

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**

ΓΛΗΓΟΡΗΣ ΘΩΜΑΣ

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Δυναμικά χαρακτηριστικά της μεταγραφής: η λειτουργική σημασία της ιστόνης Htz1 στην έναρξη της μεταγραφής, την ενδοπυρηνική τοποθέτηση και τη μεταγραφική μνήμη του συστήματος των γονιδίων GAL στο *Saccharomyces cerevisiae*»*

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ: ΤΖΑΜΑΡΙΑΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΕΛΗΔΑΚΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΑΠΡΙΛΗΣ 2008

*Στη Μάνα, το μεγαλύτερο ήρωα
και πιο έξυπνο άνθρωπο που έχω
γνωρίσει*

Στην Αγγελική, τον Άνθρωπο μου

*Στους Δασκάλους μου Γεράσιμο
Βεργίνη, Μπάμπη Χόρτη και Λούλα
Λογοθέτη που με ενέπνευσαν, με
στήριξαν και με διέπλασαν στα
παιδικά και εφηβικά μου χρόνια*

*Σε όλους όσους δεν μπορούν να
κοιμηθούν γιατί αναζητούν μια
λύση στα δύσκολα προβλήματα*

*«Οι βεβαιότητες είναι τα λάθη
μου» .Περικλής Κοροβέσης*

*«The best way to get a good idea,
is to have a lot of ideas»
Frederique Beckoeut, Nasmyth
Lab, Oxford*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
Το γονίδιο-μοντέλο <i>GAL1</i> και μηχανισμοί μεταγραφικής ενεργοποίησης.....	7
Το σύμπλοκο <i>Ssn6(Cyc8)-Turp1</i> και η εδραίωση της μεταγραφικής καταστολής.....	11
Χρωματινική δομή και μεταγραφική ρύθμιση: η δυναμική σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων.....	13
Οι ισομορφές ιστονών (Histone variants).....	15
Γενικά χαρακτηριστικά της ιστόνης Htz1 (H2A.Z).....	16
Η ενσωμάτωση της Htz1 από το σύμπλοκο SWR1-C.....	20
Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης της Htz1 στο <i>S.cerevisiae</i>	21
Η αντι-αποσιωπητική λειτουργία της Htz1.....	22
Η ενεργοποιητική δράση της Htz1 στη μεταγραφή.....	23
Η ακετυλίωση της N-τελικής ουράς της ιστόνης Htz1.....	25
Η ενσωμάτωση της Htz1 και το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης των <i>GAL</i> γονιδίων.....	28
Η σχέση της μεταγραφής με τους πυρηνικούς πόρους στο <i>S.cerevisiae</i>	29
Μεταγραφική μνήμη και μετατόπιση των <i>GAL</i> γονιδίων στην περιφέρεια.....	34
ΣΤΟΧΟΣ.....	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
Η ιστόνη Htz1 δεν καθορίζει την νουκλεοσωμική διάταξη του υποκινητή <i>GAL1</i>	38
Η ιστόνη Htz1 απαιτείται για την έγκαιρη στρατολόγηση του Μεσολαβητή.....	39
Η ιστόνη Htz1 απαιτείται μόνο παρουσία του συμπλόκου συγκαταστολής <i>Ssn6(Cyc8)-Turp1</i>	40
Η ενσωμάτωση της Htz1 στον υποκινητή του <i>GAL1</i> εξαρτάται από το σύμπλοκο <i>Ssn6 (Cyc8)-Turp1</i>	41
Ο καταστολέας <i>Turp1</i> καθορίζει την ενσωμάτωση της Htz1 σε υποκινητές που ελέγχει.....	44
Δυναμική της ενσωμάτωσης της Htz1 <i>in vivo</i>	46
Ο <i>Turp1</i> καθορίζει αποκλειστικά την ενσωμάτωση της Htz1 στο νουκλεόσωμα που καλύπτει τη θέση έναρξης της μεταγραφής.....	49
Απαιτείται η ενσωμάτωση της Htz1 για την περιπυρηνική τοποθέτηση;.....	51
Μετάβαση του <i>GAL</i> γενετικού τόπου στη περιφέρεια του πυρήνα.....	51
Η Htz1 δεν ενισχύει την περι-πυρηνική τοποθέτηση των <i>GAL</i> γονιδίων.....	53
Η μετάβαση προς τους πυρηνικούς πόρους δεν απαιτείται για τη βέλτιστη έκφραση του γονιδίου <i>GAL1</i>	55
Η μετάβαση προς τους πυρηνικούς πόρους δεν απαιτεί τη μεταγραφή των γονιδίων <i>GAL</i>	57
Η ιστόνη Htz1 δεν είναι ο μεσολαβητής της μεταγραφικής μνήμης, η οποία έχει κυτταροπλασματική κι όχι πυρηνική βάση.....	61
Η γαλακτοκινάση Gal1 είναι ο κυτταροπλασματικός μεσολαβητής της μεταγραφικής μνήμης.....	66
Η γαλακτοκινάση Gal1 ρυθμίζει τη μεταγραφή του <i>GAL3</i> και συνολικά του συστήματος των <i>GAL</i> γονιδίων.....	68
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	95

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα διατριβή η σημασία της παρουσίας της ιστόνης Htz1 μελετήθηκε στο γονίδιο *GAL1* του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Εδραιώθηκε ο ρόλος της Htz1 στη στρατολόγηση του συμπλόκου του Μεσολαβητή κατά την έναρξη της μεταγραφής, παρέχοντας έτσι μια εξήγηση για το θετικό ρόλο της ιστόνης στη μεταγραφή. Η ενσωμάτωση της Htz1 σε ένα μεμονωμένο νουκλεόσωμα βρέθηκε να εξαρτάται από το συγκαταστολέα Ssn6-Tup1. Το δεδομένο αυτό προτείνει ότι ειδικοί ρυθμιστές του κάθε γονιδίου μπορεί να ελέγχουν την ενσωμάτωση της Htz1 στους υποκινητές. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η ενσωμάτωση αυτή πραγματοποιείται μετά το σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων κατά τη μεταγραφική καταστολή, εξαρτώμενη εν μέρει από το σύμπλοκο Ssn6-Tup1. Προτείνεται ότι με τον τρόπο αυτό ο συγκαταστολέας εξασφαλίζει μια εξίσου γρήγορη δεύτερη ενεργοποίηση.

Το γεγονός ότι η ενσωμάτωση αυτή της Htz1 έχει προταθεί να ρυθμίζει την συγκράτηση των γονιδίων *GAL* στην πυρηνική μεμβράνη και κατ' επέκταση το φαινόμενο της λεγόμενης μεταγραφικής μνήμης που παρατηρείται στα γονίδια *GAL* οδήγησε στην εξέταση του ρόλου της Htz1 στα φαινόμενα αυτά. Η ιστόνη Htz1 δεν είναι ο πρωταρχικός παράγοντας που οδηγεί την συγκράτηση των γονιδίων στην περιφέρεια. Μελετώντας την αλληλεπίδραση των γονιδίων με τους πυρηνικούς πόρους, αποδείχθηκε ότι η μετάβαση που παρατηρείται δεν είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη έκφραση του γονιδίου *GAL1*. Από την άλλη, η στρατολόγηση στην περιφέρεια αν και συμβαίνει σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού, δεν εξαρτάται από την μεταγραφή αποκλειστικά. Συνεπώς, προτείνεται ότι η μετάβαση αυτή αποτελεί ένα συνοδό φαινόμενο, το οποίο δεν ρυθμίζεται και δεν ρυθμίζει τη μεταγραφή.

Τέλος, η ιστόνη Htz1 δεν είναι ο μεσολαβητής του φαινομένου της μεταγραφικής μνήμης. Πειράματα σχηματισμού ετεροκάρυων αποδεικνύουν ότι το φαινόμενο αυτό δεν έχει πυρηνική βάση και η Htz1 δεν είναι ο καθοριστικός παράγοντας. Η κυτταροπλασματική βάση του φαινομένου εξαρτάται από τη γαλακτοκινάση Gal1, η οποία έχει προταθεί στο παρελθόν να παίζει ενεργοποιητικό ρόλο στη μεταγραφή.

ABSTRACT

During the present study the significance of the histone variant Htz1 presence was studied at the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model gene *GAL1*. It was established that the Htz1 nucleosomes are important for the recruitment of the Mediator complex during transcription initiation, providing an explanation of the positive role of this histone during transcription. Unexpectedly, the incorporation of the variant in a specific promoter nucleosome was found to depend on the corepressor Tup1-Ssn6. This finding suggests that gene-specific regulators might control the incorporation of Htz1 throughout promoters. Furthermore, it was established that this deposition takes place after the formation of canonical nucleosomes during promoter inactivation, regulated in part by Ssn6-Tup1. It is proposed that in this way the corepressor secures a rapid second activation.

The fact that this incorporation was suggested by others to regulate the attachment of the *GAL* genes at the nuclear periphery and thus the phenomenon of transcriptional memory of the *GAL* genes, led to the examination of the role of Htz1 on both of these processes.

It is concluded that Htz1 is not required for the retention at the periphery. Moreover, the enhanced affinity of the *GAL* genes for the nuclear pores was seen to be unnecessary for optimal transcription. On the other hand, this recruitment to the periphery, while taking place in a major population of nuclei, proved to be independent of transcription itself. Thus, it is proposed that this phenomenon is an escorting event but is not regulated by nor regulates transcription.

Finally, histone variant Htz1 is not the determining factor of the transcriptional memory phenomenon. Employing a yeast heterocaryon assay is demonstrated that this phenomenon has no nuclear basis and Htz1 is not the determining factor. The cytoplasmic basis of transcriptional memory was found to depend on the yeast galactokinase enzyme Gal1, supporting its previously well described activating role.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρύθμιση της μεταγραφικής έκφρασης αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο της ομοιόστασης των κυττάρων και των οργανισμών γενικότερα. Υπάρχει σήμερα διαθέσιμη μια πληθώρα μηχανισμών που έχει χαρακτηριστεί και αφορά σε όλα τα στάδια της μεταγραφικής ενεργοποίησης. Πολλοί από τους μηχανισμούς αυτούς αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν σε εξαιρετική λεπτομέρεια στη μονοκύτταρη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Ο οργανισμός αυτός, που αποτελεί ένα εξαιρετικά εύχρηστο εργαλείο, χρησιμοποιήθηκε και στη παρούσα διατριβή προκειμένου να μελετηθούν φαινόμενα της μεταγραφής.

Αφετηρία της μελέτης αυτής υπήρξε η ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι η νουκλεοσωμική δομή των υποκινητών ορισμένων καλά χαρακτηρισμένων γονιδίων (ονομαστικά των γονιδίων *GAL1*, *SUC2* και *PHO5*) χαρακτηρίζεται από την παρουσία της ιστόνης Htz1 (επίσης γνωστής με το συνώνυμο H2A.Z) παρά της κύριας ιστόνης H2A. Καθώς τα γονίδια αυτά χαρακτηρίζονται από ισχυρή επαγωγή της μεταγραφής μετά από κατάλληλη σηματοδότηση, το ενδεχόμενο η μυστηριώδης αυτή ενσωμάτωση της Htz1 να λειτουργεί ρυθμιστικά συσχετίστηκε από νωρίς με τη μεταγραφή αυτών των γονιδίων (Santisteban et al., 2000). Ωστόσο, ο τρόπος που εμπλέκεται στη μεταγραφή, οι μηχανισμοί που εξειδικεύουν την ενσωμάτωση της περισσότερο σε υποκινητές παρά σε κωδικές περιοχές, και η χρονική στιγμή που καθορίζεται η ενσωμάτωση αυτή δεν είχαν μελετηθεί.

Τα ερωτήματα αυτά προκαλούν ώστε να μελετήσει κανείς τη μεταγραφή όχι στατικά αλλά δυναμικά. Η έννοια της δυναμικής εδώ περιλαμβάνει δύο διαστάσεις: τη διάσταση του χρόνου αφενός, και τη διάσταση του χώρου αφετέρου. Για να καθοριστεί ο ρόλος της Htz1 στη μεταγραφή έπρεπε να μελετηθεί η κινητική της ενεργοποίησης. Για να μελετηθεί η ενσωμάτωση της Htz1 μελετήθηκε χρονικά η καταστολή της μεταγραφής. Για να χαρακτηριστούν οι απαραίτητοι παράγοντες για την ενσωμάτωση έπρεπε να μελετηθούν στοιχεία *in cis* των υποκινητών και παράγοντες *in trans* που ρυθμίζουν τοπικά τη λειτουργία της ιστόνης Htz1.

Καθώς οι γνώσεις μας εμπλουτίζονταν συνεχώς για την ιστόνη αυτή (Akhtar and Gasser, 2007; Brickner et al., 2007), η ιστόνη Htz1 προτάθηκε να μετέχει σε δύο επιπλέον φαινόμενα: τη συγκράτηση των ενεργοποιημένων γονιδίων *GAL* στην πυρηνική μεμβράνη και τη μεταγραφική μνήμη των γονιδίων αυτών, δηλ. την ταχύτερη δεύτερη ενεργοποίηση των γονιδίων μετά από μια πρώτη ενεργοποίηση. Στη παρούσα διατριβή η μελέτη του ρόλου της Htz1 στα δύο αυτά φαινόμενα οδήγησε στην εξαγωγή συμπερασμάτων και για τα δύο φαινόμενα.

Το γονίδιο-μοντέλο *GAL1* και μηχανισμοί μεταγραφικής ενεργοποίησης

Σε όλη την έκταση της διατριβής αυτής χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *GAL1* ως το γονίδιο-μοντέλο για την αναζήτηση απαντήσεων στα ερωτήματα που τέθηκαν. Το γονίδιο αυτό μαζί με μεμονωμένα άλλα γονίδια μελετήθηκαν εκτεταμένα τις τελευταίες δεκαετίες. Υπήρξε από τα πρώτα γονίδια όπου μελετήθηκαν επανειλημμένα μηχανισμοί της μεταγραφικής ενεργοποίησης, όπως η δράση ενεργοποιητών και καταστολέων, η δράση συνενεργοποιητών και συγκαταστολέων αλλά και η δράση συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της νουκλεοσωμικής δομής (Traven et al., 2006). Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι τα γονίδια του μονοπατιού Leloir (ή αλλιώς συστήματος *GAL*) αποτελούν ένζυμα και μεταφορείς που ρυθμίζουν την είσοδο και τον καταβολισμό της γαλακτόζης σε φωσφορική γλυκόζη. Η γαλακτόζη δεν είναι η προτιμητέα πηγή άνθρακα. Όταν όμως δεν υπάρχει γλυκόζη αλλά γαλακτόζη στο θρεπτικό μέσο ο σακχαρομύκητας ενεργοποιεί των σύστημα των γονιδίων *GAL*, και μετατρέπει τη γαλακτόζη σε φωσφορική γλυκόζη που μπορεί πλέον να εισέλθει στη γλυκόλυση κανονικά. Όλα τα ένζυμα του μονοπατιού αυτού (τα *Gal1*, *Gal10* και *Gal7*) κωδικοποιούνται από ένα συμπαγές σύμπλεγμα τριών γονιδίων που βρίσκεται κοντά στο κεντρομερές των χρωμοσώματος III και πολύ συχνά αναφέρονται ως σύμπλεγμα των *GAL* γονιδίων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν το σύστημα (*Gal4*, *Gal3* και *Gal80*) κωδικοποιούνται από γονίδια διάσπαρτα σε τρία διαφορετικά χρωμοσώματα.

Στην εικόνα 1 φαίνονται τα ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή. Χαρακτηριστικές είναι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης του ενεργοποιητή *Gal4*. Ο ενεργοποιητής προσδένεται σε κάθε μια από τις θέσεις αυτές ως διμερές ορίζοντας την αλληλουχία ενεργοποίησης (UAS, Upstream Activating Sequence). Μία από τις αλληλουχίες αυτές καθώς και μία αλληλουχία πρόσδεσης του καταστολέα *Mig1* βρίσκονται στην αλληλουχία του DNA που περικλείει ένα από τα δύο νουκλεοσώματα του υποκινητή, που αναφέρεται ως νουκλεόσωμα -2 (Nuc-2) ή άπω νουκλεόσωμα (distal nucleosome), καθώς απέχει μεγαλύτερη απόσταση από την αλληλουχία ATG που κωδικοποιεί την έναρξη της μετάφρασης του παραγόμενου μεταγράφου. Το επόμενο νουκλεόσωμα (Nuc-1) ή εγγύς νουκλεόσωμα (proximal nucleosome) περιέχει τη θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS, Transcription Start Site). Μεταξύ των δύο νουκλεοσωμάτων παρεμβάλλεται η αλληλουχία TATA που αναγνωρίζεται από το παράγοντα TBP (TATA box Binding Protein) (Bash and Lohr, 2001; Jessen et al., 2004).

Η ενεργοποίηση των γονιδίων *GAL* εξαρτάται από τρία επιμέρους συστήματα. Την ενεργοποιητική δράση του ενεργοποιητή *Gal4* και του συνενεργοποιητή *Gal3*. Την κατασταλτική δράση των διμερών *Gal80* επί του διμερισμένου *Gal4*. Τέλος, την κατασταλτική δράση του συμπλόκου *Mig1*-*Ssn6*-*Tup1* όπως περιγράφηκε στην παραπάνω ενότητα. Είναι σημαντικό εδώ να διακριθούν δύο σημαντικές έννοιες που συναντάμε στους *GAL* υποκινητές. Την έννοια της αποκαταστολής και την έννοια της ενεργοποίησης.

Πρόσδεση του ενεργοποιητή στον υποκινητή δεν ισοδυναμεί με ενεργοποίηση. Ο Gal4 εκφράζεται σε βασικά επίπεδα και προσδένεται στους υποκινητές των GAL γονιδίων ακόμη και όταν υπάρχει σηματοδότηση για πλήρη καταστολή (Bhaumik and Green, 2001; Bryant and Ptashne, 2003; Larschan and Winston, 2001). Η έννοια της αποκαταστολής είναι συμβατή με την απουσία γλυκόζης. Η απουσία επηρεάζει το σύστημα με δύο τρόπους. Αφενός, αυξάνει τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου του Gal4, το οποίο καταστέλλεται μερικώς από το σύμπλοκο Mig1-Ssn6-Tup1. Αυτό συνεπάγεται αυξημένη στρατολόγηση του Gal4 στους υποκινητές. Αφετέρου επιδρά στο ίδιο το σύμπλοκο Mig1-Ssn6-Tup1 και καταστρέφει την αλληλεπίδραση του Mig1 με το συγκαταστολέα. Σε χαμηλά επίπεδα γλυκόζης ο Mig1 φωσφορυλιώνεται από την κινάση Snf1 (Paramichos-Chronakis et al., 2004). Η τροποποίηση αυτή οδηγεί αφενός στην ρήξη της αλληλεπίδρασης με το συγκαταστολέα, αφετέρου στην έξοδο του Mig1 από τον πυρήνα. Ωστόσο, στοιχειώδης ποσότητα πρέπει να παραμένει στον πυρήνα καθώς τόσο ο Mig1 όσο και ο συγκαταστολέας παραμένουν προσδεμένοι στον υποκινητή GAL1 (αλλά και σε αυτόν του γονιδίου SUC2) και μάλιστα σε αυξημένα επίπεδα, αν και δεν καταστέλλουν πλέον (Paramichos-Chronakis et al., 2004).

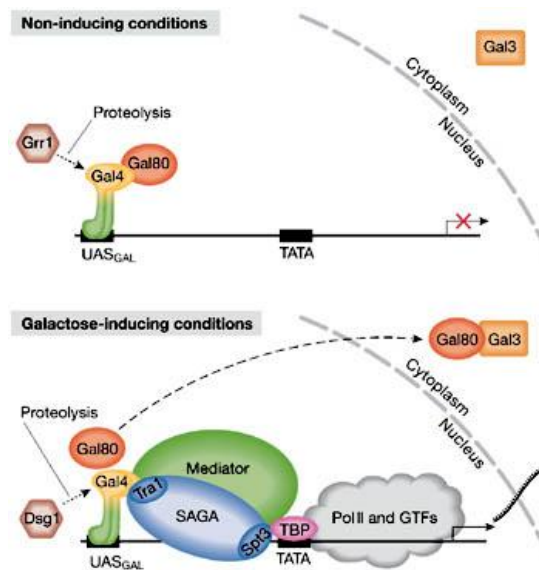
Τα γονίδια ωστόσο δεν μεταγράφονται (Bhaumik and Green, 2001; Bryant and Ptashne, 2003; Larschan and Winston, 2001). Τουλάχιστον, όχι όσα έχουν τουλάχιστον δύο θέσεις πρόσδεσης του Gal4. Ο λόγος για τα παραπάνω είναι ότι ο καταστολέας Gal80 λειτουργεί ισχυρότερα όταν υπάρχει αλληλεπίδραση διμερών του, δηλ. όταν υπάρχουν τουλάχιστον δύο αλληλουχίες διμερισμού του Gal4 (ο Gal80 διμερίζεται και σταθεροποιείται από την αλληλεπίδραση με το διμερές Gal4) (Melcher and Xu, 2001). Όταν υπάρχει μια θέση πρόσδεσης –όπως στα γονίδια Gal3 και Gal80- η καταστολή από το Gal80 είναι ατελής και οδηγεί σε χαμηλά αλλά υπαρκτά επίπεδα έκφρασης. Ακόμη και αν υπάρχουν δύο θέσεις πρόσδεσης η απόσταση μεταξύ τους είναι κρίσιμη για την αλληλεπίδραση των διμερών λόγω των στροφών της έλικας του DNA που ενδεχομένως να απομακρύνει τα διμερή. Έτσι γονίδιο του Gal3, ακόμα και σε συνθήκες καταστολής χαρακτηρίζεται από βασικά επίπεδα έκφρασης, που γίνονται ακόμα υψηλότερα απουσία γλυκόζης (Melcher and Xu, 2001).

Ο Gal3 –μία κυτταροπλασματική κυρίως πρωτεΐνη- μπορεί να προσδεθεί στον Gal80 και να τον κατακρατήσει στο κυτταρόπλασμα, δρώντας έτσι ως (συν)-ενεργοποιητής (εικ. 1). Ωστόσο, αυτό μπορεί να συμβεί μόνο παρουσία γαλακτόζης (και ATP) (Platt and Reece, 1998). Κατά συνέπεια, απουσία γλυκόζης ακόμη κι αν υπάρχουν αυξημένα επίπεδα Gal4 και Gal3 (στην πραγματικότητα υπάρχει αυξημένη παρουσία και του Gal80), το γονίδιο GAL1 δεν μεταγράφεται ούτε καν σε χαμηλά βασικά επίπεδα.

Ωστόσο, όταν πληρείται και ο δεύτερος όρος, δηλ. όταν υπάρχει (εκτός από απουσία γλυκόζης) και παρουσία γαλακτόζης, ο Gal3 σταδιακά συγκρατεί τον Gal80 στο κυτταρόπλασμα (Peng and Hopper, 2000, 2002; Pilauri et al., 2005; Reece et al., 2006) (εικ.1). Αυτό σημαίνει ότι οι δύο χαρακτηρισμένες ενεργοποιητικές όξινες περιοχές του Gal4 (acidic activation domains) (Ma and Ptashne, 1987; Ptashne, 2004) μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή. Η

σημαντικότερη νέα έννοια που προκύπτει εδώ είναι η αυτή της στρατολόγησης των συνενεργοποιητών (coactivator recruitment) . Οι ενεργοποιητικές περιοχές του Gal4 αλληλεπιδρούν με υπομονάδες των συμπλόκων ενεργοποίησης και τελικά οδηγούν στη στρατολόγηση των συμπλόκων στον υποκινητή (Ptashne and Gann, 1997, 1998).

Τέτοιες αλληλεπιδράσεις έχουν προταθεί πολλές και τις περισσότερες φορές προκύπτουν από γενετικές αναλύσεις που δεν συμπληρώνονται πάντα με τα απαραίτητα βιοχημικά πειράματα. Ωστόσο, φαίνεται ότι ο Gal4 στρατολογεί το σύμπλοκο SAGA, το σύμπλοκο του Μεσολαβητή, και το SWI/SNF σύμπλοκο (Bhaumik and Green, 2001; Bryant and Ptashne, 2003; Krebs et al., 2000; Larschan and Winston, 2001; Lemieux and Gaudreau, 2004) (εικ.1). Για το σύμπλοκο SAGA υπάρχουν δύο υπομονάδες που είναι στόχοι του Gal4, η υπομονάδα Tra1 και η υπομονάδα Taf12 (Bhaumik et al., 2004; Reeves and Hahn, 2005). Καθώς οι υπομονάδες αυτές είναι κοινά συστατικά του NuA4 και του SAGA αντίστοιχα, η ταυτόχρονη ή εναλλασσόμενη στρατολόγηση των συμπλόκων αυτών δεν αποκλείεται. Στην πραγματικότητα, από πειράματα ανασύστασης της μεταγραφής *in vitro*, με τη χρήση εκχυλισμάτων από το σακχαρομύκητα, η στρατολόγηση και των δύο συμπλόκων από τον Gal4 έχει περιγραφεί (Reeves and Hahn, 2005). Η αλληλεπίδραση αυτή και με τα δύο σύμπλοκα αναστέλλεται εξειδικευμένα από την παρουσία του Gal80 (Carrozza et al., 2002). Η παρουσία του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης SWI/SNF έχει προταθεί να είναι απαραίτητη κατά την φάση της μίτωσης, όπου η χρωματίνη είναι θεωρητικά πιο δύσκολα προσβάσιμη (Krebs et al., 2000). Επίσης, εξαρτάται από την παρουσία του Μεσολαβητή και της RNA πολυμεράσης II , αλλά και τη δράση του SAGA καθώς στρατολογείται από την αναγνώριση ακετυλιωμένων ιστονών (Hassan et al., 2001; Hassan et al., 2002; Syntichaki et al., 2000). Τέλος, από πολύ νωρίς έχει προταθεί ότι η παρουσία του SWI/SNF και η αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων ενισχύει την πρόσδεση του Gal4 (Cote et al., 1994). Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι η δράση των ενεργοποιητών αυτών αυτό-ενισχύεται. Οι ανατροφοδοτήσεις αυτές οδηγούν σε έναν από τους υψηλότερους ρυθμούς μεταγραφής με περίπου 33 μετάγραφα/min (Iyer and Struhl, 1996) τη στιγμή που ο υψηλότερος ρυθμός είναι περίπου 40 μετάγραφα/min και η μέση μεταγραφή του 80% των γονιδίων του σακχαρομύκητα είναι 0.5-2 μετάγραφα/min (Holstege et al., 1998).



Εικ. 1. Η ενεργοποίηση των γονιδίων GAL. Στην εικόνα αποδίδεται σχηματικά το μοντέλο δράσης του ενεργοποιητή Gal4, του καταστολέα Gal80 και του κυτταροπλασματικού συνενεργοποιητή Gal3. Σε συνθήκες καταστολής τα διμερή του Gal80 αναστέλλουν την αλληλεπίδραση του διμερισμένου Gal4 με υπομονάδες του SAGA και του Μεσολαβητή (Mediator). Σε συνθήκες επαγωγής ο κυτταροπλασματικός Gal3 συγκρατεί στο κυτταρόπλασμα τον Gal80 με αποτέλεσμα την σταδιακή ενεργοποίηση. Στο σχήμα δεν λαμβάνεται υπόψη το σύμπλοκο Ssn6-Tup1. Επίσης, δεν λαμβάνεται υπόψη η ισχυρότερη καταστολή αλλά και ενεργοποίηση των υποκινητών που φέρουν περισσότερες από μια αλληλουχίες πρόσδεσης του Gal4 (Τροποποιημένη από Traven et al., 2006)

Η κινητική της στρατολόγησης του SAGA, του Μεσολαβητή και των βασικών μεταγραφικών παραγόντων TFIIB/H/E (γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες, GTFs), του TBP αλλά και του ενζύμου της πολυμεράσης έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Η στρατολόγηση των GTF και του TBP είναι ταυτόχρονη με αυτή της πολυμεράσης (Bryant and Ptashne, 2003). Ωστόσο, ο Μεσολαβητής όπως και σε άλλες περιπτώσεις (Bhoite et al., 2001; Cosma et al., 2001) στρατολογείται αρκετά πριν και ανεξάρτητα από την RNA πολυμεράση (Bryant and Ptashne, 2003; Kuras et al., 2003). Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με την ιδέα της στρατολόγησης του προ-συναρμολογημένου ολοενζύμου (Wilson et al., 1996). Τέλος, το σύμπλοκο SAGA έρχεται πριν το Μεσολαβητή και δεν μετέχει στην στρατολόγηση του (Bryant and Ptashne, 2003).

Σε κάθε μεμονωμένο υποκινητή η εκκίνηση της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II οδηγεί στην μερική αποσυναρμολόγηση του ολοενζύμου στον υποκινητή. Οι υπομονάδες που «εκτροχιάζονται» είναι οι γενικοί παράγοντες TFIIF και TFIIB. Το υπόλοιπο του ολοενζύμου-συμπεριλαμβανομένου και του Μεσολαβητή- παραμένει προσδεμένο και αποτελεί μια εξέδρα (scaffold) πάνω στην οποία ανασχηματίζεται το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής. Η επανέναρξη αυτή της μεταγραφής ενισχύεται κατά πολύ από την ύπαρξη του Gal4, ο οποίος σταθεροποιεί την εξέδρα σχηματισμού (Yudkovsky et al., 2000). Είναι αξιοσημείωτο, ότι με την έναρξη της μεταγραφής ο Gal4 σταθεροποιείται στον υποκινητή και τα ίδια διμερή οδηγούν τη μεταγραφή για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα (Nalley et al., 2006).

Αν και ανοικτό ερωτηματικό παραμένει πως τα διμερή του Gal4 αλληλεπιδρούν με όλους αυτούς τους παράγοντες (π.χ. υπάρχουν κύκλοι διαδοχής ή είναι ταυτόχρονη η αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές;) η στρατολόγηση των παραγόντων αυτών είναι καλά καθορισμένη. Την καθορισμένη αυτή στρατολόγηση χρησιμοποιήσαμε για να καθοριστεί ο ρόλος της ιστόνης Htz1 στη μεταγραφή.

Το σύμπλοκο Ssn6(Cyc8)-Tup1 και η εδραίωση της μεταγραφικής καταστολής.

Το σύμπλοκο Ssn6(Cyc8)-Tup1 αποτελεί έναν από τους πρώτους συγκαταστολείς που έχουν μελετηθεί. Στο *S.cerevisiae* περίπου 180 γονίδια καταστέλλονται από το σύμπλοκο αυτό. Στο κατάλογο αυτό περιλαμβάνονται γονίδια που επάγονται από τη πτώση της γλυκόζης, τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, την απουσία οξυγόνου καθώς και γονίδια ειδικά για κάθε συζευκτικό τύπο (Malave and Dent, 2006; Smith and Johnson, 2000). Όπως συμβαίνει και με άλλους συγκαταστολείς η εξειδίκευση της πρόσδεσης του συμπλόκου συγκαταστολής καθορίζεται από καταστολείς που αναγνωρίζουν και προσδένονται σε αλληλουχίες *in cis* του υποκινητή (εικ.2).

Το σύμπλοκο Tup1-Ssn6 αποτελείται από τρία ή τέσσερα μόρια Tup1 και ένα μόριο Ssn6 (Redd et al., 1997; Varanasi et al., 1996). Η αμινο-τελική περιοχή του Tup1 είναι απαραίτητη για το τετραμερισμό του Tup1 και την αλληλεπίδραση με τον Ssn6. Η καρβόξυ-τελική περιοχή περιέχει επτά περιοχές WD40 οι οποίες αναδιπλώνονται σε μια δομή β-προπέλας. Η περιοχή αυτή είναι η περιοχή αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες όπως ο καταστολέας α2 (Sprague et al., 2000). Στο μόριο του Ssn6 περιέχονται 10 επαναλήψεις TPR (Tetratricopeptide Repeats) (Schultz et al., 1990) οι οποίες έχει προταθεί ότι σχηματίζουν μια ελικοειδή δομή που ενδεχομένως να αλληλεπιδρά με το αμινο-τελικό τετραμερές τμήμα του Tup1 (Jabet et al., 2000). Είναι επίσης σημαντικό ότι διαφορετικά TPR φαίνεται να απαιτούνται για την καταστολή των γονιδίων στόχων (Tzamarias and Struhl, 1995) αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις με διαφορετικές απακετυλάσες (Davie et al., 2003; Davie et al., 2002). Ο Tup1 αλληλεπιδρά με τις ιστόνες H3 και H4 μέσω δύο αμινο-τελικών περιοχών. Οι αμινο-τελικές ουρές των ιστονών H3 και H4 είναι αναγκαίες και επαρκείς για τις αλληλεπιδράσεις αυτές. Μεταλλάξεις στις ουρές αυτές που αποδυναμώνουν τις αλληλεπιδράσεις με τον Tup1 (Edmondson et al., 1996) ή αυξάνουν την ακετυλίωση *in vivo* (Watson et al., 2000) έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της μεσολαβούμενης καταστολής από τον Tup1. Για το λόγο αυτό και οι δύο περιοχές αυτές στο μόριο του Tup1 καλούνται περιοχές καταστολής. Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι όπως η υπομονάδα Sir3 του συμπλόκου SIR (Hecht et al., 1995) έτσι και ο Tup1 αλληλεπιδρά ισχυρά με μη τροποποιημένες –υπακετυλιωμένες– αμινοτελικές ουρές. Αυτό σημαίνει ότι η δράση του συμπλόκου ενδεχομένως είναι αυτοενισχυόμενη –όπως και του συμπλόκου SIR– καθώς η απακετυλίωση που δημιουργείται από την στρατολόγηση απακετυλασών έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσδεση του συμπλόκου που ξεκινά νέο κύκλο απακετυλίωσης.

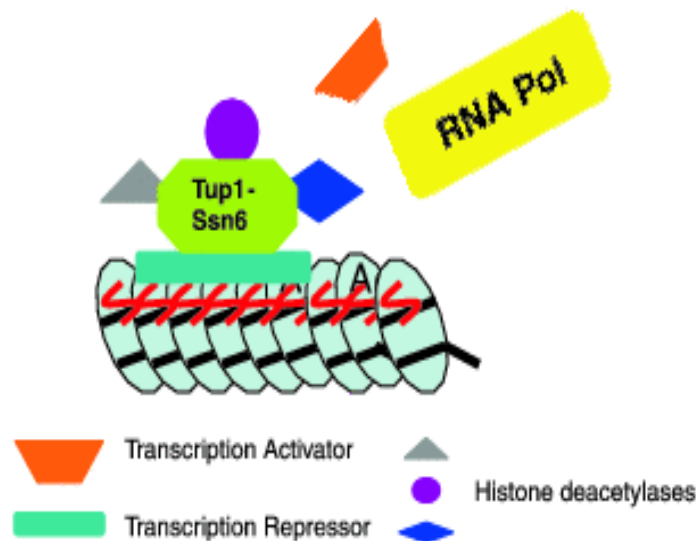
Όπως προαναφέρθηκε μέσω των περιοχών TPR ο Tup1 αλληλεπιδρά με ένα αριθμό απακετυλασών όπως είναι η Rpd3, η Hos1 και η Hos2 (Davie et al., 2003; Davie et al., 2002). Καθώς για τις αλληλεπιδράσεις αυτές απαιτούνται διαφορετικά TPR το ενδεχόμενο να αλληλεπιδρά ο Tup1 ταυτόχρονα με πολλές απακετυλάσες εξηγεί την αθροιστική δράση των απακετυλασών αυτών στη μεταγραφική καταστολή που ισοδυναμεί με την ολική καταστολή από τον Tup1 σε μερικές περιπτώσεις (Zhang and Reese, 2004). Από γενετικά πειράματα έχει εδραιωθεί και η αλληλεπίδραση με μια τέταρτη απακετυλάση, την Hda1 (Wu et al., 2001). Απαλοιφή της Hda1 επηρεάζει περίπου 30% των γονιδίων που ελέγχονται από το σύμπλοκο Ssn6-Tup1. Αυτό σημαίνει ότι η Hda1 πολύ πιθανόν εμπλέκεται στην καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων που ελέγχονται από το Ssn6-Tup1 (Robyr et al., 2002).

Μια πλειάδα μελετών έχει αποδείξει την άμεση αλληλεπίδραση με μια σειρά υπομονάδων του συμπλόκου του Μεσολαβητή. Το σύμπλοκο του Μεσολαβητή αλληλεπιδρά με το καρβόξυ-τελικό άκρο (CTD) της μεγάλης υπομονάδας της RNA PolII (Kornberg, 2005). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι και κατασταλτικές (π.χ. των υπομονάδων Srb10-Srb11) αλλά και ενεργοποιητικές. Το Ssn6-Tup1 αλληλεπιδρά γενετικά ή/και βιοχημικά με τις υπομονάδες Med3, Srb8, Srb10, Srb11, Sin4, Rox3 και Rgr1 (Malave and Dent, 2006). Μεταλλαγές στις περισσότερες από τις υπομονάδες αυτές οδηγούν σε μέτρια αποκαταστολή των γονιδίων, η οποία δεν ενισχύεται όταν συνδυάζεται με μεταλλαγές των αμινο-τελικών ουρών των ιστονών, κάτι που υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο του Μεσολαβητή και οι ιστόνες δρουν στο ίδιο μονοπάτι καταστολής, το οποίο ελέγχεται από το σύμπλοκο Ssn6-Tup1. Όλα τα μέχρι σήμερα δεδομένα συγκλίνουν στη διαπίστωση ότι ο συγκαταστολέας δρα επίσης με το να αποτρέπει την αλληλεπίδραση ενεργοποιητών με υπομονάδες του Μεσολαβητή (εικ.2) (Malave and Dent, 2006).

Αν και σε πολλά από τα γονίδια που ελέγχονται από το Ssn6-Tup1 ο καταστολέας φαίνεται να απομακρύνεται κατά την διάρκεια της μεταγραφικής ενεργοποίησης υπάρχουν εξαιρέσεις στο κανόνα αυτό. Έτσι, στο γονίδιο *GAL1* αλλά και στο γονίδιο *SUC2* κατά τη μεταγραφή το σύμπλοκο παραμένει σταθερό και ακόμη περισσότερο φαίνεται να δρα ενεργοποιητικά ενδεχομένως συμβάλλοντας στη στρατολόγηση του συμπλόκου SAGA μέσω της κοινής τους αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα Cti6 (Paramichos-Chronakis et al., 2002). Παρόλο που και ο καταστολέας Mig1 φαίνεται να παραμένει στους υποκινητές αυτούς η αλληλεπίδραση του με το συγκαταστολέα φαίνεται να αίρεται από τη δράση της κινάσης Snf1 (Paramichos-Chronakis et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα παραμονής του συμπλόκου έχουν βρεθεί και στις περιπτώσεις των γονιδίων *ANB1* και *HEM13*, αλλά εκεί η παρουσία του Cti6 δεν είναι απαραίτητη (Mennella et al., 2003). Ο συγκαταστολέας παραμένει προσδεμένος και κατά την ενεργοποίηση γονιδίων που ελέγχουν την απόκριση στο υπεροσμωτικό στρες. Στις περιπτώσεις αυτές ο συγκαταστολέας φαίνεται να στρατολογεί ακόμη και το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης SWI/SNF (Proft and Struhl, 2002). Το γεγονός αυτό θυμίζει έντονα τη δράση του συμπλόκου συγκαταστολής HIR στα γονίδια των ιστονών, με κατασταλτικό ρόλο εκτός φάσης S και με

ενεργοποιητικό ρόλο (με στρατολόγηση του SWI/SNF) κατά την ενεργοποίησή τους (Dimova et al., 1999; Prochasson et al., 2005). Ακόμη περισσότερο στα γονίδια *ARG1* και *ARG4* η παρουσία του Tup1-Ssn6 φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένη πρόσδεση του ενεργοποιητή Gcn4, ο οποίος με τη σειρά του ενισχύει τη πρόσδεση του Ssn6-Tup1 όχι μόνο στις περιοχές του υποκινητή αλλά και στην κωδική περιοχή (Kim et al., 2005).

Ωστόσο, τα *in vitro* αποτελέσματα δεν έχουν ποτέ δείξει ότι το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 μπορεί να δρα ενεργοποιητικά κάτι που σημαίνει ότι οι δράσεις αυτές είναι αυστηρά ρυθμιζόμενες και σηματοδοτούνται πολύ γρήγορα και ενδεχομένως παροδικά και η εξιχνίαση του μηχανισμού που μετατρέπει τον Tup1 σε ενεργοποιητή παραμένει ανοικτή.



Εικ 2. Η κατασταλτική δράση του συμπλόκου Ssn6-Tup1. Στην εικόνα αποδίδεται σχηματικά το μοντέλο δράσης του συγκαταστολέα. Το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 μέσω παραγόντων που προσδένονται στο DNA στρατολογείται σε υποκινητές. Αυτό οδηγεί σε απακετυλίωση και συμπίκνωση της χρωματίνης με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η στρατολόγηση ενεργοποιητών και της RNA πολυμεράσης II (τροποποιημένη από Malave and Dent, 2006).

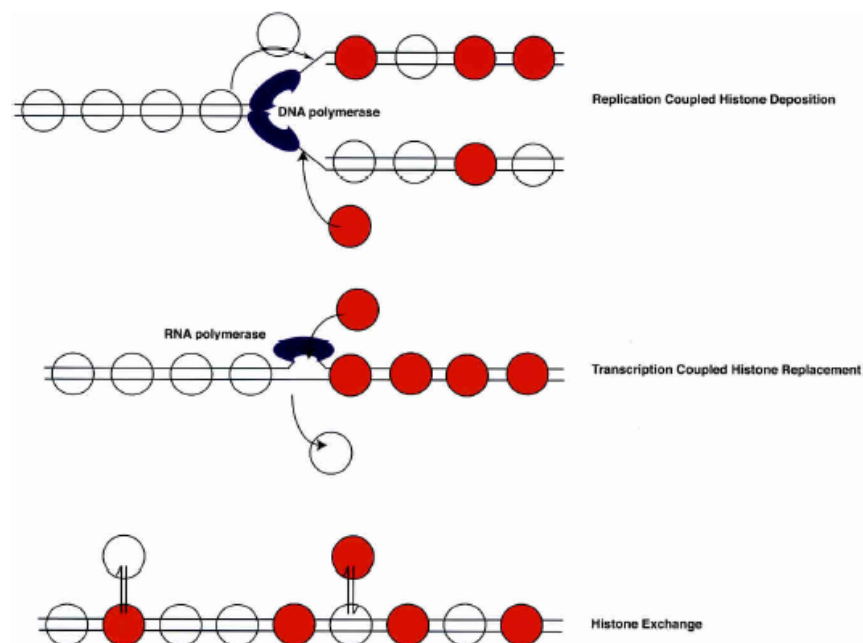
Χρωματινική δομή και μεταγραφική ρύθμιση: η δυναμική σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων.

Η δομική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα. Το νουκλεόσωμα αποτελείται από το οκταμερές των κύριων ιστονών γύρω από οποίο περιελίσσεται διπλή έλικα DNA, μήκους σχεδόν 145 ζευγών βάσεων. Η περιέλιξη αυτή ενισχύεται από 14 σημεία ισχυρής αλληλεπίδρασης αποκλειστικά καταλοίπων αργινίνης των ιστονών με το σκελετό της διπλής έλικας που σχηματίζει τις ελάσσονες αύλακες (minor grooves) και μόνο (Workman and Kingston, 1998).

Το οκταμερές των ιστονών μπορεί να διακριθεί στην ουσία σε ένα τετραμερές αποτελούμενο από τις ιστόνες H3 και H4 και από δύο ετεροδιμερή που αποτελούνται από τις ιστόνες H2A και

H2B . Σε κάτοψη, το τετραμερές καταλαμβάνει σχεδόν όλη την έκταση ενός κυκλικού δίσκου σχηματίζοντας μια πεταλοειδή μορφή. Τα ετεροδιμερή αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους στην ελεύθερη από το τετραμερές περιοχή στην ουσία σχηματίζουν ένα δεύτερο σχηματισμό κάθετο στο σχηματισμό του τετραμερούς. Όπως είναι λογικό τα σημεία επαφής του τετραμερούς με τα ετεροδιμερή αλλά και των ετεροδιμερών μεταξύ τους έχουν επίσης μεγάλη σημασία για την σταθερότητα της νουκλεοσωμικής δομής.

Η σύνθεση των γονιδίων των ιστονών υπόκειται σε πολύ αυστηρή ρύθμιση. Στους περισσότερους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το πιο σημαντικό στοιχείο της ρύθμισης αυτής είναι μετα-μεταγραφικό (Henikoff and Ahmad, 2005). Στο σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* η ρύθμιση αυτή γίνεται κυρίως σε επίπεδο μεταγραφικό από το σύμπλοκο HIR (Marzluff and Duronio, 2002).



Εικ. 3. Τρόποι δημιουργίας νουκλεοσωμάτων που περιέχουν ιστόνες ενσωμάτωσης. Η ιστόνη Htz1 ενσωματώνεται μόνο με αντικατάσταση ετεροδιμερών από το σύμπλοκο SWR1-C ενώ η ιστόνη H3.3 μπορεί να ενσωματωθεί κατά την μεταγραφή και πολύ λιγότερο κατά την αντιγραφή. (Τροποποιημένη από Kamakaka and Biggins, 2005)

Τα γονίδια των ιστονών βρίσκονται συνήθως σε πολλαπλά αντίγραφα (μέχρι και μερικές δεκάδες) και σχηματίζουν συμπλέγματα μεταγραφής. Στο *S.cerevisiae* για κάθε μια από τις κύριες ιστόνες υπάρχουν δύο πανομοιότυπα αντίγραφα. Τα γονίδια των H3 και H4 ρυθμίζονται από κοινό υποκινητή όπως και τα γονίδια των H2A και H2B. Στους περισσότερους οργανισμούς υπάρχουν και άλλες δύο μη νουκλεοσωμικές ιστόνες που ωστόσο έχουν σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες της χρωματίνης, οι ιστόνες H1 και H5 (ομόλογη της H1) που αλληλεπιδρούν με τις διανουκλεοσωμικές περιοχές γυμνού DNA, γνωστές και ως περιοχές συνδέτες (linkers) (Henikoff and Ahmad, 2005). Η ύπαρξη των νουκλεοσωμάτων οδηγεί στην απαραίτητη συσπείρωση του

γενετικού υλικού. Χωρίς την ύπαρξη των πυκνωτών αυτών δεν μπορεί να νοηθεί οργανωμένη πυρηνική λειτουργία των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων (Workman and Kingston, 1998)

Τα νουκλεοσώματα σχηματίζονται κατά τη φάση του διπλασιασμού του DNA, με μια πολύ γρήγορη διεργασία που είναι μηχανιστικά συζευγμένη με την αντιγραφή (εικ.3). Η διεργασία αυτή είναι γνωστή ως ενσωμάτωση ιστονών συζευγμένη με τη αντιγραφή (Replication Coupled Histone Deposition, RC). Για την δημιουργία των νέων νουκλεοσωμάτων που απαιτείται με το πέρασμα της διακλάδωσης αντιγραφής (Replication Fork) χρησιμοποιείται μέρος των «παλιών» νουκλεοσωμάτων, περισσότερο άθικτων τετραμερών H3-H4 και λιγότερο ετεροδιμερών H2A-H2B (Groth et al., 2007). Ο μηχανισμός αυτός είναι εν μέρει συντηρητικός αλλά όχι ημισυντηρητικός, αν και μοντέλα που υποστηρίζουν και το τελευταίο έχουν προταθεί (Groth et al., 2007; Martin and Zhang, 2007) . Μέσω αυτής της μερικής συντήρησης πιστεύεται ότι μπορεί να υπάρξει κληροδότηση των αποκτηθέντων τροποποιήσεων των ιστονών στα νεοσχηματιζόμενα νουκλεοσώματα. Η κληροδότηση αυτών των χαρακτηριστικών συχνά καλείται επιγενετική, μπορεί δηλ. θεωρητικά να παρακάμπτει και να επίσταται της πληροφορίας που κωδικοποιείται από το DNA δίνοντας την εικόνα ότι μεταβιβάζεται κατά τρόπο ασύμβατο με τους γενετικούς κανόνες του Mendel για την κληρονομικότητα. Η ρύθμιση αυτή αφορά μέχρι σήμερα αποκλειστικά τη σίγηση γονιδίων (gene silencing) που φυσιολογικά θα έπρεπε να είναι ενεργά, χωρίς να έχει παρατηρηθεί ποτέ μέχρι στιγμής το αντίστροφο (Raisner and Madhani, 2006). Τέτοια φαινόμενα έχουν δραματική σημασία κατά την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών (Surani et al., 2007). Θα έλεγε κανείς ότι η επιγενετική ρύθμιση αποτελεί μια σημαντική εξαίρεση που επιβεβαιώνει έναν κοινότοπο κανόνα.

Οι ισομορφές ιστονών (Histone variants).

Τα τελευταία χρόνια με πραγματικά διαφωτιστικές μελέτες κυρίως στη *Drosophila melanogaster* και στο *Saccharomyces cerevisiae* έχει αναδειχθεί και ένας δεύτερος τρόπος ενσωμάτωσης των ιστονών και δημιουργίας νουκλεοσωμάτων. Οι διεργασίες αυτές είναι ανεξάρτητες από την αντιγραφή (Replication Independent Histone Deposition, RI). Κοινό χαρακτηριστικό των διεργασιών αυτών είναι ότι στα νεοσχηματιζόμενα νουκλεοσώματα ενσωματώνονται εναλλακτικές μορφές των ιστονών H2A και H3 (Histone Variants, Ισομορφές Ιστονών). Δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα αναγνωρισμένες εναλλακτικές μορφές των ιστονών H4 και H2B. Αξίζει να αναφερθεί ότι η εξελικτική συγγένεια της H3 είναι μεγαλύτερη για την H2A και της H4 για την H2B (Henikoff and Ahmad, 2005).

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί καλά δύο μηχανισμοί ενσωμάτωσης RI (εικ. 3). Ο πρώτος αφορά στην ενσωμάτωση της παραλλαγής H3.3 στη *Drosophila melanogaster* (Ahmad and Henikoff, 2002). Η ιστόνη αυτή εναποτίθεται από την RNA πολυμεράση II κατά την μεταγραφή γονιδίων, σε ένα μηχανισμό που θέλει την πολυμεράση με τη σύμπραξη συμπλόκων συνοδών-

ιστονών (Histone Chaperones όπως τα σύμπλοκα FACT και HIRA) να ενσωματώνει στο νουκλεόσωμα που αφήνει πίσω της κατά την μεταγραφή ένα τετραμερές H3.3-H4 που της προμηθεύει το σύμπλοκο συνοδείας ιστονών που ταξιδεύει μαζί της. Η ανάλυση του μηχανισμού αυτού ξεφεύγει της παρούσης μελέτης. Αξίζει ωστόσο να αναφερθούμε σε δύο σημεία. Η διεργασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τα ενεργά γονίδια στην ουσία να φέρουν ως σημάδι (histone mark) την ιστόνη αυτή (Ahmad and Henikoff, 2002; Henikoff and Ahmad, 2005). Επίσης, στο γονιδίωμα του *S.cerevisiae* κωδικοποιείται μια μόνο από τις δύο παραπάνω ισομορφές, και αυτή είναι η H3.3. Το φαινόμενο της RI ενσωμάτωσης έχει λοιπόν επιβεβαιωθεί και στο *S.cerevisiae* και είναι ο κύριος τρόπος ενσωμάτωσης της H3 κατά τη μεταγραφή από την πολυμεράση. Το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε για πρώτη φορά σε ένα από επαγόμενα γονίδια του *GAL* συστήματος, που χρησιμοποιούνται ως μοντέλο και σ' όλη την έκταση της μελέτης αυτής (Schwabish and Struhl, 2004).

Ο δεύτερος μηχανισμός RI ενσωμάτωσης διαπιστώθηκε μόλις πριν λίγα χρόνια με την ανακάλυψη του συμπλοκου SWR1-C (SWR1-Complex). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από δεκατρείς υπομονάδες στο *S.cerevisiae*, ο ρόλος των περισσότερων όμως παραμένει ανεξιχνίαστος. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να ενσωματώνει ετεροδιμερή Htz1-H2B σε προσχηματισμένα νουκλεοσώματα H2A-H2B (εικ.3). Η Htz1 (ή αλλιώς H2A.Z/F ή H2Av) αποτελεί μια εξαιρετικά συντηρημένη μορφή εναλλακτικής ισομορφής H2A ιστόνης.

Γενικά χαρακτηριστικά της ιστόνης Htz1 (H2A.Z).

Η Htz1 χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στο πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila*, όπου και βρέθηκε στους μεταγραφικά ενεργούς μακροπυρήνες αλλά όχι και στους ανενεργούς μικροπυρήνες (Allis et al., 1986). Από την πρώτη αυτή αναγνώριση που τη συσχέτισε με την μεταγραφική ενεργότητα έχει βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για τη μελέτη της χρωματινικής λειτουργίας (μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδη, βάτραχο, δροσόφιλα, όρνιθα αλλά και στα θηλαστικά). Το γονίδιο της ιστόνης αυτής είναι απαραίτητο για τη ζωή στο πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila* και στα μετάζωα *Drosophila melanogaster* και *Mus musculus* ενώ απώλεια του προκαλεί αναπτυξιακά προβλήματα στο βάτραχο *Xenopus laevis* (Raisner and Madhani, 2006). Στο *Saccharomyces cerevisiae* απώλεια της Htz1 δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Santisteban et al., 2000).

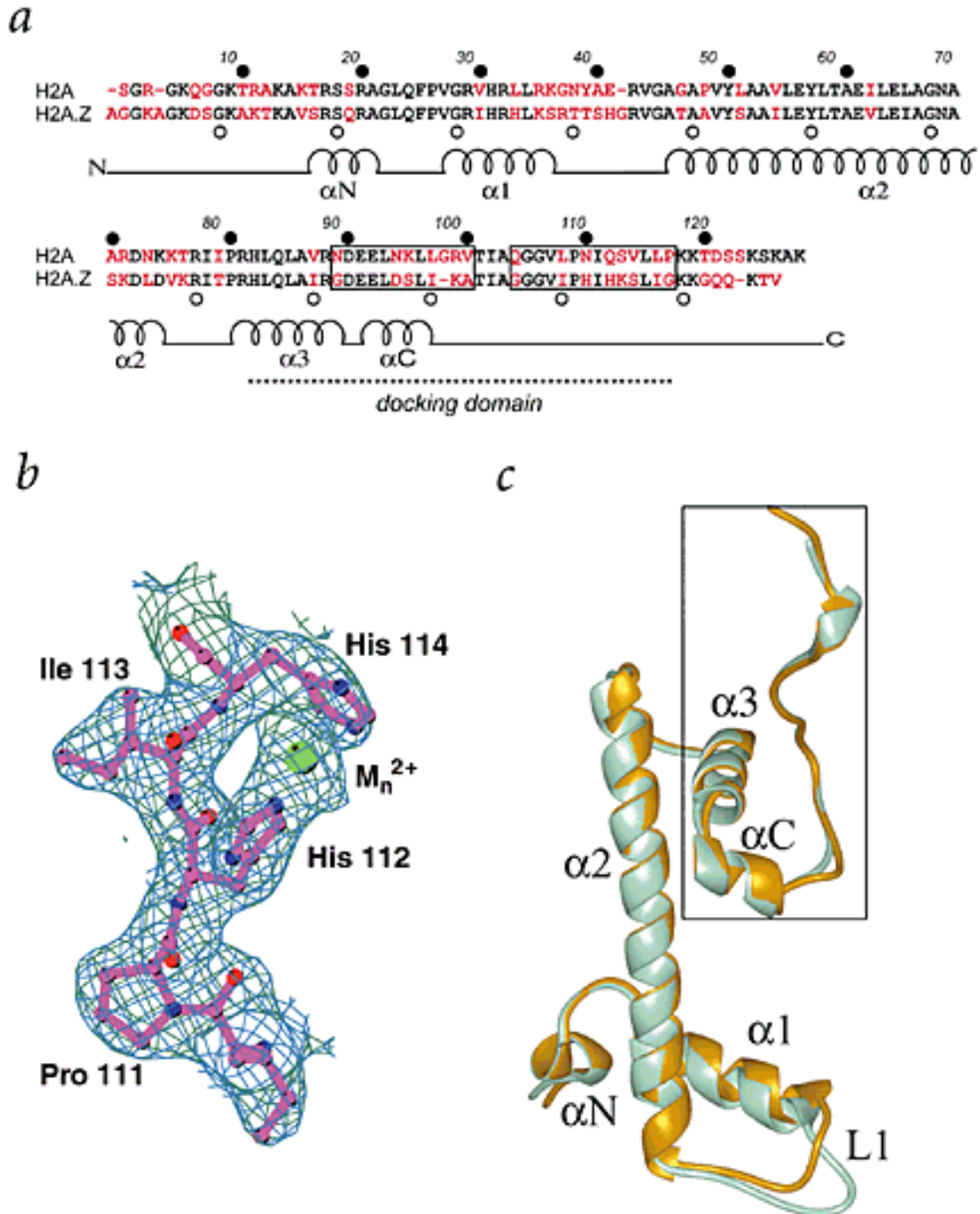
Η αμινοξική αλληλουχία της H2A.Z παρουσιάζει αρκετές διαφορές τόσο στα άκρα της πρωτεΐνης όσο και στις εσωτερικές περιοχές από την αντίστοιχη της H2A (εικ.4A). Η δομή της H2A.Z του βατράχου *Xenopus laevis* λύθηκε κρυσταλλογραφικά (Suto et al., 2000) και αποκάλυψε ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά για την αλληλεπίδραση με τις υπόλοιπες ιστόνες του οκταμερούς. Ιδιαίτερης σημασίας είναι υποκαταστάσεις αμινοξέων που αναμένεται να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των ετεροδιμερών H2A.Z-H2B με το τετραμερές H3-H4. Πιο συγκεκριμένα η αλλαγή από γλουταμίνη σε γλυκίνη στις θέσεις 104 και 106 των H2A και H2A.Z

αντίστοιχα οδηγεί στην απώλεια τριών δεσμών υδρογόνου. Καθώς η αλλαγή αυτή γίνεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης του τετραμερούς με το ετεροδιμερές H2A-H2B (docking domain, εικ.4A και 5C) αναμένεται να προκαλεί αποσταθεροποίηση του οκταμερούς. Επίσης η ύπαρξη ενός καταλοίπου ιστιδίνης στη θέση 112 καθώς και η αλληλεπίδραση της με γειτονικό κατάλοιπο στη θέση 114 φαίνεται να σταθεροποιούν στον κρύσταλλο ένα ιόν μετάλλου, το οποίο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που φέρουν τα κατάλληλα μοτίβα (Suto et al., 2000) (εικ. 4B). Τέλος, τα ετεροδιμερή H2A.Z-H2B φέρουν στην επιφάνεια του οκταμερούς μια όξινη περιοχή (acidic patch). Παρόμοια περιοχή φέρει και η H4, η όποια αναμένεται να ρυθμίζει της αλληλεπιδράσεις με γειτονικά νουκλεοσώματα, επηρεάζοντας έτσι τη χρωματινική δομή σε επίπεδο χρωματινικής ίνας. Αντίστοιχος ρόλος προτείνεται και για την όξινη περιοχή του ετεροδιμερούς H2A.Z-H2B (Tremethick, 2007) .

Στην ιστόνη Htz1 έχουν αποδοθεί βάσει κυτταρολογικών και βιοχημικών μελετών, λειτουργίες στη ρύθμιση της μεταγραφής, στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης, στην αποτροπή του σχηματισμού της ετεροχρωματίνης, στη δομή των κεντρομερών αλλά και στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και τη χρωμοσωμική σταθερότητα (Raisner and Madhani, 2006).

Για παράδειγμα στη *Drosophila melanogaster* η ομόλογη H2Av κυτταρολογικά εντοπίζεται στα ετεροχρωματινικά κεντρομερή αλλά και στο εσωτερικό των πολυταινικών χρωμοσωμάτων. Έτσι, η επικάλυψη της παρουσίας της με αυτήν της RNA πολυμεράσης II είναι μόνο μερική στη περίπτωση αυτή. Μεταλλαγές στην ιστόνη αυτή προκαλούν ελαττώματα στην μεταγραφική αποσιώπηση (gene silencing) και υπάρχει αυξημένη παρουσία της σε σημεία που επάγεται εκτοπικά η μεταγραφική αποσιώπηση (Leach et al., 2000; Madigan et al., 2002, 2003).

Τα πράγματα περιπλέκονται ακόμη περισσότερο στα θηλαστικά, καθώς η παρουσία της ιστόνης σε διάφορες περιοχές ποικίλλει. Έτσι, σε έμβρυα ποντικού η ιστόνη εμφανίζει διάχυτη κατανομή αλλά είναι επίσης συγκεντρωμένη στην περικεντρική (συστατικά ετεροχρωματινική) χρωματίνη. Από την άλλη δεν ενσωματώνεται στο εν δυνάμει ετεροχρωματινικό ανενεργό X χρωμόσωμα. Σε κύτταρα πιθήκου COS-7 επίσης κατανέμεται περισσότερο στην ευχρωματίνη παρά στην ετεροχρωματίνη.(Fan et al., 2004; Rangasamy et al., 2003; Rangasamy et al., 2004) . Ενδιαφέροντα δεδομένα όμως προέρχονται και από ερυθροκύτταρα όρνιθας όπου η ιστόνη είναι ενσωματωμένη σε υψηλά επίπεδα στο μονωτή (insulator) που διαχωρίζει το γενετικό τόπο της β-σφαιρίνης από την παρακείμενη ετεροχρωματίνη. Το εύρημα αυτό όμως ,που δεν ανατρέπει τον εδραιωμένο ρόλο της στη μεταγραφική σίγηση, προτείνει ότι τα κυτταρολογικά αποτελέσματα που την τοποθετούν στις ετεροχρωματινικές περιοχές μπορεί να οφείλονται στην ενσωμάτωση της σε αντίστοιχες περιοχές μονωτών (Bruce et al., 2005).



Εικ 4. Χαρακτηριστικά της δομής της ιστόνης Htz1. Σύγκριση της αλληλουχίας της H2A.Z του βατράχου *Xenopus leavis* με αυτήν της ιστόνης H2A του ποντικού. **(A).** Αναγράφεται η περιοχή αλληλεπίδρασης και αγκίστρωσης στο τετραμερές H3-H4 (docking domain) που εμφανίζει αρκετές αλλαγές στα αμινοξικά κατάλοιπα (τονισμένες με κόκκινο χρώμα). Οι περιοχές που βρίσκονται σε πλαίσιο είναι σημαντικές για την ιδιαίτερη δράση της ιστόνης. Οι έλικες α 1, α 2 και α 3 σχηματίζουν τη χαρακτηριστική πύχωση ιστονών (Histone fold). **(B).** Τρισδιάστατη εικόνα που δείχνει την ενσωμάτωση ενός δισθενούς ιόντος Mn^{2+} . **(C).** Υπέρθωση των δομών H2A (καφέ) και H2A.Z (γαλάζιο) όπου διακρίνεται η τροποποίηση της δομής στη θηλιά L1. Καθώς η θηλιά αυτή μετέχει στις μοτοτυπικές αλληλεπιδράσεις H2A-H2B, εικάζεται ότι εμποδίζει το σχηματισμό μεικτών νουκλεοσωμάτων H2A-H2A.Z. Σε πλαίσιο η περιοχή αγκίστρωσης στο τετραμερές H3-H4. (Τροποποιημένη από Suto et al., 2000)

Πρόσφατα μια πιθανή λύση στην παράδοξη αυτή συμπεριφορά διαφάνηκε από την ανακάλυψη ότι η H2A.Z υφίσταται τροποποίηση από την ουμπικιτίνη σε διαφοροποιημένα κύτταρα ποντικού (Sarcinella et al., 2007). Η μονή αυτή τροποποίηση (mono-ubiquitination) φαίνεται να συνοδεύει την ιστόνη στην ενσωμάτωση της στο ανενεργό Χ χρωμόσωμα αλλά όχι και στην περικεντρική ετεροχρωματίνη, διακρίνοντας με αυτό τον τρόπο την παρουσία της στη συστατική (περικεντρική) και εν δυνάμει (Χ ανενεργό χρωμόσωμα) ετεροχρωματίνη. Η H2A.Z βρέθηκε να απομονώνεται με νουκλεοσώματα που επίσης φέρουν τη χαρακτηριστική τροποποίηση της ενεργής μεταγραφικά χρωματίνης μεθυλίωση του καταλοίπου λυσίνης 4 της ιστόνης H3 (H3K4me) και όχι την μεθυλιωμένη λυσίνη 9 (H3K9me), που είναι η χαρακτηριστική τροποποίηση της ετεροχρωματίνης. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι ναι μεν υπάρχει ενσωμάτωση στη εν δυνάμει ετεροχρωματίνη αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό της βρίσκεται στην ευχρωματίνη (Sarcinella et al., 2007).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι τελικά σύμφωνα με τις προγενέστερες μελέτες στο *S.cerevisiae* στον οποίο έχουν γίνει οι περισσότερες εκτεταμένες μελέτες για το ρόλο της Htz1 *in vivo*. Αρχικά η ιστόνη αυτή βρέθηκε να ενσωματώνεται στους υποκινητές γονιδίων όπως τα γονίδια *GAL1*, *SUC2* και *PHO5* και προτάθηκε ο ρόλος της στην έναρξη της μεταγραφής (Adam et al., 2001; Larochelle and Gaudreau, 2003; Santisteban et al., 2000). Στη συνέχεια σε μελέτες σε όλη την έκταση του γονιδιώματος καθορίστηκε ο αριθμός των γονιδίων που επηρεάζονται μεταγραφικά απουσία της ιστόνης αυτής. Σχεδόν 200 γονίδια βρέθηκε να επηρεάζονται αρνητικά από την απώλεια της Htz1. Ωστόσο, τα γονίδια που η Htz1 παίζει ρόλο ενεργοποιητή ομαδοποιούνται σε ομάδες 2-3 γονιδίων που εκτείνονται σε μήκος περίπου 10 kb. Ακόμη περισσότερο από τις 18 αυτές HZAD ενεργοποιημένες περιοχές (H2A.Z Activated Domains, HZAD) οι 14 βρίσκονται σε περιοχές υποτελομερικές. Η κατανομή αυτή αποδείχθηκε ότι προστάτευε τις περιοχές των γονιδίων αυτών από την επέκταση του συμπλόκου SIR – του κύριου μηχανισμού δημιουργίας ετεροχρωματίνης στο σακχαρομύκητα (Meneghini et al., 2003).

Η ενσωμάτωση της Htz1 από το σύμπλοκο SWR1-C.

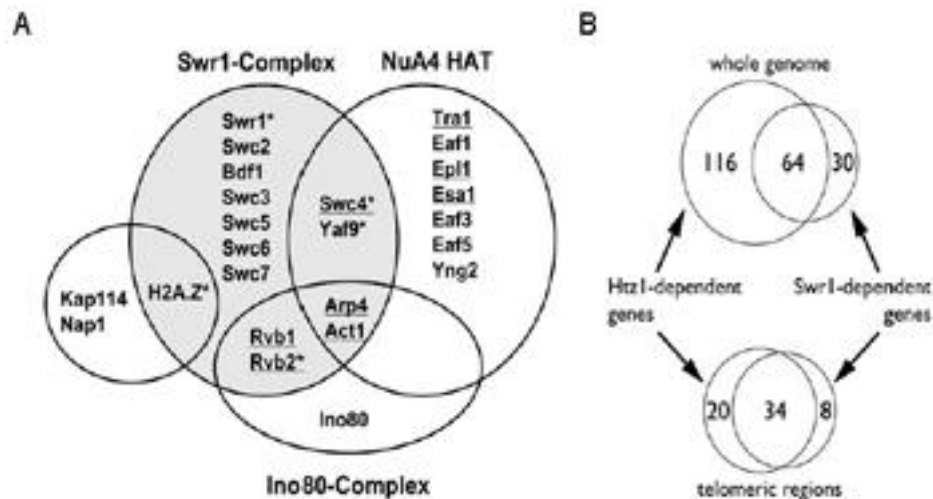
Η ενσωμάτωση της Htz1 πραγματοποιείται από το σύμπλοκο SWR1-C που πήρε το όνομα του από την ομώνυμη ATPάση Swr1 που φαίνεται να παρέχει τη απαραίτητη χημική ενέργεια που θα μετατραπεί σε μηχανική ενέργεια στο συμπλόκο και ανήκει στην ευρύτερη υπερ-οικογένεια των SWI ATPασών. Το σύμπλοκο ανακαλύφθηκε στο *S.cerevisiae* και αποτελείται από 13 υπομονάδες μερικές εκ των οποίων φαίνεται να είναι κοινές υπομονάδες και άλλων αναδιαμορφωτών της χρωματίνης (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004) (εικ. 5A). Ομόλογες πρωτεΐνες με αντίστοιχο ρόλο βρέθηκαν τελευταία και στη *D.melanogaster* αλλά και σε θηλαστικά (Cai et al., 2005; Jin et al., 2005; Ruhl et al., 2006) .Το σύμπλοκο SWR1-C αποτελεί μια εξαιρετική μηχανή καθώς είναι το πρώτο χαρακτηρισμένο σύμπλοκο που μπορεί να αντικαθιστά ετεροδιμερή H2A-H2B με ετεροδιμερή Htz1-H2B σε προσχηματισμένες νουκλεοσωμικές διατάξεις. Τα *in vitro* πειράματα που έχουν γίνει έδειξαν ότι την ιδιότητα αυτή την κατέχει ξεχωριστά και μόνο το SWR1-C και όχι τα υπόλοιπα γνωστά σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης, αποτελώντας το μόνο άμεσο και ειδικό μηχανισμό που είναι γνωστός σήμερα και που μπορεί να εκτελεί RI ενσωμάτωση (Mizuguchi et al., 2004) .

Το σύμπλοκο SWR1-C φαίνεται να επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τα ίδια γονίδια με την Htz1, αν και δεν υπάρχει απόλυτη επικάλυψη των λειτουργιών (εικ.5B). Επίσης, η στρατολόγηση του SWR1-C είναι εμπλουτισμένη στα γονίδια που φέρουν Htz1 (Kobor et al., 2004; Meneghini et al., 2003). Παρόλα αυτά στρατολόγηση του SWR1-C που να έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση της Htz1 *in vivo* περιγράφηκε για πρώτη φορά από τη παρούσα μελέτη (Gligoris et al., 2007) (βλ. αποτελέσματα).

Μια σημαντική μηχανιστική λεπτομέρεια αφορά στην ενσωμάτωση των ετεροδιμερών. Τα σημεία επαφής των ετεροδιμερών είναι ομοτυπικές επαφές. Αυτό σημαίνει ότι μεταξύ τα διμερών H3-H4 διμερών επαφή στο τετραμερές υπάρχει μόνο μεταξύ των H3 α-ελίκων και αντίστοιχα μόνο μεταξύ των L1 θηλιών της H2A (Luger et al., 1997; Workman and Kingston, 1998). Ωστόσο, η L1 θηλιά που σχηματίζεται από την Htz1 έχει –λόγω των αμινοξικών διαφορών που προαναφέρθηκαν- ασυμβατότητα με την L1 θηλιά της κύριας H2A (εικ.4C) Αυτό σημαίνει ότι η ενσωμάτωση ενός μόνο ετεροδιμερούς Htz1-H2B κατά πάσα πιθανότητα οδηγεί σε ένα ασταθές οκταμερές. Έτσι, είναι αρκετό πιθανό ότι το SWR1-C αποκαθιστά τελικά και τα δύο ετεροδιμερή οδηγώντας σε νουκλεοσώματα αμιγή -που περιέχουν δηλ. αποκλειστικά Htz1 (Mizuguchi et al., 2004; Suto et al., 2000).

Η στρατολόγηση του SWR1-C μέχρι σήμερα έχει αποδοθεί στον παράγοντα Bdf1 (Raisner et al., 2005). Ο παράγοντας αυτός απομονώνεται σε υπο-στοιχειομετρικές ποσότητες με το σύμπλοκο SWR1-C αλλά δεν έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα ότι μπορεί να στρατολογήσει το SWR1-C. Καθώς φέρει επαναλαμβανόμενα μοτίβα bromodomain -τα οποία προσδένονται σε ακετυλιωμένες λυσίνες των H3 και H4 αμινοτελικών άκρων, η στρατολόγηση του SWR1-C έχει αποδοθεί στην αναγνώριση αυξημένης ακετυλίωσης από τον Bdf1 (Matangkasombut and

Buratowski, 2003; Pamblanco et al., 2001). Σε συμφωνία με τα παραπάνω απώλεια του Bdf1 οδηγεί σε απώλεια ενσωμάτωσης της Htz1 σε μεμονωμένες περιοχές που έχουν εξεταστεί. Μέχρι σήμερα η ακετυλίωση του καταλοίπου λυσίνης 16 της ιστόνης H4 έχει αποδειχθεί η μόνη ειδική τροποποίηση που απαιτείται για την ενσωμάτωση της Htz1. Ωστόσο, η απαίτηση αυτή ισχύει μόνο για τις υποτελομερικές περιοχές (Babiarz et al., 2006; Shia et al., 2006). Επίσης, η πιθανότητα η στρατολόγηση του SWR1-C να μεσολαβείται από τον Bdf1 λόγω αναγνώρισης της H4K16 στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι αρκετά μικρή, καθώς η στρατολόγηση του Bdf1 δεν παρατηρείται όταν ακετυλιώνεται η H4K16 (Millar et al., 2004).



Εικ. 5. Υπομονάδες του συμπλόκου SWR1-Complex (SWR1-C) στο *S.cerevisiae*. Διαγράμματα Wenn. **(A)**. Οι μοναδικές υπομονάδες του συμπλόκου SWR1-C αλλά και οι κοινές υπομονάδες με τα σύμπλοκα NuA4 και INO80 (βλ. εισαγωγή). **(B)**. Η επικάλυψη των γονιδίων που ελέγχονται θετικά από την Htz1 και την ATPάση Swr1. Η επικάλυψη αυτή είναι σημαντικότερη κοντά στα τελομερή. (Τροποποιημένη από Kobor et al., 2004).

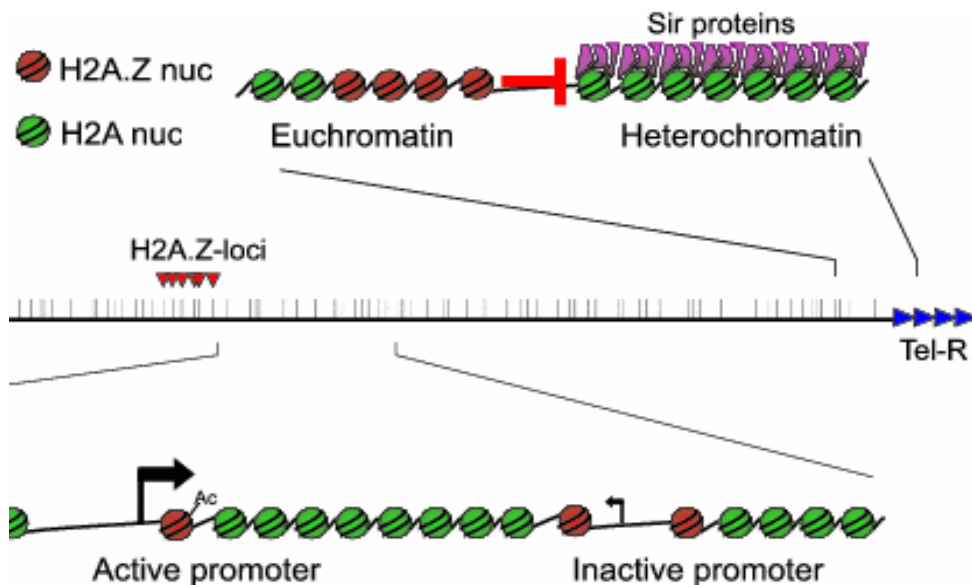
Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης της Htz1 στο *S.cerevisiae*.

Όπως και στα συστήματα των εξελικτικά ανώτερων οργανισμών έτσι και στο σακχαρομύκητα η Htz1 έχει εμπλακεί σε περισσότερες από μία λειτουργίες, κάτι αναμενόμενο για ένα συστατικό των νουκλεοσωμάτων. Ανάμεσα στους πολλούς ρόλους που της έχουν αποδοθεί ξεχωρίζει η γενικότερη αντι-αποσιωπτική της λειτουργία (anti-silencing), η ανεξιχνίαστη μέχρι σήμερα μηχανιστικά σημασία της στο ομαλό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και τη χρωμοσωμική σταθερότητα, και η λειτουργία της κατά τη μεταγραφή.

Η αντι-αποσιωπητική λειτουργία της Htz1.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε αρκετές μελέτες έχει βρεθεί απαίτηση της Htz1 σε υποτελομερικές περιοχές. Απουσία της Htz1 προκαλεί την αύξηση των επιπέδων μεταγραφής σε περίπου 100 γονίδια και μείωση σε περίπου 200. Ωστόσο, τα γονίδια στα οποία η Htz1 δρα ενεργοποιητικά διακρίνονται για τρεις λόγους. Σχηματίζουν καλά διακριτά συμπλέγματα (clusters), έχουν υψηλά επίπεδα ενσωμάτωσης της ιστόνης και περίπου το 50% των γονιδίων αυτών βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη από 35kb από τα τελομερή (υποτελομερικές περιοχές) (Meneghini et al., 2003).

Το σύμπλοκο SIR (SIR-Complex, SIR-C) αποτελείται από τρεις υπομονάδες (Sir 2,3 &4). Από αυτές η υπομονάδα Sir2 αποτελεί απακετυλάση της ιστόνης H4. Το σύμπλοκο αυτό εξαπλώνεται από τα άκρα των τελομερών όπου και στρατολογείται από το παράγοντα Rap1 μέχρι και 10kb στο εσωτερικό των χρωμοσωμάτων (εικ. 6). Η εξάπλωση αυτή γίνεται με αυτό-ενισχυόμενο τρόπο: καθώς προχωρά η απακετυλίωση, οι υπομονάδες Sir3-4 που αναγνωρίζουν και προσδένονται με μεγαλύτερη συγγένεια σε υποακετυλιωμένες ουρές H4, στρατολογούν εκ νέου τη Sir2, ξεκινώντας νέο κύκλο απακετυλίωσης και εξάπλωσης. Ο λόγος που το σύμπλοκο SIR δεν εξαπλώνεται περισσότερο στο εσωτερικό είναι αφενός ενεργητικοί μηχανισμοί (όπως η υπερακετυλίωση των H4 αμινο-τελικών ουρών και η δημιουργία μονωτών) και αφετέρου τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του συμπλόκου SIR (Grunstein et al., 1995; Hecht et al., 1995; Hoppe et al., 2002; Imai et al., 2000; Moazed, 2001; Tanny et al., 2004).



Εικ. 6. Κατανομή των νουκλεοσωμάτων Htz1 του χρωμόσωματος του III *S.cerevisiae*. Στην εικόνα αυτή φαίνεται αφενός η σποραδική κατανομή των Htz1 νουκλεοσωμάτων. Αφετέρου, αποδίδεται σχηματικά η ετεροχρωματινοποίηση από το σύμπλοκο SIR στις τελομερικές περιοχές, η δράση της Htz1 ως «μονωτή» των περιοχών αυτών, και ύπαρξη περιοχών HZAD (πυκνές περιοχές αυξημένης ενσωμάτωσης Htz1). Αφετέρου φαίνεται σχηματικά η ενσωμάτωση της Htz1 κατά προτίμηση στα νουκλεοσώματα των υποκινητών και η ακετυλίωση της στους ενεργούς υποκινητές. (Τροποποιημένη από Guillemette and Gaudreau, 2006).

Η διαπίστωση ότι από τα 200 γονίδια στα οποία η Htz1 δρα ενεργοποιητικά τα μισά βρίσκονται σε υπο-τελομερικές θέσεις, οδήγησε στην εξέταση της γενετικής και λειτουργικής αλληλεπίδρασης της Htz1 με το σύμπλοκο SIR. Έτσι, πράγματι ταυτόχρονη απαλοιφή της απακετυλάσης Sir2 αποκαθιστά τα επίπεδα έκφρασης περίπου των μισών υποτελομερικών γονιδίων που καταστέλλονται απουσία της Htz1 και αναπάντεχα, αποκατάσταση της έκφρασης περίπου του 25% των γονιδίων που δεν βρίσκονται σε υποτελομερικές περιοχές. Ακόμη περισσότερο, η αλληλεπίδραση αυτή είναι άμεση, καθώς απουσία της Htz1 τα επίπεδα του συμπλόκου SIR αυξάνονται δραματικά στις υποτελομερικές περιοχές. Ωστόσο, το υπόλοιπο 50% των γονιδίων που επηρεάζει θετικά η Htz1 δεν αποκαθιστούν την έκφραση τους απουσία και της Sir2 (Meneghini et al., 2003).

Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι εκτός από το σύμπλοκο SIR πρέπει να υπάρχει και ένας δεύτερος κατασταλτικός μηχανισμός που ενεργοποιείται σε υποτελομερικές περιοχές και τον οποίο η Htz1 αντιπαλεύει. Πράγματι, στις περιοχές αυτές φαίνεται να δρα εκτενώς η απακετυλάση ιστονών Hda1 (Robyr et al., 2002). Η απακετυλάση αυτή επηρεάζει αρνητικά την έκφραση και έχει προταθεί ότι στρατολογείται στους υποκινητές από το σύμπλοκο καταστολής Ssn6-Tup1 (Wu et al., 2001; Zhang and Reese, 2004). Τα αποτελέσματα αυτά αφήνουν ανοιχτό το ενδεχόμενο το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 να καταστέλλει τις ενεργοποιητικές δράσεις της Htz1 ή και το αντίστροφο.

Η ενεργοποιητική δράση της Htz1 στη μεταγραφή.

Από τις παραπάνω εργασίες προέκυψαν τα πρώτα στοιχεία για τη δράση της ιστόνης Htz1 και καθορίστηκε ο «ευχρωματινικός» ρόλος της ιστόνης αυτής στις υποτελομερικές περιοχές του *S.cerevisiae*.

Νέες μελέτες ήρθαν να συμπληρώσουν και να επεκτείνουν τα δεδομένα αυτά (Guillemette et al., 2005; Li et al., 2005; Millar et al., 2006; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005). Οι εργασίες αυτές απηύθυναν βασικά ερωτήματα που δεν είχαν απαντηθεί. Σχεδόν όλες περιέγραψαν την κατανομή της ενσωμάτωσης της Htz1 στο μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος. Επίσης, συσχέτισαν την παρουσία της Htz1 με την παρουσία μεταγραφής και αποπειράθηκαν να καθορίσουν στοιχεία *in cis* ή παράγοντες *in trans* που καθορίζουν την ενσωμάτωση της. Τέλος, μελετήθηκαν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της και η σημασία τους στις λειτουργίες της ιστόνης.

Η ανίχνευση της ενσωμάτωσης έγινε με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) σε συνδυασμό με την ανάλυση μικροσυστοιχιών (ChIP on chip). Αν και υπήρξαν διαφοροποιήσεις στην τεχνική (διακριτική ικανότητα μικροσυστοιχιών, έκταση του αναλυόμενου γονιδιώματος και τροποποιήσεις της μεθόδου ChIP) πέντε διαφορετικά εργαστήρια κατέληξαν ότι η Htz1 ενσωματώνεται σε ένα μεγάλο μέρος των υποκινητών των τάξης II γονιδίων (δηλ. των

γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II)- ενσωματώνεται περίπου στο 65% αυτών (Guillemette and Gaudreau, 2006) (εικ.6) Guillemette). Τα γονίδια αυτά βρέθηκαν να έχουν τυχαία κατανομή στο γονιδίωμα χωρίς ιδιαίτερη προτίμηση σε κεντροσωμικές ή υποτελομερικές περιοχές αν και σαφώς δεν αποκλείονται από αυτές. Σχεδόν όλες οι μελέτες κατέληξαν ότι η ενσωμάτωση αυτή είναι μεγαλύτερη στις περιοχές των υποκινητών και όχι στις κωδικές περιοχές αν και σημαντικές εξαιρέσεις επίσης παρατηρήθηκαν.

Η συσχέτιση με την μεταγραφή (εξετάζοντας τα επίπεδα της RNA πολυμεράσης II) έδειξε ότι υπάρχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της παρουσίας της RNA πολυμεράσης και των επιπέδων ενσωμάτωσης της Htz1 (Guillemette et al., 2005; Li et al., 2005; Millar et al., 2006; Raisner et al., 2005). Έτσι, όσο περισσότερο αδρανές μεταγραφικά είναι ένα γονίδιο τόσο μεγαλύτερα είναι τα επίπεδα της Htz1 στον υποκινητή του και αντιστρόφως όσο περισσότερο ενεργό μεταγραφικά τόσο μικρότερη η ενσωμάτωσή της. Παρόλο που κάτι τέτοιο προκαταλαμβάνει για πιθανό κατασταλτικό ρόλο, στα γονίδια που έχει αρνητική επίδραση στην μεταγραφή (δηλ. στα περίπου 100 γονίδια των οποίων η μεταγραφή αυξάνεται απουσία της Htz1) η ενσωμάτωση της Htz1 είναι χαμηλή στα γονίδια αυτά σε αντιδιαστολή με την παρουσία της στα γονίδια που παίζει θετικό ρόλο (περίπου 200) και όπου βρίσκεται σε ψηλά επίπεδα ενσωματωμένη (Li et al., 2005). Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι στα γονίδια που φαίνεται να παίζει κατασταλτικό ρόλο η Htz1 ενδεχομένως να δρα έμμεσα.

Ένα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να τονιστεί είναι ότι ο αριθμός των υποκινητών που φέρουν την Htz1 είναι πολλαπλάσιος των γονιδίων που φαίνεται να επηρεάζονται αρνητικά από την απώλεια της (βλ. παραπάνω). Το φαινόμενο αυτό είναι συμβατό με το γεγονός ότι οι υποκινητές αυτοί στην πλειονότητα τους είναι πρακτικά ανενεργοί στις συνθήκες που μελετήθηκαν. Αυτό συμβαίνει γιατί στα πλούσια θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες αυτές τα γονίδια αυτά δεν ενεργοποιούνται και άρα δεν εκδηλώνεται η αναμενόμενη απώλεια των μεταγραφικών επιπέδων απουσία της Htz1 (Li et al., 2005).

Κατά τη μεταγραφή ιδιαίτερα στο *S.cerevisiae* τα νουκλεοσώματα του υποκινητή σε μεγάλο βαθμό προοδευτικά αποσχηματίζονται και οι ιστόνες εξωθούνται (histone eviction) (Boeger et al., 2003, 2004; Deckert and Struhl, 2001; Reinke and Horz, 2003). Ωστόσο, η Htz1 δείχνει ταχύτερο ρυθμό απώλειας από τους υποκινητές σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ιστόνες, φανερώνοντας ότι τα ετεροδιμερή Htz1-H2B ενδεχομένως να έχουν ρυθμιστικό ρόλο κατά τη διαδικασία της μεταγραφικής έναρξης (Li et al., 2005; Zhang et al., 2005). Ακόμα και σε αυτό το γεγονός όμως έχουν βρεθεί εξαιρέσεις όπου τα επίπεδα της Htz1 στους υποκινητές αυξάνονται, κάτι που δεν επιτρέπει να γενικευθεί ο κανόνας που θέλει απαραίτητη πτώση της Htz1 με την έναρξη της μεταγραφής (Raisner et al., 2005).

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η δράση της Htz1 είναι εξειδικευμένη. Έτσι, υποκινητές που έχουν χαμηλούς ρυθμούς μεταγραφής διατηρούν επίπεδα Htz1 και στην περίπτωση αυτή η ιστόνη φαίνεται να έχει υποβοηθητικό ρόλο. Όσο πιο ισχυρός είναι ένας υποκινητής και όσο μεγαλύτερος ο ρυθμός με τον οποίο επαναπυροδοτείται η μεταγραφή τόσο μεγαλύτερη είναι η

απουσία της ιστόνης. Το παραπάνω σενάριο φαίνεται να συμφωνεί και με το γεγονός ότι οι υποκινητές που φέρουν τα υψηλότερα επίπεδα Htz1 στα νουκλεοσώματα τους ανήκουν στην κυρίαρχη κατηγορία των γονιδίων που δεν περιέχουν TATA-box (Zhang et al., 2005).

Στο *S.cerevisiae* η πλειονότητα των υποκινητών δεν φέρει TATA-box. Το σύμπλοκο TFIID το οποίο φέρει τον TBP –που λειτουργεί στους υποκινητές αυτούς- στρατολογείται στους υποκινητές. Όταν δεν υπάρχει TATA-box ο προσανατολισμός της μεταγραφής καθορίζεται από άλλες *cis* αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από το TFIID. Τα γονίδια αυτά που φαίνεται να επιτελούν συστατικές λειτουργίες (housekeeping genes) μπορεί να μεταγράφονται έντονα αλλά συχνότερα έχουν μέτρια επίπεδα μεταγραφής (Basehoar et al., 2004; Huisinga and Pugh, 2004; Zanton and Pugh, 2004). Η ιστόνη Htz1 βρέθηκε να έχει χαμηλότερη παρουσία στα γονίδια που φέρουν TATA-box και υψηλότερη στα γονίδια που δεν φέρουν TATA-box (Zhang et al., 2005). Αυτό συσχετίζει την παρουσία της Htz1 με τη συστατική μεταγραφή και σημαίνει ότι οι υποκινητές με χαμηλή αλλά παρούσα μεταγραφική ενεργότητα περιέχουν σχετικά υψηλά επίπεδα Htz1. Στους υποκινητές αυτούς η Htz1 είναι σημαντική για την μεταγραφή κατά πάσα πιθανότητα στο επίπεδο της επανεκκίνησης (reinitiation) (βλ. επίσης αποτελέσματα).

Ο ρόλος της Htz1 κατά την έναρξη της μεταγραφής φαίνεται αρκετά δυσνόητος αν αναλογιστεί κανείς ότι μπορεί βρεθεί σε ανενεργούς υποκινητές αλλά και σε ενεργούς. Ωστόσο, κάποια επιπλέον στοιχεία για τη σημασία της παρουσίας αυτής έχουν προκύψει από την ανάλυση της ακετυλίωσης της.

Η ακετυλίωση της N-τελικής ουράς της ιστόνης Htz1.

Γενετικές και βιοχημικές ενδείξεις ότι η Htz1 ακετυλιώνεται υπήρξαν από νωρίς (Allis et al., 1986), ωστόσο δεν είχε μελετηθεί η έκταση, ο μηχανισμός και η φυσιολογική σημασία αυτών των τροποποιήσεων. Το σύμπλοκο SWR1-C μοιράζεται ένα αριθμό υπομονάδων με το σύμπλοκο NuA4 (εικ.5) (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004), η καταλυτική μονάδα του οποίου –ακετυλοτρανσφεράση Esa1- ακετυλιώνει τα αμινο-τελικά άκρα της ιστόνης H4 (Allard et al., 1999; Reid et al., 2000; Yan et al., 2000) και πιθανώς και την H2A (Suka et al., 2001) . Η συγγένεια αυτή αλλά και άλλα σποραδικά αποτελέσματα οδήγησε διαφορετικά εργαστήρια στην αναγνώριση του συμπλόκου NuA4 και της ακετυλοτρανσφεράσης αυτού Esa1 ως το κύριο παράγοντα ακετυλίωσης της Htz1 (Babiarz et al., 2006; Keogh et al., 2006; Millar et al., 2006) .

Μεταξύ των αποτελεσμάτων των εργαστηρίων υπάρχουν επιμέρους διαφορές –ακόμη και αντιθέσεις. Ωστόσο, υπάρχουν και αναμφίβολα κοινά συμπεράσματα. Έτσι, βρέθηκε ότι τέσσερα κατάλοιπα λυσίνης (K3, K8, K10 και K14) μπορούν να ακετυλιωθούν, με την ακετυλίωση στο κατάλοιπο λυσίνης 14 (K14) να είναι η περισσότερο εξαπλωμένη τροποποίηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα σημαντικό μέρος της χρωματινικής Htz1 δεν έφερε ακετυλίωση αλλά και ότι

ένα μικρό μέρος της διαλυτής στο πυρηνόπλασμα μορφής της είναι ακετυλιωμένο (Babiarz et al., 2006).

Η ακετυλίωση της χρωματινικής Htz1 χάνεται απουσία της καταλυτικής υπομονάδας Swr1 του συμπλόκου ενσωμάτωσης SWR1-C (Babiarz et al., 2006; Keogh et al., 2006; Millar et al., 2006). Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η ακετυλίωση αυτές (τουλάχιστον οι περισσότερες όπως θα φανεί στη συνέχεια) δεν επιτελούνται από ακετυλοτρανσφεράσες τύπου I που είναι κυτταροπλασματικές και των οποίων η δράση επί των ιστονών παραμένει ένα μυστήριο (Groth et al., 2007). Έτσι το παραπάνω αποτέλεσμα ερμηνεύθηκε ως μια απαίτηση για την αρχική ενσωμάτωση της Htz1 που ακολουθείται από ακετυλίωση. Το προτεινόμενο μοντέλο θέλει τις κοινές υπομονάδες SWR1-C και NuA4-C να παραμένουν προσδεμένες μετά την ενσωμάτωση και οι μοναδικές υπομονάδες του NuA4 να διαδέχονται τις αντίστοιχες υπομονάδες του SWR1-C και να εκτελούν την ακετυλίωση ,χρησιμοποιώντας τις κοινές υπομονάδες ως εξέδρα (Scaffold) για το σχηματισμό ενός λειτουργικού NuA4 (Babiarz et al., 2006). Αυτό το μοντέλο είναι σύμφωνο με τα *in vitro* πειράματα όπου σαφώς το SWR1-C μπορεί να ενσωματώνει σταθερά και γρήγορα ετεροδιμερή που δεν φέρουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Mizuguchi et al., 2004).

Ωστόσο, σε άλλα πειράματα η ακετυλίωση στην λυσίνη K14 φάνηκε να είναι απαραίτητη για την ενσωμάτωση της Htz1 στον υποκινητή του γονιδίου *PHO5* κατά το σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων όταν η μεταγραφή σταματά (Millar et al., 2006). Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι η ακετυλίωση αυτή πρέπει να συμβαίνει πρώτα. Ακόμη περισσότερο στον υποκινητή αυτό φάνηκε ότι η ενσωμάτωση συμβαίνει μέσα σε μόλις ένα λεπτό και δεν ακολουθεί το σχηματισμό νουκλεοσωμάτων που φέρουν ετεροδιμερή H2A-H2B, αφού η ιστόνη H3 (που αντανάκλα το σχηματισμό τετραμερούς H3-H4 και κατ' επέκταση το σχηματισμό νουκλεοσωμάτων) ενσωματώνεται με πολύ βραδύτερη κινητική (Millar et al., 2006). Το μοντέλο αυτό ανατρέπει δύο πολύ καλά εδραιωμένα χαρακτηριστικά που προέρχονται από τα βιοχημικά πειράματα. Αφενός προτείνει ως απαραίτητη για την ενσωμάτωση την ακετυλίωση της Htz1, κάτι που σαφώς δεν ισχύει *in vitro*. Αφετέρου προτείνει ότι η στρατολόγηση του ετεροδιμερούς Htz1-H2B που παρατηρείται είναι ενσωμάτωση, και άρα προηγείται του σχηματισμού νουκλεοσώματος. Ακόμη περισσότερο φαίνεται να προηγείται και της μη συζευγμένης με την αντιγραφή (RI) ενσωμάτωσης που σε μεγάλο βαθμό ακολουθεί την λήξη της μεταγραφής και είναι συζευγμένη με αυτήν (βλ. παραπάνω). Καθώς δεν παρουσιάστηκαν άλλοι γενετικοί τόποι που να εμφανίζουν την ίδια απαίτηση αλλά επειδή αντιθέτως από άλλες μελέτες προκύπτει ότι η απώλεια της ακετυλίωσης (με υποκαταστάσεις ακόμη και των τεσσάρων λυσινών από αδρανή κατάλοιπα) δεν επηρεάζει τα επίπεδα της ενσωμάτωσης της Htz1 (Babiarz et al., 2006; Keogh et al., 2006), το μοντέλο αυτό κατά πάσα πιθανότητα είτε εξυπηρετεί σπάνιες εξαιρέσεις είτε είναι λαθεμένο. Κατά συνέπεια, η πιθανή διαδοχή των δράσεων των δύο συμπλόκων – SWR1-C και NuA4-C - επί τη βάσει των κοινών υπομονάδων τους, αν και περιμένει απόδειξη, είναι αρκετά πιθανή.

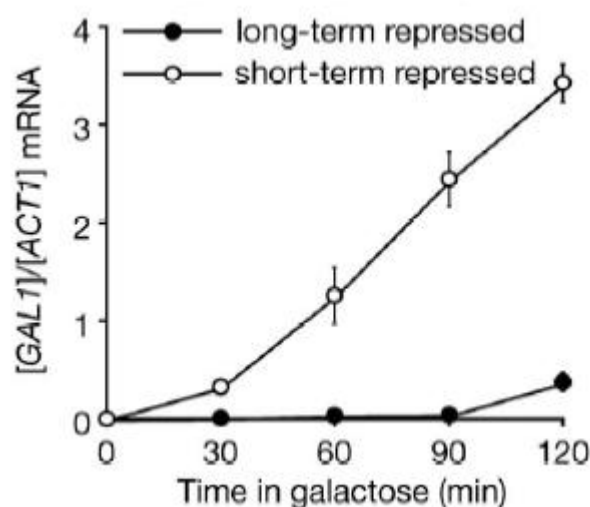
Όλες οι παραπάνω μελέτες απέτυχαν να παρουσιάσουν πειστικά δεδομένα για το ρόλο της ακετυλίωσης. Καθεμία πρότεινε μια ξεχωριστή λειτουργία χωρίς ωστόσο να τεκμηριωθεί πειστικά, όπως για παράδειγμα φάνηκε παραπάνω. Τα πλέον σημαντικά και συνεκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η ακετυλίωση των καταλοίπων αυτών (ιδιαίτερα της K14) –όταν συγκρίνεται με τη παρουσία των επιπέδων της ιστόνης Htz1- βρίσκεται σε υποκινητές που είναι μεταγραφικά ενεργοί και αποκλείεται από περιοχές που είναι αδρανείς (Millar et al., 2006) (εικ.6). Κατά συνέπεια η ακετυλίωση αποτελεί ένα σημάδι για ενεργούς υποκινητές (όπως π.χ. είναι και η ακετυλίωση της H3 στο κατάλοιπο λυσίνης K18) (Millar et al., 2006). Επίσης, από τις τέσσερις πιθανές ακετυλίωσεις η Esa1 (δηλ. το NuA4-C) εμπλέκεται άμεσα στην τροποποίηση μόνο των δύο θέσεων. Μια τρίτη οφείλεται στη δράση της ακετυλοτρανσφεράσης Gcn5 του συμπλόκου SAGA, και για την τελευταία δεν έχει ακόμη βρεθεί ακετυλοτρανσφεράση (Babiarz et al., 2006). Καθώς ένα χαμηλό ποσοστό της διαλυτής μη χρωματινικής Htz1 παραμένει ακετυλιωμένο (Babiarz et al., 2006), η πιθανότητα να ακετυλιώνεται από μια κυτταροπλασματική ακετυλοτρανσφεράση είναι υπαρκτή.

Το πιο συνεκτικό ρόλο για την ακετυλίωση τον εδραιώνει το γεγονός ότι υποκαταστάση και των τεσσάρων καταλοίπων λυσίνης που ακετυλιώνονται από αδρανή κατάλοιπα αργινίνης οδηγεί σε πτώση των μεταγραφικών επιπέδων και εξάπλωση του συμπλόκου SIR στις υποτελομερικές περιοχές (Babiarz et al., 2006). Το γεγονός αυτό έρχεται να εξηγήσει το αρχικό εύρημα, δηλ. τον ανταγωνισμό της Htz1 και του συμπλόκου SIR στις τελομερικές περιοχές και να αποδώσει το ρόλο αυτό εν μέρει στην ακετυλίωση της Htz1 (Meneghini et al., 2003). Παρόμοιο ρόλο παίζει σε αυτήν την περιοχή -και αποκλειστικά εκεί- και η ακετυλοτρανσφεράση Sas2, η οποία ακετυλιώνει συγκεκριμένα την ιστόνη H4 στο κατάλοιπο K16 (Shia et al., 2006) . Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι ταυτόχρονη απώλεια και των δύο επηρεάζει πολύ μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων απ' ό,τι θα προέκυπτε αθροιστικά, κάτι που σημαίνει ότι η συνέργεια αυτή είναι ουσιαστικά που επιδρά στην εξάπλωση του SIR. Ακόμη περισσότερο, η ακετυλίωση του καταλοίπου K16 της ιστόνης H4 απαιτείται για την ενσωμάτωση της Htz1 στις τελομερικές περιοχές και μόνο (Shia et al., 2006). Τα παραπάνω αποδεικνύουν μια λειτουργική εξάρτηση της δράσης της Htz1 από την ακετυλίωση της H4.

Παρόλο που τα παραπάνω δίνουν κάποιες απαντήσεις, πολλά παραμένουν τα ανοιχτά ερωτήματα που αφορούν στους μηχανισμούς που επηρεάζονται από την ακετυλίωση της Htz1. Ένα ενδιαφέρον σενάριο που προτάθηκε είναι ότι η ακετυλίωση της Htz1 ενδεχομένως να αποτρέπει την εξώθηση του ετεροδιμερούς από το ίδιο το SWR1-C, καθώς η αντίδραση ενσωμάτωσης από το SWR1-C δεν φαίνεται να είναι ισχυρά μονόδρομη και ενδεχομένως να συμβαίνει και στην αντίθετη κατεύθυνση. Μέσω της ακετυλίωσης η Htz1 πιθανώς να μην επιτρέπει την αναγνώριση της από το SWR1-C αποτρέποντας την εξώθηση του ετεροδιμερούς από το SWR1-C (Babiarz et al., 2006).

Η ενσωμάτωση της Htz1 και το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης των GAL γονιδίων.

Το φαινόμενο της επανενεργοποίησης του γονιδίου *GAL1* (δηλ. μετά απο μια πρώτη ενεργοποίηση να ακολουθήσει ολιγόωρη καταστολή με το πέρασμα σε γλυκόζη και στη συνέχεια νέα ενεργοποίηση με την μεταφορά σε γαλακτόζη των κυττάρων) συνοδεύεται για πολλά χρόνια από μια σημαντική ανέκδοτη παρατήρηση. Καθώς ο υποκινητής αυτός χρησιμοποιείται ευρέως για την επαγωγή και έκφραση πρωτεϊνών στο *S.cerevisiae* λόγω της ισχύος του, πολλοί –όχι μόνο όσοι δουλεύουν με το μεταγραφικό σύστημα- έχουν παρατηρήσει ταχύτερη κινητική κατά την επανενεργοποίηση του (εικ. 7).



Εικ. 7. Η εκδήλωση της μεταγραφικής μνήμης στο γονίδιο *GAL1*. Στην εικόνα φαίνεται η διαφορά στην κινητική της αρχικής ενεργοποίησης (δηλ. μετά από καταστολή μακράς διάρκειας, long term repressed) και της κινητικής επανενεργοποίησης (δηλ. ενεργοποίησης μετά από μια αρχική ενεργοποίηση που ακολουθείται από μια σύντομη καταστολή, short term repressed). Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε μεταγραφική μνήμη καθώς η μεταγραφή εκδηλώνεται ταχύτερα αν έχει ακολουθήσει σχετικά πρόσφατη ενεργοποίηση. (Από Brickner et al., 2007).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το πέρασμα της RNA πολυμεράσης II συνοδεύεται από την ενσωμάτωση ιστονών στις περιοχές που μεταγράφονται. Το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί και στο *S.cerevisiae* και ειδικά στο γονίδιο *GAL10* (Schwabish and Struhl, 2004, 2006). Στην περίπτωση αυτή προτάθηκε ότι η τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στο κατάλοιπο λυσίνης 4 (H3K4me3), μια τροποποίηση που συνοδεύει την μεταγραφή και εντοπίζεται μόνο στο 5' άκρο του μεταγραφόμενου γονιδίου, παραμένει σε υψηλά επίπεδα για 1-2 διαδοχικές διαιρέσεις μετά τη λήξη της μεταγραφής ενώ η υπεύθυνη μεθυλοτρανσφεράση (Set1) δεν είναι πλέον παρούσα (Ng et al., 2003). Αυτό οδήγησε στην πρόταση ότι η τροποποίηση αυτή μπορεί να αποτελεί ένα «σημάδι» της πρόσφατης μεταγραφής, προετοιμάζοντας έτσι το γονίδιο για ένα νέο κύκλο μεταγραφής (Ng et al., 2003). Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, προτάθηκε ότι υπάρχει κάποιος μηχανισμός που εξασφαλίζει τη μεταγραφική μνήμη (transcriptional memory) του φαινομένου που εξυπηρετεί στην γρήγορη δεύτερη ενεργοποίηση του. Στην απόπειρα ωστόσο να συσχετισθεί η γρήγορη δεύτερη ενεργοποίηση με την τριμεθυλίωση της H3K4 στην πράξη, η

αντίστοιχη ειδική μεθυλοτρανσφεράση Set1 της ιστόνης H3 δεν φάνηκε να είναι απαραίτητη για το φαινόμενο (Kundu et al., 2007).

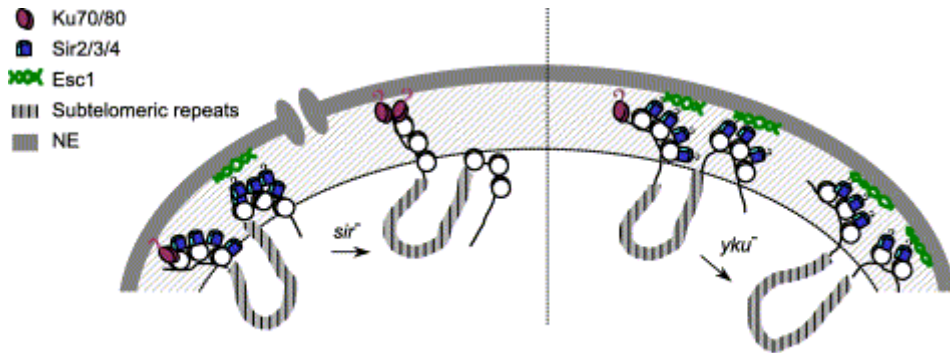
Σε πρόσφατες μελέτες όμως, ως μεσολαβητές αυτού του φαινομένου προτάθηκαν η ιστόνη Htz1 και το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης Swi/Snf αντίστοιχα (Brickner et al., 2007). Επιπλέον για την Htz1 προτάθηκε ότι η ενσωμάτωση της στους υποκινητές μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με την πυρηνική μεμβράνη η οποία προτάθηκε ότι προωθεί την ταχύτερη ενεργοποίηση (μεταγραφική μνήμη). Πριν γίνει μεγαλύτερη ανάλυση του φαινομένου της μεταγραφικής μνήμης θα περιγραφεί αρχικά η συσχέτιση της μεταγραφής με την πυρηνική περιφέρεια, που αποτέλεσε και το έναυσμα της συσχέτισης της ενσωμάτωσης της Htz1 με τη μεταγραφική μνήμη.

Η σχέση της μεταγραφής με τους πυρηνικούς πόρους στο *S.cerevisiae*.

Στο σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* η κινητικότητα της χρωματίνης είναι έντονη (Heun et al., 2001). Τα τελομερή και τα κεντροσώματα βρίσκονται στην πυρηνική περιφέρεια, σε μια τυπική διάταξη Rabl: από πολύ νωρίς – τέλη 19^{ου} και στις αρχές του 20^{ου} αιώνα- ο Boveri και ο Rabl πρότειναν ότι τα χρωμοσώματα κατέχουν σταθερές θέσεις στο μεσοφασικό πυρήνα. Ο Rabl μελετώντας ωκύτταρα του νηματώδους *Ascaris nematoides* πρότεινε ότι το κεντρόσωμα και τα τελομερή κάθε χρωμοσώματος βρίσκονται σε επαφή με την πυρηνική μεμβράνη κατά τρόπο όμως που φέρει το κεντρόσωμα στο ένα μισό και τα τελομερή στο άλλο μισό του πυρήνα. Αυτή η τοποθέτηση είναι γνωστή ως διάταξη Rabl (Rabl configuration). Η διάταξη Rabl είναι εμφανής και στο σακχαρομύκητα και τη δροσόφιλα αλλά όχι και στα θηλαστικά. Ο μεσοφασικός πυρήνας της δροσόφιλας παρουσιάζει περίπου 15 σημεία επαφής του χρωμοσωμικού άκρου με την πυρηνική μεμβράνη. Η μέση απόσταση αυτών των σημείων είναι 1-2 Mbp. Τα σημεία αυτά καθορίζουν τα όρια μεγάλων χρωματινικών θηλιών (chromatin loops) που αγκιστρώνονται στην πυρηνική μεμβράνη και προβάλλουν στο νουκλεόπλασμα (βλ. ανασκόπηση Spector, 2003)

Η αγκίστρωση αυτή στη περιφέρεια χαρακτηρίζεται από τυχαία κίνηση με ακτίνα περιορισμού περίπου 0.2 μm (Akhtar and Gasser, 2007). Η σχετική αυτή ακινησία όμως δεν ισχύει για τις περισσότερο εσωτερικές περιοχές των χρωμοσωμικών βραχιόνων. Κινήσεις που έχουν ακτίνα 0.5-0.7 μm δεν μπορούν να επηρεάσουν τη στασιμότητα των χρωμοσωμικών περιοχών στα κύτταρα των θηλαστικών ή της δροσόφιλα (με διάμετρο πυρήνα 5-10 μm) αλλά σίγουρα επιτρέπουν να χαρακτηριστεί η χρωματίνη του *S.cerevisiae* (με διάμετρο πυρήνα ca. 2μm) περισσότερο κινητική. Βάσει αυτών των δεδομένων, η πιθανότητα η κάθε περιοχή να βρεθεί στην περιφέρεια είναι αυξημένη, καθώς το 50% του σφαιρικού όγκου βρίσκεται σε ένα κέλυφος που υπαλείφει την περιφέρεια σε απόσταση μόλις 0.4 μm από τον πυρηνικό φάκελο (Akhtar and Gasser, 2007). Οι κινήσεις αυτές που χαρακτηρίζουν τόσο ενεργές όσο και ανενεργές μεταγραφικά περιοχές εξασφαλίζουν ότι κάθε περιοχή μπορεί να βρεθεί στην πυρηνική περιφέρεια, σε αντιδιαστολή με ότι συμβαίνει στους πυρήνες κυττάρων θηλαστικών και της *Drosophila*.

Στο *S.cerevisiae* η χρωματίνη χαρακτηρίζεται από υψηλή κινητικότητα εκτός κι αν βρίσκεται αγκιστρωμένη στον πυρηνικό φάκελο. Η αγκίστρωση αυτή μεσολαβείται από πρωτεΐνες που έχουν αυξημένη συνάφεια για την πυρηνική μεμβράνη. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πολύ λίγες τέτοιες πρωτεΐνες και ακόμη λιγότερες διαμεμβρανικές. Μια από αυτές με σημαντικό ρόλο στην αγκίστρωση των τελομερών είναι η Esc1 (Establishes Silent Chromatin) (Taddei et al., 2006).

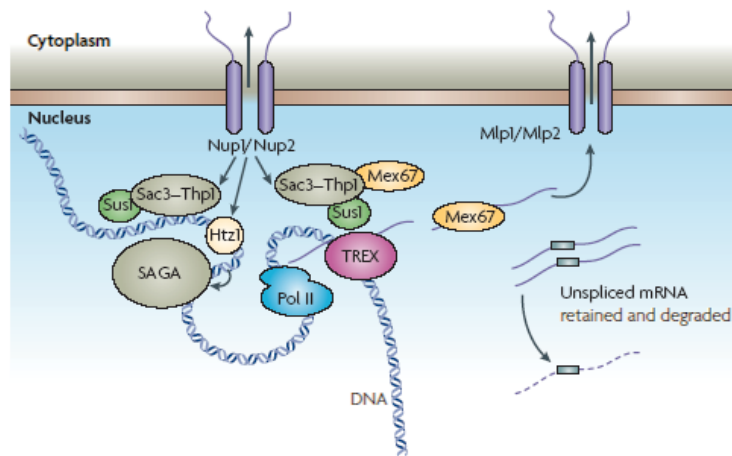


Εικ 8. Η αγκίστρωση των τελομερικών περιοχών στον πυρηνικό φάκελο οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής. Η δράση του συμπλόκου SIR μέσω της αλληλεπίδρασης με την Esc1 φαίνεται να περιορίζεται στην S φάση, ενώ και το SIR και το Yku70 μονοπάτι δρουν στη G1. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι όσο πιο σταθερή είναι η αλληλεπίδραση των τελομερικών περιοχών με τον πυρηνικό φάκελο τόσο πιο έντονη είναι η μεταγραφική σίγηση (transcriptional silencing). (Από Taddei et al., 2004).

Η πρωτεΐνη αυτή έχει βρεθεί αφενός να αλληλεπιδρά με την πυρηνική μεμβράνη αφετέρου να αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο SIR (Taddei et al., 2004). Απώλεια της, δεν οδηγεί σε ενεργοποίηση των τελομερικών περιοχών αλλά στην απελευθέρωση μέρους του SIR-C στο νουκλεόπλασμα. Παρόλη την μετατόπιση αυτή το σύμπλοκο εξακολουθεί να καταστέλλει την έκφραση τελομερικών γονιδίων. Παρατηρείται όμως αυξημένη κινητικότητα και παρουσία των τελομερικών περιοχών στο εσωτερικό του νουκλεοπλάσματος. Ένας δεύτερος σημαντικός παράγοντας που αγκιστρώνει το σύμπλοκο SIR είναι η πρωτεΐνη Yku70 (Yeast-ku70) (εικ. 8). Φαίνεται ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν συνεργατικά στην αγκίστρωση του SIR και κατ' επέκταση των τελομερών (Gartenberg et al., 2004). Με τη χρήση ανοσοφθορισμού, οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκαν να εντοπίζονται στη περιφέρεια του πυρήνα και να σχηματίζουν εστίες. Ωστόσο σημαντικό είναι να τονιστεί ότι οι εστίες αυτές που συνεντοπίζονται με εστίες άθροισης τελομερών δεν συνεντοπίζονται με τους πυρηνικούς πόρους (Gasser et al., 2004).

Οι πυρηνικοί πόροι στο σακχαρομύκητα σχηματίζουν συμπλέγματα που αποτελούνται από 10-30 μεμονωμένους πόρους (εικ.9). Σε ένα απλοειδές κύτταρο υπάρχουν περίπου 150 πυρηνικοί πόροι και 5-15 συμπλέγματα τους (Winey et al., 1997). Κάθε πόρος αποτελεί ένα σύμπλοκο 30 διαφορετικών πρωτεϊνών που σχηματίζουν μια οκταγωνική συμμετρική κυλινδρική δομή. Μια αναλυτική παρουσίαση της δομής ξεφεύγει της παρούσης, αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι το βασικό πρότυπο είναι το ίδιο με αυτό των πυρηνικών πόρων ανώτερων πολυκύτταρων οργανισμών, με τις περισσότερες νουκλεοπορίνες του

σακχαρομύκητα να έχουν συντηρηθεί εξελικτικά με υψηλά ποσοστά ομολογίας (Winey et al., 1997).



Εικ. 9. Μεταγραφή στην είσοδο των πυρηνικών πόρων. Το μοντέλο που προτείνεται για τη ρύθμιση της μεταγραφικής έκφρασης κοντά στους πυρηνικούς πόρους. Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, η κοινή υπομονάδα Sus1 του συμπλόκου SAGA και του πυρηνικού πόρου μεσολαβεί στη στρατολόγηση των γονιδίων. Το μοντέλο αυτό συνυπολογίζει την αλληλεπίδραση της Nup1 και Nup2 καθώς και των Mlp αλλά και συμπλόκων που εμπλέκονται στις μετα-μεταγραφικές διεργασίες (σύμπλοκο TREX). Ρόλος στη στρατολόγηση αποδίδεται και στην Htz1 (τροποποιημένη από (Akhtar and Gasser, 2007)).

Τα ανοιχτά ερωτήματα που υπήρχαν στη σχέση πυρηνικής περιφέρειας και χρωματίνης οδήγησαν σε μια πρώτη συστηματική μελέτη των αλληλεπιδράσεων νουκλεοπορινών με την χρωματίνη χρησιμοποιώντας την τεχνική ChIP και συνδυάζοντας την με τη χρήση μικροσυστοιχιών που έφεραν όλες τις κωδικές περιοχές των γονιδίων του σακχαρομύκητα (δηλ. δεν εξετάστηκαν ενδιάμεσες μη κωδικές περιοχές). Σε δύο εκτεταμένες μελέτες αναλύθηκαν αρκετές νουκλεοπορίνες και άλλες πρωτείνες με συνάφεια για τους πυρηνικούς πόρους (όπως καρυοφερίνες) για αλληλεπιδράσεις με τη χρωματίνη. Ένα σημαντικό ποσοστό γονιδίων βρέθηκε να αλληλεπιδρά με ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες (Casolari et al., 2005; Casolari et al., 2004). Το ενδιαφέρον είναι ότι η αλληλεπίδραση προέκυψε ότι είναι ειδική για συγκεκριμένα μόνο συστατικά του πυρηνικού πόρου αλλά και για ορισμένες καρυοφερίνες. Αυτοί οι μεταφορείς έχουν προηγουμένως εμπλακεί σε γενετικές αλληλεπιδράσεις με τις νουκλεοπορίνες και φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη και δρουν ως ισχυροί χρωματινικοί μονωτές (chromatin insulators) (Ishii et al., 2002; Ishii and Laemmli, 2003). Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, φάνηκε να αλληλεπιδρούν με το ποσοστό εκείνο των γονιδίων με την πλέον έντονη μεταγραφή (Casolari et al., 2004). Το πιο εντυπωσιακό όμως στοιχείο που προέκυψε από τις δύο μελέτες είναι η απόδειξη της επαγόμενης μετακίνησης προς την περιφέρεια και τους πυρηνικούς πόρους ως αποτέλεσμα της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων (Casolari et al., 2005; Casolari et al., 2004) (εικ.9).

Στη μελέτη της μετάβασης αυτής χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα γονιδίων με καλά μελετημένη επαγόμενη μεταγραφή. Το πρώτο είναι το σύστημα των GAL γονιδίων που αναλύθηκε παραπάνω. Το δεύτερο είναι το σύστημα των επαγόμενων γονιδίων από τη

φερομόνη παράγοντα-άλφα (alpha-factor). Όταν κύτταρα συζευκτικού τύπου **a** βρεθούν σε περιβάλλον με παράγοντα άλφα (που είναι η εκκρινόμενη ορμόνη κυττάρου του ετέρου συζευκτικού τύπου **α**) ξεκινάει ένα μονοπάτι που καταλήγει στην ενεργοποίηση των γονιδίων σύζευξης (mating genes). Τόσο τα γονίδια του *GAL* γενετικού τόπου (*GAL1, GAL10, GAL7*) που ενεργοποιούνται από τη γαλακτόζη όσο και το γονίδιο *FIG2* που ενεργοποιείται από παράγοντα άλφα παρουσίασαν αυξημένη πιθανότητα να βρεθούν στην περιφέρεια του πυρήνα και να συνεντοπιστούν με τους πυρηνικούς πόρους (Casolari et al., 2005; Casolari et al., 2004). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε η τεχνική FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) για την παρακολούθηση των χρωματινικών περιοχών. Περίπου 70% γενετικών τόπων *GAL* βρέθηκε να συνεντοπίζεται με την πυρηνική μεμβράνη σε συνθήκες επαγωγής ενώ το ποσοστό αυτό ήταν περίπου 20% σε συνθήκες καταστολής. Ανάλογα ήταν τα ποσοστά μετατόπισης και για το γονίδιο *FIG2*. Η μεταβίβαση αυτή αποδόθηκε στην αλληλεπίδραση των συστατικών των πυρηνικών πόρων με το παραγόμενο mRNA (Casolari et al., 2005).

Ακολούθησαν μελέτες στις οποίες έγινε χρήση του συστήματος LacI-GFP/LacO διάταξης (ή της παρόμοιας TetR-GFP/TetO) για την ανίχνευση της μετατόπισης ή ακόμη και της κινητικότητας των γονιδιακών τόπων (Abruzzi et al., 2006; Brickner and Walter, 2004; Cabal et al., 2006; Drubin et al., 2006; Luthra et al., 2007; Taddei et al., 2006). Το σύστημα αυτό αφενός επιτρέπει την ανίχνευση της θέσης ενός γενετικού τόπου, αφετέρου τη δυναμική της κίνησης των χρωμοσωμάτων *in vivo*. Το σύστημα αναπτύχθηκε το 1996 στο εργαστήριο του Belmont (Robinett et al., 1996) και αποτελείται από δύο στοιχεία (εικ.16): i) μια διάταξη DNA αποτελούμενη από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πρόσδεσης του μοτίβου πρόσδεσης lacO (lacO tandem repeat array) που στοχεύεται στην υπό μελέτη περιοχή και ii) έκφραση του καταστολέα LacI (που προσδένεται στη lacO διάταξη) ως χιμαιρική LacI-GFP πρωτεΐνη. Σε συνδυασμό με ένα τρόπο σήμανσης του πυρηνικού φακέλου το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται τόσο σε ανθρώπινα κύτταρα όσο και σε κύτταρα *D.melanogaster* και σακχαρομύκητα και επιτρέπει με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου και των κατάλληλων πηγών διέγερσης της GFP να αναλυθεί η κίνηση της σημασμένης χρωματίνης *in vivo* (Straight et al., 1996).

Όλες οι μελέτες επιβεβαίωσαν την αυξημένη συσχέτιση εντοπισμού στην πυρηνική μεμβράνη και μεταγραφής των γονιδίων (εικ.9). Εκτός από το *GAL* γενετικό τόπο το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε επιπλέον και σε άλλα δύο επαγόμενα γονίδια τα γονίδια *INO1* (η μεταγραφή του επάγεται από χαμηλά επίπεδα ινοσιτόλης) (Brickner and Walter, 2004) και το γονίδιο *HXK1* (το γονίδιο αυτό επάγεται απουσία γλυκόζης) (Taddei et al., 2006). Το γονίδιο *HXK1* βρίσκεται σε υποτελομερική περιοχή και έχει ήδη αυξημένη παρουσία στον πυρηνικό φάκελο, ωστόσο προτάθηκε ότι κατά την ενεργοποίησή του αυξάνει η αλληλεπίδραση του με τους πυρηνικούς πόρους. Όταν το γονίδιο αυτό ενεργοποιήθηκε συστατικά από τον ετερόλογο ενεργοποιητή VP16 αφενός παρατηρήθηκε μετατόπιση προς το εσωτερικό του πυρήνα, αφετέρου τα επίπεδα του παραγόμενου mRNA βρέθηκαν τέσσερις φορές χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα που του ενδογενή υποκινητή. Το φαινόμενο αυτό μάλιστα παρατηρήθηκε ενώ η στρατολόγηση της

RNA πολυμεράσης II διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα, αποσυνδέοντας τη παρουσία της μεταγραφικής μηχανής από την στρατολόγηση στην πυρηνική μεμβράνη. Προτάθηκε λοιπόν από τη μελέτη αυτή ότι η μετάβαση στην περιφέρεια είναι απαραίτητη για τη λεγόμενη βέλτιστη μεταγραφή (Taddei et al., 2006), δηλ. για την επίτευξη των υψηλότερων επιπέδων έκφρασης που είναι δυνατόν για τον εκάστοτε υποκινητή.

Με το ίδιο σύστημα αναλύθηκε η κινητικότητα και του GAL συμπλέγματος σε συνθήκες καταστολής και ενεργοποίησης. Η κινητικότητα στην περίπτωση αυτή (Cabal et al., 2006) εκφράζεται ως μέση τετραγωνική μετατόπιση της ακτίνας περιορισμού (Mean Square Displacement) και είναι ουσιαστικά ένα μέτρο της απόστασης που καλύπτει ένα γονίδιο στη μονάδα του χρόνου. Όσο μεγαλύτερη η τιμή τόσο πιο ελεύθερα και τυχαία κινείται μια περιοχή. Όσο μικρότερη τόσο περισσότερο περιορισμένη και εντοπισμένη είναι η θέση ενός γονιδίου. Οι μελέτες αυτές κατέληξαν σε ένα σημαντικό συμπέρασμα. Τα γονίδια τα οποία βρίσκονται προς το εσωτερικό του πυρήνα έχουν υψηλότερη κινητικότητα ανεξάρτητα από το εάν μεταγράφονται ή όχι, από τα γονίδια που μεταγράφονται στην πυρηνική περιφέρεια που έχουν περίπου 40% χαμηλότερη ακτίνα δράσης (Cabal et al., 2006), η οποία εδώ θα ονομαστεί χαμηλότερη «κινητικότητα». Και οι τρεις κατηγορίες γονιδίων που μελετήθηκαν (ανενεργά, ενεργά στο εσωτερικό και ενεργά στην περιφέρεια γονίδια) έχουν μια περιορισμένη κινητικότητα που δεν αποτελεί τυχαία κίνηση αλλά μια περιορισμένη κίνηση (confined movement) και που διαφέρει από τη τυχαία κίνηση Brown. Απαραίτητα για την συγκράτηση αυτή στην περιφέρεια προτάθηκε ότι είναι συστατικά του συμπλόκου SAGA όπως η υπομονάδα Ada2 αλλά και η πρωτεΐνη Sus1, που φαίνεται να αποτελεί ένα κοινό κρίκο των δύο συμπλόκων –SAGA και NPC- (Rodriguez-Navarro et al., 2004) (εικ.9).

Ωστόσο, οι μελέτες αυτές δεν συμφωνούν στις απόλυτες απαιτήσεις για τη στρατολόγηση. Για παράδειγμα ενώ η παραπάνω μελέτη υποδεικνύει ότι το SAGA είναι απαραίτητο (Cabal et al., 2006), η διαπίστωση αυτή διαφωνεί με τα αποτελέσματα που έγιναν με τον ετερόλογο ενεργοποιητή VP16 (Taddei et al., 2006). Ο ενεργοποιητής αυτός στρατολογεί υπομονάδες του SAGA- για την ακρίβεια οι υπομονάδες Ada βρέθηκαν ακριβώς μετά από μελέτες που χρησιμοποιούσαν τον VP16 ως ενεργοποιητή (Baumann et al., 1993; Sadowski et al., 1988). Κατά συνέπεια αν οι υπομονάδες αυτές είναι πράγματι ικανές και απαραίτητες θα έπρεπε η στρατολόγηση VP16 να οδηγεί στην πυρηνική μεμβράνη, το αντίθετο από αυτό που παρατηρήθηκε στην πράξη. Αντίστοιχα αντιφατικά αποτελέσματα ισχύουν και για την υπομονάδα Sus1. Έτσι ενώ σε κάποια πειράματα παρουσιάζεται ως απαραίτητη για τη μετάβαση (Cabal et al., 2006), σε κάποια άλλα δεν φαίνεται να παίζει ρόλο (Schmid et al., 2006).

Εν ολίγοις σχεδόν όλες οι πιθανές διεργασίες που θα μπορούσαν να έχουν ενοχοποιηθεί για την αυξημένη φυσική αλληλεπίδραση ενός ενεργοποιημένου γενετικού τόπου με τον πυρηνικό πόρο –ενεργοποιητές, συνενεργοποιητές, μεταγραφή, ωρίμανση του mRNA, διαδικασία εξόδου του mRNA- έχουν βρεθεί να είναι απαραίτητες (σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό) σε κάποιο από τα πολλά συστήματα μοντέλα ή συστήματα αναφοράς με κάποια από τις διαφορετικές

προσεγγίσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις η μόνιμη επωδός είναι ότι ο μηχανισμός είναι εξειδικευμένος για κάθε γονίδιο (gene specific). Κάτι τέτοιο βέβαια δεν φάνηκε να είναι η περίπτωση όταν μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα α στα γονίδια που ρυθμίζουν το πρόγραμμα της σύζευξης (mating specific genes) όπου και τα περίπου 30 γονίδια που ενεργοποιούνται και βρίσκονται διάσπαρτα σε όλα τα χρωμοσώματα, έχουν αυξημένη συγγένεια για την περιφέρεια (Casolari et al., 2005). Αυτό σημαίνει ότι τουλάχιστον σε αυτήν την περίπτωση η ρύθμιση είναι ενιαία και το φαινόμενο επιδρά σε μεγάλη έκταση της χρωματίνης παρά σε έναν μόνο γενετικό τόπο όπως στην περίπτωση του GAL συμπλέγματος γονιδίων.

Το μοντέλο που έχει προκύψει και συνοψιστεί (Akhtar and Gasser, 2007) θεωρεί ότι υπάρχουν δύο βήματα στη σταθερή σύνδεση των γονιδίων με την περιφέρεια και δη με τους πυρηνικούς πόρους. Σε ένα πρώτο βήμα παράγοντες που είναι ειδικοί για πρόσδεση στον υποκινητή –όπως μέλη του SAGA και η Sus1- οδηγούν σε μια πρώτη επαφή με τους πυρηνικούς πόρους. Για κάποια γονίδια η επαφή αυτή είναι αρκετή για να εδραιωθεί μια σταθερή αλληλεπίδραση με τον πυρηνικό φάκελο μέσω των συνενεργοποιητών και άλλων ειδικών παραγόντων του υποκινητή. Σε άλλες περιπτώσεις για να σταθεροποιηθεί αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να χρειαστεί η παραγωγή και η ωρίμανση του mRNA και η σύνδεση ισχυροποιείται από παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτές τις διεργασίες.

Μεταγραφική μνήμη και μετατόπιση των GAL γονιδίων στην περιφέρεια.

Καθώς έχει εδραιωθεί πλέον η μετάβαση προς την πυρηνική μεμβράνη και έχουν προταθεί οι μηχανισμοί που ενδεχομένως εμπλέκονται αλλά και εξυπηρετούνται από την μετατόπιση αυτή, μια νέα παρατήρηση ήρθε να προτείνει έναν επιπλέον –ενδεχομένως σημαντικό- ρόλο για την αλληλεπίδραση αυτή (Brickner et al., 2007).

Εξετάζοντας δύο διαφορετικά γονίδια (*GAL1* και *INO1*) παρατηρήθηκε η μερική συγκράτηση των γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια για αρκετές γενιές διπλασιασμού των κυττάρων, ακόμα κι αν τα κύτταρα βρισκόταν πλέον σε καταστολή. Από το περίπου 70% των γονιδίων που βρίσκονται στην πυρηνική περιφέρεια σε συνθήκες επαγωγής βρέθηκε να παραμένουν στην πυρηνική μεμβράνη περίπου το 50% του συνολικού πληθυσμού αφού τα κύτταρα βρισκόταν πλέον σε μεταγραφική καταστολή. Το φαινόμενο αυτό της κατακράτησης στην περιφέρεια παρατηρήθηκε εντονότερα στο *GAL* γενετικό τόπο παρά στο *INO1*.

Η συγκράτηση αυτή συσχετίστηκε με την ταχύτερη επανενεργοποίηση του *GAL1* μετά από μια σύντομη καταστολή (εικ.7). Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι τα γονίδια που παραμένουν στην περιφέρεια έχουν ένα «πλεονέκτημα» στην επανενεργοποίηση τους με αποτέλεσμα την ταχύτερη δεύτερη ενεργοποίηση. Έτσι, το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης που περιγράφηκε παραπάνω αποδόθηκε σε ακριβώς σε αυτήν την αυξημένη συγγένεια των γονιδίων για την πυρηνική μεμβράνη (Brickner et al., 2007).

Παραδόξως, το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης δεν παρατηρήθηκε για το γονίδιο *INO1* αν και η συγκράτηση στην περιφέρεια των γονιδίων αυτών παρουσιάστηκε αρκετά υψηλή. Καθώς η ιστόνη Htz1 βρέθηκε να εναποτείνεται κατά την περίοδο της σύντομης καταστολής σε επίπεδα διπλάσια από τα αντίστοιχα μιας μακρόχρονης καταστολής η παρουσία της συσχετίστηκε με την συγκράτηση των γονιδίων στην πυρηνική μεμβράνη. Επιπλέον δείχθηκε ότι η Htz1 φαίνεται να απατείται για την επανενεργοποίηση του *INO1* μετά από σύντομη καταστολή παρά για την αρχική ενεργοποίησή του, ωστόσο η επανενεργοποίηση αυτή δεν βρέθηκε να είναι ταχύτερη από την αρχική ενεργοποίηση σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου. Αντίστοιχα αποτελέσματα καταγράφηκαν και για το *GAL1* (στο οποίο όμως ισχύει το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης) όπου επίσης η ιστόνη βρέθηκε να είναι περισσότερο απαραίτητη για την ταχεία επανενεργοποίηση παρά για την αρχική ενεργοποίηση.

Παρόλο που στο *INO1* λοιπόν δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο της «μεταγραφικής μνήμης», η παρουσία της ιστόνης θεωρήθηκε ότι συμβάλλει αποκλειστικά στη κατακράτηση στην πυρηνική περιφέρεια, αφού απώλεια της ιστόνης επηρέασε αρνητικά και το συνεντοπισμό του γονιδίου με την πυρηνική μεμβράνη κατά την περίοδο της καταστολής μετά από μια πρώτη ενεργοποίηση. Το συμπέρασμα ήταν ότι χωρίς την ιστόνη η ήδη βραδύτερη στην περίπτωση αυτή επανενεργοποίηση του *INO1* γίνεται ακόμη ακόμη πιο αργή. Η Htz1 μέσω μιας αδιευκρίνιστης αλληλεπίδρασης με την πυρηνική περιφέρεια προτάθηκε ότι συγκρατεί το *INO1* στη μεμβράνη και είναι απαραίτητη για την κινητική της επανενεργοποίησης.

Αν και αντίστοιχα πειράματα δεν έγιναν για το *GAL1*, τα αποτελέσματα που αφορούν στον «επιγενετικό» όπως χαρακτηρίστηκε ρόλο της ιστόνης (λόγω της παραμονής των γονιδίων για αρκετές γενιές στην περιφέρεια) στο *INO1* επεκτάθηκαν και στο *GAL1*. Ο «επιγενετικός» αυτός ρόλος συνίσταται στη μεσολάβηση της Htz1 για συγκράτηση στην περιφέρεια μετά την πρώτη ενεργοποίηση (δηλ. κατά τη σύντομη καταστολή) με αποτέλεσμα την ταχύτερη επανενεργοποίηση. Η μελέτη αυτή κατέληξε ότι το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης οφείλεται στην Htz1 (έχει δηλ. χρωματινική βάση) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση της Htz1 με συστατικά της πυρηνικής μεμβράνης.

Χρωματινική βάση αποδόθηκε στο φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης των γονιδίων *GAL* και από μια ακόμη μελέτη (Kundu et al., 2007). Έτσι, το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε συγκεκριμένα στο σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης SWI/SNF. Η Swi2 ATPάση παρουσιάστηκε ως απαραίτητη για την δεύτερη ταχύτερη ενεργοποίηση κι όχι για την αρχική. Είναι αρκετά ενδιαφέρον ότι το ίδιο εργαστήριο στο παρελθόν είχε εδραιώσει το ρόλο του SWI/SNF στην αρχική ενεργοποίηση και ιδιαίτερα κατά τη φάση της μίτωσης όπου θεωρητικά η χρωματίνη είναι περισσότερο συμπυκνωμένη (Krebs et al., 2000). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η τριμεθυλίωση H3K4me3 που είχε προταθεί νωρίτερα (Schwabish and Struhl, 2006) ως το μεταγραφικό σήμα για την ταχύτερη δεύτερη ενεργοποίηση δεν είναι τελικά η αιτία του φαινομένου. Επιπλέον, αναγνώρισε το ρόλο του συμπλόκου ISWI ανταγωνιστικό προς τη δράση του συμπλόκου SWI/SNF (Kundu et al., 2007).

ΣΤΟΧΟΣ

Η ιστόνη Htz1 παρουσιάζει μερικά πολύ ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Είναι η μοναδική μέχρι σήμερα ιστόνη που ενσωμάτωναται με ένα μηχανισμό που αποκλείει από τους εκτεταμένους μηχανισμούς που συνοδεύουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Επιπλέον, η ενσωμάτωση αυτή είναι εξειδικευμένη για τους υποκινητές των γονιδίων. Το αποτέλεσμα είναι η Htz1 να αποτελεί ένα από τα πλέον χαρακτηριστικά διακριτικά της χρωματίνης. Η εμπλοκή της στη μεταγραφική ενεργοποίηση ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων έχει ερευνητική αξία *per se*, ωστόσο ακόμη μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η Htz1 αποτελεί και ένα «ευχρωματινικό» χαρακτηριστικό. Προκύπτει δηλ., μια δράση που αφορά στον ανταγωνισμό έναντι μηχανισμών που μπορούν με την κατασταλτική τους δράση να παραλλάξουν την αναπτυξιακή πορεία του κυττάρου, όπως είναι οι μηχανισμοί καταστολής που ελέγχει το σύμπλοκο SIR.

Προκύπτουν λοιπόν ενδιαφέροντα ερωτήματα: Ποιος ο ρόλος της Htz1 κατά τη μεταγραφή, δηλ. με ποιο (ή ποιούς) ενεργοποιητικούς παράγοντες συνεργεί; Ποια είναι η δυναμική της ενσωμάτωσής της κατά την ενεργοποίηση και την καταστολή; Πως καθορίζεται η ενσωμάτωση της στους υποκινητές; Υπάρχει περίπτωση να δρα ανταγωνιστικά και σε άλλους κατασταλτικούς μηχανισμούς που δρουν ωστόσο σε επίπεδο υποκινητών;

Πρόσφατα, η Htz1 ενεπλάκη σε δύο ενδιαφέροντα και «εντυπωσιακά» φαινόμενα: στη συγκράτηση των γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια και στο φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης. Ωστόσο, μπορούν εύκολα να εξαχθούν ενστάσεις για αυτές τις δράσεις. Η συσχέτιση της θέσης ενός γονιδίου και του μεταγραφικού δυναμικού του δεν είναι τόσο πρόδηλη! Ακόμα περισσότερο, το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης μέχρι σήμερα αποτελεί μια ιδιαιτερότητα των γονιδίων *GAL* και σε καμία περίπτωση δεν έχει την ίδια έκταση με την παρουσία της Htz1 στο 65% των γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Για να διερευνηθεί η δράση της Htz1 στα φαινόμενα αυτά πρέπει να αποσαφηνιστεί πρώτα τόσο η συσχέτιση μεταγραφής και ενδοπυρηνικής θέσης των γονιδίων όσο και η εμπλοκή στο φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης ενεργοποιητών (με κυτταροπλασματική συχνά δράση) η καθοριστική δράση των οποίων προηγείται αυτής της Htz1.

Για τη διερεύνηση των παραπάνω ερωτημάτων -που αποτέλεσε και το σκοπό αυτό της διατριβής αυτής, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των γονιδίων *GAL*. Το σύστημα αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα, τόσο μεταγραφικά όσο και βιοχημικά και μπορεί να χρησιμεύσει στην προκειμένη περίπτωση καθώς τα περισσότερα από τα παραπάνω φαινόμενα είτε πρωτοπεριγράφηκαν σε αυτό το σύστημα είτε το σύστημα αυτό προσφέρεται για την άμεση επιβεβαίωση και μελέτη τους.

Έτσι, ανιχνεύθηκε η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων κατά την μεταγραφική έναρξη και καθορίστηκε η διαδοχή των γεγονότων κατά τη μεταγραφική ενεργοποίηση και καταστολή προκειμένου να καθοριστεί η μεταγραφική δράση της ιστόνης Htz1 και η δυναμική της

ενσωμάτωσης της. Επιπλέον, μελετήθηκε μικροσκοπικά η μετάβαση των γονιδίων *GAL* στην πυρηνική μεμβράνη και εξετάστηκε η σύνδεση του φαινομένου με την μεταγραφή. Τέλος, μελετήθηκαν η πυρηνική/χρωματινική και η κυτταροπλασματική διάσταση του φαινομένου της μεταγραφικής μνήμης.

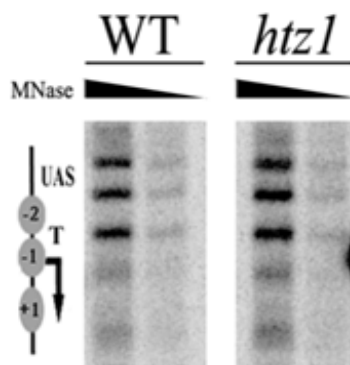
Ο γράφων *υποστηρίζει* ότι στη παρούσα διατριβή η διερεύνηση των ερωτημάτων που τέθηκαν και άρα οι στόχοι της διατριβής αυτής εκπληρώθηκαν στο μεγαλύτερο μέρος τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ιστόνη Htz1 δεν καθορίζει την νουκλεοσωμική διάταξη του υποκινητή *GAL1*.

Καθώς η Htz1 αποτελεί μέρος των νουκλεοσωμάτων υπάρχει η πιθανότητα να καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο τα νουκλεοσώματα των υποκινητών διατάσσονται. Μικρές αλλαγές στην χημική σύσταση των νουκλεοσωμάτων μπορούν να προκαλέσουν από μηδενικές έως και δραματικές αλλαγές στη διαμόρφωση της χρωματίνης (Shogren-Knaak et al., 2006). Για να καθοριστεί αν η απουσία της Htz1 αλλάζει σημαντικά τη διάταξη των νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή του *GAL1* γονιδίου χρησιμοποιήσαμε μια τεχνική νουκλεοσωμικής χαρτογράφησης χαμηλής ανάλυσης (low resolution nucleosome mapping) για να μελετηθεί η διάταξη τους. Με την τεχνική αυτή μπορεί να ανιχνευθεί η δημιουργία νέων υπερευαίσθητων θέσεων (με τη χρήση της Μικροκοκκικής Νουκλεάσης, MNase) και οι μετατοπίσεις της διάταξης των νουκλεοσωμάτων (Workman and Kingston, 1998).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες καταστολής (εικ.10). Όπως φαίνεται, δεν διαπιστώθηκαν αλλαγές στην διάταξη των νουκλεοσωμάτων (νουκλεοσώματα -2 και -1) παρουσία ή απουσία της Htz1. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι με την ευκρίνεια που μας επιτρέπει η τεχνική που χρησιμοποιήσαμε δεν παρατηρούνται δραματικές αλλαγές στη διάταξη των νουκλεοσωμάτων του υποκινητή *GAL1*.



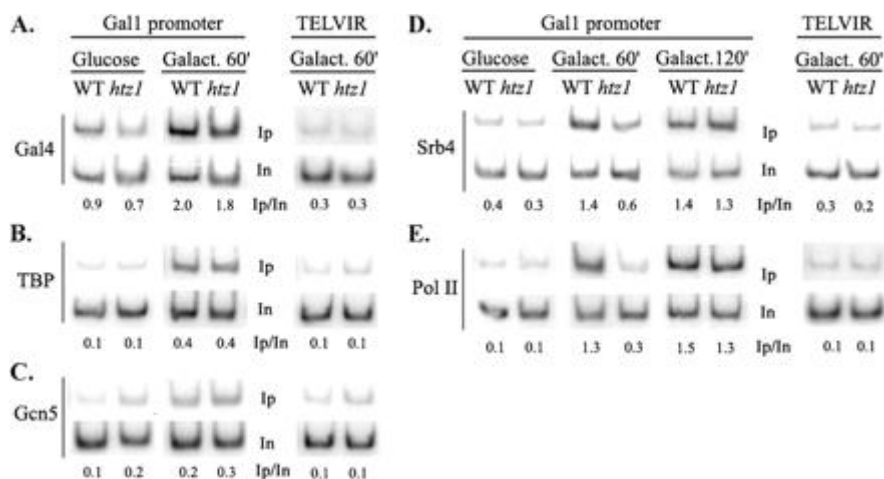
Εικ. 10. Η ιστόνη Htz1 δεν επιδρά στη διαμόρφωση της νουκλεοσωμικής διάταξης του υποκινητή *GAL1*. Διάταξη των νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή του *GAL1* σε σε κύτταρα σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζη (YPDex), στα στελέχη αγρίου τύπου (WT) και *htz1Δ*, όπως εμφανίζεται με τη χρήση της Μικροκοκκικής Νουκλεάσης (MNase). Επίσης παρουσιάζεται σχηματικά ο υποκινητής του *GAL1* παρουσιάζοντας τη θέση τριών νουκλεοσωμάτων (-1,-2,+1). Η περιοχή UAS (UAS-GAL) το στοιχείο TATA και η θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS). (Λεπτομέρειες για την τεχνική στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι)

Η ιστόνη Htz1 απαιτείται για την έγκαιρη στρατολόγηση του Μεσολαβητή.

Στοιχεία για τους παράγοντες που καθορίζουν την ενσωμάτωση της Htz1 στον υποκινητή του *GAL1* αλλά κυρίως για το ρόλος της στη μεταγραφή μπορούν να αντληθούν από την ανάλυση της έναρξης της μεταγραφής. Τα υπάρχοντα δεδομένα συνηγορούν στο ότι η Htz1 δεν είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση του ενεργοποιητή Gal4, αλλά η λειτουργική της αλληλεπίδραση με τους υπόλοιπους παράγοντες που στρατολογούνται κατά την ενεργοποίηση δεν έχει μελετηθεί (Adam et al., 2001).

Προκειμένου να ανιχνευθεί η χρονική στιγμή κατά την οποία η Htz1 μεσολαβεί κατά έναρξη της μεταγραφής παρακαλουθήσαμε με τη χρήση της μεθόδου ChIP (Chromatin Immunoprecipitation, Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης) την παρουσία ενεργοποιητών των οποίων η σειρά στρατολόγησης έχει χαρακτηριστεί..

Όπως φαίνεται και στην εικ.11A ο ενεργοποιητής Gal4 ανιχνεύεται στον υποκινητή σχεδόν σε ίδια επίπεδα σε συνθήκες ενεργοποίησης (60 λεπτά σε γαλακτόζη) τόσο παρουσία όσο και απουσία της Htz1 (σύγκριση WT με *htz1Δ* στέλεχος). Αξίζει να παρατηρηθεί ότι ο Gal4 βρίσκεται στον υποκινητή και σε συνθήκες καταστολής αφού η στρατολόγηση του σ' αυτήν την περίπτωση είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από τα επίπεδα της παρουσίας του στο δεξί τελομερικό άκρο του χρωμοσώματος VI. Η τελευταία περιοχή χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας καθώς κανένας από τους παράγοντες που εξετάζονται δεν στρατολογείται εκεί.



Εικ. 11. Η ιστόνη Htz1 απαιτείται για τη στρατολόγηση του Μεσολαβητή στον υποκινητή του GAL1. Η στρατολόγηση διαφόρων υπομονάδων του συμπλόκου έναρξης (PIC) στον υποκινητή του *GAL1* (αριστερά) και στο τελομερές VIR (TELVIR) ανιχνεύθηκε με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης και ραδιενεργή [³²ATP] PCR. Κύτταρα σε εκθετική φάση σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζης (YPDex) μεταφέρθηκαν πλούσιο υγρό θρεπτικό γαλακτόζης (YPGal) για 60 λεπτά (**A**, **B** και **C**) ή για 60 και 120 λεπτά (**D** και **E**). (**A**). Στρατολόγηση του ενεργοποιητή Gal4. (**B**). Στρατολόγηση σημασμένου HA-TBP (**C**). Στρατολόγηση σημασμένου HA-Gcn5 (**D**). Στρατολόγηση σημασμένου Myc-Srb4. (**E**). Στρατολόγηση της υπομονάδας Rpb1 της RNA Polymerase II. Στις εικόνες **A**, **B**, **C** ανιχνεύεται η περιοχή *GAL1* UAS. Στις εικόνες **D** και **E** ανιχνεύεται ο υποκινητής *GAL1* (core promoter). In (Input), IP (ImmunoPrecipitated), WT (Wild Type).

Σε παράλληλα πειράματα ανιχνεύθηκε η παρουσία του συμπλόκου SAGA (εξετάζοντας την παρουσία της ακετυλοτρανσφεράσης Gcn5), του συμπλόκου του Μεσολαβητού (εξετάζοντας την παρουσία της υπομονάδας Srb4) , του TBP (TATA-box Binding Protein) και του συμπλόκου της RNAPoIII (εξετάζοντας την παρουσία της μεγάλης υπομονάδας Rbp1).

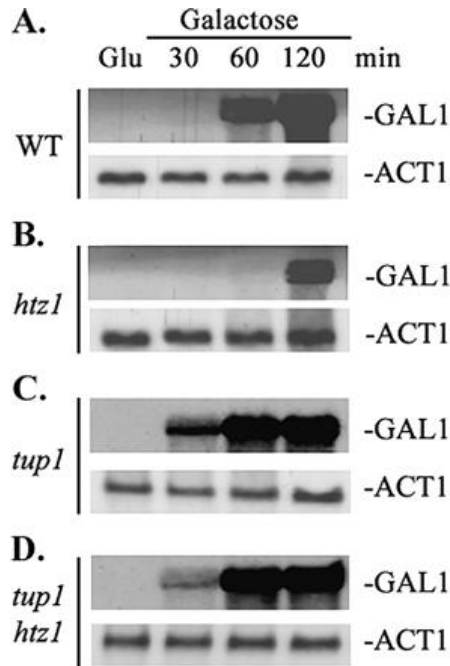
Όπως φαίνεται η Gcn5 υπομονάδα στρατολογείται στα ίδια επίπεδα παρουσία ή απουσία της ιστόνης Htz1(εικ. 11C). Το ίδιο ισχύει και για τον παράγοντα TBP (εικ. 11B). Όπως είναι αναμενόμενο η RNAPoIII (εικ.11E) ανιχνεύεται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στα πρώτα λεπτά της ενεργοποίησης, τα επίπεδα της όμως ανακάμπτουν μια ώρα μετά. Το ίδιο παρατηρείται και για την υπομονάδα του μεσολαβητή Srb4 (εικ. 11D). Το τελευταίο εύρημα ωστόσο, είναι αρκετά σημαντικό καθώς όπως και σε άλλους υποκινητές που έχουν εξεταστεί, έτσι και στον *GAL1*, σύμπλοκο του Μεσολαβητή φαίνεται να στρατολογείται ανεξάρτητα και νωρίτερα από το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης(Bryant and Ptashne, 2003; Kuras et al., 2003). Το στοιχείο αυτό επιτρέπει το συμπέρασμα ότι στον υποκινητή του *GAL1* τα νουκλεοσώματα που φέρουν Htz1 διευκολύνουν την αλληλεπίδραση και τη στρατολόγηση του ενεργοποιητικού συμπλόκου του Μεσολαβητή. Καθορίζεται έτσι για πρώτη φορά το χρονικό και λειτουργικό σημείο δράσης της κατά την ενεργοποίηση. Η αποτυχία για την έγκαιρη στρατολόγηση του Μεσολαβητή αντανακλά και στην καθυστερημένη στρατολόγηση της RNA πολυμεράσης και την βραδύτερη κινητική της ενεργοποίησης όπως θα φανεί παρακάτω.

Η ιστόνη Htz1 απαιτείται μόνο παρουσία του συμπλόκου συγκαταστολής Ssn6(Cyc8)-Turp1.

Κατά τη διάρκεια της μεταγραφικής ενεργοποίησης του *GAL1* εκτός από τη δράση των ενεργοποιητών πρέπει να εξασφαλισθεί και η εξουδετέρωση των καταστολέων. Στο σύστημα των *GAL* γονιδίων δρα ο καταστολέας Mig1 και το σύμπλοκο συγκαταστολής Cyc8(Ssn6)-Turp1 (βλ. εισαγωγή). Δεδομένου ότι η Htz1 δρα ως ενεργοποιητής του συστήματος, υποθέσαμε ότι μπορεί να συμβάλλει στην εξουδετέρωση της κατασταλτικής δράσης του Ssn6-Turp1. Ακόμη περισσότερο, ο συγκαταστολέας δρα πλειοτροπικά, στρατολογώντας απακετυλάσες ιστονών, αλληλεπιδρώντας με υπομονάδες του συμπλόκου της RNAPoIII αλλά και ρυθμίζοντας τη δράση υπομονάδων του Μεσολαβητή με κατασταλτική δράση. Ιδιαίτερα οι τελευταίες αλληλεπιδράσεις καθιστούν πιθανό ένα μοντέλο όπου η Htz1 θα μπορούσε να μεσολαβεί στην αναίρεση της κατασταλτικής αυτής δράσης με το να ενισχύει την στρατολόγηση ενεργοποιητικών υπομονάδων του Μεσολαβητή.

Εξετάσαμε λοιπόν, τη γενετική αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων (Turp1 και Htz1), παρακολουθώντας την κινητική της ενεργοποίησης με τη μέθοδο Northern σε στελέχη αγρίου τύπου, αλλά και σε στελέχη όπου ένα ή και τα δύο γονίδια *HTZ1* και *TUP1* έχουν διαγραφεί από το γονιδίωμα (εικ. 12).

Όπως έχει περιγραφεί και από τη βιβλιογραφία αλλά και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που παραθέσαμε στην παραπάνω ενότητα απουσία της ιστόνης παρατηρείται καθυστέρηση στην ενεργοποίηση και τη μεταγραφή του *GAL1* σε σχέση με αυτή του στελέχους αγρίου τύπου. Αντίθετα, απουσία του συγκαταστολέα Tup1 παρατηρείται ταχύτερη ενεργοποίηση του *GAL1* συγκριτικά με την αντίστοιχη στο στέλεχος αγρίου τύπου (εικ. 12C). Τα παραπάνω είναι σύμφωνα με το ρόλο των παραγόντων αυτών ως ενεργοποιητή και καταστολέα αντίστοιχα.



Εικ. 12. Διαγραφή του γονιδίου *TUP1* υπερνικά την απαίτηση για Htz1 στην ενεργοποίηση του *GAL1*. Ανάλυση κατά Northern του *GAL1* mRNA όπως απομονώθηκε από στελέχη (A) Αγρίου τύπου (WT), (B) *htz1Δ*, (C) *tup1Δ* και (D) διπλά μεταλλαγμένα *htz1Δtup1Δ*. Κύτταρα σε εκθετική φάση σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζης (YPDex) μεταφέρθηκαν πλούσιο υγρό θρεπτικό γαλακτόζης (YPGal). Ολικό RNA απομονώθηκε, διαχωρίστηκε σε πηκτική αγαρόζης-φορμαλδεΐδης, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη και σημάνθηκε με ιχνευτές σημασμένους με [³²ATP] για τα γονίδια *GAL1* και *ACT1* (το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου).

Ωστόσο, όπως φαίνεται και από την εικ.12D απουσία και των δύο γονιδίων η ενεργοποίηση γίνεται με κινητική που μοιάζει με την κινητική απουσία του Tup1, σαφώς ταχύτερη από αυτή του στελέχους αγρίου τύπου. Με όρους γενετικής, στο μονοπάτι ενεργοποίησης του *GAL1* η απουσία του Tup1 είναι επιστατική της απουσίας της Htz1.

Η ενσωμάτωση της Htz1 στον υποκινητή του *GAL1* εξαρτάται από το σύμπλοκο Ssn6 (Cyc8)-Tup1.

Η επιστατική σχέση του γονιδίου *TUP1* επί του γονιδίου *HTZ1* μπορεί να ερμηνευθεί με διάφορους τρόπους. Δεδομένου ότι πρόκειται για χρωματικούς παράγοντες, η σχέση αυτή θα μπορούσε να μεταφραστεί σε σχέση παρουσίας των παραγόντων στη χρωματίνη. Έτσι, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να υπονοεί ότι απουσία του Tup1 η παρουσία της Htz1 δεν είναι απαραίτητη, καθώς η ενεργοποίηση προχωρά με τον ίδιο -ταχύτερο από το φυσιολογικό- ρυθμό

είτε λείπει μόνο ο Turp1 είτε λείπει και ο Turp1 και η Htz1. Αν και αρκετά οξύμωρο αυτό που το παραπάνω πείραμα προτείνει είναι ότι ένας καταστολέας μπορεί να καθορίζει τα επίπεδα παρουσίας ενός ενεργοποιητή.

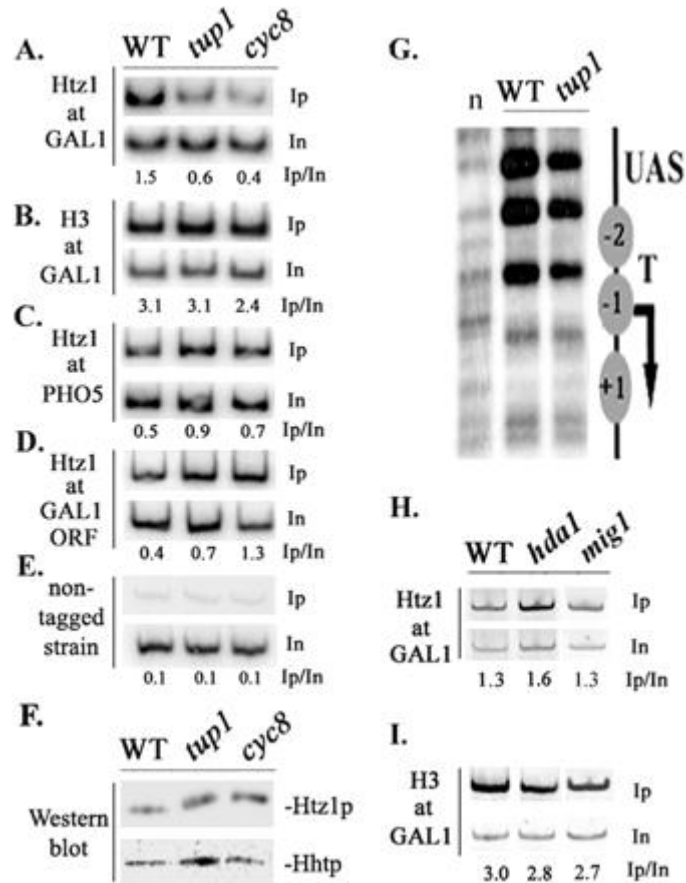
Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η παραπάνω υπόθεση καθορίστηκαν τα επίπεδα παρουσίας της Htz1 σε στελέχη αγρίου τύπου, αλλά και σε στελέχη που έχουν διαγραφεί καθένα από τα γονίδια του συγκαταστολέα Ssn6(Cyc8)-Turp1. Εξετάστηκε η παρουσία της Htz1 σε συνθήκες καταστολής τόσο στον υποκινητή όσο και προς το τέλος της κωδικής περιοχής του *GAL1* (*GAL1 PROM* και *GAL1 ORF* αντίστοιχα) καθώς και στον υποκινητή του γονιδίου *PHO5* που δεν ελέγχεται από το σύμπλοκο Ssn6-Turp1 (εικ.13A,13C και 13D). Σε παράλληλα πειράματα εξετάστηκε η παρουσία της κανονικής ιστόνης H3, καθορίζοντας με τον τρόπο αυτό τα επίπεδα των νουκλεοσωμικών ιστονών σε κάθε στέλεχος (εικ.13B). Τέλος, καθορίσαμε και τα επίπεδα θορύβου της τεχνικής, το μη ειδικό σήμα δηλ. της παρουσίας της Htz1 στην περιοχή του υποκινητή του *GAL1* (εικ.13E).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 13A απουσία είτε του Turp1 είτε του Ssn6(Cyc8) τα επίπεδα της Htz1 στον υποκινητή του *GAL1* μειώνονται σημαντικά, στο μισό και στο ένα τρίτο των φυσιολογικών αντίστοιχα. Αντίστοιχη μείωση δεν παρατηρείται στα επίπεδα της ιστόνης H3, με τα επίπεδα της στον υποκινητή να παραμένουν τα ίδια απουσία του Turp1 και να πέφτουν ελάχιστα απουσία του Ssn6 (εικ.13B). Προφανώς, η απουσία του Ssn6 επηρεάζει τη νουκλεοσωμική σύσταση συνολικά, κάτι που δεν παρατηρείται στην περίπτωση που εξετάζεται η δράση του Turp1. Τέλος, τα επίπεδα θορύβου της τεχνικής είναι εξαιρετικά χαμηλά (εικ.13E), και υποδεικνύουν ότι και στις δύο περιπτώσεις απώλειας των συγκαταστολέων, τα επίπεδα της Htz1 παραμένουν σημαντικά και σίγουρα δεν αποτελούν πειραματικό θόρυβο.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και στις δύο περιοχές ελέγχου (control regions) δηλ. στην κωδική περιοχή του *GAL1* και στην περιοχή του *PHO5* υποκινητή παρατηρείται αύξηση της παρουσίας της ιστόνης σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα (εικ. 13C,13D). Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί ποικιλοτρόπως. Αφενός υπάρχει το ενδεχόμενο απουσία των συγκαταστολέων να επηρεάζονται τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα της Htz1. Βέβαια, ακόμη και σε αυτή την περίπτωση θα περίμενε κανείς αυτή η αλλαγή να έχει την ίδια επίδραση σε όλο το φάσμα της χρωματίνης. Από την άλλη μπορεί να εξηγηθεί αν υποθεθεί ότι αν και τα επίπεδα της Htz1 παραμένουν συνολικά τα ίδια, η διαθέσιμη προς ενσωμάτωση Htz1 αυξάνεται καθώς χάνεται από περιοχές που ελέγχονται από το σύμπλοκο Ssn6-Turp1.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η πτώση που παρατηρήθηκε δεν αποτελεί παράπλευρο αποτέλεσμα μιας γενικότερης πτώσης των επιπέδων της ιστόνης αναλύσαμε τα συνολικά πρωτεϊνικά της επίπεδα στα στελέχη *turp1Δ* και *ssn6Δ* και τα συγκρίναμε με τα φυσιολογικά. Επίσης, παράλληλα αναλύσαμε τα επίπεδα της ιστόνης H3, ως πείραμα ελέγχου για την επίδραση της απώλειας των συγκαταστολέων στα επίπεδα των ιστονών γενικότερα. Όπως φαίνεται από την εικ.13F απώλεια είτε του Turp1 είτε του Ssn6 δεν επηρεάζει τα επίπεδα της Htz1 απόλυτα ή σχετικά με τα επίπεδα της H3. Εικάζεται εδώ ότι η αυξημένη παρουσία της Htz1

στις περιοχές ελέγχου ενδεχομένως είναι ένα παράπλευρο αποτέλεσμα της απώλειας της ιστόνης από περιοχές που ελέγχονται από τους συγκαταστολείς και συμπεραίνεται ότι η απώλεια στις τελευταίες αυτές περιοχές είναι ειδική και υπονοεί ότι οι συγκαταστολείς ελέγχουν σε σημαντικό βαθμό την ενσωμάτωση της Htz1 στις περιοχές αυτές.



Εικ. 13. Η ενσωμάτωση της Htz1 στον υποκινητή του GAL1 εξαρτάται από το συγκαταστολέα Ssn6-Tup1. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP) έγινε σε κύτταρα σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζη (YPDex) σε στελέχη αγρίου τύπου (WT), *tup1Δ*, *cyc8(ssn6)Δ* που εκφράζουν σημασμένη HA-Htz1. Η ενσωμάτωση των ιστονών Htz1 και H3 ανιχνεύθηκε στην GAL1 UAS περιοχή (**A και B**), στον υποκινητή του γονιδίου *PHO5* (**C**) στην 3'UTR περιοχή του γονιδίου *GAL1*. Οι αριθμοί παρουσιάζουν το λόγο IP/Input (Immunoprecipitated DNA/ Input DNA). Χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργή [³²ATP] PCR. (**E**) Τα επίπεδα θορύβου της τεχνικής ChIP ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μη-σημασμένα για Htz1 στελέχη. (**F**) Ανάλυση κατά Western από ολικά εκχυλίσματα κυττάρων σε YPDex στα σημασμένα HA-Htz1 στελέχη. Ανιχνεύονται παράλληλα η ιστόνη Htz1 και η ιστόνη H3. (**G**) Διάταξη νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή του *GAL1* σε στελέχη αγρίου τύπου (WT) και *tup1Δ*, όπως εμφανίζεται με τη χρήση της Μικροκοκκικής Νουκλεάσης (MNase). Επίσης παρουσιάζεται σχηματικά ο υποκινητής του *GAL1* παρουσιάζοντας τη θέση τριών νουκλεοσωμάτων (-1,-2,+1). Η περιοχή UAS (*UASGAL*) το στοιχείο TATA και η θέση έναρξης της μεταγραφής (*TSS*) σημειώνονται. Η ενσωμάτωση των ιστονών Htz1 (**H**) και H3 (**I**) στην *GAL1UAS* περιοχή σε στελέχη *hda1Δ* και *mig1Δ* ανιχνεύθηκε με ChIP όπως αναφέρθηκε παραπάνω (**A και B**).

Καθώς απουσία του Ssn6 φαίνεται να επηρεάζεται σε χαμηλό βαθμό τη νουκλεοσωμική σύσταση (εικ.13G), και επειδή οι δύο καταστολείς φαίνεται να δρουν με διαφορετική ένταση στην ενσωμάτωση της Htz1, ελέγχθηκε η νουκλεοσωμική διάταξη του υποκινητή, ιδιαίτερα απουσία του Tup1 όπου η παρουσία της H3 φαίνεται φυσιολογική, αλλά η Htz1 δεν ενσωματώνεται πλήρως. Όπως και παραπάνω χρησιμοποιήθηκε η τεχνική νουκλεοσωμικής χαρτογράφησης χαμηλής ανάλυσης για την ίδια περιοχή του υποκινητή σε συνθήκες καταστολής. Όπως φαίνεται

(εικ. 13F), η διάταξη των νουκλεοσωμάτων παραμένει σταθερή και δεν εμφανίζονται αλλαγές στο πρότυπο χαρτογράφησης του υποκινητή.

Τέλος, εξετάστηκε αν η επίδραση αυτή του συμπλόκου Ssn6-Tup1 στην ενσωμάτωση της Htz1 μπορεί να αποδοθεί σε κάποιο από τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο και επηρεάζουν τη δράση του ή η δική τους δράση καθορίζεται από τους συγκαταστολείς.

Στο γονίδιο του *GAL1* υπάρχει θέση πρόσδεσης για τον καταστολέα Mig1 (Paramichos-Chronakis et al., 2004). Αν και ο καταστολέας δεν στρατολογεί το σύμπλοκο αλλά οπωσδήποτε αλληλεπιδρά με αυτό (Paramichos-Chronakis et al., 2004) και ρυθμίζει την καταστολή κατ' αυτόν τον τρόπο, εξετάσαμε τη παρουσία της ιστόνης Htz1 απουσία του Mig1 και παράλληλα την παρουσία της H3. Όπως φαίνεται και από την εικ.13H απουσία του Mig1 τα επίπεδα της Htz1 είναι φυσιολογικά όπως και τα επίπεδα της ιστόνης H3 (εικ.13I).

Στο *GAL1* όπως και σε άλλα γονίδια που ελέγχονται από το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 μέρος της δράσης του συμπλόκου φαίνεται να διεκπεραιώνεται από τη στρατολογηθείσα απακετυλάση τύπου I, Hda1 (Wu et al., 2001). Προκειμένου να ελεγχθεί αν η στρατολόγηση αυτή συμβάλλει και στην ενσωμάτωση της Htz1 ανιχνεύσαμε τα επίπεδα της ιστόνης απουσία της Hda1. Στην εικ.13H φαίνεται ότι απουσία της Hda1 η Htz1 ενσωματώνεται σε ελαφρά υψηλότερα επίπεδα, σε καμία περίπτωση δηλ. δεν μετέχει στη δράση του Tup1-Ssn6 συμπλόκου που καθορίζει τα επίπεδα της Htz1 στον υποκινητή.

Ο καταστολέας Tup1 καθορίζει την ενσωμάτωση της Htz1 σε υποκινητές που ελέγχει.

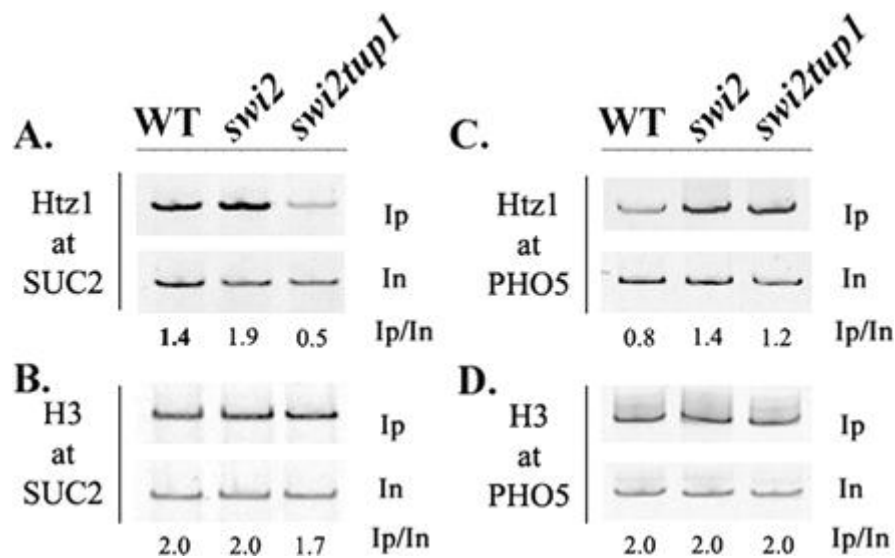
Τα παραπάνω αποτελέσματα περιγράφουν για πρώτη φορά την απαίτηση ενός ειδικού συμπλόκου μεταγραφικής καταστολής -που είναι γνωστό ότι δρα σε περιοχές υποκινητών και μόνο- να καθορίζει τα επίπεδα ενσωμάτωσης της Htz1 που επίσης έχει βρεθεί να βρίσκεται με σημαντικά υψηλότερη παρουσία στους υποκινητές γονιδίων τάξεως II, παρά στις κωδικές περιοχές τους (βλ. εισαγωγή). Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενδιαφέρον αλλά ενδεχομένως να μείνει ως μια απλή παρατήρηση αν δεν επεκταθεί αρχικά σε περισσότερους υποκινητές που ελέγχονται από το σύμπλοκο Ssn6-Tup1. Ωστόσο, με εξαίρεση τα γονίδια *GAL* όπου απώλεια του Ssn6-Tup1 δεν οδηγεί σε μεταγραφή λόγω της κατασταλτικής δράσης του Gal80, στα υπόλοιπα γονίδια που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, απώλεια του Tup1 οδηγεί σε υψηλά επίπεδα μεταγραφής. Όπως έχει ήδη περιγραφεί στην εισαγωγή η μεταγραφική ενεργοποίηση στο *S.cerevisiae* συνοδεύεται από απώλεια των νουκλεοσωμικών ιστονών από τους υποκινητές –αν και το εάν πρόκειται για ένα παθητικό αποτέλεσμα της διάβασης της RNAPoIII ή αν είναι μια ενεργητική διεργασία δεν έχει εξηγηθεί ακόμη. Αυτό σημαίνει ότι απουσία του Tup1 στους υποκινητές αυτούς τα χαμηλά επίπεδα Htz1 θα μπορούσαν να αποδοθούν στη μεταγραφή που συνεπάγεται η απώλεια του Tup1-Ssn6 και όχι στη ρύθμιση της ενσωμάτωσης της Htz1 από το σύμπλοκο αυτό.

Προκειμένου να παρακαμφθεί αυτό το γεγονός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα στέλεχος στο οποίο μια υπομονάδα της RNAPoIII φέρει μια θερμοευαίσθητη μεταλλαγή. Πέρασμα στην απαγορευτική θερμοκρασία οδηγεί στην κατάρρευση του πολυενζυμικού συμπλόκου και παύση της μεταγραφής (π.χ. Kuras et al., 2003). Μπορεί κανείς δηλ. να μελετήσει συμβάντα σε υποκινητές πριν το στάδιο ενεργοποίησης της μεταγραφής ή σταματώντας την ενεργό μεταγραφή με τη χρήση του στελέχους αυτού και τη επιβολή θερμικού σοκ, που οδηγεί στην παύση της μεταγραφής συνολικά. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν γίνεται να χρησιμοποιηθεί το εργαλείο αυτό για δύο λόγους. Πρώτον, ενεργοποίηση της αντίδρασης σε θερμικό στρες (heat shock response) έχει ήδη δειχθεί να επηρεάζει τη γενικότερη φυσιολογία του οργανισμού, μεταξύ αυτών και την ενσωμάτωση της Htz1 στους πάμπολλους υποκινητές που παροδικά έστω ενεργοποιούνται (Zhang et al., 2005). Κάτι τέτοιο θα επηρέαζε σημαντικά και τα διαθέσιμα επίπεδα της Htz1 αλλά και την ενεργότητα του SWR1-C λόγω της υψηλότερης θερμοκρασίας. Αφετέρου ακόμη κι αν αποκλειστεί η αναδιαμορφωτική δράση της RNAPoIII δεν μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία αναδιαμορφωτικών συμπλόκων, όπως το SWI/SNF που δρουν ανταγωνιστικά του Ssn6-Tup1 και ενδεχομένως να επηρεάζουν την ενσωμάτωση της Htz1.

Προκειμένου να παρακαμφθούν αυτά τα εμπόδια ταυτόχρονα με το *TUP1* διαγράφηκε και το γονίδιο της ATPάσης *SWI2*. Σε μια τέτοια περίπτωση σε γονίδια που ελέγχονται από τους δύο αυτούς παράγοντες δεν παρατηρείται σε συνθήκες καταστολής ούτε νουκλεοσωμική αναδιαμόρφωση (αφού δεν υπάρχει λειτουργικό SWI/SNF) αλλά ούτε μεταγραφή αφενός επειδή δεν υπάρχει σηματοδότηση αφετέρου επειδή η δράση του SWI/SNF είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή (Gavin and Simpson, 1997). Ένα τέτοιο καλά χαρακτηρισμένο γονίδιο είναι το *SUC2*, όπου και οι δύο παραπάνω όροι (ταυτόχρονη απουσία αναδιαμορφωτών και μεταγραφής) μπορεί να εξασφαλιστεί σε ένα στέλεχος που έχει υποχρεωτικά απαλειφθεί εκτός από το γονίδιο *Tup1* και το γονίδιο της *Swi2* ATPάσης (Gavin and Simpson, 1997).

Εξετάσαμε λοιπόν τα επίπεδα ενσωμάτωσης της Htz1 αλλά παράλληλα και της H3 ως ένδειξη της ακεραιότητας της νουκλεοσωμικής σύστασης στον υποκινητή του γονιδίου *SUC2* αλλά και στον υποκινητή του *PHO5*. Αξίζει να σημειωθεί ότι το *PHO5* αν και δεν ελέγχεται από το σύμπλοκο Ssn6-Tup1, ωστόσο ελέγχεται από το SWI/SNF (Reinke and Horz, 2003). Όπως φαίνεται και στην εικ.14A απουσία της *Swi2* παρατηρείται αύξηση της ενσωμάτωσης της Htz1 στους υποκινητές τόσο στο *SUC2* όσο και στο *PHO5* (εικ.14C), χωρίς ωστόσο να παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση στα επίπεδα της H3 (εικ.14B και 14D). Ωστόσο, στο στέλεχος όπου λείπουν και ο *Tup1* και η ATPάση *Swi2* ενώ στον υποκινητή του *PHO5* η Htz1 παραμένει σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του στελέχους που λείπει μόνο η *Swi2*, στον υποκινητή του *SUC2* παρατηρείται μια δραματική μείωση των επιπέδων της Htz1 με την αντίστοιχη μείωση στα επίπεδα της H3 να είναι ελάχιστη (εικ.14A, τρίτη λωρίδα). Δηλαδή, η απουσία του *Tup1* οδηγεί σε απώλεια της Htz1 αποκλειστικά και μόνο στον υποκινητή που ελέγχεται από αυτόν και

μάλιστα παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα από τα οποία ξεκινά αυτή η αλλαγή είναι τα υψηλά επίπεδα που παρατηρούνται απουσία της Swi2 ATPάσης (εικ.14A, μεσαία λωρίδα).



Εικ. 14. Η ενσωμάτωση της Htz1 στον υποκινητή SUC2 εξαρτάται από το συγκαταστολέα Turp1. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) σε κύτταρα εκθετικής φάσης σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζη (YPDex) σε στελέχη αγρίου τύπου (WT) και μεταλλαγμένα *swi2Δ* και *swi2Δtur1Δ* στελέχη που εκφράζουν την σημασμένη HA-Htz1 πρωτεΐνη. Η ενσωμάτωση ανιχνεύθηκε στους υποκινητές των γονιδίων *SUC2* (**A** και **B**) και *PHO5* (**C** και **D**). Οι αριθμοί παρουσιάζουν το λόγο IP/Input (Immunoprecipitated DNA/ Input DNA). Χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργή [³²ATP] PCR

Τα παραπάνω επιτρέπουν το συμπέρασμα ότι η λειτουργία του Turp1-Ssn6 στην ενσωμάτωση της Htz1 πολύ πιθανόν να επεκτείνεται σε όλο το ρεπερτόριο των ελεγχόμενων από το συγκαταστολέα υποκινητών, και δεν αποτελεί μια μεμονωμένη παρατήρηση για τα γονίδια *GAL*.

Δυναμική της ενσωμάτωσης της Htz1 *in vivo*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα εδραίωσαν την παρατήρηση ότι η ενσωμάτωση της Htz1 στους υποκινητές εξαρτάται από το σύμπλοκο Ssn6-Turp1, η δράση του οποίου περιορίζεται αποκλειστικά στους υποκινητές. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το γονίδιο της Htz1 διαφέρει από τα γονίδια των υπόλοιπων ιστονών στη χρονική ρύθμιση της έκφρασης του. Ενώ τα γονίδια των υπόλοιπων κύριων ιστονών ακολουθούν μια κυκλική έκφραση με κορύφωση της κατά την φάση του διπλασιασμού του DNA (Synthesis phase, S-phase), το γονίδιο της Htz1 μεταγράφεται καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου (Henikoff and Ahmad, 2005). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δράση του SWR1-C που φαίνεται να πραγματοποιείται σε ήδη συναρμολογημένα νουκλεοσώματα καθιστά δύσκολο τον καθορισμό του χρονικού σημείου που η Htz1 ενσωματώνεται στην χρωματίνη αλλά και το κατά πόσο αυτή η ενσωμάτωση είναι μία ρυθμισμένη στο χρόνο διαδικασία.

Ωστόσο, η κατασταλτική δράση παραγόντων όπως το σύμπλοκο Ssn6-Turp1 εκδηλώνεται κατά την μεταγραφική αποσιώπηση (transcriptional repression/silencing) και στη συνέχεια

διατηρείται με την παρουσία τους στον υποκινητή. Είναι λογικό να αναρωτηθεί κανείς εάν η δράση του *Tup1* ως καταστολέα συνδέεται με την απαραίτητη παρουσία του για πλήρη ενσωμάτωση της *Htz1* στους υποκινητές που ελέγχει. Αν κάτι τέτοιο συμβαίνει τότε θα πρέπει κανείς να περιμένει η ενσωμάτωση της *Htz1* να πραγματοποιείται κατά τη εδραίωση της καταστολής και να εξαρτάται από το συγκαταστολέα.

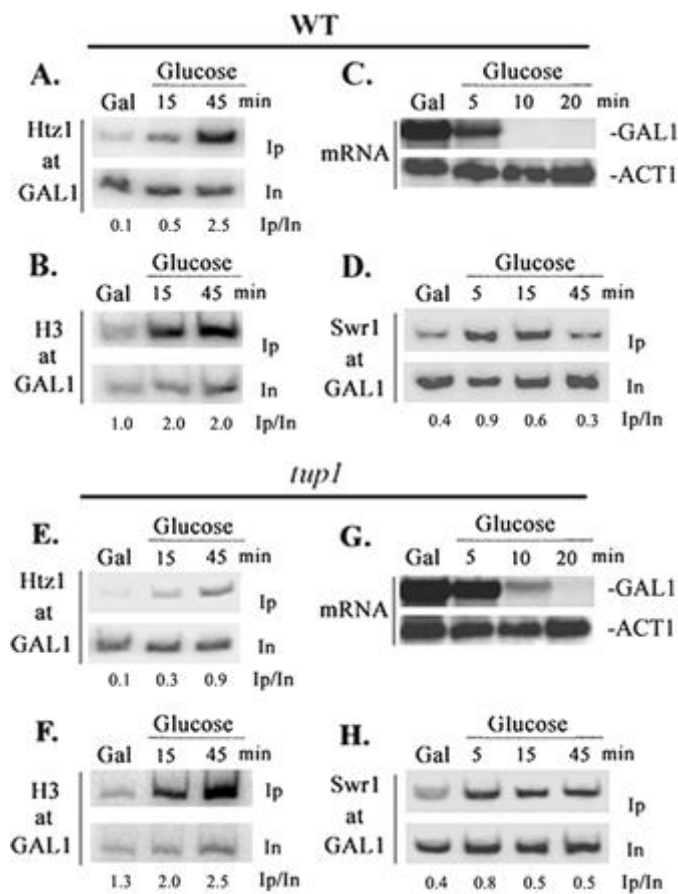
Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση ανιχνεύθηκε με πειράματα ChIP την ενσωμάτωση της *Htz1* αλλά και της *H3* κατά την εδραίωση της καταστολής, περνώντας δηλαδή τα κύτταρα που βρίσκονται σε γαλακτόζη και εκφράζουν το γονίδιο *GAL1* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αποκλειστικά γλυκόζη. Παράλληλα, για να επιβεβαιωθεί η παύση της μεταγραφής καθορίστηκαν τα επίπεδα του παραγόμενου mRNA. Τέλος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ειδική ενσωμάτωση της *Htz1* (και όχι πιθανή μη ειδική ενσωμάτωση λόγω στοχαστικής ενσωμάτωσης κατά τη φάση S) παρακολουθήσαμε κινητικά και την ενδεχόμενη στρατολόγηση της ATPάσης *Swr1* του συμπλόκου SWR1-C.

Όπως φαίνεται και στην εικ.15A και όπως είναι αναμενόμενο ενώ η μεταγραφή έχει φτάσει σε υψηλά επίπεδα (εικ.15C, mRNA) τόσο η ιστόνη *Htz1* όσο και κύρια ιστόνη *H3* βρίσκονται σε πολύ χαμηλά- σχεδόν μηδενικά επίπεδα- στον υποκινητή του *GAL1*. Η εικόνα αυτή είναι συμβατή με την έντονη μεταγραφική δράση της RNAPoIII. Λίγα λεπτά μετά το πέρασμα των κυττάρων σε γλυκόζη (χρονικό σημείο 15 λεπτών σε γλυκόζη) και ενώ η μεταγραφή έχει ήδη σχεδόν μηδενιστεί από τα πρώτα 10 λεπτά, τα επίπεδα της *H3* έχουν ουσιαστικά φτάσει στα φυσιολογικά επίπεδα (εικ. 15C). Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν είναι εμφανές και για την *Htz1* της οποίας η ενσωμάτωση συνεχίζει να αυξάνεται και παίρνει την μέγιστη τιμή σχεδόν 45 λεπτά μετά τη σηματοδότηση της καταστολής (εικ.15A). Παρακολουθώντας την στρατολόγηση της ATPάσης *Swr1* (εικ.15D) παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της αυξάνονται πάνω από τα βασικά επίπεδα μόλις 5 λεπτά μετά την προσθήκη γλυκόζης και παραμένουν υψηλά τουλάχιστον μέχρι τα πρώτα 15 λεπτά, ενώ 45 λεπτά μετά έχουν επιστρέψει στα βασικά επίπεδα. Η κορύφωση δηλ. της στρατολόγησης φαίνεται να συμπίπτει με το σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων του υποκινητή (όπως αυτός υποδηλώνεται από την παρουσία της *H3*). Από τα παραπάνω γίνεται προφανές αφενός ότι πράγματι η ενσωμάτωση της *Htz1* πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία της παύσης της μεταγραφής όπως υποτέθηκε παραπάνω, αφετέρου καθώς η κινητική ενσωμάτωσης καθυστερεί συγκριτικά με την αντίστοιχη της *H3* και παρατηρείται στρατολόγηση του SWR1-C, η ενσωμάτωση αυτή είναι ειδική και φαίνεται να ακολουθεί τον σχηματισμό κανονικών νουκλεοσωμάτων H2A-H2B.

Καθώς τα αποτελέσματα αυτά στηρίχθηκαν στην εμπλοκή του *Tup1* κατά την καταστολή και την απαίτησή του για πλήρη ενσωμάτωση της *Htz1*, πραγματοποιήσαμε τα ίδια ακριβώς πειράματα σε στέλεχος που το γονίδιο *TUP1* έχει διαγραφεί (εικ.15, κάτω μισό). Όπως φαίνεται και από την εικ.15G ενώ η μεταγραφή παύει σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό στο στέλεχος *tup1Δ*, και η κινητική σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων είναι ταυτόσημη (όπως ανιχνεύεται από την ενσωμάτωση της κύριας ιστόνης *H3*,εικ.15F), η κινητική ενσωμάτωσης της *Htz1* είναι παρόμοια

(εικ.15E) αλλά τα τελικά επίπεδα ενσωμάτωσης είναι σαφώς πολύ χαμηλότερα (τελευταία λωρίδα, 45min). Από την άλλη η στρατολόγηση του SWR1-C παρατηρείται και μάλιστα παρατεταμένη (εικ.15H).

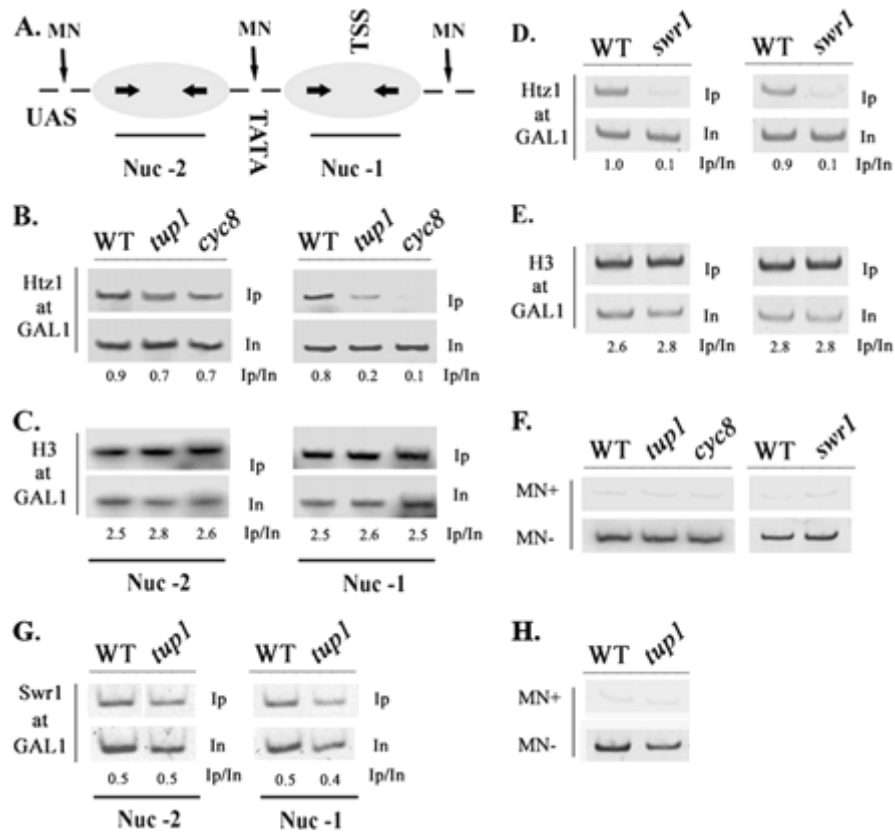
Συμπερασματικά, χρησιμοποιώντας μια τεχνητή κατάσταση συγχρονισμού όπου σχεδόν το σύνολο των υποκινητών διατηρεί πολύ χαμηλά επίπεδα της Htz1, ανιχνεύσαμε για πρώτη φορά την ενσωμάτωση της από το SWR1-C *in vivo*. Η ενσωμάτωση αυτή δεν συμπίπτει με τη χρονική στιγμή του σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων παρά μάλλον η μέγιστη ενσωμάτωση της ακολουθεί τη μέγιστη ενσωμάτωση των κύριων νουκλεοσωμικών ιστόνων. Επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα που έχουν ήδη περιγραφεί, απουσία του *Tup1* επηρεάζει τα τελικά επίπεδα ενσωμάτωσης της Htz1 χωρίς να επιδρά στην κινητική και το πρότυπο σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων.



Εικ. 15. Η ενσωμάτωση της Htz1 και η στρατολόγηση του συμπλόκου SWR1-C στον υποκινητή *GAL1* γίνεται κατά την μεταγραφική καταστολή σε γλυκόζη. (Πάνω μέρος της εικόνας) Ενσωμάτωση της Htz1 **(A)** και της H3 **(B)** στον υποκινητή του *GAL1*. Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) έγινε παράλληλα με ανάλυση ολικού RNA κατά Northern σε στέλεχος σημασμένο HA-Htz1. Κύτταρα σε εκθετική φάση σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γαλακτόζης (YPGal) μεταφέρθηκαν πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζης (YPDex) για τους χρόνους που αναγράφονται. Αντισώματα έναντι του επιτόπου HA **(A)**, έναντι της ιστόνης H3 **(B)** χρησιμοποιήθηκαν. Ανιχνεύτηκε η περιοχή *GAL1*UAS. Οι αριθμοί παρουσιάζουν το λόγο IP/Input (Immunoprecipitated DNA/ Input DNA). Χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργή [³²-ATP] PCR. **(C)** Παράλληλη ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του *GAL1* mRNA, όπως ακριβώς και στην εικόνα 2. **(D)** Η στρατολόγηση του συμπλόκου SWR1-C ανιχνεύθηκε με ChIP, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επιτόπου Myc σε στέλεχος που έφερε σημασμένη την υπομονάδα Swr1. Κύτταρα σε εκθετική φάση σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γαλακτόζης (YPGal) μεταφέρθηκαν πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζης (YPDex) για τους χρόνους που αναγράφονται. (Κάτω μέρος εικόνας) Τα πειράματα ChIP που παρουσιάζονται στα πλαίσια **E, F και H** όπως και η ανάλυση mRNA του *GAL1* έγιναν σε στέλεχος *tup1Δ* όπως περιγράφονται για το πάνω μέρος της εικόνας **(πλαίσια A, B, C και D αντίστοιχα)**

Ο Tur1 καθορίζει αποκλειστικά την ενσωμάτωση της Htz1 στο νουκλεόσωμα που καλύπτει τη θέση έναρξης της μεταγραφής.

Το γεγονός ότι απουσία του Tur1 το σύμπλοκο SWR1-C εξακολουθεί να στρατολογείται και να ενσωματώνει την Htz1 σε χαμηλά αλλά υπαρκτά επίπεδα (εικ.13A και εικ.15E) υποδηλώνει ότι μέρος του πληθυσμού των νουκλεοσωμάτων του υποκινητή του *GAL1* περιέχει ετεροδιμερή Htz1-H2B. Το άμεσο ερώτημα που προκύπτει είναι αν η ενσωμάτωση αυτή είναι τυχαία (άρα κανείς περιμένει καθένας πληθυσμός των δύο νουκλεοσωμάτων του υποκινητή να περιέχει σε ίδιο βαθμό Htz1) ή υπάρχει η περίπτωση τα δύο νουκλεοσώματα να εξαρτώνται με διαφορετικό τρόπο από το σύμπλοκο Ssn6-Tur1 (άρα κανείς περιμένει ένας πληθυσμός νουκλεοσωμάτων να περιέχει υψηλότερα επίπεδα Htz1 σε σχέση με τον άλλο).



Εικ. 16. Η ενσωμάτωση της Htz1 εξαρτάται από τον Tur1 μόνο για το νουκλεόσωμα του υποκινητή που καλύπτει τη θέση έναρξης της μεταγραφής. (A) Σχηματική παρουσίαση της οργάνωσης του υποκινητή. Παρουσιάζονται οι θέσεις των άπω και εγγύς νουκλεοσωμάτων (Nuc-2 και Nuc-1), των περιοχών UAS, TATA και TSS καθώς και οι υπερευαίσθητες θέσεις πέψης της MN. Τα βέλη εντός των νουκλεοσωμάτων καθορίζουν τα τμήματα που ανιχνεύονται με PCR. **(B)** Ενσωμάτωση της Htz1 και της H3 **(C)** στα νουκλεοσώματα Nuc-1 και Nuc-2 σε κύτταρα σε εκθετική φάση σε πλούσιο υγρό θρεπτικό γλυκόζη (YPDex) σε στελέχη αγρίου τύπου (WT), *tup1*Δ και *cyc8*Δ, μετά από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης και PCR με τη χρήση εκκινητών που υβριδίζουν στο εσωτερικό των νουκλεοσωμάτων. **(D)** Ενσωμάτωση της Htz1 και **(E)** της H3 στα νουκλεοσώματα Nuc-1 και Nuc-2 σε στελέχη αγρίου τύπου (WT) και *swr1*Δ, όπως και παραπάνω. **(F)** Η έκταση της πέψης από την MN στα παραπάνω πειράματα ανιχνεύθηκε με PCR πριν και μετά την πέψη στο ολικό DNA (input) χρησιμοποιώντας εκκινητές που ανιχνεύουν περιοχή που καλύπτει και τα δύο νουκλεοσώματα. **(G)** Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης ανιχνεύει τη στρατολόγηση της υπομονάδας Swr1 στο κάθε νουκλεόσωμα σε στελέχη αγρίου τύπου (WT) και *tup1*Δ **(H)** Η έκταση της πέψης της MN διαπιστώθηκε όπως και στο πλαίσιο **(F)**. Οι αριθμοί παρουσιάζουν το λόγο IP/Input (Immunoprecipitated DNA/ Input DNA). Χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργή [³²ATP] PCR

Το ερώτημα αυτό απαντήθηκε με τη χρήση της τεχνικής ChIP, τροποποιημένης κατά τρόπο τέτοιο ώστε να ανιχνεύεται η παρουσία χρωματικών παραγόντων σε μεμονωμένα νουκλεοσώματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η μικροκοκκική νουκλεάση (MN) που πέπτει τη χρωματίνη σε επίπεδο μεμονωμένων νουκλεοσωμάτων, τα οποία και χρησιμοποιούνται για την ανοσοκατακρήμιση στη συνέχεια (εικ. 16A) (Sekinger et al., 2005).

Αρχικά, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια της μεθόδου ανιχνεύσαμε την παρουσία της Htz1 και παράλληλα και της H3 σε ένα στέλεχος που έχει διαγραφεί το γονίδιο της ATPάσης Swr1, καθώς απουσία της οδηγεί σε αποσχηματισμό του συμπλόκου SWR1-C (Wu et al., 2005) και κατά συνέπεια σε μη ενσωμάτωση της Htz1 στη χρωματίνη. Όπως φαίνεται από την εικ.16E απουσία της Swr1 δεν επηρεάζεται η ενσωμάτωση της κύριας H3 ιστόνης σε καθένα από τα δύο νουκλεοσώματα του υποκινητή, αλλά η ιστόνη Htz1 ενσωματώνεται σε μηδενικά επίπεδα και στα δύο νουκλεοσώματα (εικ.16D). Το αποτέλεσμα αυτό μαζί με τα πειράματα ελέγχου που το συνοδεύουν (πλήρης πέψη της χρωματίνης σε επίπεδο μονο-νουκλεοσωμάτων είναι απαραίτητη όπως φαίνεται και στην εικ.16F.) αποδεικνύουν τη αξία της τεχνικής αυτής για τη διερεύνηση του ερωτήματος που έχει τεθεί.

Κατά συνέπεια, πραγματοποιήθηκαν τα ίδια πειράματα σε στελέχη που έχει διαγραφεί το γονίδιο *TUP1* και *SSN6(CYC8)* αντίστοιχα, παράλληλα με πειράματα σε στέλεχος αγρίου τύπου. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 16C απουσία των Tur1 ή Ssn6 δεν παρατηρείται επίδραση στα επίπεδα της ιστόνης H3 σε οποιοδήποτε από τα δύο νουκλεοσώματα του υποκινητή.

Αντίθετα, η παρουσία της Htz1 επηρεάζεται, κατά τρόπο διαφορετικό όμως για τα δύο νουκλεοσώματα. Όπως φαίνεται (εικ.16B) ενώ απουσία είτε του Tur1 είτε του Ssn6 τα επίπεδα της ιστόνης στο νουκλεόσωμα -2 δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά, τα αντίστοιχα επίπεδα στο νουκλεόσωμα -1 επηρεάζονται δραματικά στο στέλεχος *tup1Δ* και είναι ουσιαστικά μηδενικά στο στέλεχος *ssn6Δ*. Αν καθοριστεί η στρατολόγηση της ATPάσης Swr1 φανερώνεται μια οριακή πτώση στα επίπεδα στρατολόγησης της στο νουκλεόσωμα -2 (εικ.16G).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα δύο νουκλεοσώματα του υποκινητή απαιτούν διαφορετικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την ενσωμάτωση της Htz1 καθώς το σύμπλοκο Ssn6-Tur1 ελέγχει και είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση περισσότερο στο νουκλεόσωμα που βρίσκεται απομακρυσμένο από τις θέσεις πρόσδεσης του Gal4 και ταυτόχρονα καλύπτει την περιοχή έναρξης της μεταγραφής. Η σημασία του αποτελέσματος αυτού αναλύεται στη σύζήτηση, ωστόσο είναι πρόδηλη η ιδιαιτερότητα κάθε νουκλεοσώματος όσον αφορά την ενσωμάτωση της Htz1.

Απαιτείται η ενσωμάτωση της Htz1 για την περιπυρηνική τοποθέτηση;

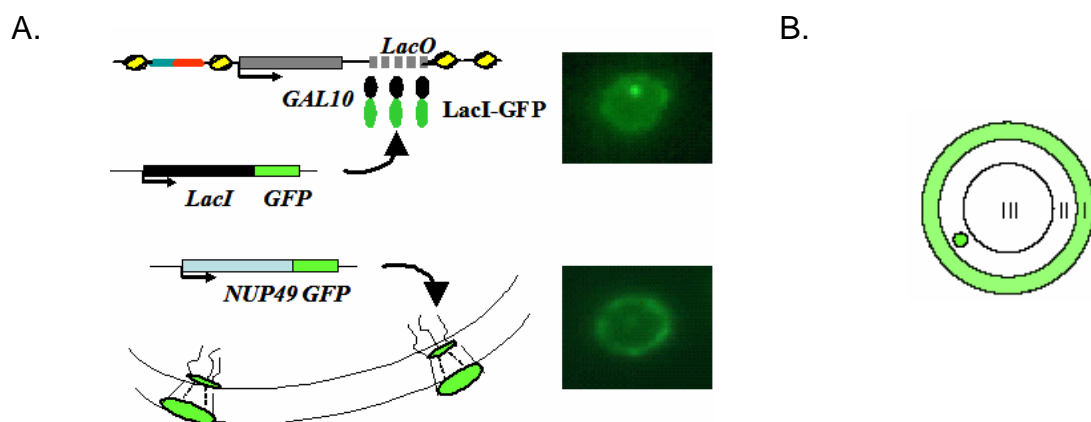
Το γεγονός ότι απουσία του Turp1 υπάρχει μια απολύτως ειδική απώλεια της Htz1 από τους υποκινητές των γονιδίων *GAL* και ιδιαίτερα από τον ισχυρότερο υποκινητή του συστήματος, αυτόν του γονιδίου *GAL1*, μας προσφέρει μια σημαντική δυνατότητα να ελεγχθεί η σημασία της ενσωμάτωσης αυτής στην συγκράτηση των γονιδίων *GAL* στην πυρηνική περιφέρεια όπως έχει προταθεί (Brickner et al., 2007). Αν πραγματικά η Htz1 είναι σημαντική για την συγκράτηση στην περιφέρεια τότε θα πρέπει στην απόλυτα ειδική απώλεια της Htz1 απουσία του Turp1 να παρατηρείται πτώση της συγκράτησης των γονιδίων στην πυρηνική μεμβράνη και μάλιστα σε συνθήκες μεταγραφικής καταστολής (γλυκόζη).

Μελετήθηκε λοιπόν στη συνέχεια η εμπλοκή της Htz1 στα τρία αυτά φαινόμενα που κατ' αρχήν προτείνεται ότι είναι αλληλένδετα (Brickner et al., 2007): την ενσωμάτωση της Htz1, την συγκράτηση στην περιφέρεια και την μεταγραφική μνήμη που εμφανίζουν τα γονίδια *GAL* μετά από μια πρώτη ενεργοποίηση. Για να μελετηθεί δυναμικά η μετατόπιση στην περιφέρεια χρησιμοποιήθηκε το σύστημα LacI-GFP/LacO διάταξης όπως περιγράφεται στην εικόνα 17. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε κύτταρα θηλαστικών, πολύ γρήγορα όμως πέρασε και στο σακχαρομύκητα *S.cerevisiae*. Χρησιμοποιείται για να εντοπιστεί μία ή και περισσότερες χρωμοσωμικές περιοχές στο εσωτερικού του πυρήνα. Προκειμένου να υπάρξει ένα σταθερό σημείο αναφοράς δημιουργείται μια υβριδική νουκλεοπορίνη (έχει καθιερωθεί η νουκλεοπορίνη Nup49) που φέρει στο καρβοξυτελικό άκρο της ένα μόριο GFP (Nup49-GFP). Η αλλαγή αυτή γίνεται στο ενδογενές γονίδιο NUP49, η πρωτεΐνη δηλ. εκφράζεται από τον φυσιολογικό υποκινητή και σε φυσιολογικά επίπεδα. Με τον τρόπο αυτό σημαίνεται η περιφέρεια του πυρήνα (εικ. 18A). Στη συνέχεια η διάταξη LacO (LacO array) η οποία αποτελείται από 256 επαναλήψεις του μοτίβου πρόσδεσης του καταστολέα LacI στοχεύεται στον επιθυμητό γενετικό τόπο. Τέλος, το γονίδιο LacI-GFP (υβριδική LacI που φέρει τη GFP στο καρβοξυτελικό άκρο) επίσης ενσωματώνεται στο γονιδίωμα. Με το τρόπο αυτό η περιοχή που φέρει τη διάταξη των αλληλουχιών LacO μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο με τη χρήση κατάλληλων πηγών φωτός που διεγείρουν το μόριο της GFP. Η περιοχή του γονιδιώματος που έχει σημανθεί παρουσιάζεται ως ένας καλά διακρίσιμος δίσκος που ξεχωρίζει πολύ εύκολα από τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων. Με τον τρόπο αυτό σημάνθηκαν περιοχές στη γειτονία των *GAL1* και *THI72* στα χρωμοσώματα III και XV αντίστοιχα. Η πρώτη αποτελούσε το υπό μελέτη τόπο και η δεύτερη χρησίμευσε ως περιοχή έλεγχου καθώς δεν υπάρχουν στην περιοχή αυτή γονίδια που να επηρεάζεται η μεταγραφική τους ρύθμιση από τη ύπαρξη ή μη γαλακτόζης στο θρεπτικό μέσο.

Μετάβαση του *GAL* γενετικού τόπου στη περιφέρεια του πυρήνα.

Αρχικά με το σύστημα αυτό μελετήθηκε η μετάβαση του γενετικού τόπου *GAL* στην περιφέρεια. Ο τρόπος με τον οποίο τα *GAL* γονίδια ενεργοποιούνται έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή. Η ενεργοποίηση αυτή έχει βρεθεί να συνοδεύεται από αυξημένη παρουσία στην πυρηνική περιφέρεια. Με τη χρήση του συστήματος LacO-LacI-GFP πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση του συμπλέγματος των *GAL* γονιδίων σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) και ενεργοποίησης (γαλακτόζη), παράλληλα πάντα με το πείραμα ελέγχου όπου ανιχνεύσαμε την θέση του *Thi72* τόπου. Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στις διάφορες συνθήκες η επίδραση στον τόπο *Thi72* υπήρξε αμελητέα, και κατά συνέπεια τα φαινόμενα που μελετάμε επιδρούν αποκλειστικά στο *GAL* σύστημα.

Η κατηγοριοποίηση που ακολουθήθηκε στηρίχθηκε σε ήδη χρησιμοποιημένη μέθοδο (Abruzzi et al., 2006; Brickner et al., 2007). Συνοπτικά, όταν υπήρχε πλήρης συνεντοπισμός της LacI-GFP κηλίδας με τον πυρηνικό φάκελο (όπως αυτός περιγράφεται από την παρουσία της Nup49-GFP ή με ανοσοφθορισμό έναντι των νουκλοπορινών Nic96 και Nup60) ο τόπος αυτός χαρακτηριζόταν ως μεμβρανικός (Membranal) όταν βρισκόταν κοντά στην περιφέρεια αλλά όχι στην πυρηνική μεμβράνη χαρακτηριζόταν υπο-μεμβρανικός (Sub-Membranal) και όταν βρισκόταν σαφώς περισσότερο εσωτερικά χαρακτηριζόταν ως κεντρικός (Central,C) (Abruzzi et al., 2006) (εικ.17B). Τα πειράματα που παρουσιάζονται έχουν πραγματοποιηθεί τουλάχιστον δύο φορές και κάθε φορά καταμετρούνταν τουλάχιστον 200 θέσεις γονιδίων και από τις μετρήσεις αποκλείστηκαν κύτταρα που βρισκόταν σε φάση διπλασιασμού όπως έχει ήδη περιγραφεί (Taddei et al., 2006). Καθώς το ενδιαφέρον εστιάζεται στην προσέγγιση του τόπου με την πυρηνική μεμβράνη καθαυτή, τα ποσοστά των εσωτερικών και υπο-περιφερειακών τόπων αθροίζονται ως εσωτερικά (Internal) και συγκρίνονται με τα ποσοστά των μεμβρανικών τόπων. Με αυτόν τον τρόπο και παρουσιάζονται στα περισσότερα γραφήματα. Τέλος, στη συνέχεια οι σημασμένοι τόποι –ενδεχομένως καταχρηστικά- θα αναφέρονται για λόγους ευκολίας και ως «γονίδια».



Εικ. 17. Το σύστημα LacI-GFP/LacO διάταξη και η ανάλυση της θέσης των σημασμένων τόπων. (A). Σε στελέχη αγρίου τύπου αρχικά σημάνθηκε η νουκλοπορίνη Nup49 με τη GFP (Nup49GFP) ώστε να σημανθεί η πυρηνική μεμβράνη. Στη συνέχεια ενσωματώθηκε η διάταξη LacO στην επιθυμητή περιοχή και τέλος εκφράστηκε συστατικά η υβριδική LacI-GFP. Η στρατολόγηση της LacI-GFP οδηγεί στην δημιουργία μιας φωτεινής κηλίδας που ξεχωρίζει σε ένταση από τη σημασμένη περιφέρεια. **(B).** Κατανομή του πυρηνικού χώρου σε τρεις περιοχές (I) Μεμβρανική (Membranal) (II) Υπο-μεμβρανική (Sub-Membranal) και (III) Κεντρική (Central). Στις περισσότερες εικόνες το άθροισμα των περιοχών (I) και (II) παρουσιάζεται ως Εσωτερική (Internal) περιοχή.

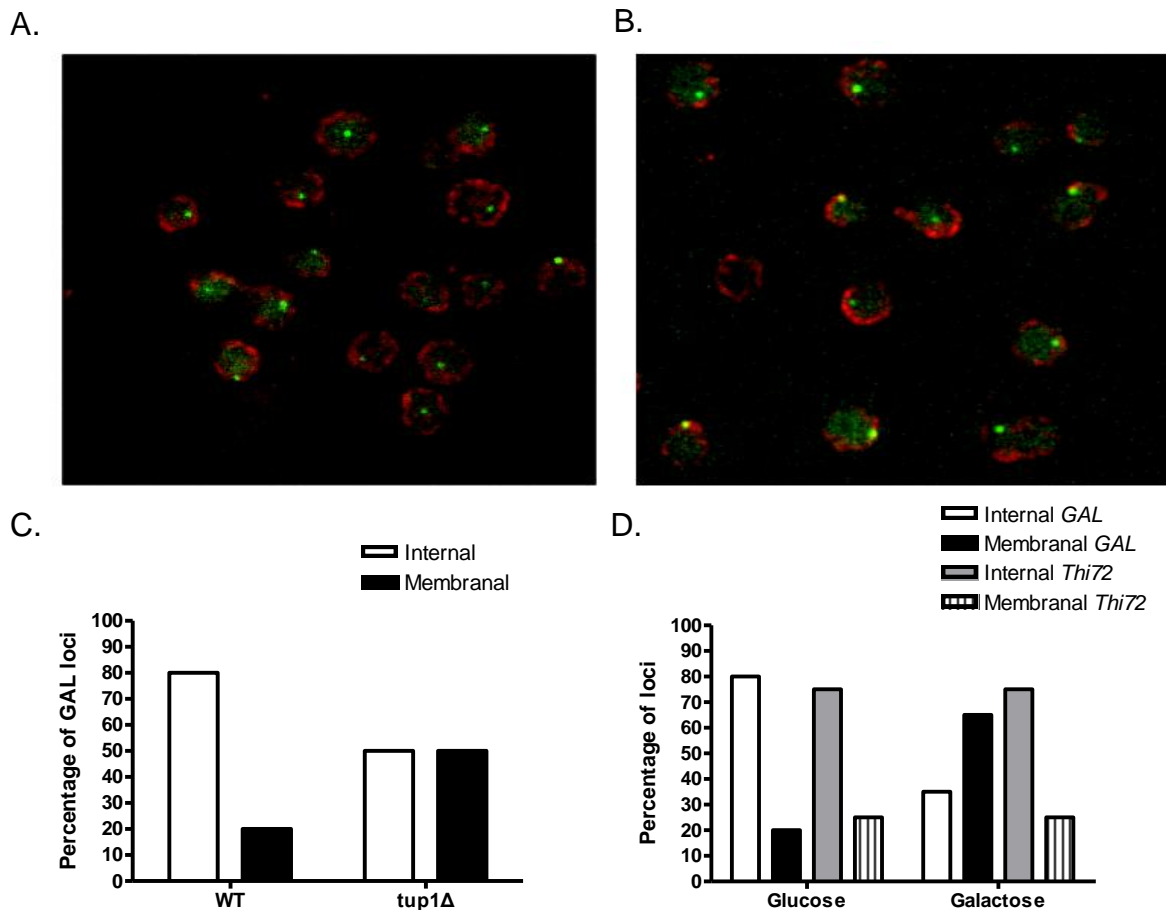
Όταν παρατηρείται η κατανομή του *GAL* τόπου σε κύτταρα που βρίσκονται σε εκθετική αύξηση και με συνεχή παρουσία γλυκόζης (πλήρες θρεπτικό μέσο με γλυκόζη 2% κ.β.) στο θρεπτικό μέσο, περίπου το 80% των γονιδίων βρίσκεται στο εσωτερικό του πυρήνα και το υπόλοιπο 20% συνεντοπίζεται με τη μεμβράνη (εικ.18D, γλυκόζη).

Όταν τα *GAL* γονίδια ενεργοποιούνται η κατανομή αντιστρέφεται (εικ. 18D, γαλακτόζη). Περίπου το 65% των γονιδίων εμφανίζεται στην μεμβράνη και το 35% στο εσωτερικό. Ακόμη και σε αυτό το τελευταίο ποσοστό όμως τα γονίδια που δείχνουν το πιο ακραίο φαινότυπο – μια καθαρά κεντρική θέση στον πυρήνα- έχουν σαφώς μειωθεί (προσωπική παρατήρηση). Ωστόσο, αυτό που πρέπει να επισημανθεί εδώ είναι ότι σε καμία περίπτωση σε συνθήκες που η έκφραση του γονιδίου έφτασε τα μέγιστα επίπεδα δεν βρέθηκε ο αριθμός γονιδίων που εντοπίζεται στη περιφέρεια να πλησιάζει το 100%.

Η Htz1 δεν ενισχύει την περι-πυρηνική τοποθέτηση των *GAL* γονιδίων.

Το γεγονός ότι απουσία του *Tup1* υπάρχει μια απολύτως ειδική απώλεια της *Htz1* από τους υποκινητές των γονιδίων *GAL* και ιδιαίτερα από τον ισχυρότερο υποκινητή του συστήματος, αυτόν του γονιδίου *GAL1*, μας προσφέρει μια σημαντική δυνατότητα να ελεγχθεί η σημασία της ενσωμάτωσης αυτής στην συγκράτηση στην πυρηνική περιφέρεια. Αν πραγματικά η *Htz1* είναι σημαντική για την συγκράτηση στην περιφέρεια τότε θα πρέπει στην απόλυτα ειδική απώλεια της *Htz1* απουσία του *Tup1* να παρατηρείται πτώση της συγκράτησης των γονιδίων στην πυρηνική μεμβράνη και μάλιστα σε συνθήκες μεταγραφικής καταστολής (γλυκόζη).

Προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αυτό παρακολουθήσαμε με το σύστημα *LacI-GFP/LacO* διάταξη το συνεντοπισμό του γενετικού τόπου *GAL* και με την πυρηνική μεμβράνη. Σε μια παραλλαγή του παραπάνω συστήματος, η πυρηνική μεμβράνη οπτικοποιήθηκε με ανοσοφθορισμό έναντι των πυρηνικών πόρων (βλ. λεζάντα για λεπτομερή περιγραφή), καθώς απουσία του *Tup1* υπήρξε αυξημένη έκφραση της υβριδικής *LacI-GFP* και κατ' επέκταση αυξημένος θόρυβος στο εσωτερικό του πυρήνα, που δυσχέραινε την εκτίμηση του συνεντοπισμού με την *Nup49-GFP*. Παρόλα αυτά, η τεχνική αυτή δίνει πανομοιότυπα ποσοστά συνεντοπισμού σε στέλεχος αγρίου τύπου σε συνθήκες καταστολής με τη χρήση της *Nup49-GFP* (εικ. 18C και 18D, γλυκόζη).



Εικ .18. Η απώλεια της Htz1 σε ένα *tup1Δ* στέλεχος και η κατανομή των GAL γονιδίων. Κύτταρα αγρίου τύπου (WT) (A), και *tup1Δ* (B), που έφεραν σημασμένο το γενετικό τόπο GAL με το σύστημα LacI-GFP/LacO διάταξη καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό που περιείχε γλυκόζη (YP-Dex) ενώ βρισκόταν πάντα σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και έγινε χρώση των πυρηνικών πόρων με χρήση του αντισώματος mAb414 που ανιχνεύει τις νουκλεοπορίνες Nic96 και τη Nur60. (C). Η κατανομή των τόπων στα πειράματα (A) και (B) καθορίστηκε όπως περιγράφεται στα Αποτελέσματα. (D) Η μεταφορά σε γαλακτόζη δεν επιδρά στην πυρηνική κατανομή του γενετικού τόπου *Thi72*.

Όπως φαίνεται και από την αντιπροσωπευτική εικόνα 18B, απουσία του Tup1 η κατανομή των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων είναι φυσιολογική. Ωστόσο, καταμετρώντας τον απόλυτο συνεντοπισμό των γονιδίων GAL με τους πυρηνικούς πόρους παρατηρήσαμε αύξηση στην παρουσία των γονιδίων στους πυρηνικούς πόρους (επίσης, γράφημα 18C). Η αύξηση αυτή είναι σημαντική καθώς οι απόλυτη τιμή συνεντοπισμού στον πληθυσμό αγγίζει το 50%. Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα να βρεθεί ο τόπος GAL στην περιφέρεια είναι υπερδιπλάσιος σε ένα στέλεχος *tup1Δ* σε σχέση με ένα στέλεχος αγρίου τύπου (περίπου 20%). Διαφορετικά διατυπωμένο, σχεδόν τα 2/3 των γονιδίων που μεταφέρονται στην πυρηνική μεμβράνη κατά τη μεταγραφική ενεργοποίηση έχουν ήδη μεταφερθεί σε ένα στέλεχος *tup1Δ* παρουσία γλυκόζης. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με το αναμενόμενο αποτέλεσμα, σύμφωνα με το οποίο η απουσία της Htz1 στους υποκινητές αυτούς θα έπρεπε να τους απομακρύνει από την πυρηνική μεμβράνη, καθώς η Htz1 προτάθηκε ως ο μεσολαβητής της συγκράτησης σε συνθήκες καταστολής.

Συμπερασματικά τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η Htz1 δεν είναι απαραίτητη για την συγκράτηση των γονιδίων *GAL* στην πυρηνική περιφέρεια. Επιπλέον, για πρώτη φορά παρατηρήθηκε μια σημαντική μετατόπιση των γονιδίων στην πυρηνική μεμβράνη χωρίς να υπάρχει μεταγραφή (σε ένα στέλεχος *tur1Δ*). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν αφενός στην επανεξέταση της σχέσης της μεταγραφής και της μετατόπισης στην πυρηνική μεμβράνη. Αφετέρου εγείρουν ερωτήματα για το ρόλο της Htz1 στη μεταγραφική μνήμη αφού έχει προταθεί ότι ο ρόλος αυτός προκύπτει από τη μεσολάβηση της ιστόνης στην συγκράτηση των γονιδίων στην περιφέρεια, κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε παραπάνω. Βάσει όλων αυτών τέθηκαν τα εξής ερωτήματα:

1) Είναι η μεταγραφή η απαραίτητη συνθήκη για την μετατόπιση στην πυρηνική μεμβράνη; Επιπλέον, απαιτείται η μετατόπιση αυτή για τη βέλτιστη έκφραση των γονιδίων;

2) Η Htz1 σχετίζεται με το καθορισμό της μεταγραφικής μνήμης;

Και τα δύο αυτά ερωτήματα παραμένουν κεντρικά στο πεδίο που μελετά τη γονιδιακή έκφραση (Goldberg et al., 2007; Misteli, 2007) και μελετήθηκαν περαιτέρω.

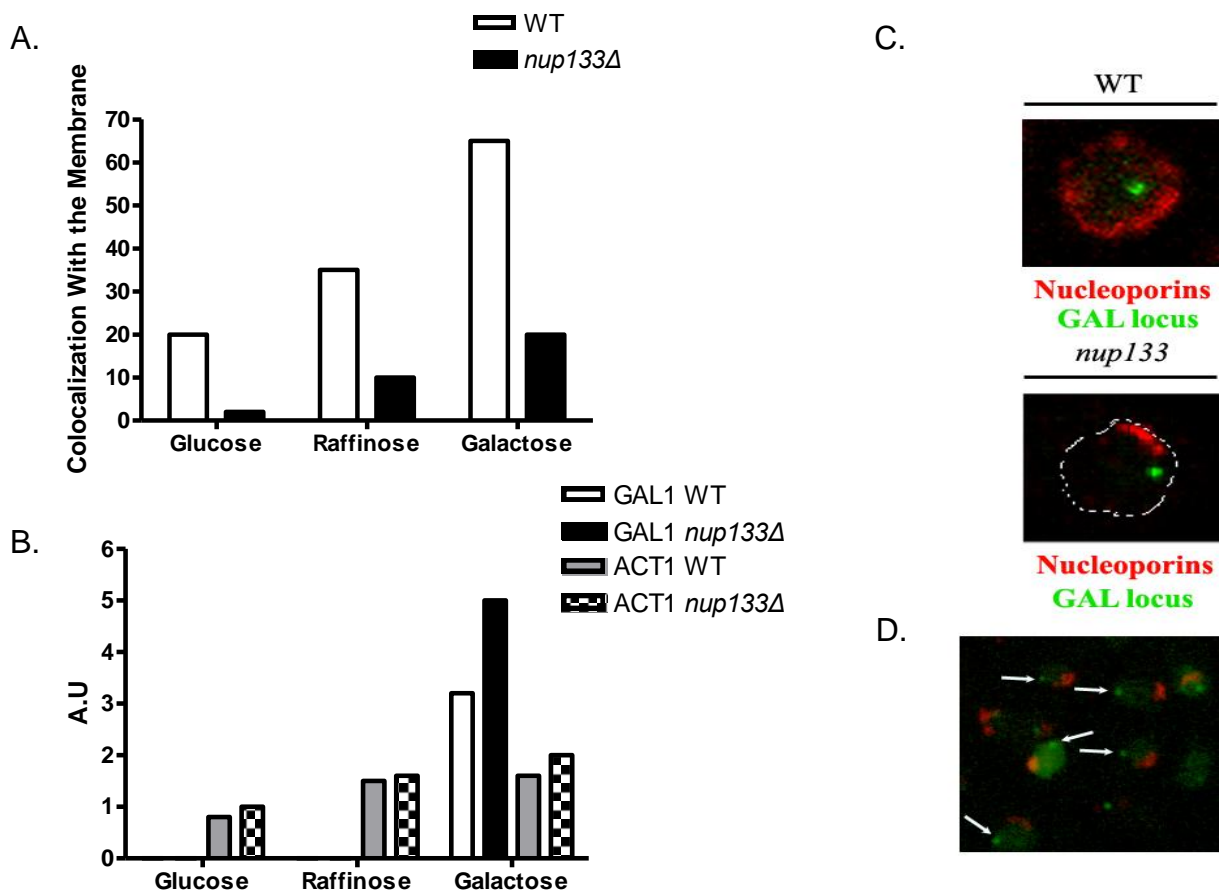
Η μετάβαση προς τους πυρηνικούς πόρους δεν απαιτείται για τη βέλτιστη έκφραση του γονιδίου *GAL1*.

Το πλέον καίριο και κρίσιμο ερώτημα που προκύπτει από τα παραπάνω –όσον αφορά την τοπολογική διάσταση της μεταγραφής- είναι κατά πόσο η μετάβαση προς την πυρηνική μεμβράνη είναι συζευγμένη μηχανιστικά με τη μεταγραφή. Είναι απαραίτητη η μετατόπιση προς την πυρηνική μεμβράνη προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη έκφραση των γονιδίων ή είναι ένα συνοδό φαινόμενο;

Καθορίστηκε συνεπώς η απαίτηση αλληλεπίδρασης του γονιδίου με τον πυρηνικό πόρο για την επίτευξη της βέλτιστης μεταγραφής του *GAL1*. Για να επιτευχθεί αυτό *in vivo* αναζητήθηκε μια φυσιολογική ή τεχνητή κατάσταση που να επιτρέπει κατά τρόπο απόλυτο την παρακολούθηση της εξάρτησης της μεταγραφής από τον πυρηνικό πόρο. Ιδανική απάντηση σε αυτήν την αναζήτηση είναι ο φαινότυπος της κατανομής των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων σε ένα στέλεχος που έχει απαλειφθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την νουκλεοπορίνη Nup133. Απουσία του γονιδίου αυτού τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων σχηματίζουν μεγάλα συσσωματώματα (1-3 στον αριθμό) που κατανέμονται στην περιφέρεια (Belgareh and Doye, 1997) (εικ. 19C). Η υπόθεση που έγινε ήταν ότι αν υπήρχε απόλυτη εξάρτηση της μεταγραφής από την παρουσία στον πυρηνικό πόρο θα έπρεπε τα ποσοστά του συνεντοπισμού γονιδίων και πυρηνικών πόρων που εμφανίζονται κατά την ενεργοποίηση να είναι σε μεγάλο βαθμό τα ίδια. Αν κάτι τέτοιο δεν παρατηρηθεί, και η απαίτηση μετάβασης για τη βέλτιστη έκφραση παραμένει, θα έπρεπε να παρατηρηθούν χαμηλότερα συνολικά ποσοστά έκφρασης του γονιδίου. Για το λόγο αυτό στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω έγινε παράλληλα

ανίχνευση τόσο της κατανομής των πόρων όσο και της έκφρασης του γονιδίου με τη μέθοδο Northern (εικ. 19B).

Όπως φαίνεται και από την εικόνα 19A όταν στο στέλεχος *nup133Δ* τα κύτταρα βρίσκονται σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε επαφή με τους πυρηνικούς πόρους είναι μόλις 2%, περίπου 10 φορές μικρότερο από ότι παρατηρείται σε στέλεχος αγρίου τύπου (εικ.19A, γλυκόζη). Σε συνθήκες ενεργοποίησης του γονιδίου το ποσοστό αγγίζει το 20%, περίπου τρεις φορές μικρότερο απ' ότι παρατηρείται σε συνθήκες επαγωγής (εικ. 19A, γαλακτόζη).



Εικ. 19. Η μετάβαση του γενετικού τύπου GAL στην πυρηνική μεμβράνη δεν απαιτείται για τη μεταγραφή. (A) Κύτταρα αγρίου τύπου (WT) και *nup133Δ* (C) που έφεραν σημασμένο το γενετικό τόπο GAL με το σύστημα LacI-GFP/LacO διάταξη καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό που YP-Dex (καταστολή), YP-Raf (αποκαταστολή) ή YP-GAL (ενεργοποίηση) ενώ βρισκόταν πάντα σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και έγινε χρώση των πυρηνικών πόρων με χρήση του αντισώματος mAb414 που ανιχνεύει την Nic96 και τη Nup60. Καταμετρήθηκε μόνο ο πλήρης συνεντοπισμός που προκύπτει από την υπέρθεση της LacI-GFP (πράσινο) και των νουκλεοπορινών (κόκκινο). (B). Στο ίδιο πείραμα έγινε παράλληλη ανάλυση κατά Northern του *GAL1* mRNA όπως απομονώθηκε από στελέχη αγρίου τύπου (WT) και *nup133Δ*. Ολικό RNA απομονώθηκε, διαχωρίστηκε σε πηκτική αγαρόζης-φορμαλδεΰδης, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη και σημάνθηκε με ιχνευτές σημασμένους με [³²ATP] για τα γονίδια *GAL1* και *ACT1* (το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου). (C). Αντιπροσωπευτική εικόνα κυττάρων όπως εμφανίζονται μετά από τον ανοσοφθορισμό που περιγράφεται στην εικόνα 5A. Το περίγραμμα των πυρήνων *nup133Δ* σχηματίζεται από τη στικτή γραμμή. (D). Τυπική εικόνα εντοπισμού των γενετικών τόπων GAL στο στέλεχος *nup133Δ* και σε συνθήκες καταστολής. Τεχνητή ενίσχυση του διάχυτου πυρηνικού σήματος της LacI-GFP καθορίζει την επιφάνεια του πυρήνα. Όπως φαίνεται στην εικόνα, μεγάλος αριθμός των τόπων GAL βρίσκεται στην περιφέρεια ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι πυρηνικών πόρων.

Ωστόσο, η πορεία ενεργοποίησης του γονιδίου φαίνεται απόλυτα φυσιολογική καθώς ο λόγος της έκφρασης των γονιδίων *GAL1* και *ACT1* παραμένει σταθερός(εικ.19B). Επιπλέον, σε συνθήκες καταστολής παρόλο που ο συνεντοπισμός με τους πυρηνικούς πόρους είναι πολύ χαμηλός ένα σημαντικό μέρος των γονιδίων φαίνεται να παραμένει στην πυρηνική μεμβράνη (εικ.19D), κάτι που επιβεβαιώνει ότι τα υψηλά ποσοστά παρουσίας στην περιφέρεια σε φυσιολογικές συνθήκες δεν οφείλονται στην αλληλεπίδραση με τους πυρηνικούς πόρους παρά τον συνεντοπισμό που παρατηρείται.

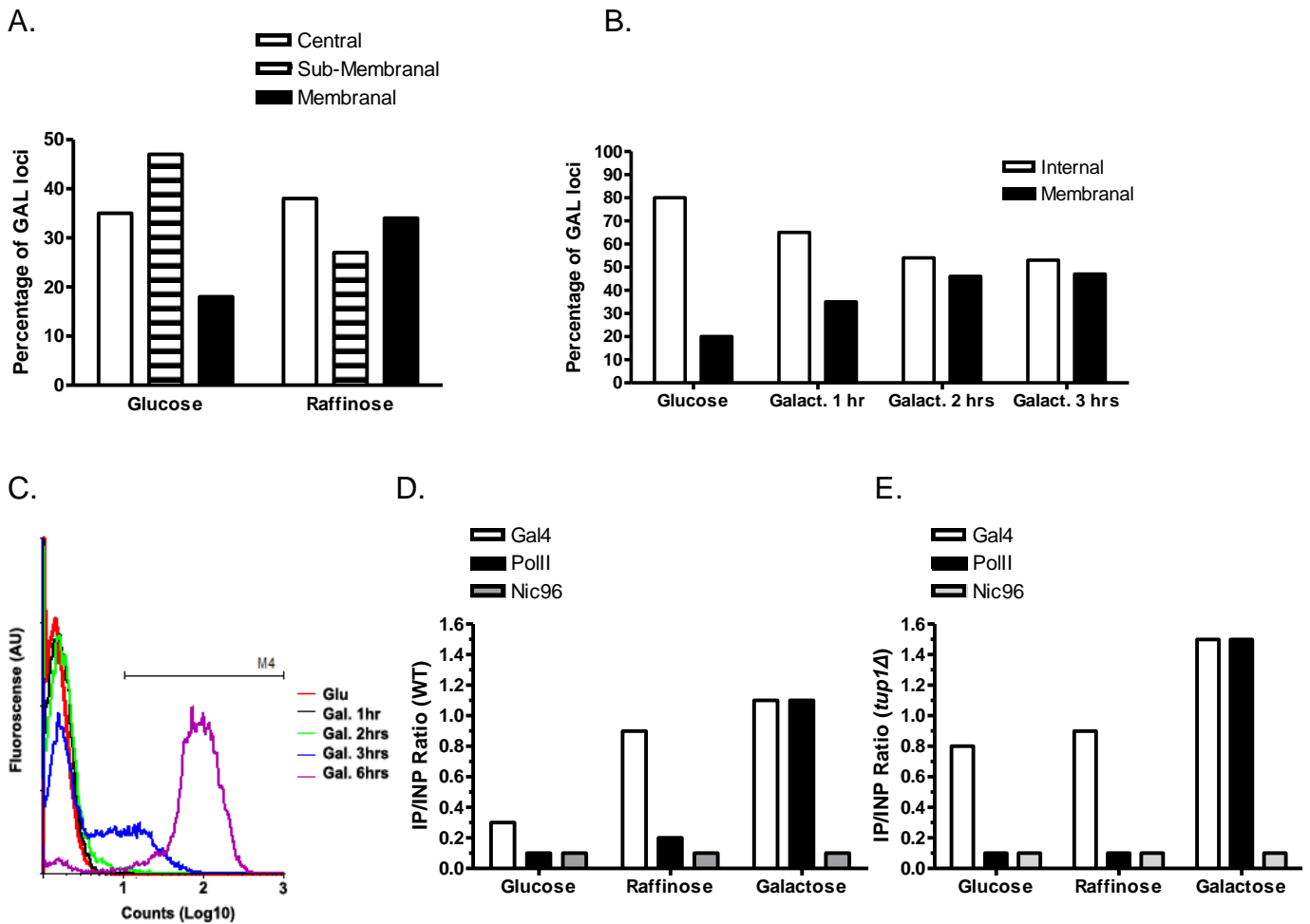
Το συμπέρασμα των πειραμάτων αυτών απορρίπτει το ενδεχόμενο της σύζευξης μεταγραφής και μετατόπισης στην πυρηνική μεμβράνη κατά τρόπο που να εξυπηρετείται η μεταγραφή. Η μεταγραφή των γονιδίων *GAL* μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά το βέλτιστο τρόπο μακριά από τους πυρηνικούς πόρους.

Η μετάβαση προς τους πυρηνικούς πόρους δεν απαιτεί τη μεταγραφή των γονιδίων *GAL*.

Το συμπέρασμα από τα παραπάνω πειράματα είναι ότι η μεταγραφή μπορεί να γίνει με ιδανικές συνθήκες ακόμη και χωρίς να βρίσκονται τα γονίδια σε αλληλεπίδραση με τους πυρηνικούς πόρους. Παραμένει ωστόσο ανοικτό το ερώτημα που αφορά στο μηχανισμό που οδηγεί στη μετατόπιση στην πυρηνική μεμβράνη, σε φυσιολογικές συνθήκες. Εφόσον ισχύουν τα παραπάνω, η μετατόπιση στην πυρηνική μεμβράνη και η μεταγραφή, αν και τις παρατηρούμε παράλληλα, είναι μηχανιστικά ασύνδετες. Στοιχεία για το γεγονός αυτό προέκυψαν και από το αρχικό πείραμα (εικ. 18B), όπου απουσία του *tup1Δ* και σε συνθήκες καταστολής –χωρίς να υπάρχει δηλ. μεταγραφή- ένα σημαντικό μέρος των γονιδίων βρίσκονται ήδη στην πυρηνική μεμβράνη. Η απουσία του *Tup1* μπορεί να ερμηνευθεί ως αποκαταστολή του συστήματος, αλλά όχι ως ενεργοποίηση, καθώς ο *Gal80* –απουσία γαλακτόζης- καταστέλλει ακόμη την ενεργοποιητική περιοχή του *Gal4* (βλ. εισαγωγή) . Παρόμοια αποκαταστολή –αλλά όχι στην ίδια έκταση- μπορούμε να προκληθεί αν τα κύτταρα μεγαλώσουν σε χαμηλά επίπεδα γλυκόζης ή ιδανικότερα αν χρησιμοποιηθεί ένας τρισακχαρίτης, η ραφινόζη, ως πηγή άνθρακα.

Το ένζυμο β-φρουκτοσιδάση (ινβερτάση, στο *S.cerevisiae* ονομάζεται *SUC2*) καταβολίζει τη ραφινόζη σε μελιβιόζη και φρουκτόζη. Η φρουκτόζη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω μεμβρανικών μεταφορέων εξοζών. Ωστόσο, η μελιβιόζη δεν καταβολίζεται περαιτέρω στα στελέχη που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο καθώς στα στελέχη αυτά εκλείπει το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση (το οποίο ωστόσο υπάρχει σε άλλα υποείδη του *S.cerevisiae* και ονομάζεται *Mel1*). Έτσι, ο τέλειος καταβολισμός της ραφινόζης απαιτεί τη δράση και των δύο ενζύμων, και στα εργαστηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται τελικά μόνο το 1/3 της ενέργειας των γλυκοζιτικών δεσμών της ραφινόζης τελικά αφομοιώνεται. Επιπλέον, τα γονίδια *MEL* και *GAL* υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν κοινή ρύθμιση από τον *Gal4* καθώς η μελιβιόζη διασπάται

από την α-γαλακτοσιδάση σε γλυκόζη και α-D-γαλακτόζη η οποία εισέρχεται στο κύτταρο (από το μεταφορέα Gal2) και μετατρέπεται σε φωσφορική γαλακτόζη από το δεύτερο ένζυμο του μονοπατιού Leloir, τη γαλακτοκινάση GAL1 (Holden et al., 2003; Kew and Douglas, 1976; Liljestrom-Suominen et al., 1988).



Εικ. 20. Η μετάβαση του γενετικού τύπου GAL στην πυρηνική μεμβράνη δεν εξαρτάται από την μεταγραφή. **(A)** Κύτταρα που έφεραν σημασμένο το γενετικό τύπο GAL με το σύστημα LacI-GFP/LacO διάταξη καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό που περιείχε γλυκόζη (YP-Dex) ή ραφινόζη (YP-Raf) ενώ βρισκόταν πάντα σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Η κατανομή των τύπων καθορίστηκε όπως περιγράφεται στα Αποτελέσματα. **(B)** Κύτταρα που έφεραν σημασμένο το γενετικό τύπο GAL με το σύστημα LacI-GFP/LacO διάταξη καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό που περιείχε γλυκόζη (YP-Dex) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε γαλακτόζη (YP-Gal) ενώ βρισκόταν πάντα σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Η κατανομή των τύπων μετρήθηκε στα χρονικά σημεία που αναγράφονται. **(C)** Σε παράλληλο πείραμα καθορίστηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS) στις ίδιες συνθήκες η έκφραση της υβριδικής Gal1-GFP από τον ενδογενή υποκινητή. **(D)** Η στρατολόγηση του ενεργοποιητή Gal4 και της υπομονάδας Rpb1 της RNA πολυμεράσης II στον υποκινητή του GAL1 (GAL1UAS) καθορίστηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Η στρατολόγηση της νουκλεοπορίνης Nic96 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό πείραμα ελέγχου. Κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε YP-Dex (καταστολή), YP-Raf (αποκαταστολή) και YP-Gal (ενεργοποίηση μετά από 6 ώρες σε γαλακτόζη). **(E)** Η στρατολόγηση των ενεργοποιητών και της Nic96 όπως και στο **(D)** στον υποκινητή του GAL1 (GAL1UAS) καθορίστηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στο στέλεχος *tup1Δ* σε συνθήκες καταστολής, αποκαταστολής, και ενεργοποίησης όπως και στο **(E)**. Οι αριθμοί παρουσιάζουν το λόγο IP/Input (Immunoprecipitated DNA/ Input DNA). Χρησιμοποιήθηκε συμβατική PCR, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδης και χρώση με SYBR Green I.

Συνεπώς, η ραφινόζη ισοδυναμεί με μειωμένη παρουσία γλυκόζης στο μέσο (δηλ. με συνθήκες αποκαταστολής) αλλά ταυτόχρονα επηρεάζει και το μονοπάτι των GAL γονιδίων. Αν η

υπόθεση που προτείνεται εδώ είναι σωστή, ότι δηλ. η μεταγραφή δεν είναι απαραίτητη για τη μετάβαση στην πυρηνική μεμβράνη, θα πρέπει παρουσία ραφινόζης (αποκαταστολής) να υπάρχει αυξημένη παρουσία των γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια, ενδεχομένως κατά τον ίδιο τρόπο που αυτό συμβαίνει απουσία του *Tup1*.

Η υπόθεση αυτή ελέγχθηκε, μετρώντας την κατανομή των γενετικών τόπων *GAL* τόσο σε στελέχη αγρίου τύπου όσο και σε στελέχη *nup133Δ* (εικ 19A) σε ραφινόζη. Όπως φαίνεται, ακόμη κι αν δεν υπάρχει μεταγραφή του γονιδίου (εικ. 19A), σε στελέχη αγρίου τύπου ένα ποσοστό κυττάρων (35%) συνεντοπίζεται με την πυρηνική μεμβράνη. Το ποσοστό αυτό είναι κατά 15% υψηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό σε συνθήκες καταστολής (20%). Επιπλέον, αύξηση του συνεντοπισμού με την πυρηνική μεμβράνη σε συνθήκες αποκαταστολής (ραφινόζη) παρατηρήθηκε και στο στέλεχος *nup133Δ* (περίπου 10% συνεντοπισμός έναντι 2% σε συνθήκες καταστολής στο ίδιο στέλεχος).

Το ποσοστό των γονιδίων που μεταφέρονται στη πυρηνική μεμβράνη όταν γίνεται αποκαταστολή με ραφινόζη, είναι περίπου 15%. Στην περίπτωση αυτή, το ποσοστό των γονιδίων που βρίσκονται κεντρικά παραμένει το ίδιο (εικ. 20A). Το ποσοστό των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στην μεμβράνη αλλά όχι επί της μεμβράνης μειώνεται όσο ακριβώς αυξάνεται ο εντοπισμός στην πυρηνική μεμβράνη (εικ.20A). Αν και δεν μπορεί να αντιστοιχηθούν πλήρως τα ποσοστά αυτά, καθώς δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθεί η πορεία καθενός γονιδίου, είναι ωστόσο θεμιτό το συμπέρασμα ότι η μετατόπιση σε συνθήκες αποκαταστολής γίνεται με μετατόπιση της δυναμικής ισορροπίας της παρουσίας στις τρεις διαφορετικές ζώνες, από την υπο-μεμβρανική περιοχή προς την περιοχή της πυρηνικής μεμβράνης.

Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται ότι η μετατόπιση προς την πυρηνική περιφέρεια είναι ασύνδετη με τη μεταγραφή. Η αποσύνδεση των δύο αυτών φαινομένων οδήγησε στη συνέχεια στη μελέτη της κινητικής των δύο διεργασιών κατά τρόπο παράλληλο. Εφόσον μεταγραφή και μετατόπιση δεν είναι μηχανιστικά συνδεδεμένες θα περίμενε κανείς ενδεχομένως να παρατηρήσει και διαφορετικές κινητικές των δύο φαινομένων. Παρόλο που το φαινόμενο της μετάβασης έχει μελετηθεί εκτενώς, όλες οι μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε σταθερές συνθήκες είτε ενεργοποίησης είτε καταστολής.

Για να συσχετισθεί σε μεγαλύτερο βαθμό η μετατόπιση των γονιδίων ενός πληθυσμού με την έκφραση μεμονωμένων κυττάρων μετρήθηκαν παράλληλα η έκφραση της υβριδικής *Gal1-GFP* με κυτταρομετρία ροής και η κατανομή των γονιδίων κατά το άμεσο πέρασμα από τη γλυκόζη στη γαλακτόζη. Εδώ θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η παραλλαγή της *GFP* (*yEGFP*, *S65T,F64L*) που χρησιμοποιήθηκε έχει σχεδόν τη διπλάσια ικανότητα αναδίπλωσης (*folding efficiency*) από την *S65T GFP*, ο μέσος χρόνος ωρίμανσης της οποίας είναι περίπου 30 min σε θερμοκρασία 37⁰ C (Tsien, 1998). Αυτό σημαίνει ότι η ανίχνευση της σύνθεσης της πρωτεΐνης γίνεται μόλις 15-20 λεπτά μετά την παραγωγή του μεταγράφου. Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής αφενός επιτρέπει την ανίχνευση πολύ χαμηλών επιπέδων έκφρασης, αφετέρου επιτρέπει να διακριθούν οι πληθυσμοί των κυττάρων που μεταγράφεται το γονίδιο *GAL1* βάσει των

επιπέδων έκφρασης τους. Από τα πειράματα που έγιναν (εικ. 20C) φαίνεται ξεκάθαρα ότι έως και τρεις ώρες μετά το πέρασμα των κυττάρων σε γαλακτόζη, ο πληθυσμός των κυττάρων που εκφράζει την Gal1-GFP είναι μόλις 33% του συνολικού πληθυσμού (εικ. 20C, μπλε καμπύλη). Τα μέσα επίπεδα έκφρασης όμως είναι μέχρι και 10 φορές χαμηλότερα από τα αντίστοιχα μέσα επίπεδα έκφρασης μετά από έξι ώρες επίδρασης της γαλακτόζης, όπου το 94% των κυττάρων εκφράζει ισχυρά την Gal1-GFP (εικ. 20C, μοβ καμπύλη) και στα οποία αντιστοιχεί η κατανομή γονιδίων της εικ.18C.

Ωστόσο, η ανακατανομή του *GAL1* γονιδίου ακολουθεί ταχύτερη κινητική αφού μόλις δύο ώρες μετά το πέρασμα των κυττάρων σε γαλακτόζη ήδη περίπου το 50% των γονιδίων φαίνεται να συνεντοπίζεται με την πυρηνική μεμβράνη (εικ. 20B) ενώ μόνο το 3% των γονιδίων εκφράζει Gal1-GFP (εικ. 20C, πράσινη καμπύλη). Αυτό σημαίνει ότι περίπου τα 2/3 του πληθυσμού των γονιδίων που τελικά θα μεταφερθεί προς την πυρηνική μεμβράνη, μετατοπίζεται χωρίς να υπάρχει μεταγραφή, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στο στέλεχος *tur1Δ* παρουσία γλυκόζης (εικ.18B). Θα πρέπει τέλος εδώ να τονιστεί ότι η κινητική ενεργοποίησης του *GAL1* που παρουσιάστηκε σε αυτό το σημείο διαφέρει από αυτήν που παρουσιάστηκε στην εικ.12. Ο λόγος της διαφοράς αυτής απορρέει από το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές πορείες ενεργοποίησης του *GAL1* προκειμένου να εξυπηρετηθούν οι διαφορετικές πειραματικές απαιτήσεις*.

Από την εικ.20 συνάγεται ότι υπάρχει μια περίοδος κατά την οποία αν και το κύτταρο δέχεται τη σηματοδότηση της ενεργοποίησης, ωστόσο η μεταγραφή δεν ξεκινά αμέσως και με τον ίδιο ρυθμό για όλα τα κύτταρα του πληθυσμού. Ακόμη περισσότερο κάτι τέτοιο σημαίνει ότι παρόλο που δεν υπάρχει μεταγραφή ωστόσο, υπάρχει κάποιος μηχανισμός που συμβάλλει στο να μεταφερθεί ένα σημαντικό μέρος των γονιδίων προς την πυρηνική μεμβράνη. Το κοινό στοιχείο των καταστάσεων αποκαταστολής –είτε προκύπτει απουσία του Tur1, είτε απουσία γλυκόζης (ραφινόζη)- είναι η αυξημένη παρουσία του ενεργοποιητή Gal4 στον υποκινητή (εικ. 20D και 20E). Η μετατόπιση των γονιδίων απουσία του Tur1 συμπίπτει με αυξημένη παρουσία του Gal4 ακόμη και σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) (εικ.20E) που είναι σχεδόν τριπλάσια από την αντίστοιχη στρατολόγηση στο στέλεχος αγρίου τύπου (εικ.20D). Επιπλέον, κατά τη παρουσία ραφινόζης στο θρεπτικό μέσο, η στρατολόγηση του Gal4 στον υποκινητή του *GAL1* σε στέλεχος αγρίου τύπου (εικ.20D), σχεδόν τριπλασιάζεται σε σχέση με την παρουσία του σε γλυκόζη και είναι σχεδόν ίση με τη παρουσία του κατά την ενεργοποίηση σε γαλακτόζη (ενεργοποίηση μετά από 6 ώρες σε γαλακτόζη). Από την άλλη η καταστολή του Gal80 επί του Gal4 (απουσία

* Για την ακρίβεια, η κινητική που περιγράφεται στην εικ.12 προκύπτει αν υπάρξει μια περίοδος αποκαταστολής πριν την ενεργοποίηση (π.χ. με χρήση ραφινόζης) ενώ η κινητική που περιγράφεται στην εικ.18C προκύπτει με πέρασμα κυττάρων που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση (προκειμένου να μην υπάρξει καμία αποκαταστολή λόγω κατανάλωσης γλυκόζης) σε γαλακτόζη. Οι διαφορές στο χειρισμό αυτό μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές διαφορές στην κινητική της ενεργοποίησης, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το γονίδιο του Gal4 και τα επίπεδα βασικής έκφρασής του και κατ' επεκταση παρουσίας του στους υποκινητές ελέγχεται μόνο από την καταστατική δράση της γλυκόζης.

γαλακτόζης) παρ' όλη την ισχυρή παρουσία του ενεργοποιητή αποτρέπει τη στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής σε ραφινόζη, όπως αυτή ανιχνεύεται από την παρουσία της μεγάλης υπομονάδας της RNA PolII (Rpb1) (εικ.20D). Επιπλέον, δεν παρατηρείται καμία αλληλεπίδραση της δομικής νουκλεοπορίνης Nic96 με τον υποκινητή του *GAL1* (αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία (Casolari et al., 2004) σε οποιαδήποτε συνθήκη κάτι που χρησίμευσε ως αρνητικό πείραμα ελέγχου (εικ.20D). Κατά συνέπεια είναι δυνατή η μετατόπιση των GAL γονιδίων στην πυρηνική μεμβράνη ανεξάρτητα από τη μεταγραφή, όπως φάνηκε από τη μετατόπιση σε συνθήκες αποκαταστολής (είτε με χρήση ραφινόζης, είτε σε γενετικό υπόβαθρο *tur1Δ*).

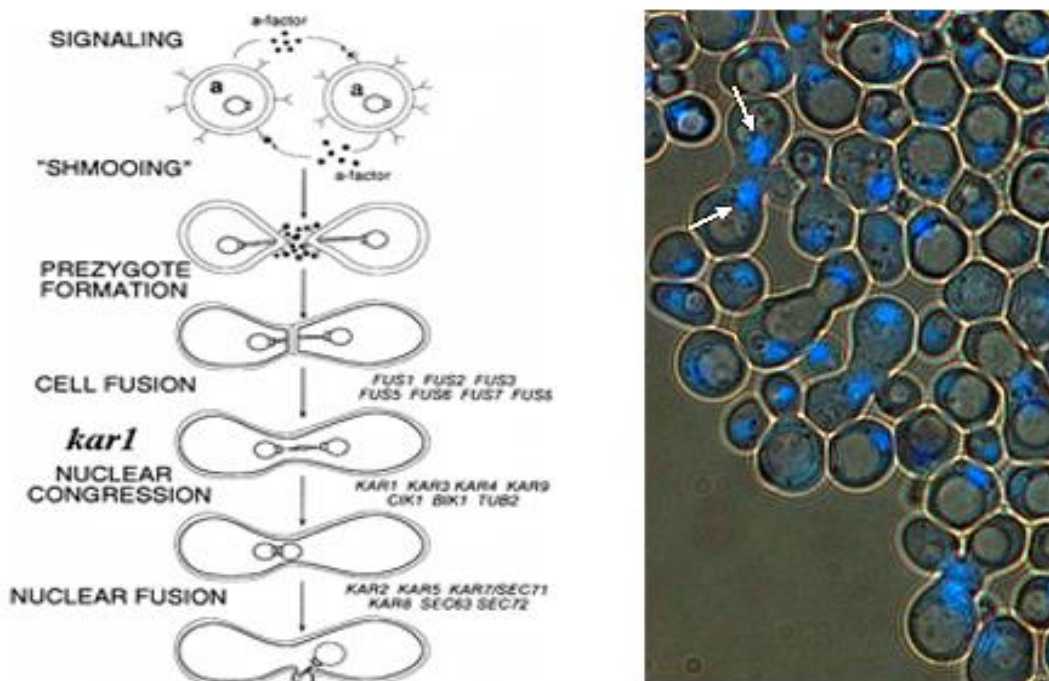
Η ιστόνη Htz1 δεν είναι ο μεσολαβητής της μεταγραφικής μνήμης, η οποία έχει κυτταροπλασματική κι όχι πυρηνική βάση.

Το γεγονός ότι η απολύτως ειδική και τοπική απώλεια της ιστόνης Htz1 απουσία του Tur1 δεν οδηγεί σε χαμηλότερη στρατολόγηση στην πυρηνική μεμβράνη παρά μάλλον σε σημαντικά υψηλότερη, μας οδήγησε στην πειραματική εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων για το φαινόμενο της μεταγραφής, υποδεικνύοντας ότι η μετατόπιση των γονιδίων στην πυρηνική μεμβράνη και η μεταγραφική τους ενεργοποίηση είναι ασύνδετες μηχανιστικά διεργασίες, με πιθανότερο σενάριο η μετατόπιση αυτή να είναι ένα συνοδό φαινόμενο και όχι ένας ρυθμιστικός μηχανισμός (βλ. επίσης συζήτηση).

Το δεύτερο φαινόμενο που συσχετίστηκε με την ενσωμάτωση της Htz1 κατά τη μεταγραφική καταστολή όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι αυτό της μεταγραφικής μνήμης των γονιδίων *GAL*. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό (Akhtar and Gasser, 2007; Brickner et al., 2007) η ενσωμάτωση της Htz1 στον υποκινητή του *GAL1* συντελεί –μέσω της συγκράτησης στην πυρηνική μεμβράνη- στην ταχύτερη ενεργοποίηση του υποκινητή αυτού μετά από μια σύντομη καταστολή. Η εμπλοκή της Htz1 στο φαινόμενο έχει προταθεί ότι αντιπροσωπεύει την καθαρά χρωματινική-πυρηνική βάση του μηχανισμού. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες ενότητες η Htz1 δεν είναι ο πρώτος κρίκος στην ενεργοποίηση των *GAL* γονιδίων. Τα πρώτα χρονικά γεγονότα στην ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών (και κατ' επέκταση και στην επανενεργοποίηση) έχουν μια καθαρά κυτταροπλασματική και όχι πυρηνική διάσταση. Ο Gal80 δεσμεύεται από τον Gal3 στο κυτταρόπλασμα και αυτό οδηγεί ουσιαστικά στην ενεργοποίηση του προσδεμένου Gal4 και τη στρατολόγηση των συνενεργοποιητών και της RNA πολυμεράσης II. Συνεπώς αρχικά να ελέγχθηκε γενικότερα το ενδεχόμενο της κυτταροπλασματικής διάστασης του φαινομένου της μεταγραφικής μνήμης των *GAL* γονιδίων.

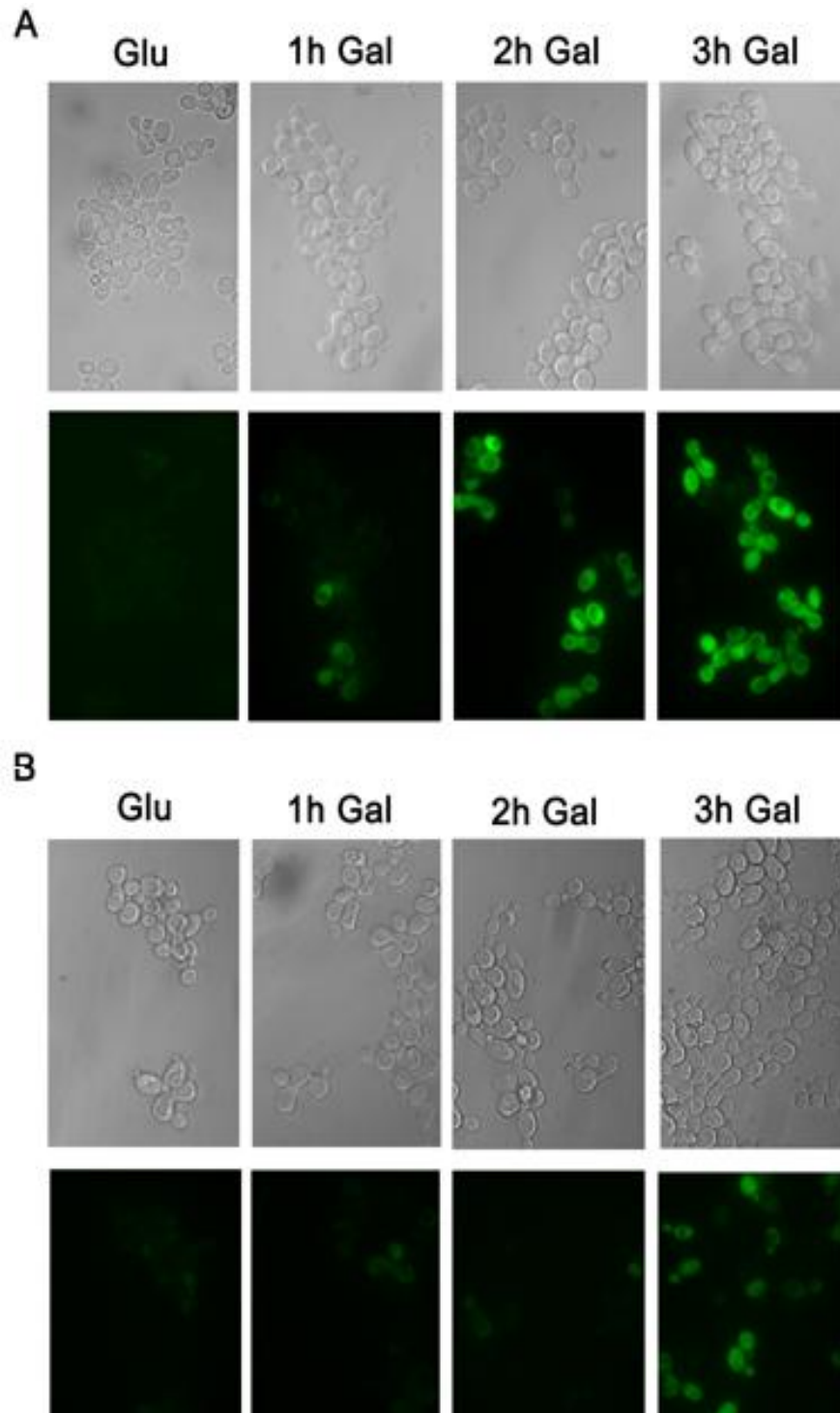
Για να διερευνηθεί η εμπλοκή του κυτταροπλάσματος στο φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης χρησιμοποιήθηκε η σύντηξη απλοειδών κυτάρων για το σχηματισμό διπλοειδών ετεροκάρυων. Τα πειράματα αυτά γίνονται πιο εύκολα κατανοητά αν κανείς φανταστεί ότι αποτελούν ουσιαστικά την εμφύτευση ενός πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ενός άλλου κυτάρου. Το κύτταρο αυτό μπορεί να έχει περάσει πριν από ενεργοποίηση σε γαλακτόζη και σύντομη

καταστολή ή μπορεί να μην έχει ποτέ πριν περάσει από ενεργοποίηση και να βρίσκεται μόνιμα σε καταστολή. Έτσι, όταν ο πυρήνας εμφυτεύεται στο κυτταρόπλασμα κυτάρου που έχει περάσει από ενεργοποίηση -και αν υπάρχει μια κυτταροπλασματική διάσταση στο φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης- σε μια δοκιμή ενεργοποίησης με γαλακτόζη θα πρέπει να επηρεαστεί ο ρυθμός με τον οποίο ο «εμφυτευμένος» πυρήνας εκφράζει την υβριδική Gal1-GFP (που έχει χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας) σε σχέση με το ρυθμό που εκφράζεται η Gal1-GFP όταν ο πυρήνας εμφυτεύεται στο κυτταρόπλασμα ενός κυτάρου που δεν έχει ποτέ πριν ενεργοποιηθεί. Η εμφύτευση πυρήνων είναι τεχνικά απαιτητική, αλλά ακριβώς ο ίδιος σκοπός εξυπηρετείται αν γίνει η σύζευξη δύο κυττάρων αντίθετου συζευκτικού τύπου, ενός που φέρει τον πυρήνα που θα εκφράσει την Gal1-GFP και ενός που έχει ή δεν έχει περάσει από πρότερη ενεργοποίηση. Επιπλέον, οι πυρήνες των κυττάρων δεν μπορούν να συζευχθούν αφού το ένα από τα δύο κύτταρα φέρει μια μονόπλευρη μεταλλαγή που αποτρέπει την καρυογαμία (*kar1-1*) (Conde and Fink, 1976). Το αποτέλεσμα είναι ένα διπλοειδές κύτταρο με ενιαίο κυτταρόπλασμα και δυο διακριτούς πυρήνες -που συνεχίζουν να διαιρούνται μιτωτικά (εικ.21).



Εικ. 21. Σχηματισμός ετεροκάρυων στο *S.cerevisiae*. Αριστερά, η φυσιολογική πορεία σχηματισμού ετεροκάρυων όταν κύτταρα αντίθετου συζευκτικού τύπου αναμιγνύονται. Το γονίδιο *KAR1* είναι απαραίτητο για τη σύγκληση των δύο πυρήνων (nuclear congression) και η μεταλλαγή *kar1-1* οδηγεί στο σχηματισμό ετεροκάρυων με ασύζευκτους πυρήνες (βέλη, δεξιά εικόνα).

Στα πειράματα που περιγράφονται στην εικ. 22Α ένα από τα δύο στελέχη (αυτό που φέρει και τη μεταλλαγή *kar1-1*) αρχικά ενεργοποιείται σε μέγιστο βαθμό και στη συνέχεια καταστέλλεται. Κύτταρα που έχουν περάσει από τα βήματα αυτά αναμιγνύονται με ίσο αριθμό κυττάρων που φέρουν το γονίδιο *GAL1-GFP* και που δεν έχουν ποτέ πριν ενεργοποιηθεί και η σύζευξη πραγματοποιείται παρουσία πάντα γλυκόζης (καταστολή). Όταν περάσει η περίοδος σύζευξης τα κύτταρα μεταφέρονται σε γαλακτόζη και ακολουθεί ενεργοποίηση.

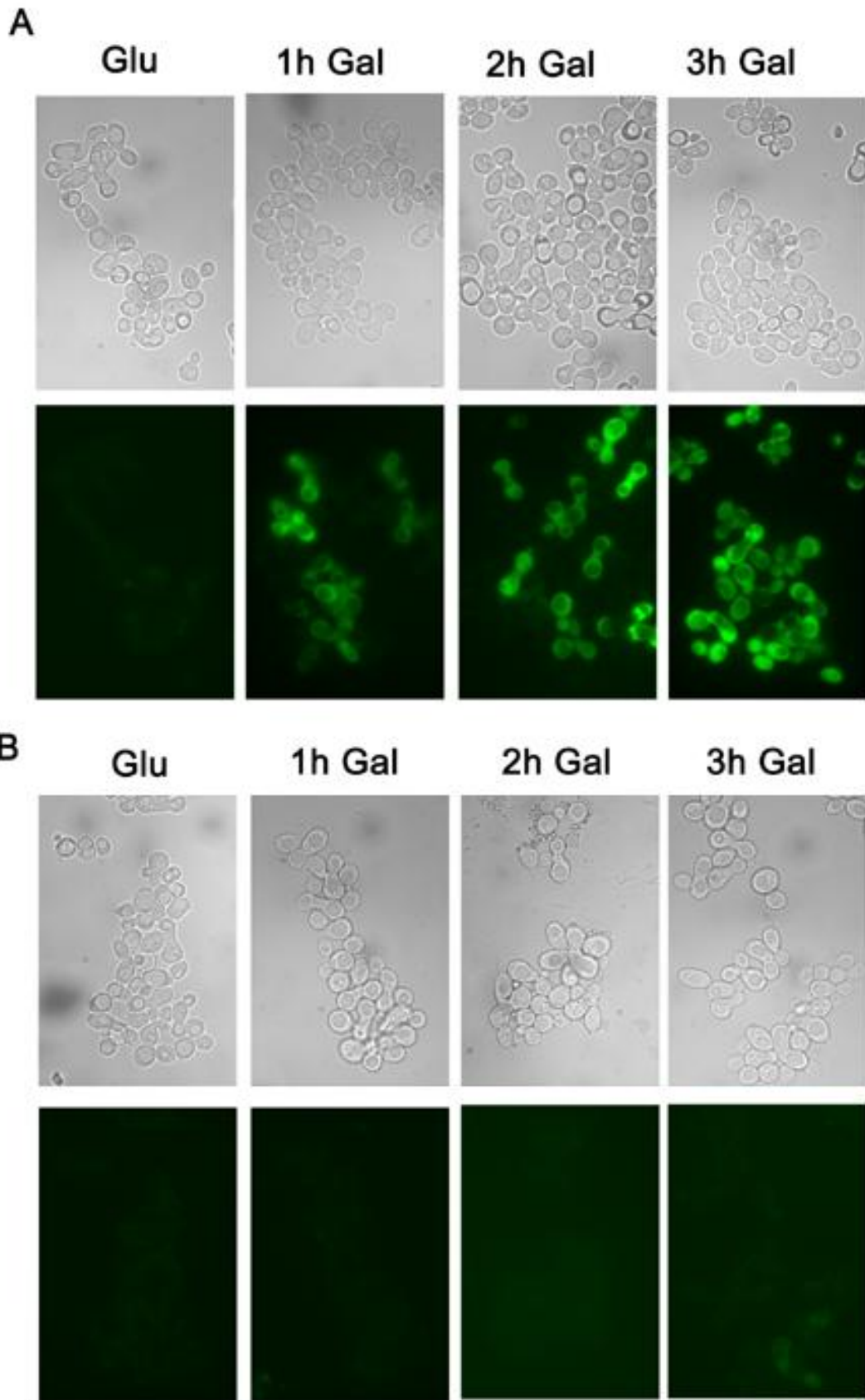


Εικ. 22. Πειράματα σχηματισμού ετεροκάρυων εδραιώνουν την κυτταροπλασματική βάση του της μεταγραφικής μνήμης. (Α). Εικόνες μικροσκοπίας ανιχνεύουν την κυτταροπλασματική Gal1-GFP και τα αντίστοιχα ετεροκάρυα σε εκθετική φάση μετά την μεταφορά σε γαλακτόζη. Κύτταρα *kar1-1* αρχικά μεγάλωσαν σε πλούσιο θρεπτικό γαλακτόζης για 24 ώρες και στη συνέχεια σε πλούσιο θρεπτικό γλυκόζη για 6 ώρες. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με ίσο αριθμό (ca. 10^7) κυττάρων GAL1-GFP αντίθετου συζευκτικού τύπου μεγάλωμένων συνεχώς σε πλούσιο θρεπτικό γαλακτόζης. Η σύζευξη αφέθηκε για 5 ώρες σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό YPDex 2%. Η απόδοση υπολογίστηκε περίπου στο 60%. Μετά από τη περίοδο αυτή τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε υγρό πλούσιο θρεπτικό μέσο γαλακτόζης, όπου και δείγματα κρατήθηκαν στα χρονικά σημεία που αναφέρονται και παρατηρήθηκαν με επιφθορίζουσα μικροσκοπία (ορατού και UV φωτός). Τα ετεροκάρυα παρουσιάζουν επίμηκη μορφολογία, συχνά με προεξέχουσες εκβλαστήσεις (όπως και στην εικ. 4) **(Β).** πείραμα παρόμοιο με αυτό του πλαισίου **(Α)**, με τη διαφορά ότι δεν υπήρξε ενεργοποίηση στα κύτταρα *kar1-1*. Τα κύτταρα *kar1-1* μεγάλωσαν συνεχώς σε γλυκόζη πριν συζευχθούν με ίσο αριθμό κυττάρων αντίθετου συζευκτικού τύπου GAL1-GFP που μεγάλωσαν επίσης συνεχώς στη γλυκόζη. Ακολούθησε ενεργοποίηση με μεταφορά σε YP-Gal ,δειγματοληψία και εξέταση στο μικροσκόπιο όπως ακριβώς και στο **(Α)**.

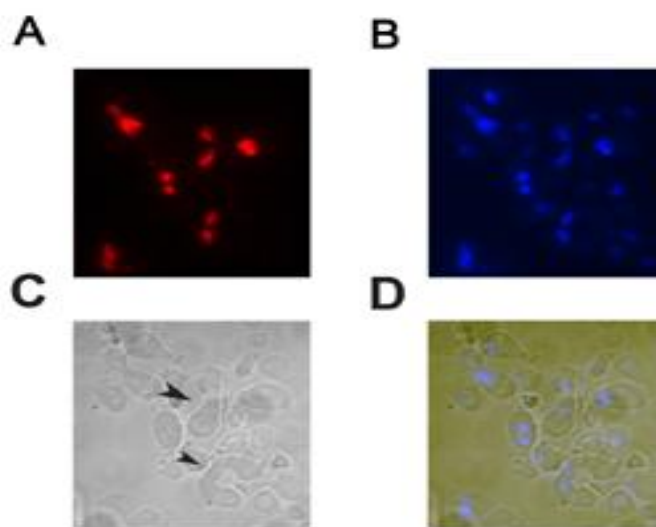
Στην εικ.22A φαίνεται η κινητική της έκφρασης του *GAL1-GFP* γονιδίου πάντα από τους «εμφυτευμένους» πυρήνες. Η κινητική αυτή συγκρίνεται με την κινητική που ακολουθεί η έκφραση της *Gal1-GFP* σε παράλληλο πείραμα όπου τα κύτταρα και των δύο συζευκτικών τύπων βρισκόταν σε συνεχή καταστολή, συζεύχθηκαν υπό συνθήκες καταστολής και ακολούθησε ενεργοποίηση που αποτελεί αρχική ενεργοποίηση και για τους δύο πυρήνες κάθε ετεροκάρυου (εικ.22B). Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε έτσι ώστε αν το κυτταρόπλασμα των κυττάρων που έχουν ήδη περάσει μία ενεργοποίηση, επιδρά με οποιοδήποτε τρόπο στην κινητική της ενεργοποίησης (θετικό ή αρνητικό), η διαφορά αυτή θα αντανάκλαται στην κινητική με την οποία συσσωρεύεται η *GAL1-GFP* στο κυτταρόπλασμα των ετεροκάρυων σε σύγκριση πάντα με την κινητική του αντίστοιχου πειράματος όπου κανένας πληθυσμός δεν έχει περάσει από ενεργοποίηση.

Όπως φαίνεται και από την εικόνα η κινητική ενεργοποίησης και της συσσώρευσης *Gal1-GFP* από την έκφραση του «εμφυτευμένου» πυρήνα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που έχουν περάσει από ενεργοποίηση (εικ.22A) είναι εντυπωσιακά ταχύτερη από την αντίστοιχη κινητική όταν οι «εμφυτευμένοι πυρήνες» βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που δεν έχουν πριν ενεργοποιηθεί (εικ.22B). Στη δεύτερη περίπτωση η *Gal1-GFP* ανιχνεύεται ήδη από την πρώτη ώρα μετά τη σηματοδότηση σε γαλακτόζη (εικ.22A). Τα πειράματα που περιγράφηκαν παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας που δημιουργεί τη μεταγραφική μνήμη έχει πρωταρχικά κυτταροπλασματική προέλευση και μπορεί να προκαλέσει την γρήγορη έναρξη της μεταγραφής (αναπαριστώντας ουσιαστικά το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης) αν επιδράσει σε πυρήνα που δεν έχει προηγουμένως ενεργοποιηθεί. Κατά συνέπεια η μεταγραφική μνήμη έχει κυτταροπλασματική και όχι πυρηνική προέλευση.

Τα παραπάνω οδήγησαν στην εξέταση της επίδρασης της *Htz1* στο φαινόμενο αυτό. Έτσι, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα με αυτό της εικ. 22A-όπου ο ένας πληθυσμός έχει ήδη περάσει από μια ενεργοποίηση και μια σύντομη καταστολή- με τη μόνη διαφορά ότι οι «εμφυτευμένοι» πυρήνες που μεταγράφουν το γονίδιο *GAL1-GFP* δεν φέρουν *Htz1* πριν τη σύζευξη (*htz1Δ GAL1-GFP*). Στη περίπτωση αυτή (εικ.23A) η κινητική είναι σαφώς ταχύτερη από αυτήν της εικ.22B και ταυτόσημη με αυτήν του αντίστοιχου πειράματος της εικ. 22A. Αντιθέτως, όταν πραγματοποιείται με τα ίδια στελέχη πείραμα αντίστοιχο με αυτό της εικ. 22B όπου οι *htz1Δ-GAL1GFP* πυρήνες «εμφυτεύονται» σε κυτταρόπλασμα που δεν έχει πριν ενεργοποιηθεί η ενεργοποίηση καθυστερεί δραματικά (εικ.23B).



Εικ. 23. Η ιστόνη Htz1 δεν απαιτείται τόσο για την εδραίωση της μεταγραφικής μνήμης αλλά για την αρχική ενεργοποίηση. Πειράματα σχηματισμού ετεροκάρυων που ελέγχουν το ρόλο της ιστόνης Htz1. **(A)**. Εικόνες μικροσκοπίας ανιχνεύουν την κυτταροπλασματική Gal1-GFP όπως ακριβώς και στην **εικ.22A** με τη διαφορά ότι στο στέλεχος *GAL1-GFP* έχει διαγραφεί το γονίδιο *HTZ1*. **(B)**. Ανίχνευση της Gal1-GFP μετά από πρότερη ενεργοποίηση του στελέχους *kar1-1*, όπως ακριβώς περιγράφεται για την **εικόνα 22B**.



Εικ. 24. Η ιστόνη Htz1 δεν απαιτείται τόσο για την εδραίωση της μεταγραφικής μνήμης αλλά για την αρχική ενεργοποίηση. Ετεροκάρυα μετά από σύζευξη *kar1-1* (HA-Htz1) X *htz1Δ*. Κύτταρα *kar1-1 HA-Htz1* μεγάλωσαν συνεχώς σε γλυκόζη πριν συζευχθούν με κύτταρα *htz1Δ* αντίθετου συζευκτικού τύπου σε στερεό θρεπτικό YPDex 2%. Μετά τη σύζευξη μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεΐδη, και έγινε χρώση της Htz1 με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA. Στη συνέχεια εξετάστηκαν για ανοσοφθορισμό με επιφθορίζουσα μικροσκοπία. Όπως φαίνεται, η Htz1 ανιχνεύεται αμέσως μετά τη σύζευξη **(A)** και στους δύο πυρήνες **(B)**. **(A)**. Ανοσοφθορισμός έναντι της Htz1(κόκκινο). **(B)**. χρώση DAPI των πυρήνων. **(C)**. Εικόνα των ετεροκάρυων και **(D)**. Υπέρθωση των **(B)** και **(C)**.

Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι ο ρόλος της Htz1 δεν είναι σημαντικός για το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης καθώς η κυτταροπλασματική διάστασή του επιστατεί. Ακόμη περισσότερο, υποδηλώνει ότι η Htz1 είναι σημαντική κατά την πρώτη ενεργοποίηση. Κρίσιμο σημείο στην ερμηνεία αυτών των πειραμάτων είναι ότι μετά την σύζευξη των κυττάρων (ανεξάρτητα αν πραγματοποιείται μεταξύ των *htz1Δ-GAL1-GFP* κυττάρων με κύτταρα που έχουν ή δεν έχουν πρότερη ενεργοποίηση) η Htz1 έχει ήδη συσσωρευθεί στο πυρήνα που δεν έφερε Htz1, κατά τη περίοδο της σύζευξης (εικ.24). Παρόλη την ενσωμάτωση της στον πυρήνα, το πείραμα της εικ.23B υποδηλώνει ότι η ενσωμάτωση αυτή δεν είναι λειτουργική (βλ. συζήτηση). Ακόμη όμως κι αν δεν είναι λειτουργική η Htz1, το φαινόμενο της ταχύτερης ενεργοποίησης που οφείλεται στη επίδραση του κυτταροπλάσματος των κυττάρων που έχουν πρότερα ενεργοποιηθεί, επιστατεί της δυσλειτουργίας της Htz1, επιβεβαιώνοντας την κυρίαρχη κυτταροπλασματική βάση του φαινομένου.

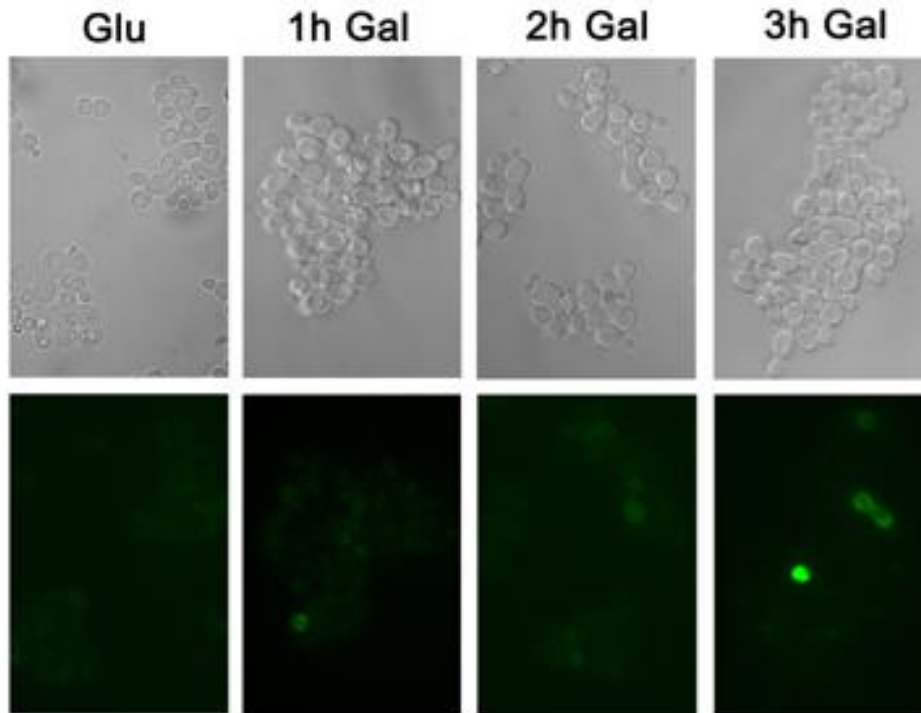
Η γαλακτοκινάση Gal1 είναι ο κυτταροπλασματικός μεσολαβητής της μεταγραφικής μνήμης.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο Gal3 δρα κατακρατώντας τον Gal80 στο κυτταρόπλασμα και διακρίνεται ως σχεδόν αποκλειστικά κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιεί τον Gal4, δρα δηλ. σαν ένας κυτταροπλασματικός συν-ενεργοποιητής.

Καθώς τα παραπάνω πειράματα αποδεικνύουν την παρουσία ενός κυτταροπλασματικού θετικού ρυθμιστή εξετάστηκε το ενδεχόμενο ο ρυθμιστής αυτός να είναι ο Gal3. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα με κυτταρομετρία ροής που απέρριψαν το ενδεχόμενο ο συνενεργοποιητής Gal3 να είναι ο μεσολαβητής και κατέστησαν απαραίτητη την ύπαρξη της γαλακτοκινάσης Gal1 για την εκδήλωση του φαινομένου. Τα πειράματα αυτά σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν από το Γιάννη Ζαχαριουδάκη και το Δημήτρη Τζαμαρία.

Η γαλακτοκινάση Gal1 παρουσιάζει υψηλή αμινοξική ταυτότητα και ομολογία με τον ενεργοποιητή Gal3. Τα δυο γονίδια είναι παρα-ομόλογα και ο διαχωρισμός τους φαίνεται να προέκυψε εκατομμύρια χρόνια πριν (Bhat and Venkatesh, 2005). Η γαλακτοκινάση δεσμεύει τον καταστολέα Gal80 με την ίδια ακριβώς στοιχειομετρία όπως και ο Gal3, αν και με χαμηλότερη χημική συγγένεια (Timson et al., 2002). Η Gal1 έχει αποδειχθεί ότι δρα ως ενεργοποιητής του συστήματος και εκτοπική έκφραση της από συστατικό -μη επαγόμενο υποκινητή από γαλακτόζη μπορεί να αναπληρώσει την απώλεια του Gal3 (Bhat and Venkatesh, 2005).

Δεδομένων των παραπάνω εξετάστηκε το ενδεχόμενο η γαλακτοκινάση να αποτελεί τον κυτταροπλασματικό μεσολαβητή της μεταγραφικής μνήμης. Επαναλήφθηκαν τα αντίστοιχα πειράματα με χρήση της μεθόδου σχηματισμού ετεροκάρυων, με τη διαφορά αυτή τη φορά ότι ο πληθυσμός των κυττάρων που έχει περάσει από την πρώτη ενεργοποίηση με γαλακτόζη δεν φέρει το γονίδιο της γαλακτοκινάσης (στο θρεπτικό μέσο τώρα έχει προστεθεί και η αδρανής μεταγραφικά ραφινόζη αφού κύτταρα *gal1Δ* δεν επιζούν σε θρεπτικό που περιέχει αποκλειστικά γαλακτόζη). Δηλαδή, οι πυρήνες *GAL1-GFP* «εμφυτεύθηκαν» σε κυτταροπλάσματα που δεν περιείχαν τη γαλακτοκινάση, καθώς όμως έχουν όμως ενεργοποιηθεί όλα τα υπόλοιπα γονίδια *GAL* τα κύτταρα έχουν περάσει πρακτικά από την ίδια ενεργοποίηση. Όπως φαίνεται από την εικ.25 κινητική της ενεργοποίησης όπως ανιχνεύεται από την έκφραση της Gal1-GFP διαφέρει δραματικά από την αντίστοιχη εικόνα που προκύπτει όταν στο κυτταρόπλασμα υπάρχει η γαλακτοκινάση Gal1 (εικ.22A). Ακόμη περισσότερο η κινητική αυτή θυμίζει έντονα την κινητική που παρατηρείται όταν οι πυρήνες «εμφυτεύονται» σε κυτταροπλάσματα κυττάρων που δεν έχουν πριν ενεργοποιηθεί (εικ.22B). Τα πειράματα αυτά αποδεικνύουν με τρόπο κατηγορηματικό ότι ο κυτταροπλασματικός μεσολαβητής της μεταγραφικής μνήμης είναι γαλακτοκινάση *GAL1*.



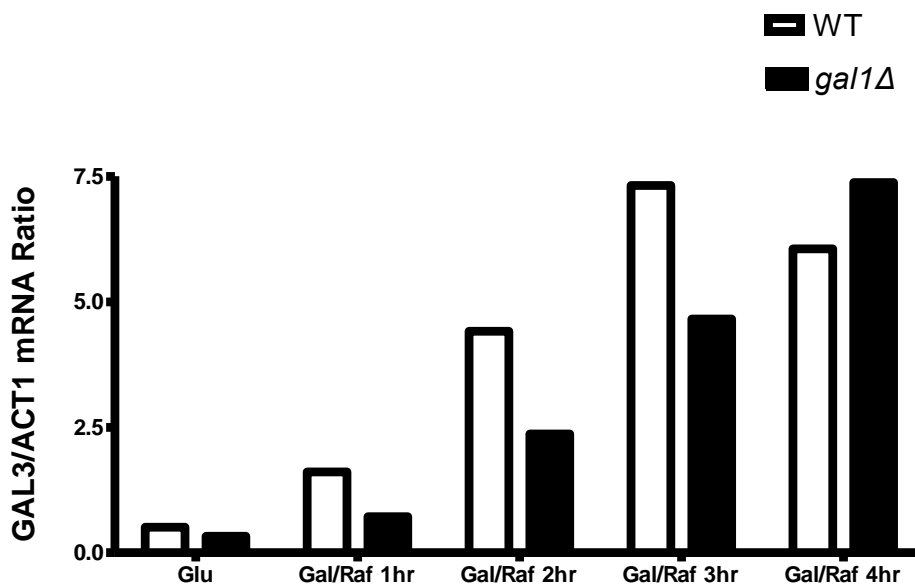
Εικ. 25. Η γαλακτοκινάση Gal1 είναι ο κυτταροπλασματικός μεσολαβητής της κυτταρικής μνήμης. Εικόνες μικροσκοπίας ανιχνεύουν την κυτταροπλασματική *GAL1-GFP* και τα αντίστοιχα ετεροκάρυα σε εκθετική φάση μετά την μεταφορά σε γαλακτόζη. Κύτταρα *kar1-1 gal1Δ* αρχικά μεγάλωσαν σε πλούσιο θρεπτικό ραφινόζης-γαλακτόζης για 24 ώρες και στη συνέχεια σε πλούσιο θρεπτικό γλυκόζης για 6 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε σύζευξη με κύτταρα *GAL1-GFP* αντίθετου συζευκτικού τύπου σε στερεό θρεπτικό YPDex 2% και επανενεργοποίηση σε θρεπτικό ραφινόζης-γαλακτόζης όπως ακριβώς περιγράφηκε στην εικόνα 3. Δείγματα κρατήθηκαν στα χρονικά σημεία που αναφέρονται και παρατηρήθηκαν με επιφθορίζουσα μικροσκοπία (ορατού και UV φωτός).

Η γαλακτοκινάση Gal1 ρυθμίζει τη μεταγραφή του *GAL3* και συνολικά του συστήματος των *GAL* γονιδίων.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι παρά το γεγονός ότι η γαλακτοκινάση αλληλεπιδρά με τον καταστολέα Gal80 με μικρότερη χημική συγγένεια, ωστόσο μπορεί και επιδεικνύει δράση ενεργοποιητή όμοια με αυτή του Gal3. Το φαινόμενο αυτό γίνεται ιδιαίτερα έντονο μετά από μια πρώτη μέγιστη ενεργοποίηση καθώς τα επίπεδα της γαλακτοκινάσης που συσσωρεύονται γίνονται πολλαπλάσια των αντίστοιχων του Gal3, ισοσκελίζοντας με την ποσοτική αυτή υπεροχή την χαμηλότερη χημική συγγένεια για τον Gal80. Ωστόσο, αυτό σημαίνει ότι κατά την πορεία της αρχικής –πρώτης- ενεργοποίησης πρέπει να υπάρχει μια χρονική στιγμή που η γαλακτοκινάση Gal1 ενδεχομένως να αποκτά επίσης σημαντικό ρόλο, ενδεχομένως ακόμα και υποκαθιστώντας τη δράση του Gal3, στην ενεργοποίηση των *GAL* γονιδίων. Το σενάριο αυτό εξετάστηκε για την περίπτωση του γονιδίου *GAL3*. Καθώς η έκφραση του *GAL3* αυξάνεται κατά την ενεργοποίηση - αν τα παραπάνω ισχύουν- είναι πιθανόν η γαλακτοκινάση που μεταγράφεται και συσσωρεύεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό να ελέγχει την έκφραση του συνενεργοποιητή. Έτσι, εξετάστηκε η κινητική της ενεργοποίησης του *GAL3* με τη μέθοδο Northern σε στέλεχος αγρίου τύπου καθώς

και σε στέλεχος που το γονίδιο της γαλακτοκινάσης έχει απαλειφθεί. Όπως φαίνεται και από την εικόνα υπάρχει σαφής καθυστέρηση στην επαγωγή του *GAL3* που φτάνει μεν στα μέγιστα επίπεδα αλλά με καθυστέρηση μίας ώρας (εικ.26).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η γαλακτοκινάση εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του συστήματος με έμμεσο τρόπο σε πολλαπλά επίπεδα, ρυθμίζοντας όχι μόνο τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού Gal80 και επιδρώντας έτσι στη ρύθμιση όλων των γονιδίων αλλά ρυθμίζοντας και την έκφραση του Gal3, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την πολυπλοκότητα της ανάδρομης θετικής ρύθμισης.



Εικ. 26. Η γαλακτοκινάση Gal1 ελέγχει τη μεταγραφή του ενεργοποιητή Gal3. Στελέχη αγρίου τύπου και *gal1Δ* μεγάλωσαν αρχικά σε πλούσιο θρεπτικό μέσο γλυκόζης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο ραφινόζης-γαλακτόζης και δείγματα κρατήθηκαν για ανάλυση κατά Northern του mRNA των γονιδίων *GAL3* και *ACT1*. Εμφανίζεται ο λόγος των τιμών του mRNA σήματος των δύο γονιδίων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η λειτουργική σημασία της ισομορφής Htz1 της κύριας ιστόνης H2A. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των γονιδίων *GAL* για να μελετηθεί η εμπλοκή της ιστόνης Htz1 στην έναρξη της μεταγραφής, στην μετατόπιση των γονιδίων *GAL* στην πυρηνική μεμβράνη και στο φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης των γονιδίων αυτών. Βρέθηκε ότι η ενσωμάτωση της Htz1 στο νουκλεόσωμα που φέρει τη θέση έναρξης της μεταγραφής εξαρτάται από το συγκαταστολέα Ssn6-Tup1 και συμβαίνει κατά τη λήξη της μεταγραφής κατά στρατολόγηση του SWR1-C. Η Htz1 διευκολύνει τη στρατολόγηση του Μεσολαβητή και όταν απουσιάζει η στρατολόγηση αυτή δεν είναι έγκαιρη με αποτέλεσμα την βραδύτερη κινητική ενεργοποίησης του γονιδίου. Αποδείχθηκε ότι η Htz1 δεν είναι απαραίτητη για την συγκράτηση των γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια όπως είχε προταθεί, καθώς απουσία του Tup1 η παρουσία των γονιδίων στην περιφέρεια αυξάνεται αντί να μειώνεται. Η μετάβαση των γονιδίων στην περιφέρεια δεν εξαρτάται από τη μεταγραφή και πολύ περισσότερο δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή. Τέλος, η μεταγραφική μνήμη που επίσης είχε αποδοθεί στην Htz1 και τη συγκράτηση των γονιδίων στην περιφέρεια δεν έχει χρωματινική αλλά κυτταροπλασματική βάση, και η Htz1 είναι απαραίτητη για την πρώτη ενεργοποίηση και όχι για την επανενεργοποίηση. Ο κυτταροπλασματικός μεσολαβητής της μεταγραφικής μνήμης είναι η γαλακτοκινάση Gal1.

Η στρατολόγηση των παραγόντων που προσδένονται άμεσα στο DNA όπως ο ενεργοποιητής Gal4 και TBP δεν επηρεάζεται από την απουσία της Htz1 (εικ.11). Το ίδιο συμβαίνει και με την αλληλεπίδραση της ακετυλοτρανσφεράσης Gcn5 που εκπροσωπεί το σύμπλοκο SAGA (εικ.11). Αντιθέτως το σύμπλοκο του Μεσολαβητή (ανιχνεύοντας την υπομονάδα Srb4) δεν στρατολογείται εγκαίρως. Καθώς στα γονίδια *GAL* –όπως και σε άλλες περιπτώσεις- ο Μεσολαβητής στρατολογείται ανεξάρτητα από το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης II (βλ. εισαγωγή) το αποτέλεσμα αυτό επιτρέπει να προσδιοριστεί το χρονικό σημείο που η Htz1 επιδρά. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή στα περισσότερα από τα γονίδια που ελέγχει θετικά η Htz1 παρατηρείται σε φυσιολογικές συνθήκες υψηλότερη ενσωμάτωση της Htz1 απ' ό,τι στον πλήρως ενεργό υποκινητή του *GAL1* (εικ.15). Αν και αυτό δεν έχει εξηγηθεί πλήρως μηχανιστικά, είναι συμβατό με το γεγονός ότι όσο χαμηλότερος είναι ο ρυθμός μεταγραφής τόσο μεγαλύτερη είναι η πτώση στα επίπεδα της ενσωμάτωσης της Htz1 (Li et al., 2005). Ωστόσο, η πλειονότητα των ενεργών γονιδίων στο σακχαρομύκητα (που ενσωματώνουν Htz1) έχει χαμηλά επίπεδα μεταγραφής (βλ. εισαγωγή). Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία της Htz1 είναι σημαντική όσο τα γονίδια μεταγράφονται. Καθώς απώλεια της Htz1 οδηγεί σε χαμηλότερη στρατολόγηση του Μεσολαβητή (εικ.11), ο οποίος αποτελεί σημαντικό στοιχείο της «εξέδρας» επανέναρξης της μεταγραφής μετά από κάθε πυροδότηση (Yudkovsky et al., 2000), η χαμηλότερη αυτή μεταγραφή των γονιδίων πρέπει να οφείλεται στην αποσταθεροποίηση του συμπλόκου αυτού. Το γεγονός αυτό εξηγεί για πρώτη φορά το λόγο που εμφανίζονται χαμηλότερα επίπεδα

μεταγραφής στα γονίδια που ελέγχει η Htz1. Η σημασία του ευρήματος αυτή επίσης αξιόλογη καθώς για πρώτη φορά έρχεται να επιβεβαιώσει την προτεινόμενη επιλεκτικότητα του Μεσολαβητή για συγκεκριμένα χρωματινικά υποστρώματα (Lorch et al., 2000). Για παράδειγμα πρόσφατα βρέθηκε ότι πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων σε αλληλουχίες που βρίσκονται μέσα σε κωδικές περιοχές οδηγεί στην στρατολόγηση χρωματινικών αναδιαμορφωτών που λειτουργούν τροποποιώντας τα νουκλεοσώματα αλλά δεν οδηγεί σε μεταγραφή καθώς από όλους τους απαραίτητους συνενεργοποιητές μόνο ο Μεσολαβητής δεν στρατολογείται στις περιπτώσεις αυτές (Topalidou and Thireos, 2003). Η χαμηλότερη παρουσία της Htz1 στις κωδικές περιοχές αντιστοιχεί σε χαμηλότερο αριθμό νουκλεοσωμάτων που φέρουν την ιστόνη στις κωδικές περιοχές. Η απουσία αυτών των Htz1 νουκλεοσωμάτων, σε συνδυασμό με την απουσία κρίσιμων αλληλουχιών πρόσδεσης παραγόντων όπως ο TBP (το TFIID γενικότερα), προφανώς ελαχιστοποιεί την περίπτωση σποραδικής μεταγραφής από θέσεις στο εσωτερικό των κωδικών περιοχών. Τα παραπάνω συμφωνούν με *in vitro* αποτελέσματα που δείχνουν ότι ο Μεσολαβητής έχει την ικανότητα όχι μόνο να προσδένεται σε νουκλεοσώματα αλλά και να τα τροποποιεί (Lorch et al., 2000). Μετεγγραφικοί παράγοντες σαφώς ενισχύουν και σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση αυτή- όπως συμβαίνει και στην περίπτωση ενός *htz1Δ* στελέχους όπου στους υποκινητές υπάρχουν αποκλειστικά H2A-H2B ετεροδιμερή. Στην περίπτωση αυτή παρά την προφανή χαμηλότερη χημική συγγένεια του Μεσολαβητή για τον υποκινητή, ο Μεσολαβητής στρατολογείται αλλά με βραδύτερη κινητική. Αυτό που δεν πρέπει να λησμονείται είναι ότι απώλεια της Htz1 αναπληρώνεται σε μεγάλο βαθμό από την κύρια H2A η οποία και ενσωματώνεται στα νουκλεοσώματα που κανονικά φέρουν την Htz1.

Από τη ανάλυση της εικόνας 12 προκύπτει ο ανταγωνιστικός ρόλος του συγκαταστολέα Ssn6-Tup1 και της ιστόνης Htz1. Όπως αποδεικνύεται όμως γενετικά ο συγκαταστολέας επιστατεί της ιστόνης, αφού ταυτόχρονη απώλεια και των δύο δεν οδηγεί σε έναν ενδιάμεσο φαινότυπο παρά μάλλον σε φαινότυπο όμοιο στελέχους που έχει χάσει μόνο τον Tup1 (εικ.12). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αντανakλά κάποια διαφοροποίηση στα επίπεδα παρουσίας της ιστόνης απουσία καθεμίας από τις πρωτεΐνες συγκαταστολείς. Ανιχνεύοντας τη παρουσία αυτή προέκυψε μια σημαντική πτώση της παρουσίας της Htz1 στον υποκινητή του *GAL1* χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα των υπόλοιπων ιστονών (όπως αυτά ανιχνεύονται από τα επίπεδα της κύριας ιστόνης H3) αλλά ούτε και η γενικότερη διάταξη των νουκλεοσωμάτων του υποκινητή (εικ.13). Ακόμη περισσότερο δεν παρατηρήθηκε πτώση παρά μάλλον αύξηση στην ενσωμάτωση της Htz1 σε περιοχές που δεν ελέγχονται από το συγκαταστολέα (εικ. 13). Η αύξηση αυτή προτείνεται εδώ ότι οφείλεται στην αύξηση της διαθέσιμης προς ενσωμάτωση Htz1 καθώς τα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης στον πυρήνα παραμένουν τα ίδια απουσία καθενός από του συγκαταστολείς (εικ.13).

Η απαίτηση αυτή για παρουσία του συγκαταστολέα προκειμένου να ενσωματωθεί η Htz1 επεκτάθηκε και στον υποκινητή του γονιδίου *SUC2* (εικ.14). Στο γονίδιο αυτό όπως και στα περισσότερα γονίδια που ελέγχονται από το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 απουσία καθενός από τους

συγκатаστολείς αυτούς οδηγεί σε υψηλά επίπεδα μεταγραφής καθώς εδώ δεν υπάρχει ένα δεύτερο σύστημα καταστολής όπως στο *GAL1* (μέσω Gal80). Προκειμένου να απαμονωθεί η απαίτηση του συστήματος για τον Tup1 και να μηδενιστεί το ενδεχόμενο η απομάκρυνση της Htz1 να οφείλεται στη δράση της ενεργής πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος που έφερε ταυτόχρονα απαλοιφή τόσο του Tup1 όσο και της ATPάσης Swi2. Απώλεια της Swi2 έχει σαν αποτέλεσμα το γονίδιο να παραμένει μεταγραφικά ανενεργό ακόμη και απουσία του συγκатаστολέα (Gavin and Simpson, 1997). Μεμονωμένη απώλεια της ATPάσης έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της Htz1 τόσο στον υποκινητή του *SUC2* όσο και στον υποκινητή του *PHO5* (επίσης ελεγχόμενου από την Swi2 ATPάση (Neef and Kladde, 2003) χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της H3 (εικ.14). Ταυτόχρονη απώλεια των Tup1 και Swi2 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα στον υποκινητή του *PHO5* (ο Tup1 δεν ελέγχει το γονίδιο *PHO5*) αλλά προκαλεί τη δραματική μείωση των επιπέδων της Htz1 στον υποκινητή του *SUC2*, με σχεδόν αμελητέα επίδραση στα επίπεδα της H3 (εικ.14).

Στα αποτελέσματα αυτά διαφαίνεται κάτι παραπάνω από μια απλή επέκταση του αριθμού των υποκινητών όπου ο Tup1-Ssn6 ελέγχει την ενσωμάτωση της Htz1. Απ' ό,τι φαίνεται το ενεργοποιητικό σύμπλοκο SWI/SNF εμπλέκεται κατά τρόπο αντίθετο από τον συγκатаστολέα στην ενσωμάτωση της Htz1 στους υποκινητές. Απουσία της ATPάσης Swi2 οδηγεί σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της Htz1 τόσο στο *GAL1* όσο και στο *PHO5* (εικ.14). Αυτό σημαίνει ότι περισσότερα νουκλεοσώματα περιέχουν αποκλειστικά Htz1 καθώς δεν μπορούν να υπάρξουν νουκλεοσώματα που φέρουν H2A και Htz1 ταυτόχρονα (βλ. εισαγωγή). Μπορούν να υπάρξουν διάφορες ερμηνείες για την αύξηση αυτή. Καθώς ο συγκатаστολέας Ssn6-Tup1 δρα ανταγωνιστικά με το SWI/SNF, η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη δραστηριοποίηση του SWR1-C λόγω επικράτησης της παρουσίας του Ssn6-Tup1 στους υποκινητές. Η αυξημένη αυτή δραστηριότητα του SWR1-C θα μπορούσε να είναι και ανεξάρτητη της δράσης του Ssn6-Tup1 καθώς απουσία του SWI/SNF που είναι ένας γενικός αναδιαμορφωτής που δρα σχεδόν στο σύνολο της χρωματίνης των υποκινητών, σημαίνει αντίστοιχα μεγαλύτερη πιθανότητα αλληλεπίδρασης του SWR1-C με τη χρωματίνη στη μονάδα του χρόνου και ενδεχομένως μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης της Htz1. Το γεγονός αυτό επίσης υποδηλώνει ότι ακόμη και σε αυτούς τους πρωτότυπους Htz1 υποκινητές, η παρουσία της Htz1 δεν είναι κορεσμένη, δηλ. δεν περιέχουν όλα τα νουκλεοσώματα του πληθυσμού των υποκινητών Htz1. Τα παραπάνω αποτελέσματα στοιχειοθετούν μια αλληλεπίδραση των συμπλόκων SWR1-C και SWI/SNF στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Το σύμπλοκο SWI/SNF έχει την ικανότητα να απομακρύνει ένα ή και δύο ετεροδιμερή H2A-H2B από το οκταμερές του νουκλεοσώματος (Bruno et al., 2003; Vicent et al., 2004; Yang et al., 2007). Αν και δεν έχει μελετηθεί αν τα ετεροδιμερή αυτά μπορεί να είναι Htz1-H2B ετεροδιμερή τα αποτελέσματα που παρουσιάσαμε δεν αποκλείουν το ενδεχόμενο της διαδοχικής δράσης των δύο συμπλόκων. Το SWI/SNF ενδεχομένως να απομακρύνει τα Htz1-H2B ετεροδιμερή και το SWR1-C να ακολουθεί και να ενσωματώνει νέα ετεροδιμερή. Αν απουσιάζει το SWI/SNF, η

ισορροπία που υπάρχει στους υποκινητές (και η οποία μπορεί φυσιολογικά να οδηγεί σε ποικίλους βαθμούς ενσωμάτωσης της Htz1) θα εκτρέπεται προς την ενσωμάτωση της Htz1 κάτι που υποστηρίζεται ως πιθανότητα και από το γεγονός ότι το SWI/SNF δεν έχει την παραμικρή δυνατότητα ενσωμάτωσης ετεροδιμερών Htz1-H2B από πειράματα *in vitro* (Mizuguchi et al., 2004).

Η απαίτηση για την παρουσία του Tup1 για την ενσωμάτωση στον υποκινητή του *SUC2*, εδραιώθηκε απουσία τόσο αναδιαμορφωτικής δράσης μηχανών όπως το SWI/SNF αλλά και της οποιασδήποτε σποραδικής μεταγραφικής δράσης της RNA πολυμεράσης II, μηδενίζοντας έτσι την περίπτωση η απώλεια που παρατηρήθηκε είτε στον υποκινητή του *GAL1* είτε στον υποκινητή του *SUC2* να οφείλεται στις δράσεις των δύο αυτών παραγόντων. Κατά συνέπεια συμπεραίνεται ότι η απαίτηση για την ύπαρξη του συγκαταστολέα είναι απολύτως ειδική και πιθανότατα επεκτείνεται σε όλους του ελεγχόμενους από τον συγκαταστολέα υποκινητές. Αυτή είναι η πρώτη φορά που εδραιώνεται η εξάρτηση της ενσωμάτωσης αυτής από παράγοντες που δρουν σε επίπεδο αποκλειστικά και μόνο υποκινητών σε αντιδιαστολή με παράγοντες που λειτουργούν σε όλο το φάσμα της χρωματίνης όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες NuA4 και Gcn5 αλλά και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών που έχουν μέχρι σήμερα συσχετισθεί με την ενσωμάτωση της Htz1 (βλ. εισαγωγή).

Η εδραίωση της εξάρτησης αυτής οδήγησε στο επόμενο ερώτημα που σχετίζεται με την χρονική στιγμή της ενσωμάτωσης αυτής *in vivo*. Όπως αναφέρθηκε ήδη (βλ. εισαγωγή) το SWR-1C έχει απόλυτη εξειδίκευση στην ενσωμάτωση ετεροδιμερών Htz1-H2B *in vitro* σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα σύμπλοκα-αναδιαμορφωτές (Mizuguchi et al., 2004). Εξετάζοντας αντίστοιχα σε όλη την έκταση του γονιδιωματος την επίδραση απαλοιφής της Htz1 και της Swr1 παρατηρείται μεγάλη αλληλοεπικάλυψη ιδιαίτερα στις τελομερικές περιοχές (εικ.5). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει παρατηρηθεί *in vivo* η λειτουργία της Swr1, δηλ. στρατολόγηση με συνέπεια την ενσωμάτωση της ιστόνης. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η ενσωμάτωση της Htz1 δεν αναμένεται να πραγματοποιείται μόνο κατά τη φάση S και αυτό γιατί η μεταγραφή του γονιδίου της είναι αδιάλειπτη κατά τον κυτταρικό κύκλο. Ακόμη περισσότερο είναι δύσκολο να συζητηθεί η στοχευμένη δράση του SWR1-C στους υποκινητές με την καθολική δράση των μηχανών που εκτελούν τη συζευγμένη με την αντιγραφή ενσωμάτωση όλων των κύριων μορφών ιστονών (Replication Coupled Deposition). Αν και όλα τα παραπάνω λοιπόν οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Htz1 ενσωματώνεται μη συζευγμένα με την αντιγραφή, πειραματικά δεν έχει ποτέ επιβεβαιωθεί τότε ενσωματώνεται η ιστόνη αυτή. Αναζητήθηκε λοιπόν η διεργασία αυτή κατά την καταστολή των γονιδίων. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι κατά τη διάρκεια της μεταγραφής το σύμπλοκο Tup1-Ssn6 παραμένει προσδεμένο σε αρκετούς από του υποκινητές που ελέγχει -του *GAL1* περιλαμβανομένου- χωρίς πλέον να καταστέλλει (Paramichos-Chronakis et al., 2002; Proft and Struhl, 2002). Έτσι, ο Tup1 βρίσκεται προσδεμένος στον υποκινητή όταν ξεκινά η καταστολή. Καθώς λοιπόν, η κατασταλτική δράση του παρόντα Tup1 πρέπει να πρωτοεμφανίζεται κατά το πέρασμα από τη μεταγραφική ενεργοποίηση στην μεταγραφική

καταστολή, υποθέσαμε ότι η χαμηλή ενσωμάτωση της Htz1 πρέπει να γίνεται εμφανής κατά τη μεταγραφική καταστολή σε ένα *tur1Δ* στέλεχος. Κάτι τέτοιο αφενός θα επιβεβαιώνει την δράση του Tur1 στην ενσωμάτωση αυτή, αφετέρου θα συνέδεε την κατασταλτική του δράση με την εδραίωση μιας ενεργοποιησιμής κατάστασης στον υποκινητή και τέλος θα έδινε για πρώτη φορά τη δυνατότητα να εδραιωθεί *in vivo* η δράση του SWR1-C και να μελετηθεί κινητικά η ενσωμάτωση της Htz1. Όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, κατά την μεταγραφική καταστολή ενός στελέχους αγρίου τύπου, σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα παρατηρείται μηδενισμός της μεταγραφής, εναπόθεση H3 ιστόνης και αυξημένη στρατολόγηση του SWR1-C (εικ. 15). Η εικόνα αυτή είναι απόλυτα σύμφωνη με την ήδη περιγραφείσα και στο *S.cerevisiae* μη συζευγμένη με την αντιγραφική ενσωμάτωση νουκλεοσωμάτων (Replication Independent/Uncoupled deposition, RI deposition) (Henikoff and Ahmad, 2005; Schwabish and Struhl, 2004). Η ενσωμάτωση αυτή έχει ήδη φθάσει στα μέγιστα επίπεδα μόλις 10 λεπτά μετά τη σηματοδότηση με γλυκόζη (εικ.15). Η κινητική αυτή δεν μπορεί να αντικατοπτρίζει αποκλειστικά και μόνο ενσωμάτωση συζευγμένη με την αντιγραφή (RC deposition) καθώς σε τέτοια περίπτωση θα έπρεπε να είναι πολύ βραδύτερη και να φθάνει στα τελικά επίπεδα σε χρονικό διάστημα ενός κυτταρικού κύκλου (περίπου 120 λεπτά). Αυτό ισχύει καθώς για να ενσωματωθεί στα τελικά επίπεδα θα έπρεπε οι υποκινητές που μόλις πέρασαν τη φάση S χωρίς ωστόσο να έχουν ενσωματώσει την H3 (χρονικό σημείο 0, κύτταρα ακόμη σε γαλακτόζη) και που αποτελούν το 30% του συνολικού πληθυσμού των υποκινητών, να διανύσουν έναν ολόκληρο κυτταρικό κύκλο προκειμένου να ενσωματώσουν νέα H3. Η κινητική της ενσωμάτωσης της H3 διαφέρει σε πολύ μεγάλο βαθμό από την κινητική της ενσωμάτωσης της ιστόνης Htz1 η οποία κορυφώνεται 30 λεπτά αργότερα (εικ.15). Αντίθετα και όπως προβλέπεται από τα αποτελέσματα που έχουν ήδη περιγραφεί αν και παρατηρείται ενσωμάτωση απουσία Tur1, τα τελικά επίπεδα στρατολόγησης της Htz1 είναι σημαντικά χαμηλότερα (εικ.15) Το αποτέλεσμα αυτό αφενός εδραιώνει για πρώτη φορά *in vivo* ότι η Htz1 ενσωματώνεται με ένα μηχανισμό μη συζευγμένο με την αντιγραφή, αφετέρου επιβεβαιώνει ότι η ενσωμάτωση αυτή που συνοδεύεται από αυξημένη στρατολόγηση του SWR1-C και προφανώς διεκπεραιώνεται από αυτό, πρέπει να πραγματοποιείται επί προσχηματισμένων νουκλεοσωμάτων που φέρουν ήδη H2A-H2B ετεροδιμερή τα οποία και αντικαθιστά το SWR1-C με ετεροδιμερή Htz1-H2B. Επίσης, αποδεικνύει ότι ο μηχανισμός ενσωμάτωσης της Htz1 είναι διακριτός από τον εξαρτώμενο από το πέρασμα της πολυμεράσης μηχανισμό και στον οποίο εμπλέκονται διαφορετικά σύμπλοκα (Henikoff and Ahmad, 2005; Schwabish and Struhl, 2004). Υπάρχουν δηλ. δύο διακριτοί αλλά αλληλένδετοι μηχανισμοί που οδηγούν στην δημιουργία των νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή του *GAL1* με την παύση της μεταγραφής και που διαφέρουν ριζικά από τον αντίστοιχο μηχανισμό που λαμβάνει χώρα κατά την αντιγραφή. Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι αν και η ενσωμάτωση της Htz1 φαίνεται να καθυστερεί, η στρατολόγηση του SWR-C1 αποδεικνύεται ταχύτερη (εικ.15). Εκτιμούμε ότι στο πολυπρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο πρέπει να υπάρχουν υπομονάδες που είτε δέχονται άμεσα τη σηματοδότηση από συστατικό του μονοπατιού της

καταστολής είτε/και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες και πολύ μικρής διάρκειας τροποποιήσεις των κυρίων ιστονών που εντέλει στρατολογούν το SWR1-C (βλ. επίσης παρακάτω). Η άμεση στρατολόγηση του SWR1-C πρέπει να έχει ρόλο ανταγωνισμού της στρατολόγησης άλλων συμπλόκων που ενδεχομένως δρουν ανταγωνιστικά όπως του SWI/SNF (όπως αποδείξαμε παραπάνω) ή του INO80 (Paramichos-Chronakis et al., 2006; van Attikum et al., 2007).

Το γεγονός της μειωμένης αλλά υπαρκτής ενσωμάτωσης στον υποκινητή απουσία του *Tup1-Ssn6* οδήγησε να μελετηθεί η κατανομή της ενσωμάτωσης της *Htz1* σε καθένα από τα δύο νουκλεοσώματα του υποκινητή απουσία ή παρουσία των δύο συγκαταστολέων. Όπως αποδείχθηκε σε πειράματα ελέγχου και όπως ήταν αναμενόμενο απώλεια της ATPάσης *Swr1* οδηγεί σε απώλεια της *Htz1* σε μηδενικά σχεδόν επίπεδα και στα δύο νουκλεοσώματα, χωρίς να επηρεάζεται η κατανομή της ιστόνης H3 (εικ.16). Όταν όμως εξετάστηκε η παρουσία της *Htz1* σε καθένα από τα στελέχη *tup1Δ* και *ssn6Δ* παρατηρήθηκε διαφορετική εικόνα. Απώλεια καθενός από τα συστατικά του συμπλόκου *Ssn6-Tup1* επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό το νουκλεόσωμα -1 (*Nuc-1*) και πολύ λιγότερο το νουκλεόσωμα -2 (*Nuc-2*). Αν και απώλεια του *Ssn6* οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα ενσωμάτωσης και στο *Nuc-2*, η πτώση αυτή είναι δραματική στο *Nuc-1*. Όλα αυτά χωρίς να επηρεάζεται η ενσωμάτωση της κύριας H3 ιστόνης (εικ.16). Με βάση τα παραπάνω κι ενώ η μηχανή που ενσωματώνει την *Htz1* έχει αναγνωρισθεί, η αναγνώριση του μηχανισμού ή μηχανισμών στόχευσης της δράσης του SWR1-C παραμένει σημαντική. Η αναγνώριση του μηχανισμού αυτού θα διαλευκάνει στην ουσία όλα τα ερωτήματα που σχετίζονται όχι απλά και μόνο με το ρόλο της *Htz1* αλλά και με τους μηχανισμούς που διακρίνουν υποκινητές από κωδικές περιοχές σε επίπεδο χρωματινικό και άρα λειτουργικό. Όπως σε όλες τις αντίστοιχες περιπτώσεις είναι σαφές ότι η πρωτογενής πληροφορία πρέπει να αναζητηθεί στην αλληλουχία του DNA. Αν και στατιστικά έχει αναγνωρισθεί η απαίτηση για την ταυτόχρονη ύπαρξη αλληλουχίας πρόσδεσης του παράγοντα *Reb1* και επαναλήψεων *dA:dT* για την ύπαρξη *Htz1* νουκλεοσωμάτων, τα δεδομένα αυτά παραμένουν ανεκμετάλλευτα (Raisner et al., 2005). Παραδόξως μέχρι σήμερα καμία μελέτη δεν έχει εμφανισθεί που να εμπλέκει τον *Reb1* –του οποίου το μοτίβο πρόσδεσης είναι το πιο συχνό στους υποκινητές του γονιδιώματος (Zhang et al., 2005) - αφετέρου υπάρχει πληθώρα υποκινητών που φέρουν την *Htz1* και δεν φέρουν κάποιο από τα παραπάνω στοιχεία με κλασική περίπτωση τον υποκινητή του *GAL1*. Ο υποκινητής αυτός διαφέρει στην αρχιτεκτονική του σε ένα ακόμη σημείο, καθώς δεν φέρει το κλασικό πρότυπο των δύο νουκλεοσωμάτων εκατέρωθεν της περιοχής ενεργοποίησης (Liu et al., 2005). Αντίθετα, υπάρχει ένα νουκλεόσωμα που καλύπτει την περιοχή έναρξης της μεταγραφής και φέρει *Htz1* σε κανονικά επίπεδα (εικ.16A). Κατά συνέπεια η στόχευση της *Htz1* πρέπει να εξηγηθεί όχι μόνο για τα εκατέρωθεν της περιοχής πρόσδεσης των ενεργοποιητών νουκλεοσώματα αλλά και για τα περισσότερο απομακρυσμένα από την περιοχή αυτή νουκλεοσώματα που συχνά απαντάμε σε αυστηρά ρυθμιζόμενους υποκινητές όπως είναι αυτοί στο *GAL1* αλλά και στο *PHO5* γονίδιο. Παρόλα αυτά δεν καθορίστηκε στη παρούσα εργασία ο ακριβής μηχανισμός που στρατολογεί το SWR1-C στον υποκινητή αφού απουσία του *Tup1*

εξακολουθεί να στρατολογείται χωρίς όμως η Htz1 να ενσωματώνεται στο εγγύς νουκλεόσωμα (εικ.16). Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, αν και δεν έχει αποδειχθεί πλήρως, ο παράγοντας Bdf1 ενδεχομένως να στρατολογεί το SWR1-C μέσω αλληλεπίδρασης με υπερ-ακετυλιωμένες ιστόνες. Ωστόσο, κατά την παύση της μεταγραφής συνήθως παρατηρείται στρατολόγηση απακετυλασών και απακετυλίωση των ιστονών (Katan-Khaykovich and Struhl, 2002). Στον υποκινητή του *GAL1* ενδεχομένως να ισχύει το αντίθετο, όσον αφορά την ιστόνη H4. Όπως έχει δείχθει, στον υποκινητή αυτό (και ενδεχομένως και σε άλλους επαγόμενους υποκινητές), η ιστόνη H4 απακετυλιώνεται κατά την έναρξη της μεταγραφής και λογικά αποκτά τα φυσιολογικά επίπεδα ακετυλίωσής της κατά τη μεταγραφική καταστολή (Deckert and Struhl, 2001). Προτείνεται λοιπόν εδώ ότι ο Bdf1 ενδεχομένως να αναγνωρίζει αυτήν την ακετυλίωση και να στρατολογεί το SWR1-C κατά την καταστολή. Αυτό ενδεχομένως να εξηγεί και την παρατεταμένη στρατολόγηση του SWR1-C απουσία του Tur1, καθώς απουσία του συγκαταστολέα ο υποκινητής είναι υπερακετυλιωμένος και για την H3 και για την H4 (προσωπική παρατήρηση). Το φαινόμενο να στρατολογείται το SWR1-C και μάλιστα παρατεταμένα αλλά να μην ενσωματώνεται η Htz1, που παρατηρήθηκε απουσία του Tur1 (εικ.15) υποδηλώνει ότι ο ρόλος του Tur1 είναι έντονα μηχανιστικός και όχι απλού στρατολογητή. Κάτι τέτοιο άλλωστε φαίνεται και από το γεγονός ότι ρυθμίζει την εναπόθεση σε ένα μόνο από τα δύο νουκλεοσώματα και μάλιστα αυτού που διαφοροποιεί τη δομή του υποκινητή από τη δομή των περισσοτέρων υποκινητών που φέρουν Htz1. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να διατυπωθεί για πρώτη φορά η υπόθεση ότι οι υποκινητές που ξεφεύγουν από την τυπική αυτή δομή έχουν διαφορετικό μηχανισμό ενσωμάτωσης της Htz1. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να μην εξαρτάται από τους εκάστοτε μηχανισμούς που προφανώς ξεκινούν από δομικά *in cis* στοιχεία του υποκινητή (όπως η περιοχή ενεργοποίησης) καθώς δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία στο νουκλεόσωμα -1. Αντίθετα, φαίνεται να εξαρτάται από παράγοντες *in trans* όπως είναι το σύμπλοκο Ssn6-Tur1 και μάλιστα χωρίς να εξαρτάται από παράγοντες που προσδένονται στο DNA και αλληλεπιδρούν με το συγκαταστολέα – όπως είναι ο καταστολέας Mig1 απουσία του οποίου δεν επηρεάζεται η ενσωμάτωση της Htz1 (εικ.13). Προτείνεται στη παρούσα διατριβή ότι το σύμπλοκο Ssn6-Tur1 με το να διασφαλίζει την ενσωμάτωση της Htz1 συμμετέχει σε μια θηλιά ανατροφοδότησης της «ενεργοποιήσιμης κατάστασης» των υποκινητών στις ιδιαίτερα ευαίσθητες αυτές περιοχές, σε αντιδιαστολή με την «αποσιωπημένη κατάσταση» που εγγενώς δημιουργεί. Στη μελέτη αυτή υπήρξε ιδιαίτερο ευτύχημα ότι το γονίδιο *GAL1* δεν καταστέλλεται αποκλειστικά από τον Ssn6-Tur1 αλλά και από τον Gal80. Η συγκυρία αυτή μας επέτρεψε να συσχετισθεί η απώλεια της ενσωμάτωσης της Htz1 με τον συγκαταστολέα καθαυτό και όχι με τις παρενέργειες (αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα και παρουσία χρωματινικών αναδιαμορφωτών) που επίσης οδηγούν σε απομάκρυνση της Htz1.

Η ενσωμάτωση αυτή της Htz1 κατά την καταστολή συσχετίζεται αρχικά με εύκολο τρόπο με την πρόσφατα προταθείσα λειτουργία της Htz1 στη μεταγραφική μνήμη (Brickner et al., 2007). Έτσι, προτάθηκε ότι η Htz1 συγκρατώντας τα γονίδια στην πυρηνική μεμβράνη διευκολύνει σε

μια δεύτερη ταχύτερη ενεργοποίηση μετά από μια σύντομη καταστολή. Βάσει των αποτελεσμάτων που προηγήθηκαν, απουσία του *Tup1* θα έπρεπε να παρατηρηθεί χαμηλότερη μετατόπιση στην περιφέρεια καθώς η *Htz1* απομακρύνεται επίσης από τον υποκινητή του *GAL1*. Χρησιμοποιώντας το σύστημα *LacI-GFP/LacO*-διάταξη μελετήθηκε η τοποθέτηση των γονιδίων στο εσωτερικό του πυρήνα αρχικά σε ένα *tup1Δ* στέλεχος αλλά και η ενεργοποίηση σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου (εικ.18). Αν και επιβεβαιώθηκε η ειδική ανακατανομή των *GAL* γονιδίων κατά την ενεργοποίηση, απουσία του *Tup1* παρατηρήθηκε το αντίθετο από το προβλεπόμενο αποτέλεσμα, με μια σημαντική αύξηση της μετατόπισης του *GAL* τόπου στους πυρηνικούς πόρους (εικ.18). Καθώς μέχρι σήμερα η μετατόπιση των *GAL* γονιδίων έχει απόλυτα συσχετισθεί με την μεταγραφή (Akhtar and Gasser, 2007; Cabal et al., 2006; Casolari et al., 2004), εξετάστηκε η εξάρτηση της αλληλεπίδρασης με τους πυρηνικούς πόρους για τη βέλτιστη μεταγραφή του *GAL1*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *nup133Δ*, απουσία του οποίου οι πυρηνικοί πόροι σχηματίζουν συσσωματώσεις και χάνεται η ομοιόμορφη κατανομή τους στην πυρηνική μεμβράνη, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται σημαντικά η λειτουργία τους (Belgareh and Doye, 1997). Αν και επιβεβαιώθηκε η μετάβαση στην πυρηνική μεμβράνη σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου όπως ακριβώς έχει περιγραφεί (περίπου 65% των γονιδίων εντοπίζονται στη μεμβράνη), απουσία της *nup133Δ* ο συνεντοπισμός στην πυρηνική μεμβράνη παρατηρείται μόνο για το 20% του συνόλου ενός πληθυσμού γονιδίων (εικ.19). Παρά το χαμηλό αυτό συνεντοπισμό η μεταγραφή του *GAL1* δεν βρέθηκε να διαφέρει ποιοτικά ή ποσοτικά σε ένα στέλεχος *nup133Δ* σε σχέση με ένα στέλεχος αγρίου τύπου (εικ.19). Άρα, η μετάβαση στην πυρηνική περιφέρεια δεν απαιτείται για τη βέλτιστη μεταγραφή. Εξετάζοντας το αντίστροφο ερώτημα, αν δηλ. η μετατόπιση απαιτεί να υπάρχει μεταγραφή, καταλήξαμε ότι και αυτή η συνθήκη δεν είναι απαραίτητη. Έτσι, εκτός του ότι σε ένα στέλεχος *tup1Δ* υπάρχει αυξημένη μετατόπιση χωρίς να υπάρχει μεταγραφή (εικ. 12 και 18), το ίδιο συμβαίνει και στα αρχικά στάδια της σηματοδότησης για ενεργοποίηση (όπου χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής δεν παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων για περίπου δύο ώρες) αλλά και κατά την αποκαταστολή που πραγματοποιείται όταν σαν πηγή σακχάρου χρησιμοποιείται η ραφινόζη, όταν δηλ. δεν υπάρχει ενεργοποίηση αλλά ούτε και καταστολή από γλυκόζη (εικ. 20). Το συμπέρασμα από τα παραπάνω είναι ότι η μετάβαση προς την πυρηνική περιφέρεια δεν είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη για τη βέλτιστη μεταγραφή. Προτείνεται λοιπόν ότι το φαινόμενο αυτό είναι ένα συνοδό χαρακτηριστικό, που δεν ρυθμίζεται και δεν ρυθμίζει τη μεταγραφή μηχανιστικά. Πως μπορεί ωστόσο να εξηγηθεί ικανοποιητικά;

Μια πιθανή εξήγηση –ξεκινώντας με βάση τα παραπάνω ευρήματα- μπορεί να δοθεί αν ληφθεί υπόψη η κινητικότητα των τόπων που μεταγράφονται όπως αυτή μετρήθηκε με *in vivo* μικροσκοπία από άλλους (Cabal et al., 2006; Drubin et al., 2006). Όπως φάνηκε από τις εργασίες αυτές η κινητικότητα των γενετικών τόπων διαφέρει όταν τα γονίδια βρίσκονται στο εσωτερικό του πυρήνα, με τα γονίδια που μεταγράφονται στην πυρηνική μεμβράνη να έχουν περίπου 40% χαμηλότερη ακτίνα κίνησης από τις άλλες κατηγορίες (γονίδια που δεν

μεταγράφονται και γονίδια που μεταγράφονται στο εσωτερικό πάντα του πυρήνα). Σε όλες τις περιπτώσεις όμως υπάρχει ένας περιορισμός στην κίνηση η οποία είναι περιορισμένη και δεν περιγράφεται ως μια τυχαία κίνηση Brown (Cabal et al., 2006). Αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια που βρίσκονται στα κεντρικότερα σημεία του πυρήνα αν και έχουν υψηλή κινητικότητα περιορίζονται στο εσωτερικό του πυρήνα. Ωστόσο, τα περισσότερα περιφερειακά γονίδια όταν στοχαστικά βρεθούν στην πυρηνική μεμβράνη αποκτούν χαμηλότερη κινητικότητα ενόσω μεταγράφονται και παγιδεύονται στην περιφέρεια. Το αποτέλεσμα είναι η ισορροπία που υπάρχει στο πέρασμα από και προς την πυρηνική μεμβράνη να μετατοπίζεται προς όφελος της συγκράτησης στην πυρηνική μεμβράνη κατά την ενεργοποίηση. Έτσι, ο πληθυσμός των γονιδίων που βρίσκεται κοντά στην πυρηνική μεμβράνη αλλά όχι επί της μεμβράνης στην ουσία τροφοδοτεί τη μετατόπιση αυτή (το ποσοστό αυτό είναι περίπου το 50% του συνόλου των γονιδίων σε συνθήκες καταστολής, εικ.20). Αυτό φάνηκε όταν μελετήθηκε η μετάβαση στην περιφέρεια σε συνθήκες αποκαταστολής (ραφινόζη) όπου ο πληθυσμός των κεντρικών γονιδίων παρέμεινε σταθερός (με μια οριακή μάλιστα αύξηση) ενώ το ποσοστό της αύξησης στην περιφέρεια ισούται με το αντίστοιχο ποσοστό μείωσης από την υπο-περιφερειακή ζώνη (εικ.20). Το ερώτημα που προκύπτει σε αυτήν την περίπτωση είναι σε τι οφείλεται η μειωμένη αυτή κινητικότητα των γονιδίων που μεταγράφονται στην πυρηνική περιφέρεια. Στη μελέτη που αναφέρθηκε (Cabal et al., 2006), η περιορισμένη αυτή κίνηση αποδόθηκε στην στρατολόγηση του συμπλόκου SAGA. Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται να διατηρεί μια κοινή υπομονάδα με τον πυρηνικό πόρο, την πρωτεΐνη Sus1. Αν και τα βιοχημικά δεδομένα δεν υποστηρίζουν κοινή γενική μεταγραφική λειτουργία της Sus1 και του SAGA (Rodriguez-Navarro et al., 2004), η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται για τη μετάβαση στην περιφέρεια αλλά ταυτόχρονα επηρεάζει και τη μεταγραφή του *GAL1*, χωρίς να είναι δυνατόν έτσι να διακριθεί ο ακριβής ρόλος της στη μετατόπιση. Προτείνεται ωστόσο, ότι καθώς αποτελεί ένα κοινό στοιχείο SAGA και NPC μεσολαβεί στην συγκράτηση στην πυρηνική μεμβράνη (Akhtar and Gasser, 2007; Cabal et al., 2006). Τα αποτελέσματα ωστόσο των εικ. 18 και 20 αποδεικνύουν ότι δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη μεταγραφής για τη μετάβαση στην περιφέρεια ,και το σύμπλοκο SAGA στρατολογείται μόνο κατά την ενεργοποίηση: ακόμη και παρουσία ραφινόζης, που στον υποκινητή του *GAL1* ανιχνεύονται υψηλά ποσοστά προσδεμένου Gal4 (εικ.20) δεν έχει βρεθεί στρατολόγηση του συμπλόκου SAGA (Bhaumik and Green, 2001; Bryant and Ptashne, 2003; Larschan and Winston, 2001) επειδή οι περιοχές ενεργοποίησής του Gal4 αδρανοποιούνται από την παρουσία του Gal80 (Reece et al., 2006). Κατά συνέπεια, η μειωμένη αυτή κινητικότητα που οδηγεί στη συγκράτηση στην περιφέρεια δεν ξεκινά από το σύμπλοκο SAGA. Τα κοινά στοιχεία τόσο της αποκαταστολής με ραφινόζη όσο και της απουσίας του Tup1 –όπου παρατηρείται η αυξημένη παρουσία στην πυρηνική μεμβράνη χωρίς όμως μεταγραφή- είναι η αυξημένη παρουσία του ενεργοποιητή Gal4 στον υποκινητή (εικ.20). Κατά συνέπεια προτείνεται ότι ο ενεργοποιητής είναι το πρώτο βήμα στην αλληλεπίδραση με την πυρηνική μεμβράνη. Το ενδεχόμενο αυτό δεν είναι απίθανο καθώς πρόσφατα έχει δειχθεί ότι δύο καλά χαρακτηρισμένοι ενεργοποιητές έχουν σημαντική παρουσία

στον πυρηνικό φάκελο (Habeler et al., 2002; Menon et al., 2005). Τέλος, η αρχική αλληλεπίδραση των γονιδίων *GAL* με την πυρηνική μεμβράνη φαίνεται να είναι ανεξάρτητη των πυρηνικών πόρων καθώς στο στέλεχος *nur133Δ* παραμένει έντονη ακόμη κι αν μόλις 2% των γονιδίων συνεντοπίζεται με τους πυρηνικούς πόρους (εικ.19). Η αλληλεπίδραση αυτή μάλλον οφείλεται στην φυσική θέση του γενετικού τόπου *GAL* που απέχει λιγότερο από 40kb από το κεντρομερές του 3ου χρωμοσώματος. Τα κεντρομερή έχουν ισχυρή παρουσία στην πυρηνική μεμβράνη κατά τον κυτταρικό κύκλο (διάταξη *Rabi*) λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τα πολικά σωμάτια της ατράκτου (Winey and O'Toole, 2001) . Ωστόσο, ακόμη και απουσία της *Nur133* το καθαρό ποσοστό που τελικά μεταφέρεται στους πυρηνικούς πόρους είναι σημαντικό τόσο σε ραφινόζη (8%) όσο και σε γαλακτόζη (18%) και συγκρίσιμο με τα ποσοστά καθαρής μετατόπισης στις δύο συνθήκες σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου (14% και 45% αντίστοιχα) (εικ.19). Παρόλο λοιπόν που η μετατόπιση δεν είναι απαραίτητη και μπορεί να συμβαίνει ανεξάρτητα από τη μεταγραφή τα δύο φαινόμενα εξελίσσονται παράλληλα. Η σύνδεση αυτή είναι ένα φαινόμενο που επηρεάζεται από τη φυσική θέση του τόπου στο χρωμόσωμα η οποία και καθορίζει την αρχική κατανομή του πριν την ενεργοποίηση αλλά και την «προδιάθεσή» του να «παγιδευθεί» στην πυρηνική μεμβράνη κατά την ενεργοποίηση.

Καθώς η *Htz1* δεν είναι απόλυτα απαραίτητη για την αλληλεπίδραση των γενετικών τόπων με την πυρηνική μεμβράνη και σε αυτήν ακριβώς την αλληλεπίδραση έχει αποδοθεί το φαινόμενο της μεταγραφικής μνήμης, εξετάσαμε τη συμβολή της *Htz1* στο φαινόμενο αυτό. Το μοντέλο αυτό, καθώς και το μοντέλο που προτείνει το ρόλο του *SWI/SNF* στη μεταγραφική μνήμη προτείνει με έμφαση την πυρηνική βάση του φαινομένου (Brickner et al., 2007; Kundu et al., 2007). Προκειμένου να αποκλειστεί η κυτταροπλασματική βάση του φαινομένου και να επιβεβαιωθεί η δράση της *Htz1* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του σχηματισμού ετεροκάρυων (εικ.21). Ο εμφανής λόγος που αυτή η διάσταση του φαινομένου πρέπει να ελεγχθεί ,ιδιαίτερα στο σύστημα των *GAL* γονιδίων, είναι ότι τα πρώτα βήματα της ενεργοποίησης στα γονίδια αυτά ρυθμίζονται ουσιαστικά στο κυτταρόπλασμα (εικ.1). Η συγκράτηση του *Gal80* από τον κυτταροπλασματικό *Gal3* οδηγεί στην ενεργοποίηση του. Η τεχνική σχηματισμού ετεροκάρυων μπορεί να παραλληλιστεί με την εμφύτευση πυρήνων σε κυτταρόπλασμα κυτάρων. Αν δεν υπάρχει κυτταροπλασματική διάσταση οι «εμφυτευμένοι» πυρήνες πρέπει να ενεργοποιούνται με τον ίδιο τρόπο ανεξάρτητα από το αν βρεθούν σε κυτταρόπλασμα κυτάρων που έχει ή δεν έχει περάσει από πρώτη ενεργοποίηση σε γαλακτόζη. Το πείραμα του σχηματισμού ετεροκάρυων εκπληρώνει την ίδια ακριβώς συνθήκη μόνο που πραγματοποιείται με σύζευξη κυτάρων παρά με εμφύτευση πυρήνων, απλοποιώντας τη μέθοδο. Επιπλέον, οι πυρήνες των δύο κυτάρων δεν συντήκονται καθώς σε ένα από τα δύο κύτταρα η μεταλλαγή *kar1-1* εξασφαλίζει ότι δεν θα υπάρξει πυρηνική σύντηξη (εικ.21).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών εδραίωσαν κατηγορηματικά την κυτταροπλασματική βάση του φαινομένου της μεταγραφικής μνήμης (εικ.22). Πυρήνες που φέρουν το γονίδιο *GAL1-GFP* όταν βρεθούν σε κυτταρόπλασμα κυτάρων που έχουν ήδη

ενεργοποιηθεί εκφράζουν την υβριδική Gal1-GFP με δραματικά ταχύτερο ρυθμό από τους αντίστοιχους πυρήνες που βρίσκονται σε κυτταρόπλασμα κυτάρων που δεν έχουν πριν ενεργοποιηθεί (εικ.22). Η ίδια ακριβώς κινητική παρατηρείται και στην περίπτωση που ο πυρήνας που εκφράζει την Gal1-GFP, δεν περιέχει Htz1 (εικ.23). Αντίθετα, και σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της εικ.12 η Htz1 απαιτείται για την ενεργοποίηση όταν ο πυρήνας *htz1Δ GAL1-GFP* βρεθεί σε κυτταρόπλασμα κυτάρων που δεν έχουν ενεργοποιηθεί πριν (εικ.23), απαιτείται δηλ. για την πρώτη ενεργοποίηση και όχι για τη μεταγραφική μνήμη, η κυτταροπλασματική ρύθμιση της οποίας είναι κυρίαρχη στην όποια επίδραση της Htz1. Το συμπέρασμα των παραπάνω είναι ότι η Htz1 δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική μνήμη η οποία έχει κυτταροπλασματική κι όχι πυρηνική βάση, κάτι που οριστικά απορρίπτει τα συμπεράσματα των δύο προηγούμενων μελετών (Brickner et al., 2007; Kundu et al., 2007).

Στην αναζήτηση του κυτταροπλασματικού παράγοντα στον οποίο οφείλεται η μνήμη της πρότερης ενεργοποίησης αναγνωρίστηκε η γαλακτοκινάση Gal1. Η γαλακτοκινάση είναι παραομόλογη του κυτταροπλασματικού ενεργοποιητή Gal3, ο οποίος από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο του Δ.Τζαμαρία από τον Ι.Ζαχαριουδάκη βρέθηκε να μην είναι απαραίτητος για το φαινόμενο αυτό. Τα γονίδια Gal1 και Gal3 έχουν προκύψει από διπλασιασμό στο γονιδίωμα του *S.cerevisiae* πριν από μερικά εκατομμύρια χρόνια. Εξελικτικά μετατράπηκε σε συνενεργοποιητή με το να αλληλεπιδρά με τον Gal80 παρουσία γαλακτόζης και ATP (Reece et al., 2006). Ωστόσο, αλλαγές δύο μόλις αμινοξέων στην αλληλουχία του μπορούν να επαναφέρουν τη δράση γαλακτοκινάσης (Platt et al., 2000). Κατά ανάλογο τρόπο η γαλακτοκινάση Gal1 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον Gal80 και να λειτουργήσει ως ενεργοποιητής αν και η *in vitro* η χημική συγγένεια με τον Gal80 είναι αρκετά χαμηλότερη από αυτή που έχει ο εξειδικευμένος Gal3 (Timson et al., 2002). Προκειμένου να ελεγχθεί ο ρόλος της γαλακτοκινάσης Gal1, οι πυρήνες *GAL1-GFP* βρέθηκαν πλέον στο κυτταρόπλασμα κυτάρων στα οποία το γονίδιο *GAL1* είχε διαγραφεί, ωστόσο τα κύτταρα αυτά είχαν πριν μεταφερθεί σε γαλακτόζη (και ραφινόζη ως ουδέτερου σακχάρου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πηγή άνθρακα, καθώς όπως είναι αναμενόμενο κύτταρα *gal1Δ* δεν μπορούν να καταβολίσουν γαλακτόζη). Το αποτέλεσμα του πειράματος αυτού είναι μια συσσώρευση Gal1-GFP (εικ.25) με ρυθμούς σχεδόν ίδιους με αυτούς που παρατηρούνται όταν οι πυρήνες βρίσκονται σε κυτταροπλασματικό περιβάλλον κυτάρων που δεν έχουν πριν ενεργοποιηθεί (εικ.22). Τα παραπάνω υποστηρίζουν τον αποκλειστικό ρόλο της γαλακτοκινάσης Gal1 στην ενεργοποίηση όλου του συστήματος των *GAL* γονιδίων. Αυτό σημαίνει ότι η Gal1 είναι ο παράγοντας που συντελεί στη μεταγραφική μνήμη, ο μηχανισμός της οποίας δεν απαιτεί κάποια ιδιαίτερη χρωματινική ή επιγενετική ρύθμιση, αλλά είναι πανομοιότυπος στις βασικές διεργασίες με ότι συμβαίνει σε μια αρχική ενεργοποίηση. Η απλή μεταγραφική βάση του φαινομένου αυτού αποτυπώνεται πολύ καθαρά στο πείραμα της εικ.26 όπου εξετάστηκε η επίδραση της γαλακτοκινάσης Gal1 στη μεταγραφή του γονιδίου *GAL3*. Έτσι, απουσία της Gal1 η μεταγραφή του γονιδίου *GAL3* (αρχική ενεργοποίηση) αν και τελικά φθάνει στα ίδια τελικά επίπεδα, ωστόσο

πραγματοποιείται χαρακτηριστικά πιο αργά. Αυτό σημαίνει ότι η Gal1 ρυθμίζει τη μεταγραφή των GAL γονιδίων και σε στάδια της αρχικής ενεργοποίησης ο ρόλος της όμως γίνεται περισσότερο εμφανής αφού έχει πρώτα προλάβει να ενεργοποιηθεί το σύστημα από τον Gal3, το γονίδιο του οποίου μεταγράφεται σε βασικά επίπεδα σε αντίθεση με το γονίδιο της Gal1, στο οποίο η καταστολή από τον Gal80 είναι ισχυρότερη (βλ. εισαγωγή και Melcher and Xu, 2001).

Τα παραπάνω οδηγούν στην επανεξέταση του ορισμού του φαινομένου της μεταγραφικής μνήμης των GAL γονιδίων ως επιγενετικού. Ο όρος επιγένεση και επιγενετικά φαινόμενα χρησιμοποιείται πολλές φορές για να περιγράψει φαινόμενα που μεταβιβάζουν μόνιμα πληροφορία από μια γενιά στις επόμενες, παρακάμπτοντας επιστατικά την πληροφορία που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα. Ωστόσο, ο ορισμός που περισσότερο πληροί το σύνολο των απαιτήσεων θέλει επιγενετικά τα φαινόμενα που εκτός από κληρονομήσιμα (heritable) είναι και αυτό-ενισχυόμενα (self-reinforcing) (Ptashne, 2007). Σύμφωνα με τον ορισμό αυτό, καθαρά επιγενετικά φαινόμενα είναι η αδρανοποίηση ενός εκ των δύο φυλετικών X χρωμοσωμάτων των κυττάρων των θηλαστικών, η γονιδιακή αποτύπωση (gene imprinting), και η επίδραση θέσεως (PEV, position effect variegation). Σε όλα αυτά τα φαινόμενα κυρίαρχο και σηματοδοτικό ρόλο παίζει η μεθυλίωση του DNA (Goldberg et al., 2007). Επειδή πολύ συχνά οι αλλαγές αυτές στην έκφραση των γονιδίων συνοδεύονται από αλλαγές στη χημική σύσταση των νουκλεοσωμάτων (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ενσωμάτωση ισομορφών ιστονών) υπάρχει η τάση όποια τέτοια αλλαγή να χαρακτηρίζεται «επιγενετική», ως εάν κάθε τέτοια αλλαγή οδηγεί σε μόνιμη, κληρονομήσιμη και αυτό-ενισχυόμενη αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης (Ptashne, 2007). Απ' όσο μέχρι σήμερα ωστόσο είναι γνωστά καμία αλλαγή της χημικής σύστασης των ιστονών δεν πληροί κανένα από τους παραπάνω όρους, ούτε καν η μεθυλίωση των καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν μόνιμες (μη-αντιστρεπτές), αλλά που σήμερα έχει αποδειχθεί η ενζυμική αντιστροφή τους (Chang et al., 2007). Η μόνη πραγματική επιγενετική αλλαγή της οποίας η χημική βάση είναι γνωστή είναι αυτή που ξεκινάει από την μεθυλίωση του DNA. Η τροποποίηση αυτή απουσιάζει από το «επιγένωμα» (epigenome) του σακχαρομύκητα *S.cerevisiae*.

Στο σύνολο της εργασίας αυτής η ιστόνη Htz1 και η λειτουργική της σημασία μας οδήγησε να μελετηθούν μεταγραφικά φαινόμενα στο γονίδιο GAL1. Η πολύ καλά μελετημένη φυσιολογία του συστήματος των GAL γονιδίων επέτρεψε να μελετηθεί ο ρόλος της ιστόνης αυτής σε ένα αριθμό φαινομένων όπως η έναρξη της μεταγραφής, η μετατόπιση στην πυρηνική μεμβράνη και η μνήμη της προηγηθείσας μεταγραφής. Η ιστόνη Htz1 είναι ένας παράγοντας ρύθμισης της μεταγραφής. Ωστόσο, τα μεταγραφικά φαινόμενα δεν ρυθμίζονται πρωτίστως από τη χρωματίνη *per se*, όσο από τους μεταγραφικούς παράγοντες που υποδεικνύουν και αναδεικνύουν τις λειτουργίες της χρωματίνης. Και η ρύθμιση αυτή ξεκινά από την ίδια την αλληλουχία του DNA που κωδικοποιεί τη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων αλλά και σε ένα πολύ σημαντικό ποσοστό και την ίδια τη διάταξη των νουκλεοσωμάτων ιδιαίτερα στους υποκινητές (Albert et al., 2007).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Εγχειρίδια

- Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition. By David C. Amberg, Daniel J. Burke, ; Jeffrey N. Strathern ISBN 978-087969728-0
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual (*Third Edition*)By Joseph Sambrook, ; David Russell, ISBN 978-087969576-7

Πρωτότυπες Δημοσιεύσεις

- Abruzzi, K.C., Belostotsky, D.A., Chekanova, J.A., Dower, K., and Rosbash, M. (2006). 3'-end formation signals modulate the association of genes with the nuclear periphery as well as mRNP dot formation. *EMBO J* 25, 4253-4262.
- Adam, M., Robert, F., Laroche, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* 21, 6270-6279.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9, 1191-1200.
- Akhtar, A., and Gasser, S.M. (2007). The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* 8, 507-517.
- Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C., and Pugh, B.F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 446, 572-576.
- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Cote, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J* 18, 5108-5119.
- Allis, C.D., Richman, R., Gorovsky, M.A., Ziegler, Y.S., Touchstone, B., Bradley, W.A., and Cook, R.G. (1986). hv1 is an evolutionarily conserved H2A variant that is preferentially associated with active genes. *J Biol Chem* 261, 1941-1948.
- Babiarz, J.E., Halley, J.E., and Rine, J. (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 700-710.

- Basehoar, A.D., Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 116, 699-709.
- Bash, R., and Lohr, D. (2001). Yeast chromatin structure and regulation of GAL gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65, 197-259.
- Baumann, R., Grogan, E., Ptashne, M., and Miller, G. (1993). Changing Epstein-Barr viral ZEBRA protein into a more powerful activator enhances its capacity to disrupt latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4436-4440.
- Belgareh, N., and Doye, V. (1997). Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant yeast cells. *J Cell Biol* 136, 747-759.
- Bhat, P.J., and Venkatesh, K.V. (2005). Stochastic variation in the concentration of a repressor activates GAL genetic switch: implications in evolution of regulatory network. *FEBS Lett* 579, 597-603.
- Bhaumik, S.R., and Green, M.R. (2001). SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev* 15, 1935-1945.
- Bhaumik, S.R., Raha, T., Aiello, D.P., and Green, M.R. (2004). In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev* 18, 333-343.
- Bhoite, L.T., Yu, Y., and Stillman, D.J. (2001). The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev* 15, 2457-2469.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S., and Kornberg, R.D. (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol Cell* 11, 1587-1598.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S., and Kornberg, R.D. (2004). Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol Cell* 14, 667-673.
- Brickner, D.G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P.C., Widom, J., and Brickner, J.H. (2007). H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5, e81.
- Brickner, J.H., and Walter, P. (2004). Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol* 2, e342.
- Bruce, K., Myers, F.A., Mantouvalou, E., Lefevre, P., Greaves, I., Bonifer, C., Tremethick, D.J., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (2005). The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucleic Acids Res* 33, 5633-5639.
- Bruno, M., Flaus, A., Stockdale, C., Rencurel, C., Ferreira, H., and Owen-Hughes, T. (2003). Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol Cell* 12, 1599-1606.
- Bryant, G.O., and Ptashne, M. (2003). Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol Cell* 11, 1301-1309.

- Cabal, G.G., Genovesio, A., Rodriguez-Navarro, S., Zimmer, C., Gadal, O., Lesne, A., Buc, H., Feuerbach-Fournier, F., Olivo-Marin, J.C., Hurt, E.C., *et al.* (2006). SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* *441*, 770-773.
- Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S.K., Kusch, T., Li, B., Workman, J.L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem* *280*, 13665-13670.
- Carrozza, M.J., John, S., Sil, A.K., Hopper, J.E., and Workman, J.L. (2002). Gal80 confers specificity on HAT complex interactions with activators. *J Biol Chem* *277*, 24648-24652.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Drubin, D.A., Rando, O.J., and Silver, P.A. (2005). Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev* *19*, 1188-1198.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P.A. (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* *117*, 427-439.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* *318*, 444-447.
- Conde, J., and Fink, G.R. (1976). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *73*, 3651-3655.
- Cosma, M.P., Panizza, S., and Nasmyth, K. (2001). Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol Cell* *7*, 1213-1220.
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J.L., and Peterson, C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* *265*, 53-60.
- Davie, J.K., Edmondson, D.G., Coco, C.B., and Dent, S.Y. (2003). Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J Biol Chem* *278*, 50158-50162.
- Davie, J.K., Trumbly, R.J., and Dent, S.Y. (2002). Histone-dependent association of Tup1-Ssn6 with repressed genes in vivo. *Mol Cell Biol* *22*, 693-703.
- Deckert, J., and Struhl, K. (2001). Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* *21*, 2726-2735.
- Dimova, D., Nackerdien, Z., Furgeson, S., Eguchi, S., and Osley, M.A. (1999). A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell* *4*, 75-83.
- Drubin, D.A., Garakani, A.M., and Silver, P.A. (2006). Motion as a phenotype: the use of live-cell imaging and machine visual screening to characterize transcription-dependent chromosome dynamics. *BMC Cell Biol* *7*, 19.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M., and Roth, S.Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* *10*, 1247-1259.

- Fan, J.Y., Rangasamy, D., Luger, K., and Tremethick, D.J. (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell* 16, 655-661.
- Gartenberg, M.R., Neumann, F.R., Laroche, T., Blaszczyk, M., and Gasser, S.M. (2004). Sir-mediated repression can occur independently of chromosomal and subnuclear contexts. *Cell* 119, 955-967.
- Gasser, S.M., Hediger, F., Taddei, A., Neumann, F.R., and Gartenberg, M.R. (2004). The function of telomere clustering in yeast: the circe effect. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 327-337.
- Gavin, I.M., and Simpson, R.T. (1997). Interplay of yeast global transcriptional regulators Ssn6p-Tup1p and Swi-Snf and their effect on chromatin structure. *EMBO J* 16, 6263-6271.
- Gligoris, T., Thireos, G., and Tzamarias, D. (2007). The Tup1 corepressor directs Htz1 deposition at a specific promoter nucleosome marking the GAL1 gene for rapid activation. *Mol Cell Biol* 27, 4198-4205.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635-638.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128, 721-733.
- Grunstein, M., Hecht, A., Fisher-Adams, G., Wan, J., Mann, R.K., Strahl-Bolsinger, S., Laroche, T., and Gasser, S. (1995). The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *J Cell Sci Suppl* 19, 29-36.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.
- Guillemette, B., and Gaudreau, L. (2006). Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem Cell Biol* 84, 528-535.
- Habeler, G., Natter, K., Thallinger, G.G., Crawford, M.E., Kohlwein, S.D., and Trajanoski, Z. (2002). YPL.db: the Yeast Protein Localization database. *Nucleic Acids Res* 30, 80-83.
- Hassan, A.H., Neely, K.E., and Workman, J.L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104, 817-827.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583-592.

- Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 133-153.
- Heun, P., Laroche, T., Shimada, K., Furrer, P., and Gasser, S.M. (2001). Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science* 294, 2181-2186.
- Holden, H.M., Rayment, I., and Thoden, J.B. (2003). Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* 278, 43885-43888.
- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.
- Hoppe, G.J., Tanny, J.C., Rudner, A.D., Gerber, S.A., Danaie, S., Gygi, S.P., and Moazed, D. (2002). Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol Cell Biol* 22, 4167-4180.
- Huisinga, K.L., and Pugh, B.F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 13, 573-585.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaerberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.
- Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G., and Laemmli, U.K. (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* 109, 551-562.
- Ishii, K., and Laemmli, U.K. (2003). Structural and dynamic functions establish chromatin domains. *Mol Cell* 11, 237-248.
- Iyer, V., and Struhl, K. (1996). Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5208-5212.
- Jabet, C., Sprague, E.R., VanDemark, A.P., and Wolberger, C. (2000). Characterization of the N-terminal domain of the yeast transcriptional repressor Tup1. Proposal for an association model of the repressor complex Tup1 x Ssn6. *J Biol Chem* 275, 9011-9018.
- Jessen, W.J., Dhasarathy, A., Hoose, S.A., Carvin, C.D., Risinger, A.L., and Kladde, M.P. (2004). Mapping chromatin structure in vivo using DNA methyltransferases. *Methods* 33, 68-80.
- Jin, J., Cai, Y., Yao, T., Gottschalk, A.J., Florens, L., Swanson, S.K., Gutierrez, J.L., Coleman, M.K., Workman, J.L., Mushegian, A., *et al.* (2005). A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J Biol Chem* 280, 41207-41212.
- Kamakaka, R.T., and Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19, 295-310.

- Katan-Khaykovich, Y., and Struhl, K. (2002). Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev* 16, 743-752.
- Keogh, M.C., Mennella, T.A., Sawa, C., Berthelet, S., Krogan, N.J., Wolek, A., Podolny, V., Carpenter, L.R., Greenblatt, J.F., Baetz, K., *et al.* (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev* 20, 660-665.
- Kew, O.M., and Douglas, H.C. (1976). Genetic co-regulation of galactose and melibiose utilization in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* 125, 33-41.
- Kim, S.J., Swanson, M.J., Qiu, H., Govind, C.K., and Hinnebusch, A.G. (2005). Activator Gcn4p and Cyc8p/Tup1p are interdependent for promoter occupancy at ARG1 in vivo. *Mol Cell Biol* 25, 11171-11183.
- Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2, E131.
- Kornberg, R.D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30, 235-239.
- Krebs, J.E., Fry, C.J., Samuels, M.L., and Peterson, C.L. (2000). Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* 102, 587-598.
- Krogan, N.J., Baetz, K., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T.C., Thompson, N.J., Davey, M.G., Pootoolal, J., Hughes, T.R., *et al.* (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13513-13518.
- Kundu, S., Horn, P.J., and Peterson, C.L. (2007). SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster. *Genes Dev* 21, 997-1004.
- Kuras, L., Borggrefe, T., and Kornberg, R.D. (2003). Association of the Mediator complex with enhancers of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13887-13891.
- Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J* 22, 4512-4522.
- Larschan, E., and Winston, F. (2001). The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev* 15, 1946-1956.
- Leach, T.J., Mazzeo, M., Chotkowski, H.L., Madigan, J.P., Wotring, M.G., and Glaser, R.L. (2000). Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275, 23267-23272.
- Lemieux, K., and Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4040-4050.

- Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., and Workman, J.L. (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18385-18390.
- Liljestrom-Suominen, P.L., Joutsjoki, V., and Korhola, M. (1988). Construction of a Stable alpha-Galactosidase-Producing Baker's Yeast Strain. *Appl Environ Microbiol* 54, 245-249.
- Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., Friedman, N., and Rando, O.J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* 3, e328.
- Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C.M., Myers, L.C., and Kornberg, R.D. (2000). Mediator-nucleosome interaction. *Mol Cell* 6, 197-201.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luthra, R., Kerr, S.C., Harreman, M.T., Apponi, L.H., Fasken, M.B., Ramineni, S., Chaurasia, S., Valentini, S.R., and Corbett, A.H. (2007). Actively transcribed GAL genes can be physically linked to the nuclear pore by the SAGA chromatin modifying complex. *J Biol Chem* 282, 3042-3049.
- Ma, J., and Ptashne, M. (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* 48, 847-853.
- Madigan, J.P., Chotkowski, H.L., and Glaser, R.L. (2002). DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Res* 30, 3698-3705.
- Malave, T.M., and Dent, S.Y. (2006). Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem Cell Biol* 84, 437-443.
- Martin, C., and Zhang, Y. (2007). Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 19, 266-272.
- Marzluff, W.F., and Duronio, R.J. (2002). Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr Opin Cell Biol* 14, 692-699.
- Matangkasombut, O., and Buratowski, S. (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell* 11, 353-363.
- Melcher, K., and Xu, H.E. (2001). Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO J* 20, 841-851.
- Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.

- Mennella, T.A., Klinkenberg, L.G., and Zitomer, R.S. (2003). Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot Cell* 2, 1288-1303.
- Menon, B.B., Sarma, N.J., Pasula, S., Deminoff, S.J., Willis, K.A., Barbara, K.E., Andrews, B., and Santangelo, G.M. (2005). Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5749-5754.
- Millar, C.B., Kurdistani, S.K., and Grunstein, M. (2004). Acetylation of yeast histone H4 lysine 16: a switch for protein interactions in heterochromatin and euchromatin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 193-200.
- Millar, C.B., Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev* 20, 711-722.
- Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128, 787-800.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.
- Moazed, D. (2001). Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr Opin Cell Biol* 13, 232-238.
- Nalley, K., Johnston, S.A., and Kodadek, T. (2006). Proteolytic turnover of the Gal4 transcription factor is not required for function in vivo. *Nature* 442, 1054-1057.
- Neef, D.W., and Kladde, M.P. (2003). Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of PHO5. *Mol Cell Biol* 23, 3788-3797.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* 11, 709-719.
- Pamblanco, M., Poveda, A., Sendra, R., Rodriguez-Navarro, S., Perez-Ortin, J.E., and Tordera, V. (2001). Bromodomain factor 1 (Bdf1) protein interacts with histones. *FEBS Lett* 496, 31-35.
- Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T., and Tzamarias, D. (2004). The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO Rep* 5, 368-372.
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J.E., and Peterson, C.L. (2006). Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev* 20, 2437-2449.

- Papamichos-Chronakis, M., Petrakis, T., Ktistaki, E., Topalidou, I., and Tzamarias, D. (2002). Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1. *Mol Cell* 9, 1297-1305.
- Peng, G., and Hopper, J.E. (2000). Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 5140-5148.
- Peng, G., and Hopper, J.E. (2002). Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8548-8553.
- Pilauri, V., Bewley, M., Diep, C., and Hopper, J. (2005). Gal80 dimerization and the yeast GAL gene switch. *Genetics* 169, 1903-1914.
- Platt, A., and Reece, R.J. (1998). The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J* 17, 4086-4091.
- Platt, A., Ross, H.C., Hankin, S., and Reece, R.J. (2000). The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3154-3159.
- Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2005). The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev* 19, 2534-2539.
- Proft, M., and Struhl, K. (2002). Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* 9, 1307-1317.
- Ptashne, M. (2004). Two "what if" experiments. *Cell* 116, S71-72, 72 p following S76.
- Ptashne, M. (2007). On the use of the word 'epigenetic'. *Curr Biol* 17, R233-236.
- Ptashne, M., and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569-577.
- Ptashne, M., and Gann, A. (1998). Imposing specificity by localization: mechanism and evolvability. *Curr Biol* 8, R897.
- Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.
- Raisner, R.M., and Madhani, H.D. (2006). Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev* 16, 119-124.
- Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J* 22, 1599-1607.

- Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D.J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 650-655.
- Redd, M.J., Arnaud, M.B., and Johnson, A.D. (1997). A complex composed of tup1 and ssn6 represses transcription in vitro. *J Biol Chem* 272, 11193-11197.
- Reece, R.J., Beynon, L., Holden, S., Hughes, A.D., Rebora, K., and Sellick, C.A. (2006). Nutrient-regulated gene expression in eukaryotes. *Biochem Soc Symp*, 85-96.
- Reeves, W.M., and Hahn, S. (2005). Targets of the Gal4 transcription activator in functional transcription complexes. *Mol Cell Biol* 25, 9092-9102.
- Reid, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., and Struhl, K. (2000). Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol Cell* 6, 1297-1307.
- Reinke, H., and Horz, W. (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell* 11, 1599-1607.
- Robinett, C.C., Straight, A., Li, G., Wilhelm, C., Sudlow, G., Murray, A., and Belmont, A.S. (1996). In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol* 135, 1685-1700.
- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S.K., Wang, A., Suka, N., and Grunstein, M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* 109, 437-446.
- Rodriguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M.J., Antunez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Perez-Ortin, J.E., Reed, R., and Hurt, E. (2004). Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116, 75-86.
- Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671-5677.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411-422.
- Sarcinella, E., Zuzarte, P.C., Lau, P.N., Draker, R., and Cheung, P. (2007). Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* 27, 6457-6468.

- Schmid, M., Arib, G., Laemmli, C., Nishikawa, J., Durussel, T., and Laemmli, U.K. (2006). Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol Cell* 21, 379-391.
- Schultz, J., Marshall-Carlson, L., and Carlson, M. (1990). The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 4744-4756.
- Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2004). Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 24, 10111-10117.
- Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2006). Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 22, 415-422.
- Sekinger, E.A., Moqtaderi, Z., and Struhl, K. (2005). Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol Cell* 18, 735-748.
- Shia, W.J., Li, B., and Workman, J.L. (2006). SAS-mediated acetylation of histone H4 Lys 16 is required for H2A.Z incorporation at subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 2507-2512.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.
- Smith, R.L., and Johnson, A.D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 25, 325-330.
- Spector, D.L., (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72, 573-608.
- Sprague, E.R., Redd, M.J., Johnson, A.D., and Wolberger, C. (2000). Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J* 19, 3016-3027.
- Straight, A.F., Belmont, A.S., Robinett, C.C., and Murray, A.W. (1996). GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein-protein interactions can mediate sister chromatid cohesion. *Curr Biol* 6, 1599-1608.
- Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J., and Grunstein, M. (2001). Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell* 8, 473-479.
- Surani, M.A., Hayashi, K., and Hajkova, P. (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128, 747-762.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7, 1121-1124.
- Syntichaki, P., Topalidou, I., and Thireos, G. (2000). The Gcn5 bromodomain coordinates nucleosome remodelling. *Nature* 404, 414-417.

- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., Bauer, C., and Gasser, S.M. (2004). Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J* 23, 1301-1312.
- Taddei, A., Van Houwe, G., Hediger, F., Kalck, V., Cubizolles, F., Schober, H., and Gasser, S.M. (2006). Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* 441, 774-778.
- Tanny, J.C., Kirkpatrick, D.S., Gerber, S.A., Gygi, S.P., and Moazed, D. (2004). Budding yeast silencing complexes and regulation of Sir2 activity by protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 24, 6931-6946.
- Timson, D.J., Ross, H.C., and Reece, R.J. (2002). Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry. *Biochem J* 363, 515-520.
- Topalidou, I., and Thireos, G. (2003). Gcn4 occupancy of open reading frame regions results in the recruitment of chromatin-modifying complexes but not the mediator complex. *EMBO Rep* 4, 872-876.
- Traven, A., Jelacic, B., and Sopta, M. (2006). Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep* 7, 496-499.
- Tremethick, D.J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128, 651-654.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544.
- Tzamarias, D., and Struhl, K. (1995). Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev* 9, 821-831.
- van Attikum, H., Fritsch, O., and Gasser, S.M. (2007). Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *EMBO J* 26, 4113-4125.
- Varanasi, U.S., Klis, M., Mikesell, P.B., and Trumbly, R.J. (1996). The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol Cell Biol* 16, 6707-6714.
- Vicent, G.P., Nacht, A.S., Smith, C.L., Peterson, C.L., Dimitrov, S., and Beato, M. (2004). DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* 16, 439-452.
- Watson, A.D., Edmondson, D.G., Bone, J.R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D.J., and Roth, S.Y. (2000). Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev* 14, 2737-2744.

- Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Young, R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.
- Winey, M., and O'Toole, E.T. (2001). The spindle cycle in budding yeast. *Nat Cell Biol* 3, E23-27.
- Winey, M., Yarar, D., Giddings, T.H., Jr., and Mastronarde, D.N. (1997). Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol Biol Cell* 8, 2119-2132.
- Workman, J.L., and Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67, 545-579.
- Wu, J., Suka, N., Carlson, M., and Grunstein, M. (2001). TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol Cell* 7, 117-126.
- Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1064-1071.
- Yan, Y., Barlev, N.A., Haley, R.H., Berger, S.L., and Marmorstein, R. (2000). Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases. *Mol Cell* 6, 1195-1205.
- Yang, X., Zaurin, R., Beato, M., and Peterson, C.L. (2007). Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATP-dependent H2A-H2B displacement. *Nat Struct Mol Biol* 14, 540-547.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225-229.
- Zacharioudakis, I., Gligoris, T., and Tzamarias, D. (2007). A Yeast Catabolic Enzyme Controls Transcriptional Memory. *Curr Biol*.
- Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004). Changes in genomewide occupancy of core transcriptional regulators during heat stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16843-16848.
- Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219-231.
- Zhang, Z., and Reese, J.C. (2004). Redundant mechanisms are used by Ssn6-Tup1 in repressing chromosomal gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 39240-39250.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Χημικά: τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες SIGMA, MERCK και FMC Bioproducts.

Ένζυμα: Όλες οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και τα ένζυμα τροποποίησης του DNA προήλθαν από τις εταιρίες MINOTECH, NEW ENGLAND BIOLABS, PROMEGA, STRATAGENE.

Η μικροκοκκική νουκλεάση ήταν και η ζυμολύση της SIGMA και η πρωτεΐνάση K της MERCK.

Τα θερμοανθεκτικά ένζυμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις αλυσιδωτού πολυμερισμού (PCR) κατασκευάστηκαν από τις εταιρίες MINOTECH (MinoTaq) και ROCHE (AmpliTaq).

Kits: Για την απομόνωση ζωνών DNA από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το rapid gel extraction system της QIAGEN,

Αντισώματα και υλικά ανοσοεντοπισμού: τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των επιτόπων HA και Myc και PolII προήλθαν από τη SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb414 που ανιχνεύει τις νουκλεοπορίνες Nic96 και Nur60 ήταν μια προσφορά του Gareth Lycett. Τα δευτερογενή αντισώματα anti-mouse και anti-rabbit συζευγμένα με HRP προήλθαν είτε από τη SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY είτε από την JACKSON IMMUNORESEARCH. Τα ειδικά υποστρώματα δράσης της υπεροξειδάσης ήταν της PIERCE. Τα σφαιρίδια Protein-A/G Sepharose προμηθεύτηκαν από την AMERSHAM-PHARMACIA.

Μεμβράνες: Η μεταφορά νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) έγινε σε μεμβράνες νάυλον NytranN (Schleicher and Schuell) ενώ η μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran (Schleicher and Schuell). Οι ίδιες μεμβράνες (Protran) χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά βακτηριακών αποικιών.

Ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια: τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια α [³²P]-dATP, α [³²P]-dCTP, γ [³²P]-dATP και α ³⁵S-dATP που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις ραδιοσήμανσης προήλθαν από την AMERSHAM-PHARMACIA ή την PERKIN ELMER (NEN).

Ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές (primers): όλα τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ

Χρωστικές: χρησιμοποιήθηκε η χρωστική χρώσης του δίκλωνου DNA Sybr Green Nucleic Acid Gel Stain I της Molecular Probes για τη χρώση πηκτής ακρυλαμίδης (7%).

Θρεπτικά μέσα

Τα **θρεπτικά μέσα**, υγρά και στερεά, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών (LB, SOC) αλλά και των στελεχών ζύμης (MIN, YP) καθώς και τα διαλύματα **αντιβιοτικών** (αμπικιλίνη, γενετισίνη-G418), κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγχειριδίων Molecular Cloning (Sambrook et al.) και Methods in Yeast genetics (CSHLP).

Μη επαγωγικές συνθήκες ανάπτυξης: Οι φυσιολογικές (μη επαγωγικές) συνθήκες ανάπτυξης των καλλιιεργειών ζύμης ήταν είτε πλούσιο θρεπτικό μέσο (YPD)

Συνθήκες επαγωγής γαλακτόζης: Για την ενεργοποίηση μέσω του ενεργοποιητή Gal4, τα στελέχη ζύμης αναπτύχθηκαν σε πλούσιο μέσο που περιείχε 2% ραφινόζη μέχρι να φτάσουν σε εκθετική λογαριθμική φάση οπότε και μεταφέρθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο με 2% γαλακτόζη (YPG) εκτός κι αν αναφέρεται αλλιώς στα αποτελέσματα.

Πλασμιδιακοί φορείς

Ο βακτηριακός πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε κυρίως για υποκλωνοποιήσεις τμημάτων DNA ήταν ο ειδικός φορέας **pGEM-T Easy** (PROMEGA).

Οι πλασμιδιακοί φορείς ζύμης που αποτέλεσε τη βάση για την κατασκευή των πλασμιδίων ένθεσης της διάταξης LacO ήταν οι φορείς pAFS059 και pAFS052 παράγωγοι των YIPlac-112 και YIPlac-109. Η ένθεση των ομόλογων τμημάτων αλληλουχίας στις περιοχές GAL και THI72 έγινε πάντα με τη χρήση των θέσεων BamHI/KpnI. Οι φορείς αυτοί κλωνοποιήθηκαν σε κύτταρα Stab12 (37° C) ή και σε DH5a (σε θερμοκρασία δωματίου). Η ένθεση στο γονιδίωμα του *S.cerevisiae* έγινε χρησιμοποιώντας μια ενδογενή μοναδική θέση περιορισμού. Η ένθεση της LacI-GFP έγινε με τη χρήση του φορέα pDB030. Οι φορείς αυτοί υπήρξαν ευγενική προσφορά της D.Bressan από το εργαστήριο του Jim Haber (Brandeis Univ.)

Στελέχη

A. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη της *Escherchia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- **Stab12** (STRATAGENE),
- **DH5a** (GibcoBRL),

Οι γονότυποί τους αναφέρονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989).

B. Στελέχη σακχαρομήκυτα

Τα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν έχουν περιγραφεί στις αντίστοιχες εργασίες (Glitoris et al., 2007; Zacharioudakis et al., 2007). Το στέλεχος *kar1-1* ήταν μια προσφορά του G.R. Fink (Conde and Fink, 1976). Όλα τα στελέχη δημιουργήθηκαν στο γενετικό υπόβαθρο S288C και είναι απόγονοι του FT5 (MATa *leu2-3 ura3-52 trp1-1 his3Δ200*).

Μέθοδοι

A. Γενικές μοριακές τεχνικές

• Μέθοδοι τροποποίησης των μορίων DNA

Στις γενικές μοριακές τεχνικές τροποποίησης των μορίων DNA περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, υδρόλυσης των 5' φωσφορικών ομάδων με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, πολυμερισμού των άκρων με το ένζυμο DNA poll (Klenow), σύνδεσης μορίων με το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Οι αντιδράσεις εφαρμόστηκαν όπως αυτές αναφέρονται από τους Sambrook et al. 1989 και σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και στους καταλόγους των αντίστοιχων εταιριών.

• Ανάλυση και απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, όπως αναφέρεται από τους Sambrook et al. 1989 και με σκοπό την ποσοτική εκτίμηση ή την εκτίμηση του μεγέθους της/των αναλυμένων ζωνών. Όπου ήταν απαραίτητος ο ακριβέστερος προσδιορισμός της ποσότητας του DNA μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 260nm (OD_{260}). Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο μεγεθών DNA (DNA marker) το προϊόν της πέψης του γενωμικού DNA του φάγου λ με το περιοριστικό ένζυμο *λStyl*.

Για την απομόνωση και καθαρισμό τμημάτων DNA μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους σε πήκτωμα αγαρόζης εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι, ανάλογα με την ποσότητα και το μέγεθος του προς καθαρισμό τμήματος. Μεγάλες ποσότητες απομονώθηκαν κυρίως με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης και σπανιότερα με τη χρήση πηκτώματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως, μέθοδοι που περιγράφονται από τους Sambrook et al. 1989. Για μικρότερες ποσότητες DNA προτιμήθηκε η χρήση του ειδικού QIAGEN rapid gel extraction system και σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση σε μικρή κλίμακα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος λύσης με βρασμό (Sambrook et al.). Εναλλακτικά, σε περιπτώσεις που οι συνθήκες απαιτούσαν καλύτερης ποιότητας DNA, χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική λύση, όπως αυτή περιγράφεται από τους Sambrook et al. (Molecular Cloning Manual).

Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα. Σε περιπτώσεις όπου ήταν απαραίτητη η απομόνωση υπερελικωμένου DNA υψηλής ποιότητας επιλέχθηκε η συνδυαστική χρήση της μεθόδου κατακρήμνισης με πολυαιθυλενγλυκόλη (PEG) 8000 (Sambrook et al.).

- **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση πολυμερισμού ήταν 5-50 ng όταν το DNA ήταν πλασμιδιακό, ενώ 50-100ng όταν επρόκειτο για γενωμικό DNA. Οι αντιδράσεις ως επί τω πλείστον γίνονταν στα 25μl και είχαν την παρακάτω σύσταση: 10mM Tris-HCl, pH.9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM από κάθε dNTP, 25-50 pmoles από κάθε εκκινητή και 0.1-0.5u Taq πολυμεράση.

Το πρόγραμμα που επιλέχθηκε ήταν ειδικό για κάθε περίπτωση, ανάλογα με το T_m του κάθε ανιχνευτή αλλά και το μέγεθος του προϊόντος. Το γενικό σχήμα των αντιδράσεων πολυμερισμού που εφαρμόστηκαν φαίνεται στη συνέχεια:

Αρχή: 5 λεπτά στους 94^oC για αρχική αποδιάταξη
22-30 κύκλοι: 30 δευτερόλεπτα στους 94^oC για αποδιάταξη
30 δευτερόλεπτα στην επιλεγμένη θερμοκρασία
(T_m- 4^oC) για υβριδοποίηση των εκκινητών
επιλεγμένο χρόνο στους 72^oC για επιμήκυνση της αλυσίδας
Τέλος: επιλεγμένο χρόνο στους 72^oC για συμπλήρωση των άκρων

Για τον πολυμερισμό των τμημάτων DNA που προέκυπταν μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) η αντίδραση συνέβαινε παρουσία ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων (α[³²P]-dATP ή α[³²P]-dCTP) .

- **Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων.**

Για την παρασκευή και το μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων εφαρμόστηκε είτε η χημική-συμβατική μέθοδος χλωριούχου ασβεστίου είτε η μέθοδος της παροχής ηλεκτρικού πεδίου (electroporation) (Molecular Cloning, ό.π).

- **Ανάλυση κατά Southern και κατά Northern**

Εφαρμόστηκαν καθιερωμένα πρωτόκολλα ακριβώς όπως περιγράφονται στο Molecular Cloning. Για τη μεταφορά χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη νάυλον (Nytran Super Plus) ενώ για τη

σταθεροποίηση του DNA ή RNA πάνω στη μεμβράνη εφαρμόστηκε η τεχνική της ομοιοπολικής πρόσδεσης με έκθεση της μεμβράνης σε λάμπα UV για 5 λεπτά.

Η υβριδοποίηση της μεμβράνης έγινε με τη μέθοδο Church ενώ η ραδιοσήμανση μορίων DNA για την απόκτηση ραδιενεργών ανιχνευτών με τη μέθοδο των τυχαίων υβριδισμών (random priming).

- **Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών και ανοσοεντοπισμός ακινητοποιημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη (SDS-PAGE και Western blot analysis)**

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (Molecular Cloning, Sambrook et al.).

Για τον ανοσοεντοπισμό των αναλυθέντων πρωτεϊνών έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά αυτών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά και η διαδικασία εφαρμογής των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων έγιναν όπως αναφέρονται στο CPMB (Ausubel et al. 1999) ενώ για τις ιδανικές αραιώσεις των αντισωμάτων λήφθηκαν υπόψιν οι οδηγίες των κατασκευαστών. Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των επιτόπων HA και Myc της Santa Cruz Biotechnology. Ο ανοσοεντοπισμός έγινε ενζυματικά με τη δράση της υπεροξειδάσης (HRP), η οποία ήταν συζευγμένη με το δευτερογενές αντίσωμα (anti-rabbit ή anti-mouse-HRP conjugated), σε κατάλληλα υποστρώματα.

B. Μοριακές τεχνικές ειδικές για το σακχαρομήκυτα

- **Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης**

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα ζύμης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του οξικού λιθίου (LiAc TRAF0). Πρόκειται για μια μέθοδο υψηλής αποτελεσματικότητας η οποία βασίζεται στη δημιουργία δεκτικών κυττάρων ζύμης λόγω αλκαλικών κατιόντων και περιγράφεται εγχειρίδιο Methods in Yeast Genetics.

- **Απομόνωση γενωμικού DNA ή ολικού RNA από κύτταρα ζύμης**

Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των γυάλινων σφαιριδίων (glass beads) όπως περιγράφεται στο Methods in Yeast Genetics. Το DNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε είτε ως μήτρα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανάλυση του γονοτύπου στελεχών ζύμης είτε τέθηκε σε πέψη με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης οπότε και αναλύθηκε κατά Southern.

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα ζύμης εφαρμόστηκε η μέθοδος της εκχύλισης με ζεστή όξινη φαινόλη (extraction with hot acidic phenol) όπως αυτή περιγράφεται στο Methods in Yeast Genetics. Το ολικό RNA που απομονώθηκε αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% παρουσία 5% φορμαλδεΐδης και ακολούθησε ανάλυση κατά Northern.

- **Σήμανση με επιτόπους ενδογενών γονιδίων της ζύμης (epitope tagging)**

Με σκοπό την ανίχνευση πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης εισάγουμε ήδη γνωστούς επιτόπους, που αναγνωρίζονται από εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα, στα ενδογενή γονίδια που ενδιαφέρουν. Η μέθοδος βασίζεται στην δυνατότητα ομόλογου ανασυνδυασμού στη ζύμη και εφαρμόστηκε όπως ακριβώς περιγράφηκε στο *Methods in Yeast Genetics*. Οι επιτόποι που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με την περίπτωση ήταν είτε 9 Myc είτε 3 HA ενώ η εισαγωγή του επιτόπου συμβαίνει στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης.

- **Αποσιώπηση (gene disruption) και αντικατάσταση (gene replacement) γονιδίων στη ζύμη**

Στην αποσιώπηση και στην αντικατάσταση γονιδίων της ζύμης εκμεταλλευόμαστε το φαινόμενο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Σε όλες τις περιπτώσεις απαλοιφής γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος «αποσιώπησης σε ένα βήμα» με χρήση ειδικής κασέτας-αποσιώπησης και ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τμήμα της κασέτας και τμήμα του προς διαγραφή γονιδίου (*Methods in Yeast Genetics*).

- **Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης**

Καλλιέργειες των 2ml αναπτύσσονται μέχρι $OD_{550}=0.8-1$ και συλλέγονται με φυγοκέντρηση. Επαναδιαλύονται σε 50μl διαλύματος 1X SDS loading buffer (50mM Tris-HCl, pH=6.8, 2%SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 7mM β-ME, 1mM PMSF) και προστίθεται ίσος όγκος γυάλινων σφαιριδίων (glass beads). Η λύση των κυττάρων γίνεται με ισχυρή ανάδευση (vortex), για 4 φορές από 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες επώσεις στον πάγο. Ακολουθεί βρασμός στους 100°C, φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό και το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

- **Ανίχνευση κυτταρικού εντοπισμού με ανοσοφθορισμό**

Η ανίχνευση του εντοπισμού των νουκλεοπορινών έγινε ακριβώς όπως περιγράφεται στο *Manual for Methods in Yeast Genetics*, CSHLP.

- **Μικροσκοπία Φθορισμού-Συνεστιακή Μικροσκοπία**

Κύτταρα καλλιιεργειών συγκεντρώθηκαν αρχικά μονιποιοιηθηκαν με 2% τελική συγκεντρωση φορμαλδευδης για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ξεπλύθηκαν δύο φορές με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια 5 μl κυττάρων απλώθηκαν σε επιστρωμένες με 1% αγαρόζη αντικειμενοφόρους πλάκες (agarose pads). Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση των καλλιιεργειών ήταν συνεστιακό μικροσκόπιο laser BIO-RAD MRC 1024 CONFOCAL SYSTEM (Laser Sharp Version 3.2 Bio-Rad software, zoom x2, excitation: 488nm/Blue, samples at Laser Power 10%, Kalman filter N= 5-6, 0.3 μm cut, iris: 7-8, crypton/argon laser, Nikon DIAPHOT 300 Microscope, x60 (oil immersion) lens, emission filter 522/DF35. lens reference: Plan Apo 60/1.40 oil DM, Nikon Japan 160175, 60 DM/Ph4,160/0.17). Για την καταμέτρηση των σημασμένων γενετικών τόπων συγχωνεύθηκαν περίπου δέκα μεμονωμένες εικόνες (stack) που αντιστοιχούν σε σάρωση βήματος 0.2 μm. Σε κάθε επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε φίλτρο μείωσης θορύβου βάσει του αλγόριθμου Kalman. Στα πειράματα σχηματισμού ετεροκάρυων χρησιμοποιήθηκε απλή πηγή

φωτός UV με τα κατάλληλα φίλτρα και οι φωτογραφίες πάρθηκαν με τη χρήση κάμερας CCD.

- **Μέθοδος νουκλεοσωμικής χαρτογράφησης χαμηλής ανάλυσης.**

Ακολουθήθηκε η μέθοδος δημιουργίας διαπερατών σε ένζυμα κυττάρων ζύμης λόγω δράσης του ενζύμου νυστατίνη. Οι σφαιροπλάστες εναιωρούνται σε 200μl/25ml αρχικής καλλιέργειας διαλύματος νυστατίνης (1M σορβιτόλη, 20mM Tris-HCl, pH: 8, 50mM NaCl, 1.5mM CaCl₂) στο οποίο προστίθενται 50μg/ml νυστατίνης. Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα μικροκοκκικής νουκλεάσης (1, 2,5,10,20u) και ακολουθεί επώαση στους 37⁰C για 20 λεπτά. Η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος τερματισμού (10X: 10% SDS, 50mM EDTA). Ακολουθεί πέψη με 50μg πρωτεΐνάσης K, στους 37⁰C και για 30 λεπτά. Το DNA καθαρίζεται με εκχύλιση φαινόλης/χλωροφορμίου, κατακρημνίζεται με οξικό νάτριο και αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε νερό.

Για την ανάλυση του επεξεργασμένου με μικροκοκκική νουκλεάση γενωμικού DNA εφαρμόστηκε η μέθοδος της σήμανσης από το άκρο (indirect end labeling) σύμφωνα με την οποία το επαναδιαλυμένο DNA τίθεται σε πέψη παρουσία κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου που οριοθετεί το ένα άκρο και σε απόσταση 1000-2000 ζευγών βάσεων από την προς ανάλυση περιοχή. Το DNA αναλύεται στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης, ακολουθεί μεταφορά κατά Southern, και υβριδοποίηση με κατάλληλο ραδιενεργό ανιχνευτή.

- **Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)**

Η μέθοδος που περιγράφηκε στην εργασία Gligoris et al.,2007. Επιγραμματικά, κύτταρα ζύμης από καλλιέργειες των 50ml αναπτύσσονται μέχρι OD: 0.5-0.8 και επωάζονται για 20 λεπτά υπό ανάδευση με 1% φορμαλδεΐδη ώστε να επιτευχθεί στερέωση (fixing) των κυττάρων. Η διαδικασία διακόπτεται με την προσθήκη 125mM γλυκίνης και επώαση για 5 λεπτά. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000rpm και για 5 λεπτά και πλένονται 2 φορές με 10ml διαλύματος TBS (20mM Tris-HCl, pH:7.5, 200mM NaCl).

Ακολουθεί λύση των κυττάρων σε 400μl διαλύματος λύσης (50mM HEPES-KOH, pH:7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton, 0.1% sodium deoxycholate, 1mM PMSF) παρουσία ίσου όγκου γυάλινων σφαιριδίων (glass beads) και με ισχυρή ανάδευση (vortex) για 40 λεπτά στους 4⁰C. Το εναιώρημα συλλέγεται και ηχοβολείται (sonication) στα 4-6 microns του ηχοβολητή (Soniprep 150, MSE) για 4 φορές από 12 δευτερόλεπτα. Με τον τρόπο αυτό η χρωματίνη σπάει σε κομμάτια DNA μεγέθους 200-800 ζευγών βάσεων. Το ολικό χρωματινικό εκχύλισμα φυγοκεκτρείται για 5 λεπτά στις 14000 rpm και στους 4⁰C και ακολούθως για άλλα 60 λεπτά στις ίδιες συνθήκες, οπότε η καθαρή χρωματίνη απομονώνεται στο υπερκείμενο.

Ποσότητα που να αντιστοιχεί περίπου στο 1/10 του ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος αραιώνεται σε 300μl διαλύματος λύσης και επωάζεται, με περιστροφική ανάδευση, για τουλάχιστον 12 ώρες και στους 4⁰C με 1.5γ από το αντίσωμα έναντι του παράγοντα που ενδιαφέρει. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των επιτόπων HA και Myc, H3 ιστόνης, της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II .

Μετά την επώαση προστίθενται στο δείγμα 30μl σφαιριδίων Protein-A σεφαρόζης (από ένα 1:1 εναιώρημα των σφαιριδίων σε διάλυμα λύσης) και ακολουθεί επώαση για 1.5 ώρα στους 4°C υπό περιστροφική ανάδευση.

Τα σφαιρίδια συλλέγονται (13000rpm, 1 λεπτό) και πλένονται υπό περιστροφική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά με 1ml από τα παρακάτω διαλύματα, κατά σειρά διαδοχής: διάλυμα λύσης, διάλυμα λύσης με 500mM NaCl, διάλυμα III (10mM Tris-HCl, pH: 8.0, 250mM LiCl, 0.5% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM EDTA) και TE. Η έκλουση των ανοσοκατακρημνισμένων συμπλόκων γίνεται σε 250μl διαλύματος έκλουσης (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH: 7.5) με επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αραιώνεται με 250μl TE και επωάζεται με 50μg πρωτεϊνάσης K στους 42°C και για 1 ώρα. Τελικά, οι ομοιοπολικοί δεσμοί που δημιουργήθηκαν αρχικά με την επώαση με φορμαλδεΐδη, σπάνε με επώαση του δείγματος στους 65°C για 5 ώρες.

Ποσότητα που να αντιστοιχεί περίπου στο 1/100 του αρχικού ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος (περίπου 1/10 του προς ανοσοκατακρήμνιση) λαμβάνεται ως δείγμα ποσοτικού και ποιοτικού ελέγχου της μη ανοσοκατακρημνισμένης αρχικής χρωματίνης (input). Αραιώνεται σε 500μl TE και επωάζεται ομοίως με το ανοσοκατακρημνισμένο δείγμα με πρωτεϊνάση K και ακολούθως στους 65°C προς αναστροφή των ομοιοπολικών δεσμών.

Το DNA από το ανοσοκατακρημνισμένο και μη δείγμα εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο παρουσία οξικού νατρίου και κατακρημνίζεται με αιθανόλη.

Τα δείγματα αφού επαναδιαλυθούν σε νερό (100μl) χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για την ανίχνευση των προϊόντων οι αντιδράσεις γίνονται είτε παρουσία ραδιενεργών νουκλεοτιδίων και σε συνθήκες γραμμικότητας της αντίδρασης οπότε τα προϊόντα αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτιμώνται ποσοτικά με Phosphorimager, είτε παρουσία χρωστικής Sybr Green I μετά από ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδης (7%). Όλες οι ραδιενεργές αντιδράσεις έγιναν στα 25μl με 5μl από το κάθε δείγμα, 0.5μl α[³²P]-dATP και α[³²P]-dCTP και 0.1u Taq.