιημένη κάτω από τον έλεγχο του *tetO* προαγωγέα αντί για MCS. ^e +*, *tetR* και *VP16ad* τα οποία διαχωρίζονται από ένα cI-λ διάστημα.

Για την κλωνοποίηση των *pcc2* αλληλόμορφων στο φορέα pCM185 (μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού), ενισχύσαμε το *PCC2* γονίδιο στο πλασμίδιο pFL38 με ένα ολιγονουκλεοτίδιο-χίμαιρα. Ένα τέτοιο ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμβατό τόσο για το φορέα όσο και για το εξεταζόμενο γονίδιο. Στην περίπτωση αυτή, το *PCC2* γονίδιο και ο φορέας ενισχύονται με χρήση της PCR και μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, είναι εφικτή η εισαγωγή του γονιδίου στο φορέα. Τα επιλεγμένα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα pFL38/Ykr038-8 και pFL38/Ykr038-14 υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού *BamHI* στους 37°C για μια ώρα και ενισχύθηκαν μέσω PCR με τη χρήση ειδικής *Taq* DNA πολυμεράσης (*Pfy* DNA polymerase), ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, ως εξής: 1μl dNTPs (10mM), 5μl TP10x, 1μl oligo574 (15μM, ειδικό για το pCM-5' άκρο), 1μl oligo238 (15μM, ειδικό για το pCM-3' άκρο), 1μl *Taq* πολυμεράσης, 1μl (25ng/μl) DNA και νερό μέχρι τελικού όγκου 50μl προετοιμάστηκαν και η PCR πραγματοποιήθηκε στις συνήθεις συνθήκες, εκτός της θερμοκρασίας υβριδοποίησης η οποία ορίστηκε στους 52°C. [Η αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου 574 είναι: CTAAATTACCGGATCAATTCGGGGGATCCatggtcaacttgaacac].

Στη συνέχεια, 20μl προϊόντος της PCR αντίδρασης υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση, η μπάντα στις 1200bp εξάχθηκε από το πήκτωμα και 5μl του εκλουόμενου DNA υποβλήθηκαν σε νέα ηλεκτροφόρηση (εικόνα 18). Παράλληλα, το πλασμίδιο pCM185 επώαστηκε με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NotI στους 37°C για μια ώρα και υπέστη ηλεκτροφόρηση. Η αναμενόμενη μπάντα στις 7730bp εξάχθηκε από το πήκτωμα και 5μl του δείγματος υποβλήθηκαν σε νέα ηλεκτροφόρηση (εικόνα 18). Τέλος, το W303 mat α στέλεχος του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με τον επαγωγίμο φορέα pCM185 και τα ενισχυμένα αλληλόμορφα και τα μετασχηματισμένα στελέχη επώαστηκαν σε CSM-TRP τριβλίο στους 30°C για τρεις-τέσσερις ημέρες. Τα προκύπτοντα στελέχη εξετάστηκαν για την επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου, όπου και παρατηρήσαμε ότι η ανάπτυξη των αλληλόμορφων παρέμεινε όμοια με αυτή στο αγρίου τύπου στέλεχος. Συμπερασματικά, λοιπόν, από τα εξετασθέντα μέχρι στιγμής αλληλόμορφα, δεν ανιχνεύσαμε κανένα αρνητικά επικρατές αλληλόμορφο του PCC2 γονιδίου.



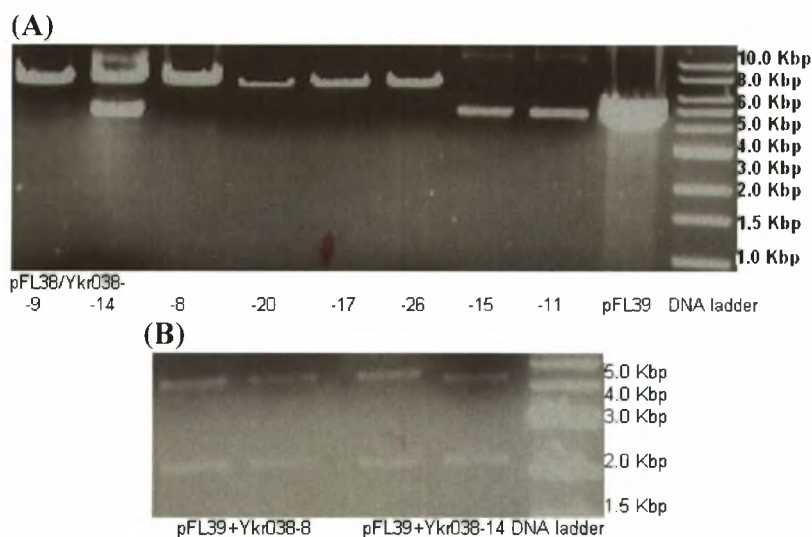
Εικόνα 18: Κλωνοποίηση του αλληλόμορφου pFL38/Ykr038-8 στον επαγωγίμο φορέα pCM185. Το αλληλόμορφο υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI και ενισχύθηκε μέσω PCR με χρήση της Pfy DNA πολυμεράσης. Από την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR αντίδρασης αναμένεται μια μπάντα στις 1200bp. Παράλληλα, το πλασμίδιο pCM185 επώαστηκε με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NotI και υπέστη ηλεκτροφόρηση δίνοντας μια μπάντα στις 7730bp.

Παράλληλα με τα ανωτέρω πειράματα για την ταυτοποίηση ενός αρνητικά επικρατούς αλληλόμορφου, τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα εξετάστηκαν και για τη λειτουργικότητά τους. Για την πραγματοποίηση αυτού του πειράματος, τα αλληλόμορφα κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pFL39. Τα αλληλόμορφα pFL38/Ykr038-8, pFL38/Ykr038-9, pFL38/Ykr038-11, pFL38/Ykr038-14, pFL38/Ykr038-15, pFL38/Ykr038-17, pFL38/Ykr038-20 και pFL38/Ykr038-26 επώαστηκαν με το ένζυμο περιορισμού EcoRV ενώ ο φορέας pFL39 με τα ένζυμα PvuII/ HindIII στους 37°C για μια ώρα. Φυσιολογικά, αναμένεται μια μπάντα στις 6789bp για τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα και δυο μπάντες στις ≈4211bp και 139bp για το φορέα. Μετά την

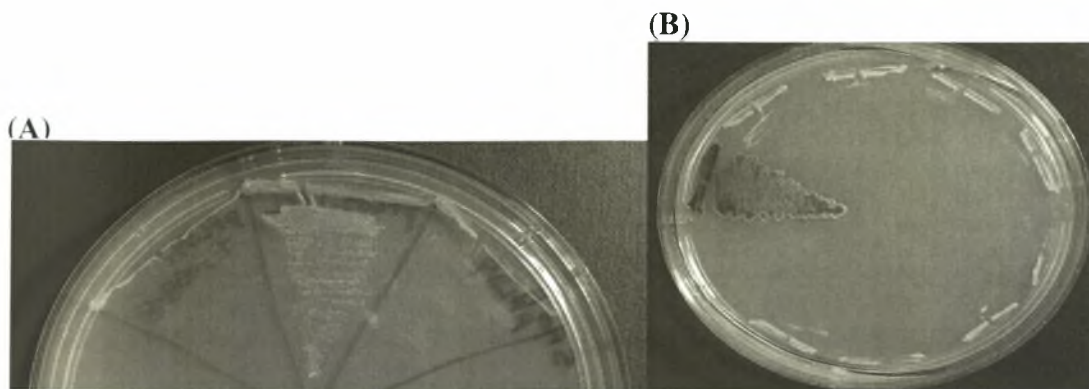
ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (εικόνα 19,A) οι προαναφερθέντες μπάντες απομονώθηκαν από το πήκτωμα και 5μl από κάθε δείγμα υποβλήθηκαν σε νέα ηλεκτροφόρηση, για να ελεγχθεί η ποσότητα του γραμμικού DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός του W303 mat α στελέχους με τα αρνητικά επικρατή αλληλόμορφα και το φορέα, κατά τη διάρκεια του οποίου πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός ανάμεσα στα δυο πλασμίδια. Ως αρνητικό κοντρόλ, χρησιμοποιήθηκε μόνο 1μl φορέα pFL39. Στη συνέχεια, τα μετασχηματισμένα στελέχη επώαστηκαν σε CSM-TRP τριβλία στους 30°C για τρεις-τέσσερις ημέρες. Για να επιβεβαιώσουμε ότι ο ομόλογος ανασυνδυασμός κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού ήταν επιτυχής, ο αριθμός των ληφθέντων αποικιών στα μετασχηματισμένα στελέχη με τα pFL39+Ykr038 αλληλόμορφα έπρεπε να ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των κοντρόλ-αποικιών. Οι αναπτυχθέντες αποικίες απομονώθηκαν και επώαστηκαν σε CSM-TRP μέσο στους 30°C για μια ημέρα. Ωστόσο, λόγω έλλειψης χρόνου, το τελευταίο βήμα πραγματοποιήθηκε μόνο για τα αλληλόμορφα, pFL38/Ykr038-8 και pFL38/Ykr038-14. Τα πλασμίδια απομονώθηκαν από τις αντίστοιχες αποικίες και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό συμβατών *E.coli* βακτηρίων. Τα προκύπτοντα βακτήρια επώαστηκαν στους 37°C για μια ημέρα και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Τα δείγματα επώαστηκαν με το ένζυμο περιορισμού BamHI στους 37°C και εν συνεχεία ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 19,B). Τέλος, το ΔYkr038::His+pCM188/Ykr038c στέλεχος του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με τα αλληλόμορφα, το φορέα-αρνητικό κοντρόλ pFL39 και τα αλληλόμορφα-θετικά κοντρόλ pFL39_12^a ή pFL39/WTYkr038. Τα μετασχηματισμένα στελέχη επώαστηκαν σε CSM-TRP τριβλία στους 30°C για τρεις-τέσσερις ημέρες, ενώ αποικίες αναπτύχθηκαν μόνο στο μετασχηματισμένο στέλεχος με το αλληλόμορφο pFL39+Ykr038-8. Τρεις αποικίες από αυτό απομονώθηκαν και επώαστηκαν για μια ακόμη ημέρα στο ίδιο θρεπτικό υλικό. Τελικά, το αλληλόμορφο εξετάστηκε για τη λειτουργικότητά του, επωάζοντάς το σε 5-FOA μέσο στους 24°C για δυο ημέρες. Μετέπειτα, τα στελέχη ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη αποικιών, όπου και παρατηρήσαμε ότι το στέλεχος pFL39+Ykr038-8 δεν αναπτύχθηκε (όπως και το αρνητικό κοντρόλ pFL39), σε αντίθεση με το στέλεχος-θετικό κοντρόλ pFL39_12^a, δηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο Ykr038-8 δεν είναι λειτουργικό (εικόνα 20,A).

Επιπρόσθετα, οκτώ μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του *PCC2* γονιδίου, τα οποία είχαν παραχθεί από τη Lailla Illan, είχαν εισαχθεί στο πλασμίδιο pFL39 και μόνο δυο από αυτά βρέθηκε να επάγουν αρνητικά επικρατή φαινότυπο. Για τον έλεγχο της

λειτουργικότητας αυτών των αλληλόμορφων, το ΔYkr038-18mat a+ pCM188(URA⁺)-Ykr038c στέλεχος του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με τα αλληλόμορφα pFL39/Ykr038.1*, pFL39/Ykr038.2*, pFL39/Ykr038.3*, pFL39/Ykr038.4*, pFL39/Ykr038.6*, pFL39/Ykr038.7*, pFL39/Ykr038.8*, το πλασμίδιο pFL39 ως αρνητικό κοντρόλ και τα αλληλόμορφα pFL39/Ykr038-18#2.1, pFL39/WTYkr, pFL39/Ykr038c12a ως θετικά κοντρόλ. Τα μετασχηματισμένα στελέχη επωάστηκαν στους 24°C και εξετάστηκαν ως προς την ανάπτυξή τους. Κανένα από τα αλληλόμορφα δεν αναπτύχθηκε και συνεπώς οι μεταλλάξεις αυτών των αλληλόμορφων δεν είναι λειτουργικές (εικόνα 20,B). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς τα περισσότερα από τα παραπάνω αλληλόμορφα είχαν μεταλλάξεις στη καταλυτική τους περιοχή και ένα αλληλόμορφο (pFL39/Ykr038.4*) είχε υποστεί μετάλλαξη στη C-τελική περιοχή του.



Εικόνα 19: Κλωνοποίηση των *rcc2* αλληλόμορφων στο φορέα pFL39, ώστε να ελεγχθεί η λειτουργικότητά τους. Α) Τα αλληλόμορφα pFL38/Ykr038-8, pFL38/Ykr038-9, pFL38/Ykr038-11, pFL38/Ykr038-14, pFL38/Ykr038-15, pFL38/Ykr038-17, pFL38/Ykr038-20 και pFL38/Ykr038-26 επωάστηκαν με το ένζυμο περιορισμού EcoRV, ενώ ο φορέας pFL39 με τα ένζυμα PvuII/ HindIII. Η πέψη αυτή αναμένεται να δώσει μια μπάντα στις 6789bp για τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα και δυο μπάντες στις ~4211bp και 139bp για το φορέα. Β) Πέψη των κλωνοποιημένων αλληλόμορφων, pFL39+Ykr038-8 και pFL39+Ykr038-14, με το ένζυμο περιορισμού BamHI. Η μπάντα στις 4211bp αντιστοιχεί στο φορέα και η μπάντα στις 2000bp στο ένθεμα.



Εικόνα 20: Έλεγχος λειτουργικότητας *A)* του *rcc2* αλληλόμορφου *Ykr038-8* και *B)* των οκτώ μεταλλαγμένων αλληλόμορφων, τα οποία κατασκευάστηκαν από τη *Laila Illan* και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα *pFL39*. Το $\Delta Ykr038::His + pCM188/Ykr038c\#1^a$ στέλεχος του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με τα ανωτέρω αλληλόμορφα και τα μεταλλαγμένα στελέχη επιστρώθηκαν σε 5-FOA τριβλία. *A)* Η σειρά των αλληλόμορφων είναι: *pFL39+Ykr038-8*, *pFL39_12'* και *pFL39*. *B)* Η σειρά των αλληλόμορφων είναι: *pFL39/WTYkr038*, *pFL39*, *pFL39-1**, *pFL39-2**, *pFL39-3**, *pFL39-4**, *pFL39-6**, *pFL39-7**, *pFL39-8**. Κανένα από τα εξετασθέντα αλληλόμορφα δεν είναι λειτουργικό.

Αλληλεπίδραση των *PCCI* και *ESAI* γονιδίων in vivo

Κύριος στόχος αυτής της ερευνητικής διαδικασίας ήταν η εύρεση της γενετικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα γονίδια *PCCI* και *ESAI*. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν μελέτες επιβίωσης στελεχών ζυμομύκητα, όπου χρησιμοποιήθηκαν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *pcc1.4* σε συνδυασμό με έλλειψη ή υπερ-έκφραση του *ESAI* γονιδίου. Από προηγούμενες μελέτες είχε γίνει γνωστό ότι στελέχη τα οποία έχουν μεταλλάξεις στο *ESAI* και *PCCI* γονίδιο ήταν θερμοευαίσθητα, πεθαίνοντας στους 37°C, ενώ επιπρόσθετα η έλλειψη του *ESAI* γονιδίου σε συνδυασμό με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *pcc1.4* ήταν συνθετικά θανάσιμη. Για την διευκρίνιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δυο αυτών γονιδίων, εξετάσαμε την επίδραση της υπερ-έκφρασης του *ESAI* γονιδίου στο μεταλλαγμένο *pcc1.4* στέλεχος. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του *pcc1.4* στελέχους με ένα πλασμίδιο σε πολλά αντίγραφα, το οποίο περιείχε το *ESAI* γονίδιο.

Για την κλωνοποίηση του *ESAI* γονιδίου, κατασκευάστηκε αρχικά μια βιβλιοθήκη DNA από αγρίου τύπου ζύμη (χρησιμοποιώντας το ένζυμο περιορισμού *Sau3A*) σε δυο multicopy πλασμίδια, ένα με δείκτη λευκίνη (*pFL46S*) και ένα με δείκτη τρυπτοφάνη (*pFL45S*). Κατόπιν, το *esa⁻* στέλεχος του ζυμομύκητα (*CY1851*)

μετασχηματίστηκε με τα προκύπτοντα πλασμίδια και τα στελέχη επιστρώθηκαν σε κατάλληλα μέσα επιλογής (CSM-LEU και CSM-TRP). Η ανάπτυξη αποικιών στα τριβλία μετασχηματισμού οφειλόταν σε τρεις αιτίες: Α) ανάπτυξη αποικιών λόγω του ότι τα στελέχη του ζυμομύκητα περιείχαν πλασμίδιο με το *ESAI* γονίδιο, Β) ανάπτυξη λόγω αντίστροφης μετάλλαξης στο *esaI* γονίδιο και Γ) ανάπτυξη λόγω του φαινομένου καταστολής πολλαπλών αντιγράφων. Για τον διαχωρισμό αυτών των περιπτώσεων, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή πλασμιδίων από τις αναπτυγμένες αποικίες και επαναμετασχηματισμός του CY1851 στελέχους. Λόγω του ότι η αντίστροφη μετάλλαξη πραγματοποιείται μόνο στα χρωμοσωμικά γονίδια, το τελευταίο στάδιο ήταν ικανό να αποκλείσει την ανάπτυξη αποικιών στα τριβλία λόγω αντίστροφων μεταλλάξεων. Οι υπόλοιπες δυο περιπτώσεις διαχωρίστηκαν μεταξύ τους με έλεγχο περιοριστικών ενζύμων, ώστε να επιλεγούν τα πλασμίδια τα οποία περιείχαν το *ESAI* γονίδιο.

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν κατά το μετασχηματισμό του CY1851 στελέχους προήλθαν από τις ακόλουθες τράπεζες πλασμιδίων:

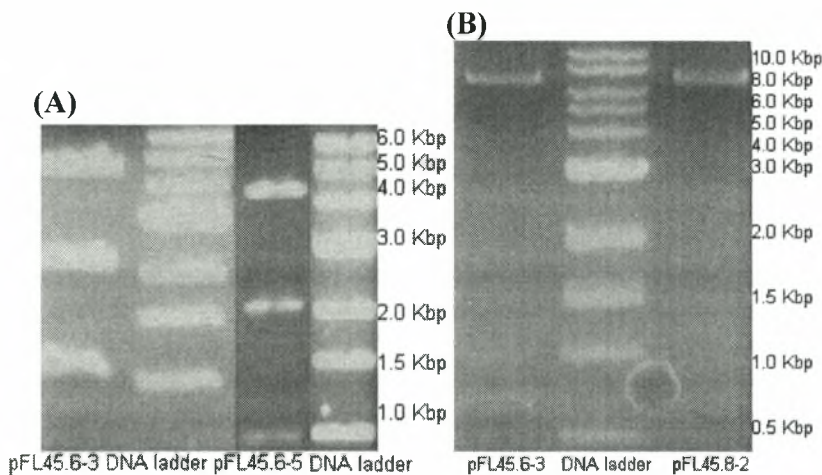
- (I) τράπεζα πλασμιδίων pFL46S II (ESA1, LEU): pFL46-1, pFL46-2, pFL46-3
- (II) τράπεζα πλασμιδίων pFL45S II (ESA1, TRP): pFL45-1, pFL45-2, pFL45-3, pFL45-4, pFL45-6, pFL45-7, pFL45-8, pFL45-9 και pFL45-10.

Τα ανωτέρω πλασμίδια εξήχθηκαν από τις αντίστοιχες αποικίες και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό συμβατών *E.coli* βακτηρίων. Στη συνέχεια ακολούθησε εξαγωγή των πλασμιδίων από δυο ή τέσσερις βακτηριακές αποικίες και τα δείγματα επώαστηκαν με το ένζυμο περιορισμού EcoRI στους 37°C για μια ώρα και υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση (εικόνα 21,Α). Ο σκοπός αυτής της πέψης ήταν να επιβεβαιώσουμε το μέγεθος του ενθέματος. Συγκεκριμένα, για το πλασμίδιο pFL46L αναμένουμε τρεις μπάντες στις 1441bp, 2240bp και 4141bp, για το πλασμίδιο pFL46S δυο μπάντες στις 1782bp και 4296bp, ενώ για το πλασμίδιο pFL45S τρεις μπάντες στις 4500bp, 2100bp και 1000bp.

Στη συνέχεια, τα στελέχη pFL45.6 και pFL45.8 επώαστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και XhoI/ PvuI. 2μl DNA από τα δείγματα επώαστηκαν με 0,5μl από κάθε ένζυμο στους 37°C για μια ώρα και υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση (εικόνα 21,Β). Οι αναμενόμενες μπάντες στο πήκτωμα αγαρόζης αντιστοιχούν στις 948bp, 1500bp και 5753bp για τη πέψη με το ένζυμο περιορισμού HindIII, ενώ από τη πέψη με τα ένζυμα PvuII/ XhoI αναμένονται δυο μπάντες (η μία από τις οποίες αντιστοιχεί στο ένθεμα και η άλλη στο πλασμίδιο) επειδή η θέση αναγνώρισης του ενζύμου PvuII βρίσκεται εντός του πολυσυνδέτη. Οι παραπάνω μπάντες ελήφθησαν μόνο για το κλώνο pFL45.6, σε

αντίθεση με τον κλώνο pFL45.8 ο οποίος δεν διαθέτει θέση αναγνώρισης του ενζύμου HindIII εντός του ενθέματος, άρα και το *ESAI* γονίδιο. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι ο κλώνος pFL45.6 έχει στο ένθεμά του την αλληλουχία του *ESAI* γονιδίου.

Ο επιλεγμένος κλώνος υποβλήθηκε σε ανάλυση της αλληλουχίας του, για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη της *ESAI* αλληλουχίας. Ένα δείγμα 700ng DNA από το κλώνο, μαζί με το ολιγονουκλεοτίδιο PU (2286A 100μg/μl) σε αραιώση 10x δόθηκαν στο αντίστοιχο εργαστήριο για ανάλυση της ακολουθίας του. Τέλος, η προκύπτουσα αλληλουχία αναλύθηκε με το πρόγραμμα BLAST για να βρεθεί η ομολογία της. Οι παράμετροι του τεστ ορίστηκαν ως εξής: BLASTN program, comparison matrix: Blosum62, sort output by p-value και complete genomic sequence, chromosomes (DNA) as sequence database. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης επιβεβαίωσε ότι ο επιλεγθέν κλώνος είχε πολύ καλή ομολογία με το *ESAI* γονίδιο (η τιμή smallest sum probability ($P_{(N)}$) ήταν $4.4e-131$).



Εικόνα 21: Α) Οι τράπεζες πλασμιδίων pFL46S II και pFL45S II υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*, ώστε να επιβεβαιωθεί το μέγεθος του ένθετου. Οι προκύπτουσες μπάντες των στελεχών pFL45.6-3 και pFL45.6-5 αντιστοιχούν στις 4500bp (φορέας), 2100bp (*ESAI* γονίδιο) και 1000bp (μεταξύ των δυο αναγνωριστικών θέσεων *EcoRI*). Β) Τα στελέχη pFL45.6-3 και pFL45.8-2 επωάστηκαν με το ένζυμο περιορισμού *HindIII*. Μόνο το στέλεχος pFL45.6-3 έδωσε τις κατάλληλες μπάντες στις 948bp, 1500bp και 5753bp υποδηλώνοντας τη παρουσία του *ESAI* γονιδίου στο φορέα.

Καθώς επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη του *ESAI* γονιδίου στο κλώνο pFL45.6, το επόμενο στάδιο ήταν να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση του *pcc1.4* αλληλόμορφου με το *ESAI* γονίδιο. Για το σκοπό αυτό, το Pcc1.4::His mat α στέλεχος του ζυμομύκητα μετασηματίστηκε με το κλώνο pFL45.6, όπως και με το πλασμίδιο pFL45L ως κοντρόλ. Τα μετασηματισμένα στελέχη επιστρώθηκαν σε CSM-TRP μέσο, επωάστηκαν για μια νύχτα στους 30°C και δυο αποικίες από κάθε μετασηματισμό απομονώθηκαν και

εξετάστηκαν για την ανάπτυξή τους σε YPDA και CSM-TRP τριβλία στους 30°C, 34°C και 37°C μετά από επώαση δυο ημερών. (επιπρόσθετα από το κοντρόλ pFL45L, χρησιμοποιήθηκε και το στέλεχος Pcc1.4::His + pCM188/ADE8/LM1 mat α ως κοντρόλ, το οποίο όμως δεν μπορεί να επιστρωθεί σε CSM-TRP τριβλίο επειδή έχει ως δείκτη επιλογής URA^r). Η ανάπτυξη των αποικιών ήταν (εικόνα 22):

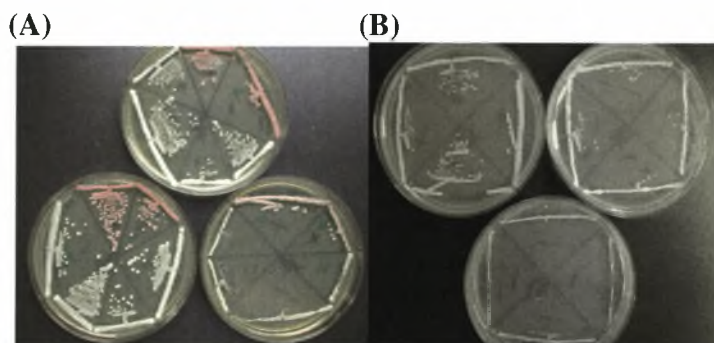
YPDA τριβλία:

	30°C	Αύξηση	
		34°C	37°C
pFL45.6-5	+/+	+/+	-/-
pFL45L	+/+	+/+	-/-
pcc1.4::His pCM188/ADE8/LM1 mat α	+/+	+/+	+/+

CSM-TRP τριβλία:

	30°C	Αύξηση	
		34°C	37°C
pFL45.6-5	+/+	+/+	-/-
pFL45L	+/+	+/+	-/-

Σύμφωνα με τον ανωτέρω πίνακα, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών του pcc1.4/ ESA1 στελέχους στο YPDA ή CSM-TRP μέσο στους 37°C, σε σχέση με το θετικό κοντρόλ, ενώ στους 30°C και 34°C οι σχηματιζόμενες αποικίες είχαν το ίδιο μέγεθος με το κοντρόλ. Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η υπερ-έκφραση του ESA1 γονιδίου δεν καταστέλλει τη θερμοευαισθησία του pcc1.4 στελέχους.



Εικόνα 22: Αλληλεπίδραση μεταξύ των PCC1 και ESA1 γονιδίων. Το στέλεχος Pcc1.4::His mat α μετασχηματίστηκε με το κλώνο pFL45.6-5 και τα μετασχηματισμένα στελέχη επωάστηκαν σε YPDA και CSM-TRP τριβλία. Α) Ανάπτυξη αποικιών στο YPDA μέσο. Η σειρά των αλληλόμορφων είναι: pCM188/ADE8/Pcc1, pFL45L και pFL45.6-5. Το πάνω τριβλίο επωάστηκε στους 34°C, το κάτω-αριστερά τριβλίο στους 30°C και το κάτω-δεξιά τριβλίο στους 37°C. Β) Ανάπτυξη σε CSM-TRP μέσο. Η σειρά των αλληλόμορφων είναι: pFL45L και pFL45.6-5. Το πάνω-αριστερά τριβλίο επωάστηκε στους 30°C, το πάνω-δεξιά στους 34°C ενώ το τρίτο τριβλίο επωάστηκε στους 37°C. Το μετασχηματισμένο στέλεχος με το κλώνο pFL45-6.5 δεν αναπύχθηκε στο YPDA ή CSM-TRP μέσο όταν επωάστηκε στους 37°C.

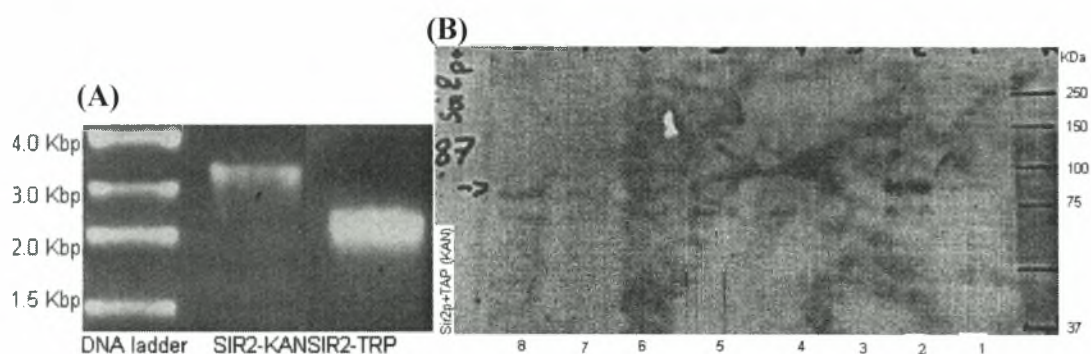
Πρόσδεση της Sir2p στο GAL1 γονίδιο, στα τελομερή, τη rDNA περιοχή και στις διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος του *Saccharomyces cerevisiae*

Κύριο μέλημα της προσπάθειας μας ήταν να επιβεβαιώσουμε την άμεση αλληλεπίδραση των *PCC1* και *SIR2* γονιδίων, ελέγχοντας καταρχήν τη πρόσδεση της Sir2p στις rDNA, τελομερικές και διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος του ζυμομύκητα μέσω πειραμάτων ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης και δεύτερον, διαπιστώνοντας αν η Sir2p είναι ικανή να προσδεθεί και να επηρεάσει τη λειτουργία του *GAL1* γονιδίου, όπως και η *Pcc1p*. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε πειράματα C-τελικής επισήμανσης του *SIR2* γονιδίου.

Η κασέτα που φέρει την TAP αλληλουχία πολλαπλασιάστηκε μέσω PCR με 5' primer για το TAP και με 3' primer για το δείκτη και 5μl προϊόντος της PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση για ποσοτικοποίηση ώστε να ληφθεί μια μπάντα στις 1,5Kbp (εικόνα 23.4). Στη συνέχεια, το ενισχυμένο DNA κατακρημνίστηκε και το W303 mat *a* στέλεχος του ζυμομύκητα μετασχηματίστηκε με αυτό. Για το μετασχηματισμό του στελέχους με την TAP-TRP κασέτα, 10μl δείγματος PCR και κατάλληλος όγκος Tmix προστέθηκαν σε 80μl φυγοκεντρημένων κυττάρων και επώαστηκαν στους 42°C για είκοσι λεπτά. Το μείγμα μετασχηματισμού, φυγοκεντρήθηκε, αραιώθηκε σε 100μl νερό, και επιστρώθηκε σε CSM-TRP τριβλία για επώαση στους 30°C για τρεις-τέσσερις ημέρες. Αντίστοιχα, για το μετασχηματισμό του στελέχους με τη TAP-KAN κασέτα, 80μl φυγοκεντρημένων κυττάρων επώαστηκαν με 10μl PCR δείγματος και κατάλληλο όγκο Tmix στους 42°C για είκοσι λεπτά. Στη συνέχεια, το μείγμα μετασχηματισμού φυγοκεντρήθηκε και αραιώθηκε σε 100μl νερό. Από αυτή τη ποσότητα, 50μl επιστρώθηκαν άμεσα σε YPDA-KAN μέσο και επώαστηκαν στους 30°C για τρεις-τέσσερις ημέρες, ενώ στα υπόλοιπα 50μl μετασχηματισμένου δείγματος προστέθηκε 1ml YPDA και το τελικό μείγμα επώαστηκε στους 30°C για μια ώρα, φυγοκεντρήθηκε και εν συνεχεία επώαστηκε σε YPDA-KAN μέσο για τρεις-τέσσερις ημέρες.

Μετά τον αναφερόμενο χρόνο επώασης, το W303/Sir2-Tap-Kan τριβλίο αντιγράφηκε σε νέο τριβλίο (εξαιτίας background ανάπτυξης) και επώαστηκε στους 30°C για μια ημέρα. Στη συνέχεια, οκτώ αποικίες από το τριβλίο-αντίγραφο W303/Sir2-Tap-Kan και το τριβλίο W303/Sir2-Tap-Trp, απομονώθηκαν και επώαστηκαν στους 30°C για μια επιπλέον ημέρα. Το επόμενο στάδιο είναι η ανοσοκαθίζηση της χρωματίνης των επισημασμένων δειγμάτων, κάτι το οποίο έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα για τον Sir2-Tap-Kan κλώνο.

Συγκεκριμένα, οι οκτώ απομονωμένες αποικίες του τριβλίου και ένα δείγμα-κοντρόλ (pcc1.4-Tap-Trp) υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, για να διαπιστωθεί η παρουσία της Sir2-Tap-Kan πρωτεΐνης. Αφού, η πρωτεΐνη κάθε δείγματος εξήχθηκε, 10-15μl από αυτή φορτώθηκαν στο πήκτωμα και οι προκύπτουσες μπάντες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη και έγινε ανίχνευσή τους. Όπως παρατηρούμε στο πήκτωμα, ελήφθησαν δυο μπάντες, μια στα 87KDa και μια μικρότερη εξαιτίας πιθανής λύσης της πρωτεΐνης (εικόνα 23, B).



Εικόνα 23: Tap-tag του SIR2 γονιδίου. Α) Το SIR2 γονίδιο υποβλήθηκε σε επισήμανση επιλογής του C-τελικού άκρου χρησιμοποιώντας TAP αλληλουχίες με δείκτη καναμυκίνη και τρυπτοφάνη. Το ενισχυμένο SIR2-TAP γονίδιο υποβλήθηκε στη συνέχεια σε ηλεκτροφόρηση, ώστε να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωση της TAP αλληλουχίας. Β) Ανίχνευση της Sir2p-TAP(Kan) πρωτεΐνης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης Sir2p και της TAP κασέτας είναι 62KDa και 25KDa αντίστοιχα, συνεπώς αναμένεται μια μπάντα στα 87KDa. Η μπάντα στα 75KDa οφείλεται σε ενδεχόμενη λύση της πρωτεΐνης.

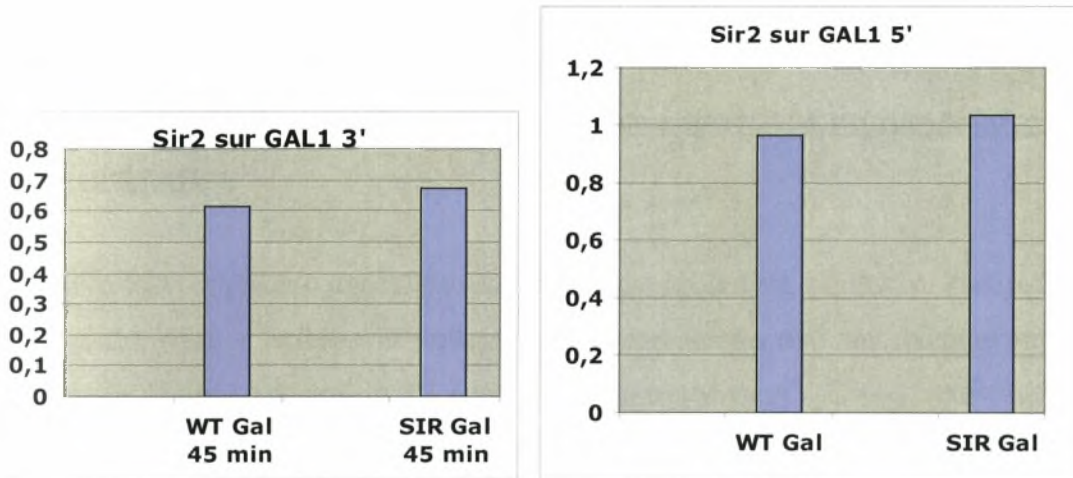
Ακολούθως, η επισημασμένη χρωματίνη υποβλήθηκε σε ανοσοκαθίζηση και το εκλούόμενο DNA αναλύθηκε με PCR ποσοτικοποίησης. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε μια καλλιέργεια Sir2-YPDA σε ραφινόζη και μια καλλιέργεια W303 (κοντρόλ), ενώ παράλληλα η Sir2 καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε μέσο με γαλακτόζη, ώστε να πραγματοποιηθεί επαγωγή της μεταγραφής. Συνολικά τα εξετασθέντα δείγματα ήταν: ένα κοντρόλ (W303) και ένα Sir2-YPDA σε μέσο με ραφινόζη και τα αντίστοιχα δείγματα σε γαλακτόζη (W303-Raf IP, W303-Gal IP, Sir2-Raf IP, Sir2-Gal IP). Παράλληλα, ελέγχθηκε και μια σειρά δειγμάτων, τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε ανοσοκαθίζηση και επειδή περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα DNA υποβλήθηκαν σε αραιώση (W303-Raf αραιώση 1/100 no IP, W303-Gal αραιώση 1/100 no IP, Sir2-Raf αραιώση 1/100 no IP, Sir2-Gal αραιώση 1/100 no IP, W303-Gal αραιώση 1/2, W303-Gal αραιώση 1/4, Sir2-Gal αραιώση 1/2 και Sir2-Gal αραιώση 1/4). Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη PCR ποσοτικοποίησης ήταν τα 446/447 (ειδικά για το GAL-1

γον΄διο). Από τις προκύπτουσες καμπύλες εν΄σχυσης και περαιτέρω στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, παρατηρούμε ότι η Sir2p πρωτεΐνη προσδένεται ελαφρά στο *GAL1* γον΄διο (εικόνα 24).

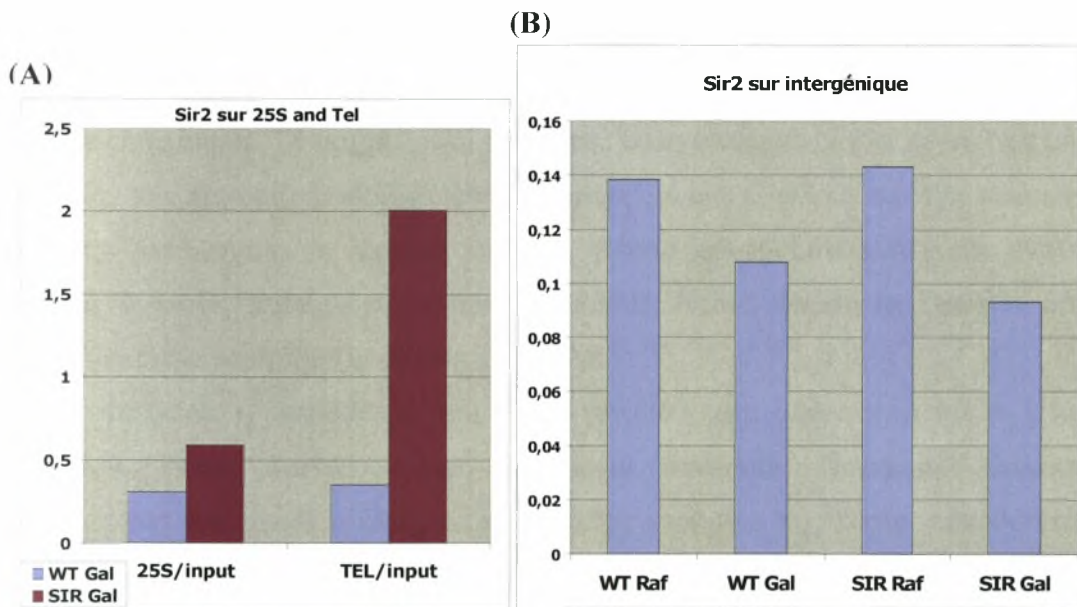
Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και αν΄χνευση του RNA για να επιβεβαιώσουμε τη μεταγραφή του γονιδ΄ου της γαλακτόζης. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα W303-Gal no RT, W303-Raf RT, W303-Gal RT, Sir2-Raf RT, Sir2-Gal RT υποβλήθηκαν σε αν΄στροφη μεταγραφή και PCR ποσοτικοποίησης με τα ολιγονουκλεοτ΄δια 446/447, ενώ τα δείγματα W303-Raf RT, W303-Gal RT, Sir2-Raf RT, Sir2-Gal RT με τα ολιγονουκλεοτ΄δια 262/265. Τα ολιγονουκλεοτ΄δια 446/447 (2,5μM) είναι ειδικά για το *GAL1* γον΄διο, ενώ τα ολιγονουκλεοτ΄δια 262/265 (5μM) για την εν΄σχυση του *U4* γονιδ΄ου, το οπο΄ο χρησιμοποιείται για τη παραγωγή σταθερής ποσότητας RNA, ως δέκτης αναφοράς. Οι παράμετροι της RT-PCR ήταν: θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95°C για δέκα λεπτά, στάδιο αναδιάταξης στους 55°C για πέντε δευτερόλεπτα και στάδιο πολυμερισμού στους 72°C για πέντε λεπτά. Από τα διαγράμματα εν΄σχυσης διαπιστώσαμε τη μεταγραφή του γονιδ΄ου της γαλακτόζης.

Επιπρόσθετα, η ανοσοκαταβυθισμένη-επισημασμένη χρωματ΄νη εξετάστηκε και για τη πρόσδεση της Sir2p πρωτεΐνης στις τελομερικές, rDNA και διαγονιδιακές περιοχές. Όσον αφορά τον έλεγχο για τη πρόσδεση της πρωτεΐνης στις τελομερικές και rDNA περιοχές, τα ΄δια δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR ποσοτικοποίησης αλλά με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδ΄ων για τα τελομερή (412/413 5μM) και την rDNA περιοχή (409/410 5μM, ειδικότερα για το 25S rDNA γον΄διο). Ο προγραμματισμός της PCR έγινε με το πρόγραμμα *Mx300P-SYBR Green* ως εξής: ένας κύκλος αποικοδόμησης στους 95°C για δέκα λεπτά ακολουθήθηκε από σαράντα κύκλους αναδιάταξης του ενός λεπτού στους 55°C και τέλος ένα κύκλο εν΄σχυσης στους 95°C για ένα λεπτό και 55°C για τριάντα δευτερόλεπτα. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 25,A η Sir2p προσδένεται στη rDNA περιοχή και στα τελομερή.

Τέλος, όσον αφορά τη πρόσδεση της πρωτεΐνης στις διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος, η ανοσοκαταβυθισμένη χρωματ΄νη υποβλήθηκε σε PCR ποσοτικοποίησης χρησιμοποιώντας ειδικά ολιγονουκλεοτ΄δια για αυτή τη περιοχή. Όπως διαφάνεται από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η Sir2p δεν συνδέεται στις διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος του ζυμομύκητα (εικόνα 25,B).



Εικόνα 24: Πρόσδεση της Sir2p πρωτεΐνης στο GAL1 γονίδιο (με χρήση εκκινήτων για τα 3' και 5' άκρα του γονιδίου). Η στήλη WT Gal αναφέρεται σε δείγμα το οποίο δεν υποβλήθηκε σε διαδικασία επισήμανσης (untagged), ενώ η στήλη SIR Gal σε δείγμα χρωματίνης που υποβλήθηκε σε επιλεκτική επισήμανση (tagged). Και τα δυο δείγματα μεταχειρίστηκαν σε μέσο επαγωγής της μεταφραφής του γονιδίου (γαλακτόζη). Καθώς δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, συμπεραίνουμε ότι η Sir2p πρωτεΐνη παρουσιάζει χαλαρή ή καθόλου σύνδεση με τη GAL1 χρωμοσωμική περιοχή του ζυμομύκητα.



Εικόνα 25: Ανάκτηση της Sir2p πρωτεΐνης A) στις rDNA, τελομερικές και B) διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος του ζυμομύκητα. A) Συγκρίνοντας τις δυο στήλες μεταξύ τους (WT Gal και SIR Gal) παρατηρούμε μικρή πρόσδεση της Sir2p στην 25S rDNA περιοχή (σχεδόν διπλάσια διαφορά μεταξύ της επισημασμένης και μη επισημασμένης χρωματίνης) και ισχυρή πρόσδεση της πρωτεΐνης στα τελομερή (περίπου τετραπλάσια διαφορά μεταξύ του WT και SIR σήματος). B) Συγκρίνοντας τις WT Gal και SIR Gal στήλες, παρατηρούμε ότι η τελευταία είναι μικρότερη της πρώτης, υποδηλώνοντας ότι μικρή ποσότητα επισημασμένης πρωτεΐνης είναι ενωμένη με τη χρωματινική περιοχή, ή ότι δεν παρατηρείται πρόσδεση της Sir2p πρωτεΐνης στις διαγονιδιακές περιοχές του γενώματος του ζυμομύκητα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνεισφορά της Pcc2p πρωτεΐνης στην απομόνωση πρωτεϊνών στόχων-δράσης του PCC συμπλόκου

Το PCC σύμπλοκο αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες, τις Pcc1p, Pcc2p, Pcc3p και Bud32p, όπου η λειτουργία καθεμίας εξαρτάται άμεσα από την ακεραιότητα του συμπλόκου. Η ομολογία του *PCC1* γονιδίου με το αντιγόνο NY-ESO-1, αποτέλεσε την αφορμή για τη περαιτέρω μελέτη και χαρακτηρισμό αυτού του γονιδίου. Ωστόσο, τα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του συμπλόκου είναι περιορισμένα.

Όσον αφορά τη Pcc2p πρωτεΐνη, είναι γνωστό ότι ανήκει σε μια οικογένεια μεταλλοπρωτεασών, η οποία σχετίζεται με τις γλυκοπρωτεάσες των βακτηρίων και των αρχαίων. Τα χαρακτηρισμένα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν μια ισχυρή προτίμηση για Ο-σιαλο-γλυκοπρωτεΐνες. Αν και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης δεν έχει γίνει, η σημαντική ομοιότητα της αλληλουχίας της με μια Ο-σιαλογλυκοπρωτεάση του *Pasteurella haemolytica* υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη ίσως κατέχει πρωτεολυτική δράση. Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι συντηρημένη σε όλη την εξελικτική κλίμακα. Τα αρχαία μέλη αυτής της οικογένειας είναι όλα πρωτεΐνες με δυο περιοχές: μια περιοχή γλυκοπρωτεάσης ενωμένη με μια C-τελική περιοχή πρωτεϊνικής κινάσης. Αναλύοντας τη περιοχή κινάσης, γίνεται φανερό ότι ανήκει σε ένα τύπο κινάσης ο οποίος περιέχει την ανθρώπινη PRPK/ Nori-2 κινάση (p53-related protein kinase) και τη κινάση του ζυμομύκητα Bud32p. ^(7,9)

Επιπλέον, η ακεραιότητα του *PCC2* γονιδίου είναι απαραίτητη για τη ζωή του κυττάρου, καθώς απενεργοποίησή του είναι θανάσιμη. Πειράματα επιλεκτικής επισήμανσης του γονιδίου έδειξαν ότι η Pcc2p, παρόμοια της Pcc1p, προσδένεται με γονίδια, τα οποία επάγονται από τη φερομόνη, αλλά και στο *GALI* γονίδιο.

Ποιος είναι όμως ο ρόλος του PCC συμπλόκου; Πειράματα επιλεκτικής επισήμανσης (tap tag) δεν κατέστησαν εφικτή τη ταυτοποίηση κάποιας πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί στόχο δράσης του συμπλόκου. Μια τεχνική η οποία θα βοηθούσε προς αυτή τη κατεύθυνση αποτέλεσε η ανίχνευση ενός αρνητικά επικρατούς αλληλόμορφου του *PCC2* γονιδίου, καθώς θα συντελούσε στη κατακρήμνιση του συμπλόκου.

Προς αυτή τη κατεύθυνση, κατασκευάστηκαν δυο σειρές *pcc2* μεταλλαγμένων αλληλόμορφων, τα οποία εισήχθησαν στα pFL38 και pFL39 πλασμίδια και

χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κατάλληλων στελεχών ζυμομύκητα. Τελικά, τα μετασχηματισμένα στελέχη ελέχθησαν για την επαγωγή αρνητικά επικρατούς φαινοτύπου και τη λειτουργικότητά τους.

Η πρώτη σειρά μεταλλαγμένων αλληλόμορφων κατασκευάστηκε μέσω τυχαίας μεταλλαξιγένεσης με PCR και τα αλληλόμορφα ήταν θερμοευαίσθητα και λειτουργικά. Όσον αφορά την ανίχνευση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων, το στέλεχος Ykr038-18 μετασχηματίστηκε με τα *pcc2* αλληλόμορφα αλλά κανένα από αυτά δεν παρουσίασε αρνητικά επικρατή φαινότυπο, όπως υποδεικνύεται από την ανάπτυξη των αλληλόμορφων, τόσο στο YPDA όσο και στο CSM-TRP μέσο (εικόνα 12).

Η δεύτερη σειρά μεταλλαγμάτων κατασκευάστηκε μέσω PCR με ένα μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο ως εκκινητή, έτσι ώστε η μετάλλαξη να εντοπίζεται στο μοτίβο σύνδεσης ψευδαργύρου και συγκεκριμένα στα δυο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης αυτού. Τα αλληλόμορφα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του Ykr038-18 mat α στελέχους και ελέχθησαν για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη του στελέχους. Η σύγκριση των αλληλόμορφων με το θετικό και το αρνητικό κοντρόλ αποκάλυψε δώδεκα “πιθανά” αρνητικά επικρατή αλληλόμορφα, τα οποία διαχωρίστηκαν σε δυο σύνολα. Επιπλέον, ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (pFL38/Ykr038-11) είχε καλύτερη ανάπτυξη από το κοντρόλ. Όσον αφορά τη λειτουργικότητα των μεταλλαγμάτων, λόγω έλλειψης χρόνου, κλωνοποιήθηκε μόνο η πρώτη σειρά αλληλόμορφων στο πλασμίδιο pFL39 και το αλληλόμορφο pFL39+Ykr038-8 εξετάστηκε σε 5-FOA μέσο, το οποίο ωστόσο δεν ήταν λειτουργικό. Παράλληλα, εξετάστηκαν και οκτώ μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, τα οποία είχαν κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο pFL39 και βρέθηκε ότι μόνο δυο από αυτά είχαν αρνητικά επικρατή φαινότυπο, αλλά κανένα δεν ήταν λειτουργικό.

Συγκρίνοντας την ανάπτυξη ανάμεσα στις δυο σειρές των *pcc2* αλληλόμορφων, παρατηρήσαμε ότι τα μεταλλάγματα της δεύτερης σειράς αυξήθηκαν λιγότερο από τα αντίστοιχα στο πλασμίδιο pFL39, επειδή έχουν μεταλλάξεις στο καταλυτικό τους κέντρο, ενώ η πρώτη σειρά αλληλόμορφων έχει μεταλλάξεις σε περιοχές εκτός αυτού. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η παρουσία του μοτίβου της πρωτεάσης και των καταλοίπων ιστιδίνης σε αυτό, είναι απαραίτητη για τη λειτουργικότητα της Pcc2p πρωτεΐνης, με τις μεταλλάξεις σε αυτά τα κατάλοιπα να οδηγούν σε απώλεια δράσης της πρωτεΐνης.

Τα δώδεκα αρνητικά επικρατή αλληλόμορφα που βρέθηκαν στο Ykr038-18 στέλεχος του ζυμομύκητα εξετάστηκαν επίσης και στο αγρίου τύπου στέλεχος W303mata. Σύμφωνα με την παρατηρούμενη ανάπτυξη των στελεχών επτά

μεταλλαγμένα αλληλόμορφα δεν είχαν καμία επίδραση στο φαινότυπο του στελέχους, ενώ πέντε από αυτά παρουσίασαν μικρές αποικίες με αρνητικά επικρατή φαινότυπο και μεγάλες αποικίες, οι οποίες παρουσίαζαν την ίδια ανάπτυξη με το κοντρόλ. Όσον αφορά την εμφάνιση μικρών και μεγάλων αποικιών στα τριβλία μετασχηματισμού, αυτή αποδόθηκε σε πιθανό πολλαπλασιασμό του ενθέματος στις μεγάλες αποικίες.

Για να ταυτοποιήσουμε με ακρίβεια ένα αρνητικά επικρατές αλληλόμορφο του *PCC2* γονιδίου, τα *pcc2* αλληλόμορφα κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pFL45S. Από τα πέντε αλληλόμορφα, τα οποία έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα, όλα παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο με αυτό στο αγρίου τύπου στέλεχος, υποδηλώνοντας ότι έχουμε επίδραση μόνο όταν το πλασμίδιο με το αλληλόμορφο υπερ-εκφράζεται.

Τέλος, αποφασίσαμε να υπερ-εκφράσουμε μερικά από τα αλληλόμορφα σε επαγωγίμο φορέα, όπου και θα ήταν επικτική η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων. Μέχρι στιγμής δύο υποψήφια αρνητικά επικρατή αλληλόμορφα έχουν κλωνοποιηθεί σε κατάλληλο φορέα, ο οποίος φέρει tetO₂, MCS και tTA* προαγωγή, (pCM185), αλλά κανένα δεν βρέθηκε να είναι αρνητικά επικρατές.

Ο ρόλος των *PCC1* και *ESAI* γονιδίων κατά τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Οι ιστόνες τροποποιούνται δυναμικά κατά τη διάρκεια της συγκρότησης της χρωματίνης, αλλά και κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της ανάπτυξης. Οι τροποποιήσεις αυτές των ιστονών περιλαμβάνουν ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικυτινίωση και μεθυλίωσή τους, αλλά η βιολογική σπουδαιότητα αυτών των τροποποιήσεων δεν είναι πλήρως κατανοητή. Ανάμεσα στις παρατηρούμενες τροποποιήσεις των ιστονών, η ακετυλίωση αποτελεί πιθανώς τη πιο σημαντική και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία έχουν μελετηθεί εκτεταμένα. Ένα σημαντικό ένζυμο ακετυλίωσης στο *Saccharomyces cerevisiae*, αποτελεί η ακετυλοτρανσφεράση Esa1p. Το *ESAI* γονίδιο είναι μέλος της MYST οικογένειας, παρουσιάζοντας διακριτό τρόπο ακετυλίωσης των ιστονών από τα υπόλοιπα ένζυμα του ζυμομύκητα. Θερμοευαίσθητα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα χάνουν την ενζυμική δράση τους in vitro και οδηγούν σε μερική απώλεια μιας ακετυλιωμένης ισομορφής της ιστόνης H4 in vivo.

Επιπλέον, τα *esa1* μεταλλαγμένα στελέχη είναι ελαττωματικά στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, με τα κύτταρα να παρουσιάζουν εμπλοκή του κυτταρικού κύκλου στη θερμοκρασία των 37°C. Τέσσερις ώρες μετά από επώαση σε μη επιτρεπτή

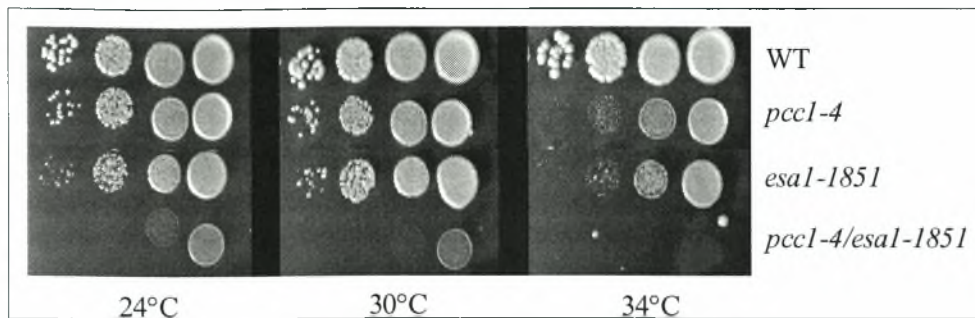
θερμοκρασία, τα *ESAI* κύτταρα διαιρούνται κανονικά και με ανάλυση κυτταρομετρίας λαμβάνονται δυο κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στις G1 και G2/M θέσεις του κύκλου. Σε αντίθεση, τα μεταλλαγμένα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται μετά από επώαση στους 37°C και συσσωρεύονται στη G2/M φάση. Επειδή τα μεταλλαγμένα κύτταρα παρουσιάζουν G2/M DNA περιεχόμενο, η απώλεια της *ESAI* λειτουργίας προφανώς δεν εμπλέκεται στη σύνθεση του DNA, αλλά τα *esal* μεταλλάγματα δεν είναι ικανά να συνεχίσουν φυσιολογικά το κύκλο ζωής τους μέσω της μίτωσης και της κυττοκίνησης. Συνεπώς, η *Esalp* δεν απαιτείται για την κυτταρική αύξηση αλλά αντίθετα είναι απαραίτητη για τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η παρατήρηση ότι τα μεταλλαγμένα κύτταρα υφίστανται διακοπή του κυτταρικού κύκλου με αντιγραφόμενο DNA μετά από επώαση σε μη επιτρεπτή θερμοκρασία, αποκαλύπτει ότι η λειτουργία της *Esalp* ίσως απαιτείται κατά τη διάρκεια της G2 φάσης ή της μίτωσης. Αυτές οι παρατηρήσεις συνεπώς, ενώνουν συγκεκριμένες τροποποιήσεις των ιστονών με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, οι οποίες πιθανώς ρυθμίζονται μέσω μεταγραφικής ρύθμισης. ⁽¹⁰⁾

Όπως έχει αναφερθεί, το *PCC1* γονίδιο εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η λειτουργία του είναι απαραίτητη για την εκβλάστηση και κυττοκίνηση κατά τη διάρκεια του κύκλου εκβλάστησης του ζυμομύκητα. Τα *pcc1.4* κύτταρα συγκεντρώνονται με 1C DNA περιεχόμενο κατά την επώασή τους στους 37°C, υποδηλώνοντας ότι η λειτουργία της *Pcc1p* απαιτείται για τη φυσιολογική πρόοδο των κυττάρων διαμέσω των G1/S και M/G1 μεταπτώσεων του κυτταρικού κύκλου.

Στόχος της ερευνητικής διαδικασίας ήταν να διαπιστώσουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ των *PCC1* και *ESAI* γονιδίων. Για την διευκρίνιση της *in vivo* αλληλεπίδρασης μεταξύ των γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν μελέτες επιβίωσης στελεχών του ζυμομύκητα, τα οποία διέθεταν το μεταλλαγμένο *pcc1.4* αλληλόμορφο σε συνδυασμό με έλλειψη ή υπερ-έκφραση του *ESAI* γονιδίου. Από προηγούμενες μελέτες είχε γίνει γνωστό ότι στελέχη τα οποία έχουν μεταλλάξεις στο *ESAI* ή *PCC1* γονίδιο είναι θερμοευαίσθητα, πεθαίνοντας στους 37°C, ενώ επιπρόσθετα η έλλειψη του *ESAI* γονιδίου ήταν θανάσιμη για το *pcc1.4* στέλεχος (εικόνα 26).

Για τη διευκρίνιση της επίδρασης της υπερ-έκφρασης του *ESAI* γονιδίου στο *pcc1.4* μετάλλαγμα, το *pcc1.4* στέλεχος μετασχηματίστηκε με ένα πλασμίδιο σε πολλαπλά αντίγραφα, το οποίο περιείχε το *ESAI* γονίδιο. Μετά από κατάλληλη επώαση των μετασχηματισμένων στελεχών, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών ούτε σε YPDA ή CSM-TRP μέσω ανάπτυξης στους 37°C, υποδηλώνοντας ότι η υπερ-έκφραση του *ESAI* γονιδίου δεν μπορεί να καταστείλει τη θερμοευαίσθησία του *pcc1.4* στελέχους.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι και τα δυο γονίδια είναι απαραίτητα για την επιβίωση του ζυμομύκητα, κατέχοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 26: Έλλειψη της *Esa1p* (*Esa1-1851*) σε συνδυασμό με μετάλλαξη της *Pcc1p* (*Pcc1.4p*) είναι συνθετικά θανάσιμη για το ζυμομύκητα. Όπως φαίνεται από τις διαδοχικές αραιώσεις στους 24°C, 30°C και 34°C, το *pcc1-4/esa1-1851* στέλεχος πεθαίνει στους 34°C.

Η δράση της Sir2p πρωτεΐνης κατά τη μεταγραφική αποσιώπηση και τη λειτουργία του *PCC1* γονιδίου στο *Saccharomyces cerevisiae*

Όπως είναι γνωστό, τα γονιδιώματα είναι οργανωμένα σε ενεργές περιοχές, γνωστές ως ευχρωματίνη και ανενεργές περιοχές, γνωστές ως ετεροχρωματίνη ή σιωπηλή χρωματίνη (silenced chromatin). Στο *Saccharomyces cerevisiae*, οι Sir πρωτεΐνες είναι τα κύρια δομικά συστατικά της ετεροχρωματίνης. Οι Sir πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν πρώτα με τους καταστολείς-silencers, οι οποίοι υπαγορεύουν ποιες περιοχές υπόκεινται αποσιώπηση, και στη συνέχεια με τα άκρα των ιστονών στα νουκλεοσώματα, καθώς οι Sir πρωτεΐνες εξαπλώνονται από τους καταστολείς κατά μήκος των χρωμοσωμάτων. Αξιοσημείωτα, η εξάπλωση αυτή απαιτεί τη δράση μιας απακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών, της Sir2p. Η Sir2p είναι μια από τις έξη HDACs οι οποίες υπάρχουν στο *Saccharomyces cerevisiae* (RPD3, HDA1, HOS1, HOS2, HOS3, και SIR2) και λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας, μειώνοντας τα επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών για να δημιουργήσει τοπικές περιοχές σιωπηλής χρωματίνης.^(8,11, 12)

Η Sir2p πρωτεΐνη αποτελεί μια NAD⁺-εξαρτώμενη απακετυλοτρανσφεράση των ιστονών H3 και H4, στοχεύοντας σε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης αυτών. Η δράση της είναι απαραίτητη για την αποσιώπηση τριών σημαντικών περιοχών του γενόματος

του *Saccharomyces cerevisiae*: των φυλοκαθοριστικών περιοχών (MAT, HM), των τελομερών και του rRNA-κωδικοποιούν DNA (rDNA). Ποια είναι όμως η λειτουργία της σιωπηλής χρωματίνης; Στη HM περιοχή η εγκαθίδρυση της σιωπηλής χρωματίνης εμποδίζει τη μεταγραφή, αλλά δυστυχώς πολύ λίγα είναι γνωστά για τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό. Τα περισσότερα πρώιμα μοντέλα υποστήριζαν ότι η συμπαγής δομή της Sir χρωματίνης αναστείλει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης II με το DNA λόγω χωροταξικών μηχανισμών. Ωστόσο, η πρωτεΐνη σύνδεσης TATA (TBP) και η pol II είναι και οι δυο παρών στον προαγωγέα HMRA1 ακόμη και όταν το γονίδιο είναι σιωπηλό. Έτσι, οι Sir πρωτεΐνες μπορούν να αναστείλουν τη μεταγραφή με διάφορους τρόπους. Καταρχήν, η Sir2p ίσως απακετυλιώνει ένα μεταγραφικό παράγοντα, και με αυτόν τον τρόπο μειώνει την ενεργότητά του. Εναλλακτικά, οι Sir πρωτεΐνες ίσως αναστέλλουν τη μεταγραφική συσκευή μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων, οι οποίες είναι ανεξάρτητες της απακετυλίωσης. Τελικά, οι Sir πρωτεΐνες ίσως αλλάζουν τις ιδιότητες των νουκλεοσωμάτων με τέτοιο τρόπο ώστε να μπλοκάρουν είτε τη κάθαρση του προαγωγέα (promoter clearance) ή την επιμήκυνση. Η ένωση των Sir πρωτεϊνών στα νουκλεοσώματα μπορεί να κάνει τη δομή των τελευταίων περισσότερο άκαμπτη, καθιστώντας αυτά λιγότερο ικανά για απαραίτητες για τη μεταγραφή αλλαγές της διαμόρφωσής τους, όπως είναι οι ήπιες δομικές αναδιατάξεις, η εκτόπιση των H2A-H2B διμερών, ή η μετάθεση ολόκληρων νουκλεοσωμάτων. ⁽⁸⁾

Με βάση πειράματα ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης που πραγματοποιήσαμε, επιβεβαιώσαμε ότι η Sir2p προσδέεται στο 25S rDNA γονίδιο και στα τελομερή του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, διαδραματίζοντας με αυτό τον τρόπο κεντρικό ρόλο κατά τη διαδικασία της αποσιώπησης αυτών των γενωμικών περιοχών.

Ένα αξιοσημείωτο στοιχείο αποτέλεσε το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια μιας δοκιμής σάρωσης για μόρια-καταστολείς σε πολλαπλά αντίγραφα, με το *pcc1-4* στέλεχος, απομονώθηκαν οκτώ ανεξάρτητοι κλώνοι, οι οποίοι κατέστειλαν τη θερμοευαισθησία του *pcc1-4* μεταλλάγματος. Όλοι οι κλώνοι περιείχαν ένα πλασμίδιο το οποίο έφερε ένα γενωμικό τμήμα από το 25S rDNA γονίδιο. Αυτό ήταν κάπως παράξενο καθώς τα απομονωμένα τμήματα δεν περιείχαν κανένα γνωστό ORF και ήταν αλλοιωμένα στα 5'-άκρα. Αυτή η περιοχή, ωστόσο, περιείχε τις θέσεις πρόσδεσης για το Sir2p σύμπλοκο. Έτσι, η καταστολή που παρατηρήθηκε ίσως οφειλόταν στη πρόσδεση του Sir2p συμπλόκου. Αυτό οδήγησε στη πρόβλεψη ότι η έλλειψη του *SIR2* γονιδίου θα μπορούσε να μιμηθεί τη καταστολή από το rDNA τμήμα. Σε συμφωνία με αυτή την

υπόθεση, ένα διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *pcc1-4/ sir2Δ* αναπτύχθηκε καλύτερα σε σχέση με το *pcc1-4* μετάλλαγμα στους 37°C. Θα μπορούσε λοιπόν, η έλλειψη της Sir2p να επιδιορθώσει την ελαττωματική μεταγραφή στο *pcc1-4* στέλεχος; Καθώς τα *sir2Δ* κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στη φερομόνη, εξαιτίας της αποσιώπησης των HML/HMR περιοχών, η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από τον άλφα παράγοντα δεν ήταν εφικτή. Γι' αυτό το λόγο εξετάστηκαν τα επίπεδα των GAL1 mRNAs στα *pcc1-4*, *sir2Δ* και *pcc1-4/ Δsir2* μεταλλαγμένα στελέχη με PCR σε πραγματικό χρόνο (real time PCR). Όπως αναμενόταν, η έκφραση του *GAL1* γονιδίου επηρεάστηκε στο *pcc1-4* στέλεχος. Η συσσώρευση του GAL1 mRNA στο *sir2Δ* μετάλλαγμα ήταν όμοια με αυτή του αγρίου τύπου στελέχους, ενώ η έλλειψη της Sir2p στο *pcc1-4* στέλεχος οδήγησε σε σχεδόν πλήρη επιδιόρθωση της GAL1 επαγωγής. Αυτό δείχνει ότι η καταστολή του *pcc1-4* φαινοτύπου από την έλλειψη της Sir2p συνδέεται με το μεταγραφικό ρόλο της Pcc1p. Καθώς το *PCC1* γονίδιο εντοπίζεται υπο-τελομερικά και η Sir2p έχει ένα σημαντικό ρόλο στην αποσιώπηση, η καταστολή του *pcc1-4* φαινοτύπου από τη *sir2Δ* μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη έκφραση της *pcc1-4* περιοχής ως επακόλουθο της εμπλοκής της τελομερικής αποσιώπησης. Για να ελεγχθεί αυτή η περίπτωση, μελετήθηκε με PCR το ποσοστό των *PCC1* μεταγραφημάτων σε αγρίου τύπου και *Δsir2* μεταλλαγμένα στελέχη. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία αξιοσημείωτη διαφορά στα επίπεδα των *PCC1* mRNAs, κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι η καταστολή του *pcc1-4* φαινοτύπου σχετίζεται άμεσα με τη δράση της Sir2p. ⁽⁵⁾

Στόχος ερευνητικής προσπάθειας αποτέλεσε και η διαπίστωση της πρόσδεσης της Sir2p στο *GAL1* γονίδιο, όπως συμβαίνει αντίστοιχα με τη Pcc1p. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε πειράματα C-τελικής επισήμανσης του *SIR2* γονιδίου και ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης. Από τις προκύπτοντες καμπύλες ενίσχυσης ωστόσο, διαπιστώσαμε μικρή πρόσδεση της Sir2p στη *GAL1* περιοχή, υποδηλώνοντας ότι το *GAL1* γονίδιο πιθανώς δεν υφίσταται αποσιώπηση από το Sir σύμπλοκο.

Σύνοψη

Το *PCC1* γονίδιο είναι ένα διατηρημένο κατά την εξελικτική κλίμακα, απαραίτητο για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί ένα παράγοντα ο οποίος προσδένεται σε ενεργά γονίδια και φαίνεται ότι απαιτείται για την μεταγραφή των γονιδίων από τις RNAP II και RNAP III. Ο *PCC1* παράγοντας φαίνεται ότι δρα ως σύμπλοκο με τρεις άλλες πρωτεΐνες, τις Pcc2p, Pcc3p και Bud32p,

καθιστώντας μια λειτουργική μονάδα. Διάφορες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι η Pcc1p αλληλεπιδρά γενετικά με παράγοντες τροποποίησης της χρωματίνης (όπως η Esa1p και Sir2p) και ότι η δράση της ίσως σχετίζεται με την έκφραση τελομερικών και/ ή υποτελομερικών γονιδίων.

Προς την κατεύθυνση ταυτοποίησης πρωτεϊνών-στόχων του PCC συμπλόκου, κύριο μέλημα αποτέλεσε η ανεύρεση αρνητικά επικρατών αλληλόμορφων του *PCC2* γονιδίου, συντελώντας στην καθίζηση του συμπλόκου. Ωστόσο, η ταυτοποίηση τέτοιων αλληλόμορφων δεν κατέστη εφικτή, ενώ παράλληλα τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα ελέγχθηκαν και για τη λειτουργικότητά τους. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι έλλειψη του *ESAI* γονιδίου είναι συνθετικά θανάσιμη με μία μετάλλαξη του *PCCI* γονιδίου (*pcc1.4*), ενώ η υπερ-έκφραση του *ESAI* γονιδίου δεν επηρεάζει τη θερμοευαισθησία του *pcc1.4* στελέχους, δηλώνοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο γονιδίων. Τέλος, μέσω πειραμάτων ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης, επιβεβαιώθηκε ότι η Sir2p πρωτεΐνη προσδένεται στις rDNA και τελομερικές περιοχές του γονιδιώματος του *Saccharomyces cerevisiae*, διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο κατά τη μεταγραφική αποσιώπησή τους. Ωστόσο, η Sir2p πρωτεΐνη, σε αντιδιαστολή με τη Pcc1p, δεν προσδένεται στο *GALI* γονίδιο.

Όλα τα στοιχεία που παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία υποδηλώνουν ότι ο PCC1 παράγοντας κατέχει σημαντικό ρόλο στη ζωή του *Saccharomyces cerevisiae*, επιβεβαιώνοντας τη σημασία της μελέτης του και ενισχύοντας τη συγγενειά του με τα ανθρώπινα γονίδια τα οποία εκφράζονται αυστηρώς στα καρκινικά κύτταρα. Ευελπιστούμε ότι η ανάλυση των PCC γονιδίων στο ζυμομύκητα θα επιτρέψει τη κατανόηση της μοριακής λειτουργίας των ανθρώπινων καρκινικών αντιγόνων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Chen, Y. T., Gure, A. O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A. and Old, L. J. (1998) Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6919-23.
- (2) Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M. and Old, L. J. (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1914-8.
- (3) Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.*, **188**, 22-32.
- (4) Stockert, E., Jager, E., Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A. and Old, L. J. (1998) A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med*, **187**, 1349-54.
- (5) Romanova-Kissileva Elena, PhD Thesis, Centre de Génétique Moléculaire, C.N.R.S., France.
- (6) Saccharomyces Genome Database, <http://www.yeastgenome.org>
- (7) Lopreiato Raffaele, Facchin Sonia, Sartori Geppo, Arrigoni Giorgio, Casonato Stefano, Ruzzene Maria, Pinna A. Lorenzo and Carignani Giovanna. (2004) Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem. J.*, **377**, 395–405.
- (8) Rusche N. Laura, Kirchmaier L. Ann and Rine Jasper. (2003) The establishment, inheritance and function of silenced chromatin in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 481–516.
- (9) Hofmann Kay, PhD Bioinformatics group, Memorec Biotec GmbH, Stoeckheimer Weg1, Koeln/Germany.
- (10) Clarke S. Astrid, Lowell E. Joanna, Jacobson J. Sandra, and Lorraine Pillus. (1999) Esa1p Is an Essential Histone Acetyltransferase Required for Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, No 4, 2515-2526.
- (11) Gottlieb S., Espodito RE. (1989) A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*, **56(5)**, 771-776.
- (12) Bradley E. Bernstein, Jeffrey K. Tong, and Stuart L. Schreiber. (2000) Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *PNAS*, **97**, No 25, 13708-13713.

- (13) U.S. National Library of Medicine, www.nlm.nih.gov
- (14) Troyanskaya OG, Dolinski K, Owen AB, Altman RB, and Botstein D. (2003) A Bayesian framework for combining heterogeneous data sources for gene function prediction (in *S. cerevisiae*) (web supplements). *PNAS*, **100** (14), 8348–8353.
- (15) Bonneaud Nathalie et al. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/E.coli shuttle vectors. *Yeast*, **7**, 609-615.
- (16) QIAquick Spin Handbook of QIAGEN, July 2002.
- (17) QIAGEN Plasmid Purification Handbook of QIAGEN, September 2000.
- (18) Gietz R. Daniel and Woods A. Robin. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology*, **350**, 87-96.
- (19) Puig Oscar, Caspary Friederike, Rigaut Guillaume, Rutz Berthold, Bouveret Emmanuelle, Bragado-Nilsson Elisabeth, Wilm Matthias, and Seraphin Bertrand. (2001) The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods*, **24**, 218–229.
- (20) Sambrook Joseph Fritsch, E.F. Μανιάτης Θωμάς. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. (2nd edition) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (21) LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Instruction manual of Roche, December 2002.
- (22) Labscientific, Inc, (114 West Mt. Pleasant Avenue Livingston, New Jersey), www.labscientific.com
- (23) Rpicorp, research products international corp, www.rpicorp.com
- (24) Facchin Sonia, Lopreiato Raffaele, Stocchetto Silvia, Arrigoni Giorgio, Cesaro Luca, Marin Oriano, Carignani Giovanna and Pinna A. Lorenzo. (2002) Structure–function analysis of yeast piD261/Bud32, an atypical protein kinase essential for normal cell life. *Biochem. J.*, **364**, 457-463.
- (25) Armstrong M. Christopher, Kaeberlein Matt, Shin Ichiro Imai, and Guarente Leonard. (2002) Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* Gene *SIR2* Can Have Differential Effects on In Vivo Silencing Phenotypes and In Vitro Histone Deacetylation Activity. *Molecular biology of the cell*, **13**, 4, 1427-1438.
- (26) Cuperus Guido and Shore David. (2002) Restoration of silencing in *Saccharomyces cerevisiae* by Tethering of a novel Sir2-interacting protein, Esc8. *Genetics*, **162**, 633-645.

- (27) Eisen Arri, Utley T. Rhea, Amine Nourani, Stéphane Allard, Peter Schmidt, William S. Lane, John C. (2001) The Yeast NuA4 and *Drosophila* MSL Complexes Contain Homologous Subunits Important for Transcription Regulation. *J. Biol. Chem.*, **276**, Issue 5, 3484-3491.
- (28) Gotta Monica, Sabine Strahl-Bolsinger, Renauld Hubert, Laroche Thierry, Kennedy K. Brian, Grunstein Michael and Gasser M. Susan. (1997) Localization of Sir2p: the nucleolus as a compartment for silent information regulators. *The EMBO Journal*, **16**, No11, 3243-3255.
- (29) Huang Julie and Moazed Daneshh. (2003) Association of the RENT complex with non-transcribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes and Development*, **17**, 2162-2176.
- (30) Moazed Danesh, Kistler Amy, Axelrod Amy, Rine Jasper, and Alexander D. Johnson. (1997) Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: A SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 2186-2191.
- (31) Gari Eloi, Piedrafita Lidia, Aldea Marti and Herrero Enrique. (1997) A Set of Vectors with a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 837–848.
- (32) Pfu DNA Polymerase, Instruction manual of Stratagene.
- (33) Rundlett E. Stephen, Andrew A. Carmen, Ryuji Kobayashi, Sergei Bavykin, Bryan M. Turner and Michael Grunstein. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93** (25), 14503-14508.
- (34) Siavash K. Kurdistani and Grunstein Michael. (2003) Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature reviews of Mol Cell Bio*, **4**, 276-284.