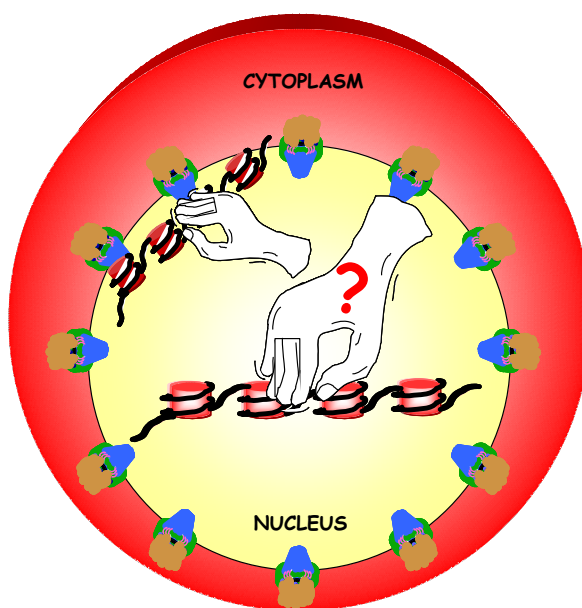


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

« ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΥΡΗΝΙΚΗ
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟ
Saccharomyces cerevisiae "



ΚΟΝΤΑΚΗ ΧΑΡΟΥΛΑ

Υπό την επίβλεψη του ερευνητή Δρ. Γ. Θηραίου
Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Σακχαρομύκητα

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2005

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής» στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Σακχαρομύκητα του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Τ.Ε)

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια

Κοντάκη Χαρούλα

Επιβλέπων ερευνητής

Θηραΐος Γιώργος

Υπεύθυνη καθηγήτρια τμήματος Βιολογίας

Αλεξανδράκη Δέσποινα

Κατά το χρονικό διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Σακχαρομύκητα του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Τ.Ε), είχα την τύχη να συνεργαστώ με πολύ ικανούς και έμπειρους ανθρώπους του ερευνητικού χώρου. Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά:

Το Δρ. Γιώργο Θηραίο, ερευνητή Α΄ και διευθυντή του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Τ.Ε) ο οποίος με εμπιστεύτηκε δίνοντάς μου την ευκαιρία να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριό του, και αποτελώντας πραγματικά πολύτιμο αρωγό στην προσπάθειά μου. Καθ' όλη τη διάρκεια αυτής, το ενδιαφέρον του παρέμενε αμείωτο και με μεγάλη προθυμία παρείχε τις συμβουλές και τις πολύ εύστοχες παρατηρήσεις του για την καθοδήγηση της πορείας της.

Τον Δρ. Δημήτρη Τζαμαρία, ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Τ.Ε), ο οποίος μου προσέφερε αλόγιστα τις συμβουλές και τη βοήθειά του οποιαδήποτε στιγμή τις χρειάστηκα. Οι συζητήσεις μου μαζί του παρείχαν συχνά λύσεις σε αδιέξοδα που ανέστειλαν την προσπάθειά μου.

Τη Νίκη Γουναλάκη, τεχνικό του εργαστηρίου, για την εξαιρετική τεχνική υποστήριξη που μου προσέφερε, παραγκωνίζοντας συχνά δικές τις υποχρεώσεις. Την ευχαριστώ ακόμα για τις φιλικές συζητήσεις και τη συμπαράστασή της τόσο σε ευχάριστες όσο και σε δύσκολες καταστάσεις που αντιμετώπισα.

Το Θωμά Γληγόρη, ο οποίος εκπονεί τη διδακτορική του διατριβή στο εργαστήριο του Δρ. Δημήτρη Τζαμαρία, και ο οποίος μου παρείχε χρήσιμες συμβουλές και με βοήθησε πολύ από την αρχή να εγκλιματιστώ στο χώρο και να εξοικειωθώ με τεχνικές που ως τότε δεν είχα παρακολουθήσει.

Τη Δρ. Δέσποινα Αλεξανδράκη, καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την αξιολόγηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου και η οποία στάθηκε πολύτιμη για μένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

•	<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	5
•	<u>ABSTRACT</u>	6
•	<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	
	Α. Πρόλογος	7
	Β. Τα μόρια Tup1 και Ssn6 και το κατασταλτικό σύμπλοκο Ssn6 -Tup1 ..	9
	Γ. Πυρηνικός πόρος και νουκλεοπορίνες	10
	<u>ΣΚΟΠΟΣ</u>	12
•		
•	<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
	1. Υλικά	13
	1.1 <u>Στελέχη</u>	14
	Α. Βακτηριακά στελέχη.....	14
	Β. Στελέχη σακχαρομύκητα.....	14
	2. Μέθοδοι	14
	2.1 <u>Τεχνικές ειδικές για το σακχαρομύκητα</u>	14
	Α. Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης	14
	Β. Μέθοδος γονιδιακής απενεργοποίησης	15
	Γ. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)	16
	Δ. Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις πολυμερισμού δειγμάτων μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)	17
	Ε. Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης	18

2.2 Γενικές τεχνικές	18
Α. Μέθοδοι τροποποίησης των μορίων DNA	18
Β. Ανάλυση και απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	18
Γ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	19
Δ. Παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων ικανών να μετασχηματίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electrocompetent cells)	19
Ε. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electroporation)	19
ΣΤ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	20
Ζ. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών και ανοσοεντοπισμός ακινητοποιημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη (SDS-PAGE και Western blot analysis).....	20
• <u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	
1. Έλεγχος της μετατόπισης του γονιδίου gal1 στην περιοχή των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης σε συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής του.....	21
2. Ένα ποσοστό της τάξεως του 50% της ποσότητας των νουκλεοπορινών χάνεται κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης	25
3. Μέθοδος παρατήρησης της τοπολογίας του προς μελέτη γονιδίου με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας	26
• <u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	29
• <u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	33
• <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	42

- Στο τέλος της εργασίας εσωκλείεται CD που περιέχει της παρούσα διπλωματική εργασία σε ηλεκτρονική μορφή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η αναζήτηση παραγόντων που διαδραματίζουν ρόλο στο μηχανισμό της μετατόπισης των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων προς την πυρηνική περιφέρεια. Η αφορμή δόθηκε εξαιτίας μιας πρόσφατης δημοσίευσης από το εργαστήριο της P. Silver [8], η οποία παρουσίασε τη μετατόπιση των γονιδίων μεταβολισμού της γαλακτόζης προς την πυρηνική περιφέρεια υπό συνθήκες ενεργοποίησής τους. Δεδομένου του εντοπισμού του *tup1* στην πυρηνική περιφέρεια όσο και της παραμονής του κατασταλτικού συμπλόκου *Cyc8(Ssn6)-Tup1* πάνω στον υποκινητή, ακόμα και σε συνθήκες ενεργοποίησης, η μελέτη απέβλεπε στη διερεύνηση της ενδεχόμενης συμμετοχής του συγκεκριμένου συμπλόκου και ειδικότερα του μεταγραφικού παράγοντα *Tup1* στο μηχανισμό μετατόπισης. Πραγματοποιήθηκαν επανειλημμένες προσπάθειες με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης προς επιβεβαίωση της σύνδεση των γονιδίων *GAL* με συστατικά του πυρηνικού πόρου σε συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής τους. Κάτι τέτοιο ωστόσο, δεν κατέστη δυνατό, οδηγώντας την πορεία της έρευνας προς αδιέξοδο, καθώς χωρίς την επιβεβαίωση της αρχικής παρατήρησης δεν ήταν δυνατή η διερεύνηση περαιτέρω ερωτημάτων. Για το λόγο αυτό, οι προσπάθειες στράφηκαν προς μία διαφορετική κατεύθυνση, που σκοπό έχει την οπτική πλέον παρατήρηση της τοπολογίας των γονιδίων *GAL* σε συνθήκες καταστολής και ενεργοποίησής τους, με τη βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας.

ABSTRACT

The aim of the current thesis was to study the mechanism through which transcriptionally active genes move towards the nuclear periphery. Published recently by P. Silver [8], the interaction between highly transcribed genes (GAL genes) and a subset of nuclear pore proteins predicts that at least some genes move to the pore upon transcriptional activation. According to previously published data, the Cyc8(Ssn6)-Tup1 corepressor complex is continuously associated with target promoters under both repressive and inducing conditions. In addition Tup1 is localized at the nuclear periphery. Taking in account these observations, it was worthwhile to study the possible role of Tup1 in the movement of GAL genes upon their transcriptional induction. In order to confirm the connection of GAL genes with components of the nuclear pore upon galactose induction, many chromatin immunoprecipitation experiments were performed. However, the published result was not repeated., leading the study to a “dead end”. A way out of this was the development of a two vector system, with which the topology of the studied genes can be observed with confocal microscopy.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Πρόλογος

Η βασική δομική και λειτουργική μονάδα της ζωής, το κύτταρο, είναι εξοπλισμένο με ένα άψογα οργανωμένο πληροφοριακό υλικό (DNA), το οποίο καλείται να επεξεργάζεται και να μεταφράζει υπηρετώντας ένα και μοναδικό σκοπό: να διατηρεί την ύπαρξή του! Η πληροφορία αυτή απαιτείται να μεταφέρεται αναλλοίωτη από το χώρο αποθήκευσής της (πυρήνας) στο χώρο αξιοποίησής της (κυτταρόπλασμα) με απόλυτη πιστότητα και ταχύτητα. Άλλωστε, το κύτταρο, εκτός από τις προγραμματισμένες του ανάγκες, έρχεται συχνά αντιμέτωπο και με απρόβλεπτες καταστάσεις στρες (περιβαλλοντική πίεση, έλλειψη πηγών άνθρακα, έλλειψη οξυγόνου κ.α.), τις οποίες καλείται να αντιμετωπίσει άμεσα. Έτσι, επιστρατεύει τη διαδικασία μεταγραφής των κατάλληλων γονιδίων και διασφαλίζει την έξοδο του μηνύματος από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου αναλαμβάνει δράση η μεταφραστική μηχανή. Πώς όμως το κύτταρο θα μπορούσε να διασφαλίσει την έξοδο του μηνύματος στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό ειδικά σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης; Ένα ελκυστικό σενάριο θα αποτελούσε η μετατόπιση καθ' αυτών των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων στην πύλη εξόδου από τον πυρήνα, στην περιοχή δηλαδή των πυρηνικών πόρων.

Σε αντίθεση με την προαναφερθείσα υπόθεση, αρκετές μελέτες συνδέουν την πυρηνική περιφέρεια με την αποσιώπιση γονιδίων. Για παράδειγμα, οι τελομερικές περιοχές των χρωμοσωμάτων στο *Saccharomyces cerevisiae* είναι συνδεδεμένες με την πυρηνική περιφέρεια μέσω του συμπλόκου των πυρηνικών πόρων. Επιπλέον, υποτελομερικά γονίδια είναι μεταγραφικά ανενεργά [1, 2, 3, 4, 5]. Η καταστολή των mating-type loci (HML και HMR) στον ίδιο οργανισμό βασίζεται επίσης στη σύνδεσή τους με την πυρηνική περιφέρεια [5, 6, 7]. Εντούτοις, έχουν πραγματοποιηθεί και έρευνες που δίνουν έρεισμα στο προαναφερθέν σενάριο. Συγκεκριμένα, μία ολοκληρωμένη γονιδιωματική μελέτη στο σακχαρομύκητα παρουσιάζει ομάδες ενεργοποιημένων γονιδίων όπως γονίδια γλυκόλυσης και

βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών, να συνδέονται με συστατικά του πυρηνικού πόρου (νουκλεοπορίνες, πρωτεΐνες συνδεόμενες με το πυρηνικό πόρο) καθώς και καρυοφερίνες. Επιπρόσθετα, η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων μεταβολισμού της γαλακτόζης (γονίδια GAL) φαίνεται να οδηγεί στη μετατόπισή τους προς την πυρηνική περιφέρεια [8]. Άλλο παράδειγμα αποτελεί η μετατόπιση του γονιδίου INO1 στην πυρηνική μεμβράνη υπό συνθήκες ενεργοποίησής του [9]. Σε μία ακόμα έρευνα παρατηρείται η διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες-μεταφορείς αγκίστρωση ενός ενεργοποιημένου γονιδίου στον πυρηνικό πόρο [10].

Αν λοιπόν η μετατόπιση των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια είναι γεγονός, το πολύ ενδιαφέρον ερώτημα που αμέσως προκύπτει είναι το εξής: ποιος είναι ο μηχανισμός βάση του οποίου πραγματοποιείται η μετακίνηση της χρωματίνης κατά την ενεργοποίησή της;

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν ακριβώς να αναζητηθούν οι παράγοντες που διαδραματίζουν ρόλο στο μηχανισμό της μετατόπισης των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων προς την πυρηνική περιφέρεια και να προσδιοριστούν κατ' επέκταση τα χρονικά πλαίσια στα οποία λαμβάνει χώρα η μετακίνηση.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στο *Saccharomyces cerevisiae*, ένα καλά μελετημένο μοντέλο μεταγραφικής ρύθμισης, και ειδικότερα σε μία κατηγορία γονιδίων καταβολισμού άνθρακα τα οποία ρυθμίζονται σε δύο επίπεδα: υφίστανται καταστολή της μεταγραφής παρουσία γλυκόζης, ενώ επάγονται μόνο παρουσία εναλλακτικών πηγών άνθρακα. Γονίδια που εντάσσονται στην παραπάνω κατηγορία είναι τα γονίδια GAL, των οποίων η μετατόπιση στην πυρηνική περιφέρεια κατά τη μεταγραφική τους ενεργοποίηση παρουσία γαλακτόζης ως πηγής άνθρακα έχει παρατηρηθεί [8, 11].

Ένα κλασσικό παράδειγμα υποκινητή της οικογένειας GAL που υπόκειται σε πολυσύνθετη και αυστηρή μεταγραφική ρύθμιση από τον ενεργοποιητή Gal4 είναι ο υποκινητής του γονιδίου GAL1. Η μεταγραφική αποσιώπηση του συγκεκριμένου υποκινητή είναι αποτέλεσμα της δράσης των διακριτών καταστολέων Gal80 και Cyc8(Ssn6)-Tup1[42, 43, 44, 46] καθώς και της παρουσίας δύο σταθερών νουκλεοσωμάτων. Κατά την ενεργοποίησή του συμμετέχουν εκτός του Gal4 και δύο μεταγραφικά σύμπλοκα: το SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 45] και το Μεσολαβητικό σύμπλοκο του Ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης (Mediator Complex) [16, 19, 20].

B. Τα μόρια Tup1 και Ssn6 και το κατασταλτικό σύμπλοκο Ssn6 -Tup1

Τα μόρια Tup1 και Ssn6 αναγνωρίστηκαν σε γενετικές σαρώσεις, οι οποίες είχαν σχεδιαστεί προκειμένου να μελετηθεί η γονιδιακή ρύθμιση στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η απαλοιφή καθενός από τα δύο γονίδια είναι βιώσιμη για το κύτταρο, ωστόσο τα στελέχη αυτά εμφανίζουν μια σειρά από φαινοτύπους: αργούς ρυθμούς ανάπτυξης, συναθροίσεις κυττάρων, απώλεια συζευξιμότητας των τύπου α στελεχών, χαμηλή σπορίωση κ.ά [49].

Στα χρόνια που ακολούθησαν μια σειρά από εργασίες αποκάλυψε ότι τα μόρια αυτά δρουν σε συνεργασία και επιτελούν, ως σύμπλοκο, ρόλο μεταγραφικού συγκαταστολέα σε μοριακή στοιχειομετρία 1:4 (Ssn6:Tup1) [50]. Αυτό σημαίνει ότι το συγκεκριμένο σύμπλοκο, άμεσα (ενεργή καταστολή) και όχι με κάποιο μηχανισμό ρύθμισης της παρουσίας ή όχι ενεργοποιητών, καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση. Πρόκειται για ένα καταστολέα γενικευμένης δράσης καθώς επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφή πολλών διαφορετικών γονιδίων (βρίσκονται υπό τον έλεγχο του περισσότερα από 150 διαφορετικά γονίδια) [43].

Η πρωτεΐνη Ssn6 έχει μοριακό βάρος 107 kDa. Αποτελεί μία πυρηνικά εντοπισμένη πρωτεΐνη που περιέχει στο αμινοτελικό της άκρο δέκα αντίγραφα ενός ολιγοπεπτιδικού μοτίβου που καλούνται TPR μοτίβα (Tetratricopeptide motifs) και είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία της πρωτεΐνης [51]. Τα πρώτα τρία είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση του Cyc8 (Ssn6) με τον έτερο παράγοντα του κατασταλτικού συμπλόκου, το Tup1 [52]. Τα υπόλοιπα TPR μοτίβα απαιτούνται για τις αλληλεπιδράσεις του Cyc8 με διάφορους ειδικούς παράγοντες πρόσδεσης στο DNA όπως είναι ο Mig1 και ο α2 [44].

Η πρωτεΐνη Tup1 είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 713 αμινοξέα μοριακού βάρους ~78 kDa. Η αμινοτελική περιοχή (1-91) μεσολαβεί στον τετραμερισμό του Tup1 και είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τα TPR μοτίβα του Ssn6. Η καρβόξυ-τελική περιοχή του Tup1 (334-713) αποτελείται από επτά αλληλουχίες WD40. Οι επαναλήψεις WD40 βρίσκονται σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μια πληθώρα λειτουργιών όπως η μεταβίβαση σήματος, η επεξεργασία του πρόδρομου mRNA και η συναρμολόγηση του

κυτταροσκελετού. Η κεντρική περιοχή του Tup1 είναι εκείνη που καθορίζει την κατασταλτική ενεργότητα του μορίου και πιθανώς την ενεργότητα του συμπλόκου [52]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τεχνητά προσδεδεμένη πρωτεΐνη Tup1 σε υποκινητή αναφοράς είναι ικανή να καταστέλλει τη μεταγραφή ακόμα και απουσία του Cyc8 [52, 53, 54].

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η εκδοχή η μετακίνηση των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων GAL να διαμεσολαβείται από τον κατασταλτικό παράγοντα Tup1-Ssn6 [42, 43, 44]. Ο συγκεκριμένος καταστολέας προσδένεται στον υποκινητή μέσω του Mig1, ενός ειδικού παράγοντα πρόσδεσης στο DNA. Υπό συνθήκες ενεργοποίησης ο Mig1 φωσφορυλιώνεται από την κινάση Snf1 και, με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης-μεταφορέα Msn5, ένα μέρος του εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την αποκαταστολή του γονιδίου. Ένα πολύ ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι παρά το γεγονός ότι το γονίδιο ενεργοποιείται μεταγραφικά, το κατασταλτικό σύμπλοκο δεν αποδεσμεύεται αλλά παραμένει προσδεδεμένο πάνω στο υποκινητή [46]. Εντυπωσιακός είναι και ο εντοπισμός του tup1 στην πυρηνική περιφέρεια όπου παρατηρείται η χαρακτηριστική δομή ροζέτας (T. Γλιγόρης).

Γ. Πυρηνικός πόρος και νουκλεοπορίνες

Το σύμπλεγμα του πυρηνικού πόρου (NPC: Nuclear Pore Complex) αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες μακρομοριακές δομές του ευκαρυωτικού κυττάρου. Το μέγεθός του ποικίλει από ~50MDa στο σακχαρομύκητα και ~125 MDa στα θηλαστικά. Παρά τη μεγάλη διαφορά στο μέγεθος, η αρχιτεκτονική του συμπλόκου διατηρείται σταθερή μεταξύ των ειδών. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ο πόρος εμφανίζει μία οκταεδρική δομή. Η πυρηνική πλευρά του εκτείνεται περί τα 95nm και



η διάταξη της μοιάζει με καλάθι (basket-like). Μελέτες έχουν δείξει τη συμμετοχή συστατικών του πυρηνικού πόρου στη μεταγραφική ρύθμιση στο σακχαρομύκητα [55].

Το πλέον συντηρημένο χαρακτηριστικό μεταξύ των νουκλεοπορινών στο σακχαρομύκητα και στα θηλαστικά είναι οι αλληλουχίες των FG διπεπετιδικών

Εικόνα Α: Δομή του πυρηνικού πόρου

μοτίβων στο ένα τρίτο περίπου του συνόλου των συστατικών του πυρηνικού πόρου. Τα συγκεκριμένα μοτίβα παρέχουν θέσεις αλληλεπιδράσεων με παράγοντες μεταφορείς που διαμεσολαβούν την πυρηνοκυτταροπλασματική επικοινωνία [56].

Παρά την ασυμμετρία του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου, οι περισσότερες νουκλεοπορίνες είναι συμμετρικά τοποθετημένες και στις δύο πλευρές της δομής. Υπάρχουν ωστόσο και περιπτώσεις απόλυτης ασυμμετρίας όπως οι FG-νουκλεοπορίνες Nup60, Nup1 και Nup2 οι οποίες βρίσκονται αποκλειστικά στην πυρηνική πλευρά καθώς και οι Nup159 και Nup42 που συναντώνται μόνο στην κυτταροπλασματική πλευρά. Κυτταροπλασματικά βρίσκονται επίσης οι FG-νουκλεοπορίνες Nup100 και Nup116 [56]. Η Nic96 μαζί με τις Nsp1, Nup57 και Nup49 δημιουργεί ένα υποσύμπλοκο στον πυρηνικό πόρο [57]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το υποσύμπλοκο τοποθετείται τόσο προς την κυτταροπλασματική όσο και προς την πυρηνοπλασματική πλευρά του πυρηνικού πόρου. Η Nic96 αποτελείται από τρεις περιοχές με επαναλήψεις επτάδας (heptad repeats) στην N-τελική περιοχή και με μη πολικά αμινοξέα στην κεντρική περιοχή. Απαλοιφή των heptad repeats και σημειακές μεταλλάξεις στην κεντρική περιοχή διακόπτουν την κυκλοφορία των πρωτεϊνών (εικόνα A) [56].

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η αναζήτηση παραγόντων που διαδραματίζουν ρόλο στο μηχανισμό της μετατόπισης των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων προς την πυρηνική περιφέρεια.

Εν πρώτοις, ήταν αναγκαία η επιβεβαίωση των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων από το εργαστήριο της P. Silver [8], τα οποία δείχνουν τη σύνδεση των γονιδίων GAL με συστατικά του πυρηνικού πόρου σε συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής τους.

Ακόλουθο ερώτημα προς διερεύνηση αποτέλεσε η ενδεχόμενη συμμετοχή του κατασταλτικού συμπλόκου Cyc8(Ssn6)-Tup1 και ειδικότερα του μεταγραφικού παράγοντα Tup1 στο μηχανισμό μετατόπισης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

Τα θρεπτικά μέσα, υγρά και στερεά, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών (LB) αλλά και των στελεχών ζύμης, καθώς και τα διαλύματα αντιβιοτικών (αμπικιλίνη, καναμυκίνη), κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγχειριδίων Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. 1999) και Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989). Οι οδηγίες για την παρασκευή των διαλυμάτων αμινοξέων αναφέρονται στο Methods in Yeast Genetics (Kaiser et al. 1994). Οι φυσιολογικές (μη επαγωγικές) συνθήκες ανάπτυξης των καλλιεργειών ζύμης ήταν: YPD (2% γλυκόζη), YPG (2% γαλακτόζη), YPGlyc (2% γλυκερόλη) και YPR (2% ραφινόζη), καθώς και ελάχιστο θρεπτικό μέσο (MIN) συμπληρωμένο με τα απαιτούμενα αμινοξέα.

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

Όλες οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και τα ένζυμα τροποποίησης του DNA προήλθαν από τις εταιρίες MINOTECH, NEW ENGLAND BIOLABS. Η πρωτεΐνωση K που χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης είναι της εταιρίας MERCK. Τα θερμοανθεκτικά ένζυμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις αλυσιδωτού πολυμερισμού (PCR) κατασκευάστηκαν από τις εταιρίες MINOTECH (MinoTaq)

Τα αντισώματα (μονοκλωνικά και πολυκλωνικά) έναντι του επιτόπου myc προήλθαν από τη SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Τα δευτερογενή αντισώματα anti-mouse και anti-rabbit συζευγμένα με HRP προήλθαν είτε από τη SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY είτε από την JACKSON IMMUNORESEARCH. Τα σφαιρίδια Protein-A Sepharose προμηθεύτηκαν από την AMERSHAM-PHARMACIA.

Η μεταφορά πρωτεϊνών έγινε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran (Schleicher and Schuell), ενώ η μεταφορά νουκλεϊκών οξέων σε μεμβράνη Nytran SuperCharge (Schleicher and Schuell).

Τα ολιγονουκλεοτίδια/εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και τα οποία αναφέρονται στη συνέχεια, προήλθαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ.

1.1. Στελέχη

A. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη της *Escherchia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν DH5a (GibcoBRL), και STBL2. Ο γονότυπός τους αναφέρεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989).

B. Στελέχη σακχαρομήκυτα

Ο γονότυπος του αγρίου τύπου στελέχους PSY2156/Z1256 είναι: MAT_a, *ade2-1*, *trp1-1*, *can1-100*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*, *ura3*, GAL⁺, psi⁺. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν διέθεταν σημασμένες τις νουκλεοπορίνες Nup100, Nup60 και Nup116 με τον επίτοπο 9x MYC στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Πρόκειται για τα στελέχη *nup100::Myc* (PSY2774), *nup60::Myc* (PSY2825) και *nup116::Myc* (PSY2945), τα οποία ήταν ευγενική προσφορά της P.Silver. Τα ισογενή ελλιπή στελέχη *tup1Δ::KanMX4* δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της γονιδιακής απενεργοποίησης που περιγράφεται στη συνέχεια. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το στέλεχος *nic96::Myc* (FT5) καθώς και τα ισογενή του *tup1Δ::KanMX4* και *mig1Δ::KanMX4*. Ο γονότυπος του αγρίου τύπου στελέχους FT5 είναι: MAT_a, *ura3-52*, *trp1Δ-63*, *leu2::pet56*, *his3-Δ200*.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Τεχνικές ειδικές για το σακχαρομήκυτα

A. Παρασκευή και μετασχηματισμός επιλεκτικών κυττάρων ζύμης

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα ζύμης εφαρμόστηκε η μέθοδος δημιουργίας επιλεκτικών κυττάρων ζύμης με οξικό λίθιο (LiAc TRAF0). Πρόκειται για μια μέθοδο υψηλής αποτελεσματικότητας η οποία βασίζεται στη δημιουργία δεκτικών κυττάρων ζύμης λόγω αλκαλικών κατιόντων και περιγράφεται από τους (Gietz et al., 1995)

Το στέλεχος του σακχαρομήκυτα, που πρόκειται να μετασχηματιστεί, μεγαλώνει σε 5 ml πλούσιου θρεπτικού (YPD) στους 30⁰C κατά τη διάρκεια της

νύχτας. Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται σε 20 ml YPD, έτσι ώστε $OD_{600}=0.2$ και επωάζεται με ανάδευση στους $30^{\circ}C$ μέχρι $OD_{600}=0.5-0.7$. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές και στους $4^{\circ}C$ για πέντε λεπτά, απομάκρυνση του θρεπτικού, και πλύσιμο της πελέτας με 10 ml αποστειρωμένο νερό υπό τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρωσης. Η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 0,1 ml LiAc αποστειρωμένου νερού και φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για 30sec. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής :

240 μl PEG 3500 50% w/v

36 μl LiAc 1M

50 μl βρασμένου μονόκλωνου DNA ως carrier(2mg/ml)

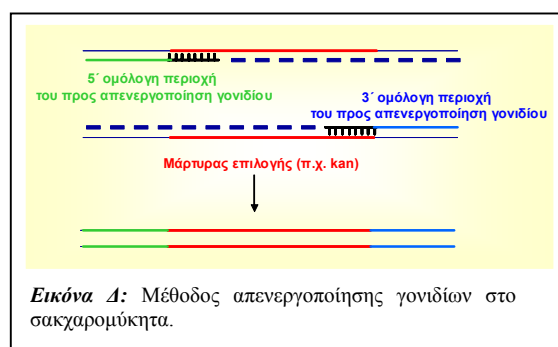
34 μl DNA για το epitope tagging (1-2 μg) και νερό

συνολικός όγκος αντίδρασης : 360 μl

Τα κύτταρα, επαναδιαλύονται με vortex στο transformation mix και επωάζονται στους $42^{\circ}C$ για 40 λεπτά. Κατόπιν, φυγοκεντρώνονται σε μέγιστη ταχύτητα, αφαιρείται το υπερκείμενο, η πελέτα επαναδιαλύεται σε 1 ml YPD και επωάζεται υπό ανάδευση για 3 ώρες στους $30^{\circ}C$ (recovery). Στην συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, το θρεπτικό αφαιρείται και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 100-200 μl αποστειρωμένου νερού, τα οποία απλώνονται σε πιάτο επιλογής, που επωάζεται στους $30^{\circ}C$ για 2-3 μέρες.

B. Μέθοδος γονιδιακής απενεργοποίησης

Η διαδικασία κατασκευής μεταλλαγμένων στελεχών σακχαρομύκητα με τη μέθοδο απενεργοποίησης γονιδίων περιλαμβάνει το μετασχηματισμό του στελέχους



με κατάλληλο κάθε φορά προϊόν PCR (εικόνα Δ). Το τελευταίο προκύπτει με ειδικούς εκκινητές αποτελούμενους από ένα τμήμα ομόλογο προς την 5' και 3' περιοχή του γονιδίου που διακόπτεται και ένα τμήμα ομόλογο με την περιοχή μίας κασέτας μάρτυρα επιλογής. Το

τελικό προϊόν διαθέτει ομόλογες περιοχές με το ενδογενές γονίδιο το οποίο θα απενεργοποιηθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό [48].

Γ. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP)

Κύτταρα ζύμης από καλλιέργειες των 50ml σε θρεπτικό μέσο επιλογής αναπτύσσονται μέχρι OD: 0.5-0.8 και επωάζονται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά με 1% φορμαλδεΰδη ώστε να επιτευχθεί η ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-DNA. Η διαδικασία διακόπτεται με την προσθήκη γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 125mM και επώαση για 5 λεπτά. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000rpm 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, 0,1% SDS, 1mM PMSF) παρουσία ίσου όγκου προπλυμένων γυάλινων σφαιριδίων (glass beads) και με ισχυρή ανάδευση (vortex) για 40 λεπτά στους 4⁰C. Η υγρή φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm, 4⁰C για 5 λεπτά, αφαίρεση του υπερκείμενου (απομάκρυνση διαλυτών πρωτεϊνών) και επαναδιάλυση της πελέττας σε 400μl lysis buffer. Ακολουθεί ηχοβόλιση (sonication) στα 4-6 microns του ηχοβολητή (Soniprep 150, MSE) για 4 φορές από 30 δευτερόλεπτα. Με τον τρόπο αυτό η χρωματίνη σπάει σε κομμάτια DNA μεγέθους 200-800 ζευγών βάσεων. Το ολικό χρωματινικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται 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 400μl 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 του επιτόπου Myc.

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 4⁰C υπό περιστροφική ανάδευση. Τα σφαιρίδια συλλέγονται (6000rpm, 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 ανοσοκατακρημισμένων συμπλόκων γίνεται σε 250μl

διαλύματος έκλουσης (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH: 7.5), με επώαση στους 65⁰C για 10 λεπτά και ισχυρή ανάδευση (vortex) κάθε 2 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο αραιώνεται με 250μl TE και επωάζεται με 50μg πρωτεΐνάσης K στους 42⁰C και για 1 ώρα. Τελικά, οι ομοιοπολικοί δεσμοί που δημιουργήθηκαν αρχικά με την επώαση με φορμαλδεΐδη, σπάνε με επώαση του δείγματος στους 65⁰C για 5 ώρες.

Ποσότητα που να αντιστοιχεί περίπου στο 1/100 του αρχικού ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος (περίπου 1/10 του προς ανοσοκατακρήμιση) λαμβάνεται ως δείγμα ποσοτικού και ποιοτικού ελέγχου της μη ανοσοκατακρημισμένης αρχικής χρωματίνης (input). Αραιώνεται σε 500μl TE και επωάζεται ομοίως με το ανοσοκατακρημισμένο δείγμα με πρωτεΐνάση K και ακολούθως στους 65⁰C προς αναστροφή των ομοιοπολικών δεσμών.

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

Τα δείγματα αφού επαναδιαλυθούν σε νερό (50μl για την ανοσοκατακρημισμένη χρωματίνη και 500μl για τα input) χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Δ. Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις πολυμερισμού δειγμάτων μετά από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP)

GAL1 URS	5' TGA AAC GCA GAT GTG CCT 3' (-370) Reads from 5'	5' CGC TTC GCT GAT TAA TTA CCC 3' (-169) Reads from 3'
GAL1 ORF	5' TGA CAA AAT TTG TTC CAT TGC 3' (+1343) Reads from 5'	5' CTG GTT TAG AGA CGA TGA TAG 3' (+1558) Reads from 3'
PHO 5	5' AAT AGC ACG TTT TCG CAT AGA 3' (-367) Reads from 5'	5' AAG AAG CGG CTA AAA TTG AAT 3' (+40) Reads from 3'
SUC 2	5'GGG GGA TCC CGG GCG TGC CTT TGT TGA AC 3' (+240) Reads from 5'	5'GGG GGA TCC CGG GAC GTG GGG TCG ATT ACC 3' (+) Reads from 3'
TRP 3 ORF	5' AAG GAG AGG CCT TGT GTT TT 3' (+1003) Reads from 5'	5' GAA TGA ATG CAG GTC CCT ATT 3' (+1260) Reads from 3'
STE6 ORF	5'CGG CAC CCA GTC TGA ACT T 3' (+1752) Reads from 5'	5'ATG CTC AGA AGT TGT GGC CCT 3' (+2049) Reads from 3'

E. 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 επωάσεις στον πάγο. Ακολουθεί βρασμός στους $100^{\circ}C$, φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 1 λεπτό και το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

2.2. Γενικές τεχνικές

A. 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, 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.

B. 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 *SlyI*.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού

σημείου τήξεως, θέρμανση για 10 λεπτά στους 65°C, εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο παρουσία οξικού νατρίου και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Γ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση σε μικρή κλίμακα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης, όπως αυτή περιγράφεται από τους Sambrook et al. 1989. Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα.

Δ. Παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων ικανών να μετασχηματίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electrocompetent cells)

Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο LB, στους 30⁰ C ή 37⁰C ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος, μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων (OD₆₀₀) να γίνει 0.6-0.8. Στην συνέχεια, συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4⁰ C και στις 3000 στροφές. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται με ήπιο τρόπο σε H₂O αντίστασης 18MΩ, ίσου όγκου με την αρχική καλλιέργεια και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα ξεπλένονται ακόμα μια φορά με H₂O και συμπύκνωσης σε όγκο ίσο με το μισό όγκο της αρχικής καλλιέργειας. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται για ακόμα δύο φορές. Τελικά επαναδιαλύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10%, όγκου ίσου με το 1/500 έως 1/300 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας. Τα κύτταρα μοιράζονται σε μικρές ποσότητες των 60μl (aliquots) και φυλάσσονται στους -80⁰ C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Όλα τα υλικά και τα μέσα, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και όλοι οι χειρισμοί έγιναν στους 4⁰C.

Ε. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electroporation).

Τοποθετούμε, για κάθε μετασχηματισμό, 60μl δεκτικών κυττάρων στον πάγο για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 2μl από την αντίδραση σύνδεσης και επωάζουμε στον πάγο για 1 λεπτό. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε ειδική κυψελίδα, την οποία τοποθετούμε στην κατάλληλη θέση του ειδικού μηχανήματος (electroporator) και διοχετεύουμε ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 1.65kV. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 1 ml

θρεπτικού μέσου SOC και επωάζουμε για 1,5 ώρα στους 30°C υπό ανάδευση. Τελικά συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 5 λεπτά και τα επιστρώνουμε υπό στείρες συνθήκες σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιέχει κατάλληλη ποσότητα του αντιβιοτικού με το οποίο κάνουμε την επιλογή (π.χ αμπικιλίνη). Το πιάτο τοποθετείται στους 30°C ή 37°C για 16 ώρες τουλάχιστον, έτσι ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

ΣΤ. 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 0.5u 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°C για αρχική αποδιάταξη
- 25-30 κύκλοι: → 30 δευτερόλεπτα στους 94°C για αποδιάταξη
→30 δευτερόλεπτα στην επιλεγμένη θερμοκρασία για υβριδοποίηση των εκκινητών
→επιλεγμένος χρόνο στους 72°C για επιμήκυνση της αλυσίδας
- Τέλος: →5 λεπτά στους 72°C για συμπλήρωση των μονόκλωνων άκρων

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

Οι συγκεκριμένες τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των κλώνων σακχαρομύκητα, που είχαν την πρωτεΐνη σημασμένη με τον έκαστοτε επίτοπο. Οι πρωτεΐνες αναλύονται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε αποδιατακτικό

πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (Sambrook et al. 1989). Για τον ανοσοεντοπισμό των αναλυθέντων πρωτεϊνών γίνεται 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 του επιτόπου *Myc*. 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.

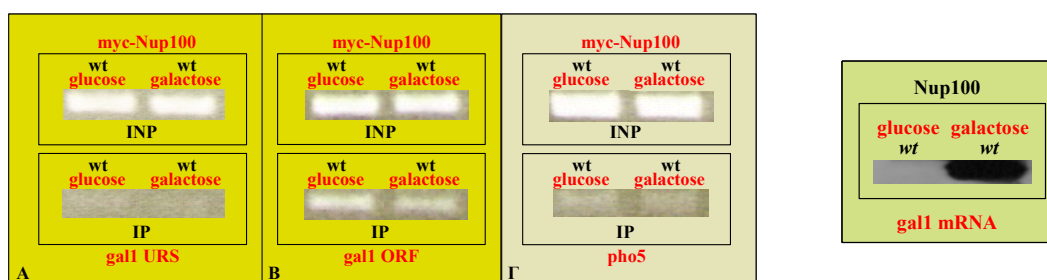
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Έλεγχος της μετατόπισης του γονιδίου *gal1* στην περιοχή των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης σε συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής του.

Σύμφωνα με δημοσιευμένα αποτελέσματα από το εργαστήριο της P. Silver, η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων μεταβολισμού της γαλακτόζης (γονίδια GAL) φαίνεται να οδηγεί στη μετατόπισή τους προς την πυρηνική περιφέρεια. Συγκεκριμένα, σε αγρίου τύπου στελέχη σακχαρομύκητα, τα γονίδια GAL1, GAL2, GAL7 και GAL10 παρουσία γαλακτόζης εντοπίζονται συνδεδεμένα με τις νουκλεοπορίνες Nup100, Nup60, Nup116 σε ποσοστό που υπερβαίνει το 97%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε συνθήκες καταστολής τους (παρουσία γλυκόζης) είναι πολύ μικρότερο [8].

Το ζητούμενο, πριν από τη διερεύνηση οποιουδήποτε ερωτήματος αναφορικά με τη μετατόπιση των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια, είναι η παρατήρηση της εν λόγω μετακίνησης των γονιδίων GAL σε στελέχη αγρίου τύπου και στο δικό μας εργαστήριο. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Ch-IP), μία πειραματική προσέγγιση με την οποία μπορεί να ελεγχθεί άμεσα και *in vivo* η σύνδεση παραγόντων με τη χρωματίνη. Τα χρησιμοποιούμενα στελέχη είναι εκείνα του εργαστηρίου της P. Silver [8], τα οποία διαθέτουν νουκλεοπορίνες σημασμένες με τον επίτοπο myc. Επίδραση φορμαλδεΰδης στα κύτταρα συνεπάγεται την ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ πρωτεϊνών καθώς και μεταξύ πρωτεϊνών – DNA. Με χρήση αντισωμάτων για το συγκεκριμένο επίτοπο (α -myc) επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση της συνδεδεμένης με τις νουκλεοπορίνες χρωματίνης. Η παρουσία των γονιδίων GAL ελέγχεται με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Στην εικόνα 1 (1A, 1B) παρουσιάζεται το ποσό του *gal1* υποκινητή που κατακρημνίζεται μαζί με τη myc- Nup100, τόσο παρουσία γλυκόζης όσο και παρουσία γαλακτόζης. Αντίθετα απ' ό τι αναμενόταν, δεν παρατηρείται αυξημένη σύνδεση του γονιδίου *gal1* με τη νουκλεοπορίνη Nup100 όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε περιβάλλον γαλακτόζης οπότε και το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό. Το ποσοστό τόσο του *gal1* URS όσο και του *gal1* ORF κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα και στις δύο συνθήκες. Στην εικόνα 2 φαίνονται τα

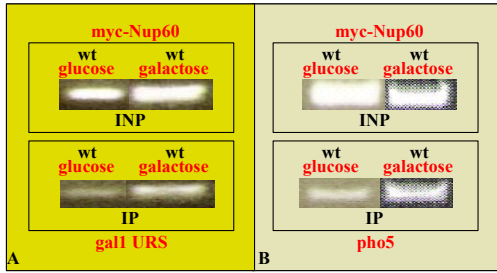
επίπεδα του *gal1* mRNA παρουσία γλυκόζης και γαλακτόζης στις συνθήκες που πραγματοποιείται και η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, όπου είναι εμφανής η επαγωγή του γονιδίου *gal1* παρουσία γαλακτόζης. Στην περίπτωση του γονιδίου *pho5*, το οποίο είναι κατασταλμένο τόσο παρουσία γλυκόζης όσο και παρουσία γαλακτόζης, το παρατηρούμενο προφίλ σύνδεσης με τη νουκλεοπορίνη Nup100 διατηρείται επίσης σταθερό (εικόνα 1Γ).



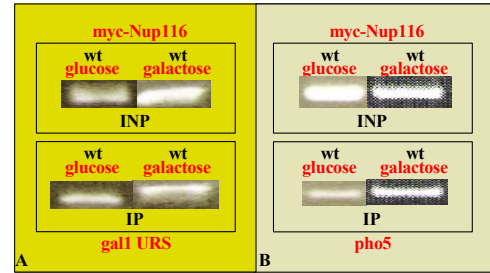
Εικόνα 1: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχος σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, στο οποίο η νουκλεοπορίνη **Nup100** είναι σημασμένη με τον επίτοπο *myc*. Τα κύτταρα καλλιεργούνται αρχικά παρουσία γλυκόζης και στη συνέχεια παρουσία γαλακτόζης οπότε επάγεται η ενεργοποίηση των γονιδίων GAL. Το DNA από το ανοσοκατακρημμισμένο (IP) και μη (INP) δείγμα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στην ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Κατάλληλοι εκκινητές για την περιοχή των **A.** *gal1* URS, **B.** *gal1* ORF και **Γ.** *pho5*, δίνουν το προφίλ σύνδεσης των συγκεκριμένων γονιδίων με τη νουκλεοπορίνη Nup100. Τόσο παρουσία γλυκόζης όσο και γαλακτόζης το ποσοστό σύνδεσης των *gal1* URS και *gal1* ORF με τη Nup100 διατηρείται σταθερό (λόγος INP/IP). Κατά συνέπεια δεν παρατηρείται μετατόπιση του μεταγραφικά ενεργοποιημένου *gal1* γονιδίου στην πυρηνική περιφέρεια. Σταθερό διατηρείται και το προφίλ σύνδεσης του γονιδίου *pho5*, το οποίο είναι κατασταλμένο και στις δύο συνθήκες.

Εικόνα 2: Επίπεδα του *gal1* mRNA σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) και ενεργοποίησης (γαλακτόζη) του γονιδίου *gal1*. Όπως αναμένεται η έκφραση του γονιδίου είναι μηδενική παρουσία γλυκόζης ενώ βρίσκεται σε πολύ υψηλά επίπεδα σε περιβάλλον γαλακτόζης.

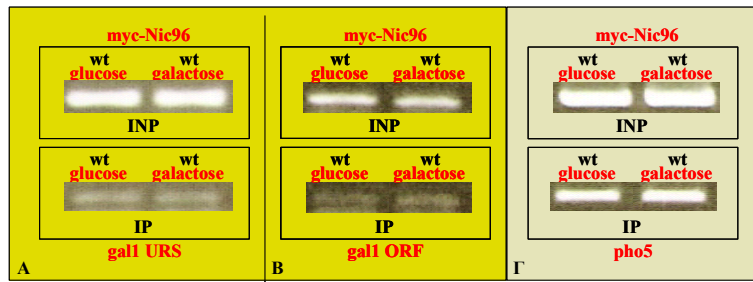
Αντίστοιχες πειραματικές προσεγγίσεις πραγματοποιήθηκαν και σε στελέχη με σημασμένες τις νουκλεοπορίνες Nup60, Nup116 και Nic96 με τον επίτοπο *myc*, προκειμένου να διαπιστωθεί η μετατόπιση των γονιδίων GAL στην πυρηνική περιφέρεια σε συνθήκες ενεργοποίησής τους. Στις εικόνες 3, 4 και 5 παρατίθενται τα αποτελέσματα από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντισώματα α -*myc* σε στελέχη αγρίου τύπου με σημασμένες τις νουκλεοπορίνες Nup60, Nup116 και Nic96 αντίστοιχα. Και σε αυτήν την περίπτωση η αναλογία INP/IP τόσο σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) όσο και σε συνθήκες ενεργοποίησης (γαλακτόζη) παραμένει σταθερή. Σταθερή διατηρείται επίσης και η αναλογία INP/IP του γονιδίου ελέγχου *pho5* (εικόνες 3B, 4B και 5Γ).



Εικόνα 3: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχος σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, στο οποίο η νουκλεοπορίνη **Nup60** είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Οι συνθήκες είναι εκείνες που παρατίθενται στην εικόνα 1. Η αναλογία INP/IP στην περίπτωση του γονιδίου *gal1* **A**, *gal1 URS* διατηρείται σταθερή τόσο σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) όσο και ενεργοποίησης (γαλακτόζη). **B**. Σταθερό διατηρείται και το προφίλ σύνδεσης του γονιδίου *pho5*, το οποίο είναι κατασταλαμένο και στις δύο συνθήκες



Εικόνα 4: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχος σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, στο οποίο η νουκλεοπορίνη **Nup116** είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Οι συνθήκες είναι εκείνες που παρατίθενται στην εικόνα 1. Η αναλογία INP/IP στην περίπτωση του γονιδίου *gal1* **A**, *gal1 URS* διατηρείται σταθερή τόσο σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) όσο και ενεργοποίησης (γαλακτόζη). **B**. Σταθερό διατηρείται και το προφίλ σύνδεσης του γονιδίου *pho5*, το οποίο είναι κατασταλαμένο και στις δύο συνθήκες



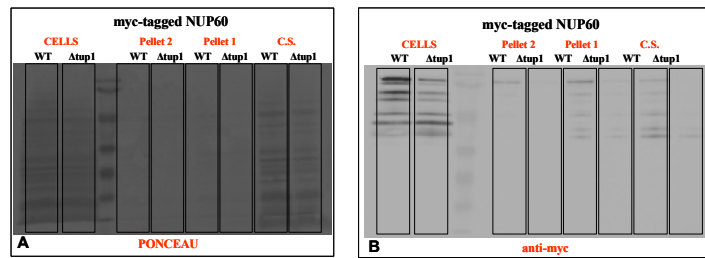
Εικόνα 5: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχος σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, στο οποίο η νουκλεοπορίνη **Nic96** είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Οι συνθήκες είναι εκείνες που παρατίθενται στην εικόνα 1. Η αναλογία INP/IP στην περίπτωση του γονιδίου *gal1* **A**, *gal1 URS* και **B**, *gal1 ORF* διατηρείται σταθερή τόσο σε συνθήκες καταστολής (γλυκόζη) όσο και ενεργοποίησης (γαλακτόζη). **B**. Σταθερό διατηρείται και το προφίλ σύνδεσης του γονιδίου *pho5*, το οποίο είναι κατασταλαμένο και στις δύο συνθήκες.

Οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης ήταν οι αντίστοιχες που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο της P. Silver [8]. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές, χωρίς να καταστεί δυνατή η επιβεβαίωση του αυξημένου ποσοστού σύνδεσης του μεταγραφικά ενεργοποιημένου γονιδίου *gal1* με τις νουκλεοπορίνες Nup100, Nup60 και Nup116. Ένα τέτοιο εμπόδιο οδηγούσε την πορεία της συγκεκριμένης εργασίας προς αδιέξοδο, καθώς δεν ήταν δυνατό να γίνουν αποδεκτά αποτελέσματα αναφορικά με μεταλλαγμένα στελέχη

χωρίς να έχει προηγουμένως επιβεβαιωθεί η αρχική παρατήρηση. Στο σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνονται και στελέχη με σημασμένες τις νουκλεοπορίνες Nup 100, Nup60, Nup116 και Nic96 στα οποία το γονίδιο *tup1* έχει διακοπεί. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο παράρτημα, χωρίς ωστόσο να μπορούν να σχολιαστούν μια και δεν έχει επιβεβαιωθεί καθ' αυτή η μετατόπιση των μεταγραφικά ενεργοποιημένων *gal* γονιδίων στα αγρίου τύπου στελέχη.

2. Ένα ποσοστό της τάξεως του 50% της ποσότητας των νουκλεοπορινών χάνεται κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.

Αναζητώντας πιθανές αιτίες που οδηγούν στην αδυναμία παρατήρησης της μετατόπισης των μεταγραφικά ενεργοποιημένων GAL γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια, διαπιστώθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό από τη σημασμένη νουκλεοπορίνη χάνεται κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης. Συγκεκριμένα, κύτταρα ζύμης καλλιεργούνται παρουσία γλυκόζης και γαλακτόζης, και λύνονται σε κατάλληλο διάλυμα λύσης, αφού προηγουμένως έχουν υποστεί επίδραση φορμαλδεύδης. Ακολουθεί σπάσιμο της χρωματίνης σε κομμάτια DNA μεγέθους περίπου 500 ζευγών βάσεων και το ολικό χρωματινικό εκχύλισμα υπόκειται σε δύο φυγοκεντρήσεις ώστε να απομονωθεί η καθαρή χρωματίνη στο υπερκείμενο. Στο σημείο αυτό ελέγχθηκε το ενδεχόμενο απώλειας της σημασμένης νουκλεοπορίνης κατά τη διάρκεια καθαρισμού του χρωματινικού εκχυλίσματος. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών τόσο στο χρωματινικό εκχύλισμα όσο και στις δύο πελέτες που προκύπτουν ύστερα από τις δύο προαναφερθείσες φυγοκεντρήσεις. Στην εικόνα 6Α φαίνονται οι συνολικές πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στην πρώτη και δεύτερη πελέτα καθώς και στο καθαρισμένο χρωματινικό εκχύλισμα, βαμμένες με τη χρωστική *ponceau*. Στην εικόνα 6B φαίνεται η ποσότητα της *myc*-σημασμένης νουκλεοπορίνης Nup60 που ανιχνεύεται με χρήση αντισώματος α -*myc* στις δύο πελέτες και στο χρωματινικό εκχύλισμα. Διαπιστώνεται ότι παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών είναι στο χρωματινικό εκχύλισμα, εντούτοις σχεδόν το 50% της ποσότητας της νουκλεοπορίνης βρίσκεται στην πρώτη πελέτα καθώς απομακρύνεται με τη φυγοκέντρωση καθαρισμού του χρωματινικού εκχυλίσματος. Κάτι τέτοιο καθιστά τεχνικά δυσκολότερη την εξαγωγή αποτελεσμάτων καθώς μειώνεται κατά πολύ το ποσό της νουκλεοπορίνης που θα χρησιμοποιηθεί για την κατακρήμνιση του DNA.



Εικόνα 6: Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών από δείγματα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης για τον έλεγχο του ποσοστού απώλειας της σημασμένης νουκλεοπορίνης Nup100 κατά τη διάρκεια καθαρισμού του χρωματικού εκχύλισματος. **A.** Φαίνονται οι συνολικές πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στο καθαρισμένο χρωματικό εκχύλισμα (C.S) όσο και στην πρώτη (pellet 1) και δεύτερη πελέτα (pellet 2), βαμμένες με ponceau. **B.** Φαίνεται η ποσότητα της myc-σημασμένης νουκλεοπορίνης Nup60 που ανιχνεύεται με χρήση αντισώματος α-myc στις δύο πελέτες (pellet 1 και 2) και στο χρωματικό εκχύλισμα (C.S). Περίπου 50% της νουκλεοπορίνης χάνεται κατά την πρώτη φυγοκέντρηση.

CELLS: Ίσες ποσότητες κυττάρων από τις καλλιέργειες αγρίου τύπου και Δtup1 πριν από την επίδραση φορμαλδεΐδης.

Για την αύξηση του ποσοστού την νουκλεοπορίνης που αποδεσμεύεται από τις μεμβράνες δοκιμάστηκε η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων SDS στο διάλυμα λύσης των κυττάρων, χωρίς ωστόσο να βελτιωθεί η παρατηρούμενη εικόνα.

Είναι γεγονός ότι με την τεχνική της ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης, παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες, δεν κατέστη δυνατό να παρατηρηθεί η μετατόπιση των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων GAL στην πυρηνική περιφέρεια. Το γεγονός αυτό οδήγησε την πορεία της έρευνας προς αδιέξοδο καθώς χωρίς την επιβεβαίωση της αρχικής παρατήρησης δεν ήταν δυνατή η διερεύνηση περαιτέρω ερωτημάτων. Για το λόγο αυτό, οι προσπάθειες στράφηκαν προς μία διαφορετική κατεύθυνση, που σκοπό έχει την οπτική πλέον παρατήρηση της τοπολογίας του gal1 γονιδίου σε συνθήκες καταστολής και ενεργοποίησής του, με τη βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας.

3. Μέθοδος παρατήρησης της τοπολογίας του προς μελέτη γονιδίου με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.

Η παρατήρηση της τοπολογίας του προς μελέτη γονιδίου σε συνθήκες καταστολής και ενεργοποίησης θα παρατηρηθεί με τη χρήση ενός συστήματος δύο φορέων, εκ των οποίων ο πρώτος περιέχει το γονίδιο καθώς και μία σειρά από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πρόσδεσης του καταστολέα TetR. Ο δεύτερος

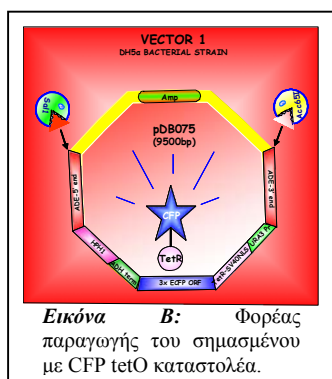
φορέας είναι υπεύθυνος για την παραγωγή του σημασμένου με CFP TetR, ο οποίος δεσμεύεται στις αντίστοιχες επαναλαμβανόμενες θέσεις πρόσδεσης (tetO array) στον πρώτο φορέα, καθιστώντας τον τελευταίο ορατό με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας [37, 39].

Πειραματική διάταξη γονιδιακού εντοπισμού

Οι δύο φορείς που συνιστούν το σύστημα παρακολούθησης της τοπολογίας γονιδίων στον πυρήνα του κυττάρου είναι αναλυτικά οι ακόλουθοι:

Φορέας 1

Στο συγκεκριμένο φορέα (εικόνα Β) είναι συγχωνευμένες η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τον καταστολέα της τετρακυκλίνης [tetracycline repressor protein (TetR)] και η κωδική αλληλουχία για τη φθορίζουσα πρωτεΐνη CFP (Cyan Fluorescence Protein) υπό τον έλεγχο ενός συστατικού για το σακχαρομύκητα υποκινητή (URA3). Ο CFP σημασμένος καταστολέας που προκύπτει διατηρεί την ιδιότητα να προσδένεται στην μήκους 19bp αλληλουχία χειριστή του tet οπερονίου. Ακολούθως του σήματος

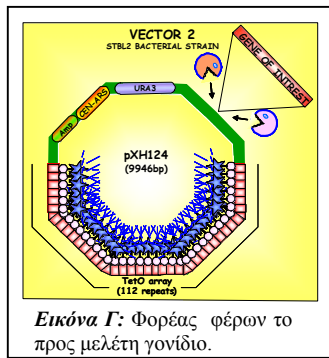


τερματισμού του υβριδικού προϊόντος υπάρχει το γονίδιο επιλογής HPH1 που προσδίδει ανθεκτικότητα στο σακχαρομύκητα παρουσία υδρομυκίνης Β. Εκατέρωθεν των τμημάτων που περιγράφηκαν παραπάνω υπάρχουν αλληλουχίες των 5' και 3' άκρων του γονιδίου ADE του σακχαρομύκητα, εξαιτίας των οποίων πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός και αντικατάσταση του ενδογενούς γονιδίου με το αντίστοιχο τμήμα του φορέα. Όλα τα χρησιμοποιούμενα κατά τις πειραματικές προσεγγίσεις στελέχη διαθέτουν ενσωματωμένο στο γονιδιακό τόπο ADE το προαναφερθέν τμήμα.

Φορέας 2

Στο δεύτερο φορέα (εικόνα Γ), ο οποίος είναι επισωμικός εξαιτίας της κασέτας CEN/ARS που διαθέτει, ενσωματώνεται με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων οποιοδήποτε γονίδιο του οποίου η θέση ζητείται να προσδιοριστεί. Ο φορέας διαθέτει 112 επαναλήψεις (tetO array) της 19bp αλληλουχίας χειριστή του tet οπερονίου πάνω στην οποία προσδένεται ο καταστολέας TetR. Η πολλαπλή

αντιπροσώπευση του χειριστή συνεπάγεται και την αντίστοιχα μεγάλου βάρους



πρόσδεση του σημασμένου με CFP καταστολέα TetR που παράγεται από το φορέα 1. Έτσι, με τη βοήθεια μικροσκοπίας, καθίσταται ορατό ολόκληρο το πλασμίδιο και μπορεί να προσδιοριστεί η τοπολογία του, κατ' επέκταση και η ακριβής θέση του ενσωματωμένου σε αυτό γονιδίου, στο εσωτερικό του πυρήνα. Προκειμένου να μη χαθούν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που

διαθέτει ο φορέας λόγω ανασυνδυασμού κατά τα στάδια επεξεργασίας του πριν την εισαγωγή του στο σακχαρομύκητα, αυτά λαμβάνουν χώρα σε ειδικά μεταλλαγμένα βακτηριακά στελέχη (STBL2).

Ως σημείο αναφοράς για τον προσδιορισμό της σχετικής θέσης του γονιδίου χρησιμοποιείται η πυρηνική περιφέρεια, η οποία γίνεται ορατή εξαιτίας της GFP σημασμένης νουκλεοπορίνης Nup49 σε όλα τα χρησιμοποιούμενα στελέχη του σακχαρομύκητα [37, 39]

Η κατασκευή της πειραματικής διάταξης των δύο φορέων που μόλις περιγράφηκε βρίσκεται σε εξέλιξη την τρέχουσα περίοδο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αφορμή για τη πραγματοποίηση της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας δόθηκε από τα δημοσιευμένα αποτελέσματα της P. Silver [8], η οποία παρουσίασε, συν τοις άλλοις, τη μετατόπιση των γονιδίων μεταβολισμού της γαλακτόζης προς την πυρηνική περιφέρεια υπό συνθήκες ενεργοποίησής τους. Η συγκεκριμένη παρατήρηση στηρίχθηκε σε δύο αλληλοσυμπληρούμενα σύνολα δεδομένων. Τα πρώτα αποτελέσματα ήταν απόρροια πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, στα οποία το προκύπτον DNA σημάνθηκε και ακολούθως υβριδοποιήθηκε σε μία συστοιχία όλων των ORF του σακχαρομύκητα. Παρατηρήθηκε ότι, παρουσία γαλακτόζης, τα γονίδια GAL1, GAL2, GAL7 και GAL10 εντοπίζονται συνδεδεμένα με τις νουκλεοπορίνες Nup100, Nup60, Nup116 σε ποσοστό που υπερβαίνει το 97%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε συνθήκες καταστολής τους (παρουσία γλυκόζης) είναι πολύ μικρότερο. Τα δεύτερα αποτελέσματα βασίζονται σε οπτικά δεδομένα από πειράματα FISH, στα οποία παρατηρείται η τοπολογία των σημασμένων γονιδίων GAL παρουσία γλυκόζης και γαλακτόζης με τη βοήθεια μικροσκοπίας. Διαπιστώνεται ότι σε συνθήκες επαγωγής, η θέση των γονιδίων συμπίπτει με την πυρηνική περιφέρεια.

Είναι γεγονός ότι έγιναν επανειλημμένες προσπάθειες και από το εργαστήριό μας προκειμένου να επιβεβαιωθεί το συγκεκριμένο αποτέλεσμα και να λειτουργήσει σαν εναρκτήριο βήμα για τη διερεύνηση περαιτέρω ερωτημάτων. Κάτι τέτοιο ωστόσο δεν κατέστη δυνατό. Τόσο η Nup100 όσο και οι Nup60 και Nup116 από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης δεν φαίνεται να συνδέονται σε μεγαλύτερο βαθμό με τα γονίδια GAL παρουσία γαλακτόζης έναντι γλυκόζης. Ενδεχομένως τεχνικά προβλήματα συνιστούν τους λόγους που οδήγησαν στο αδιέξοδο αυτό και τα οποία τελικά επισκίασαν το φαινόμενο μη επιτρέποντας την παρατήρησή του.

Το αυξημένο ποσοστό μη ειδικής σύνδεσης στα σφαιρίδια σεφαρόζης κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης (no antibody control) ήταν ένα από τα εμπόδια που έπρεπε να υπερπηδηθεί. Αν και απουσία αντισώματος, το σήμα από την PCR στα συγκεκριμένα δείγματα ελέγχου ήταν αρκετά έντονο. Για τη μείωσή του επιχειρήθηκε επώαση των σφαιριδίων με λDNA και BSA πριν από την προσθήκη του αντισώματος, συνθήκες που μείωσαν λίγο, όχι όμως ικανοποιητικά, την έντασή του. Είναι λοιπόν πιθανό να μην μπορεί να παρατηρηθεί διαφορά στην ένταση των ζωνών

μεταξύ των δύο συνθηκών που μελετώνται (γλυκόζη – γαλακτόζη) εξαιτίας υπερκάλυψής της από τη μη ειδική σύνδεση.

Το μειωμένο ποσοστό της νουκλεοπορίνης που απομένει για κατακρήμιση του DNA κατά τη διαδικασία του Ch-IP, καθιστά ακόμα δυσκολότερη τεχνικά την εξαγωγή αποτελεσμάτων. Όπως φάνηκε και στην εικόνα 6, σχεδόν το 50% της ποσότητας της νουκλεοπορίνης απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης με τη φυγοκέντρηση καθαρισμού του χρωματινικού εκχυλίσματος. Άλλωστε, μην ξεχνάμε ότι οι νουκλεοπορίνες αποτελούν στοιχεία ενός πολύ καλά οργανωμένου μεγαλομοριακού συμπλόκου της πυρηνικής μεμβράνης, δομικά συστατικά του οποίου είναι εύκολο να συμπαρασυρθούν κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης των μεμβρανικών καταλοίπων (debris). Με σκοπό την αύξηση του ποσοστού της νουκλεοπορίνης που αποδεσμεύεται από τις μεμβράνες δοκιμάστηκε η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων SDS στο διάλυμα λύσης των κυττάρων, χωρίς ωστόσο να βελτιωθεί η παρατηρούμενη εικόνα. Θα περίμενε κανείς, θεωρώντας την ένταση της μη ειδικής σύνδεσης σταθερή και αφαιρώντας την από τις τιμές των δειγμάτων, να μπορεί να διακρίνεται η πραγματική διαφορά στην ένταση των ζωνών. Ωστόσο, δεδομένης της μειωμένης ποσότητας νουκλεοπορίνης, είναι μειωμένο κατά πολύ και το ποσό του DNA που κατακρημνίζεται. Κατά συνέπεια και η ένταση της ζώνη που οφείλεται στην ειδική σύνδεση είναι πολύ μικρή, οπότε και δεν καθίσταται δυνατό να διακριθεί.

Μία επιπλέον δυσκολία συνιστά το γεγονός ότι η σύνδεση των γονιδίων GAL με τις νουκλεοπορίνες είναι πιθανότερο να διαμεσολαβείται από έτερους παράγοντες οι οποίοι «οδηγούν» τα γονίδια στους πυρηνικούς πόρους, παρά να συνιστά άμεση πρόσδεση. Η παρατήρηση τέτοιων αλληλεπιδράσεων με την τεχνική της ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης είναι κατά πολύ δυσκολότερη από περιπτώσεις όπου υπάρχει απευθείας σύνδεση του σημασμένου παράγοντα με το DNA, καθώς είναι απαραίτητο να διατηρούνται οι επαφές μεταξύ των ενδιάμεσων παραγόντων.

Είναι λογικό αντίστοιχες δυσκολίες να κλήθηκαν να αντιμετωπίσουν και στο εργαστήριο της P. Silver. Τα ακολουθούμενα πρωτόκολλα στο δικό μας εργαστήριο φροντίσαμε να είναι όσο το δυνατό πλησιέστερα στα περιγραφόμενα της συγκεκριμένης δημοσίευσης, με τη διαφορά ότι κατά το τελικό στάδιο δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν συστοιχίες για την ανάλυση του κατακρημισμένου DNA, μία προσέγγιση περισσότερο ευαίσθητη από την PCR. Δεδομένων, ωστόσο,

των τεχνικών δυσκολιών που καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε, οι παρατηρήσεις της συγκεκριμένης δημοσίευσης δεν μπορούν να τεθούν υπό αμφισβήτηση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η οπτική παρατήρηση της μετατόπισης των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων προς την πυρηνική περιφέρεια, όπως δημοσιεύεται στη συγκεκριμένη μελέτη [8], αποτελεί σαφώς ένα συμπληρωματικό στοιχείο της ιστορίας, χωρίς ωστόσο να αποδεικνύει τη σύνδεσή τους με νουκλεοπορίνες. Μία αντίστοιχη προσέγγιση προσδιορισμού της τοπολογίας των γονιδίων GAL με τη μέθοδο των δύο φορέων, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο «αποτελέσματα», αποτελεί σίγουρα ένα σημαντικό βήμα από την πλευρά μας, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων της δημοσίευσης. Αυτό θα είναι άλλωστε και μία ώθηση για τη διερεύνηση περαιτέρω ερωτημάτων σχετικά με παράγοντες που μπορεί να εμπλέκονται στη διαδικασία της μετακίνησης των γονιδίων.

Στο παράρτημα που ακολουθεί παραβάλλονται τα αποτελέσματα του συνόλου των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Αντιπροσωπευτικά εξ αυτών παρατέθηκαν στο κεφάλαιο αποτελέσματα. Παρά το ότι σε όλες τις περιπτώσεις μελετώνται εκτός του αγρίου τύπου και στελέχη με απενεργοποιημένο το γονίδιο *tup1*, δεν έγινε σχολιασμός για τα τελευταία λόγω αδυναμίας επανάληψης των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων που αφορούν στα αγρίου τύπου στελέχη. Πρόκειται ωστόσο για ένα ανοικτό προς διερεύνηση ερώτημα δεδομένων τόσο του εντοπισμού του *tup1* στην πυρηνική περιφέρεια (T. Γλιγόρης) όσο και της παραμονής του κατασταλτικού συμπλόκου Ssn6-Tup1 πάνω στον υποκινητή, ακόμα και σε συνθήκες ενεργοποίησης [46].

Στα μελλοντικά σχέδια συμπεριλαμβάνεται, γενικότερα, η αναζήτηση των παραγόντων που διαδραματίζουν ρόλο στο μηχανισμό της μετατόπισης των μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων προς την πυρηνική περιφέρεια. Τέτοιοι ενδεχομένως αφορούν στη μεταγραφική μηχανή και/ή τα μεταγραφικά σύμπλοκα, τα οποία στρατολογούνται κατά την αποκαταστολή και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των προς μελέτη γονιδίων. Δεν αποκλείεται ωστόσο το ενδεχόμενο η μετατόπιση να πραγματοποιείται μετά από την έναρξη της μεταγραφής, οπότε υποψήφιοι παράγοντες μπορούν να αναζητηθούν σε διαδικασίες που αφορούν στο αρχικό στάδιο της μεταγραφής (επεξεργασία του 5' άκρου) [21, 23, 24], στην επιμήκυνση [30, 31, 47], στο τελικό στάδιο της μεταγραφής (επεξεργασία του 3' άκρου) [25] ή στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα [21, 23, 27, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 38]. Δεν πρέπει όμως

να μας διαφεύγει το γεγονός ότι η μεταγραφή και η έξοδος του mRNA από τον πυρήνα είναι διαδικασίες στενά συνυφασμένες, κάτι που υποδηλώνει πιθανά ένα πολυσύνθετο μηχανισμό μετατόπισης

















ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Nup100 Glucose - Galactose

	gal1 URS	gal1 ORF	suc2	telomeres	ste6 ORF
Ch-IP 2	<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p>				<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p>
Ch-IP 4	<p style="text-align: center;">Ch-IP 4</p>		<p style="text-align: center;">Ch-IP 4</p>		
Ch-IP 5		<p style="text-align: center;">Ch-IP 5</p>		<p style="text-align: center;">Ch-IP 5</p>	
Ch-IP 10	<p style="text-align: center;">Ch-IP 10</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 10</p>			
Ch-IP 13	<p style="text-align: center;">Ch-IP 13</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 13</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 13</p>		<p style="text-align: center;">Ch-IP 13</p>
Ch-IP 14	<p style="text-align: center;">Ch-IP 14</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 14</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 14</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 14</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 14</p>
Ch-IP 19		<p style="text-align: center;">Ch-IP 19</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 19</p>		

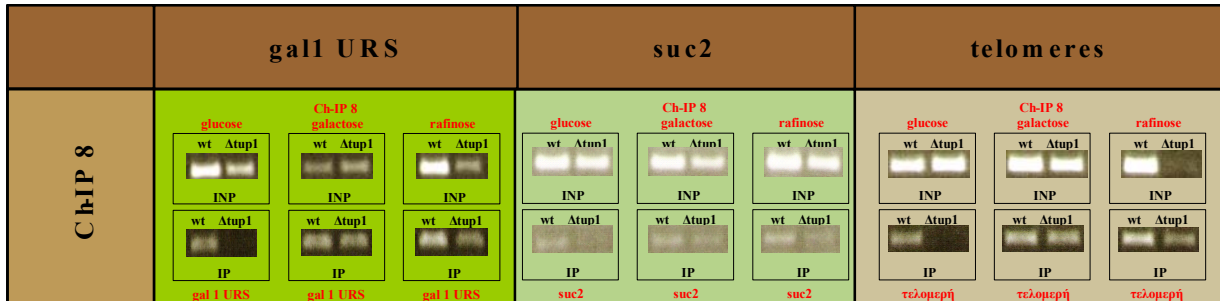
Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματινής (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου, *Δtup1* και *Δmigl* στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup100 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

Nup100
Glucose - Galactose

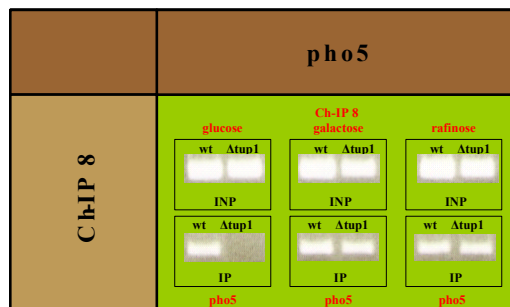
	pho5	trp3	aktin
Ch-IP 2	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 2 galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">pho5</p>	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 2 galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">trp3</p>	
Ch-IP 4			
Ch-IP 5			
Ch-IP 10	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 10</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">pho5</p>		
Ch-IP 13	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 13</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">pho5</p>		
Ch-IP 14	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 14</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">pho5</p>	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 14</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">trp3</p>	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 14</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">aktin</p>
Ch-IP 19	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 19</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1 Δmig1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>wt Δtup1 Δmig1</p>  <p>INP</p> </div> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">pho5</p>		

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου, *Δtup1* και *Δmig1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup100 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

Nup100
Glucose – Galactose - Raffinose



Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup100 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων στο συγκεκριμένο πείραμα περιελάμβαναν την παρουσία Γλυκόζης, Γαλακτόζης και Ραφινόζης.



Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup100 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων στο συγκεκριμένο πείραμα περιελάμβαναν την παρουσία Γλυκόζης, Γαλακτόζης και Ραφινόζης.

Nup60 Glucose - Galactose

	gal1 URS	gal1 ORF	suc2	telomeres	ste6 ORF
Ch-IP 1	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">gal1 URS</p>		<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">suc2</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">τελομερή</p>	
Ch-IP 2	<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">gal1 URS</p>		<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">suc2</p>		

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup60 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

	pho5	trp3	aktin
Ch-IP 1	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">pho5</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">trp3</p>	
Ch-IP 2	<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">pho5</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">wt Δtup1 INP IP</p> <p style="text-align: center;">trp3</p>	

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup60 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

Nup116 Glucose - Galactose

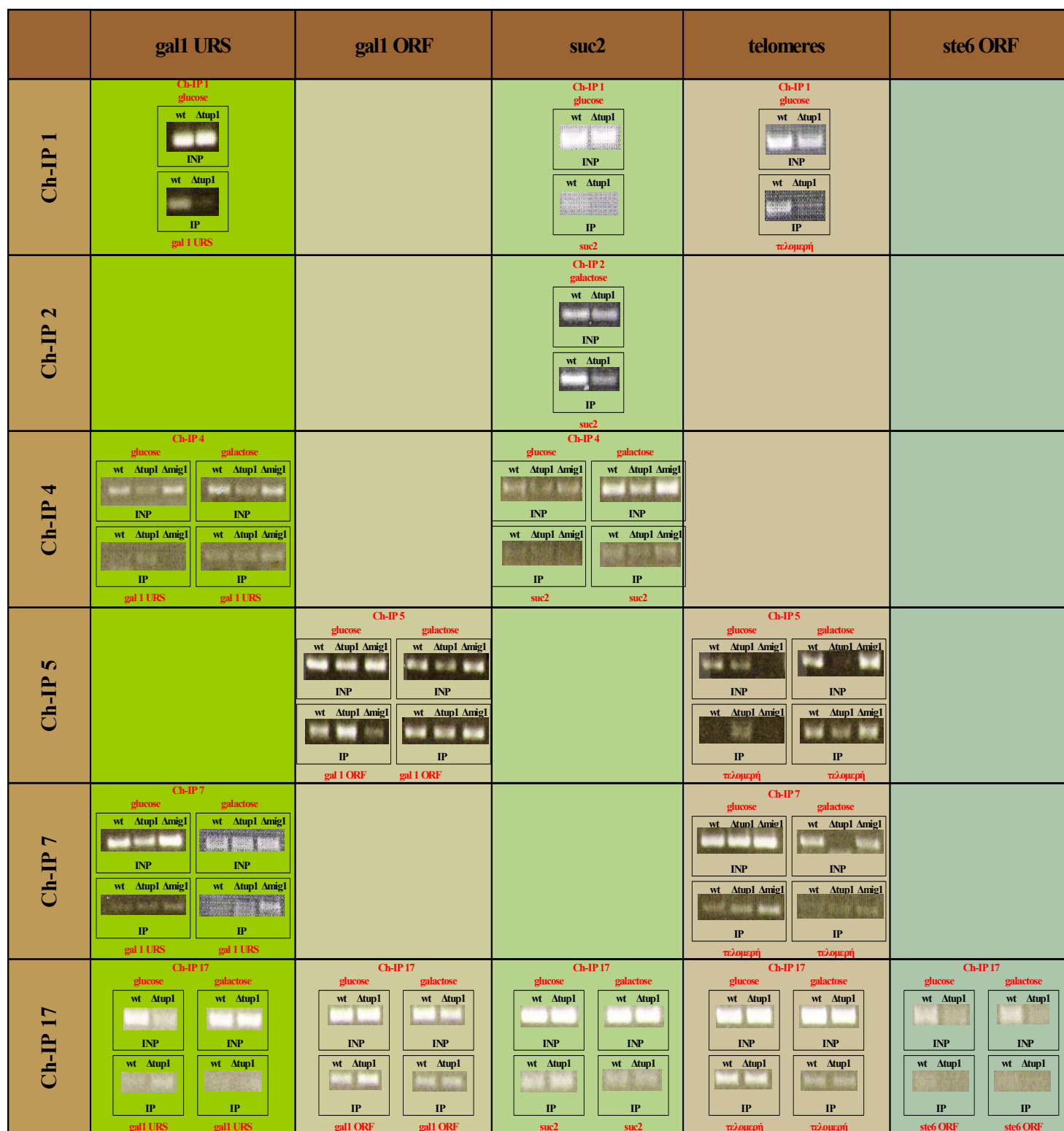
	gal1 URS	gal1 ORF	suc2	telomeres	ste6 ORF
Ch-IP 1	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">gal1 URS</p>		<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">suc2</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">τελομερή</p>	
Ch-IP 2	<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">gal1 URS</p>		<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">suc2</p>		

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup116 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

	pho5	trp3	aktin
Ch-IP 1	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">pho5</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 1 glucose</p> <p style="text-align: center;">trp3</p>	
Ch-IP 2	<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">pho5</p>	<p style="text-align: center;">Ch-IP 2 galactose</p> <p style="text-align: center;">trp3</p>	

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nup116 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

Nic96
Glucose - Galactose



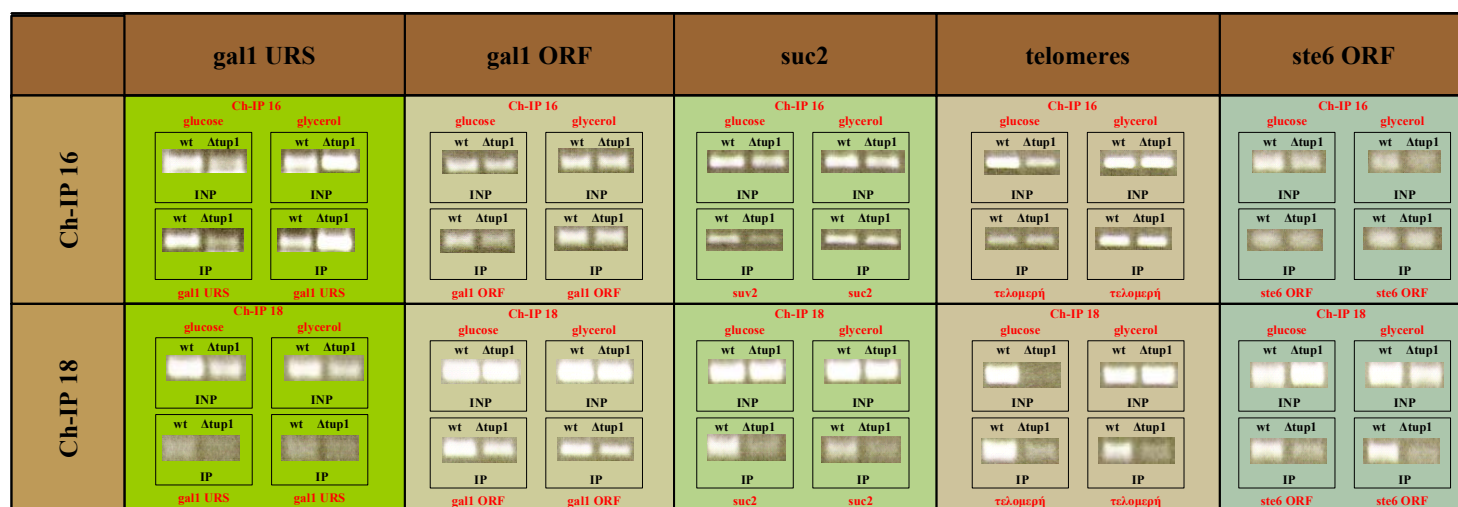
Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου, *Δtup1* και *Δmig1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nic96 είναι σημασμένη με τον επίτοπο mys. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

Nic96
Glucose - Galactose

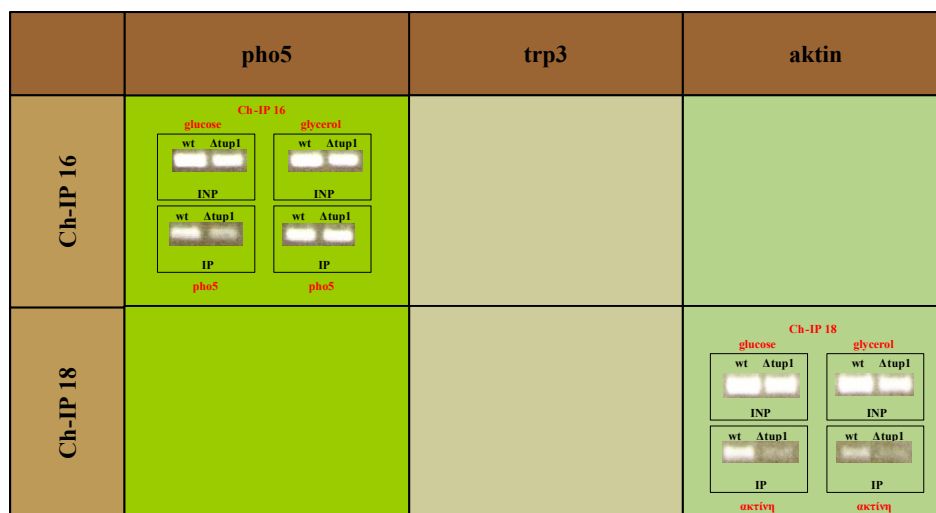
	pho5	trp3	aktin
Ch-IP 1	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 1 glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">pho5</p>	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 1 glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">trp3</p>	
Ch-IP 2	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 2 galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">pho5</p>	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 2 galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> <p style="text-align: center; color: red;">trp3</p>	
Ch-IP 4			
Ch-IP 5			
Ch-IP 7			
Ch-IP 17	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 17</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p style="color: red;">glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center; color: red;">pho5</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p style="color: red;">galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center; color: red;">pho5</div> </div>	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 17</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p style="color: red;">glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center; color: red;">trp3</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p style="color: red;">galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center; color: red;">trp3</div> </div>	<p style="text-align: center; color: red;">Ch-IP 17</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p style="color: red;">glucose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center; color: red;">aktin</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p style="color: red;">galactose</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>INP</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>wt Δtup1</p> <p>IP</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center; color: red;">aktin</div> </div>

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου, *Δtup1* και *Δmig1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nic96 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα.

Nic96 Glucose - Glycerol



Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1* στα οποία η νουκλεοπορίνη Nic96 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα. Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων στο συγκεκριμένο πείραμα περιελάμβαναν την παρουσία Γλυκόζης και Γλυκερόλης.



Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1* στα οποία η νουκλεοπορίνη Nic96 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Στις κάθετες στήλες φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών πειραμάτων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Στις οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα αποτελέσματα διαφορετικών γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο πείραμα. Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων στο συγκεκριμένο πείραμα περιελάμβαναν την παρουσία Γλυκόζης και Γλυκερόλης.

Nic96 Glucose

	gal1 URS	gal1 ORF	suc2	telomeres	ste6 ORF																																
Ch-IP 15	<p style="text-align: center;">Ch-IP 15</p> <table border="1"> <tr> <th>glucose 1</th> <th>glucose 2</th> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 INP</td> <td>wt Δtup1 INP</td> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 IP</td> <td>wt Δtup1 IP</td> </tr> <tr> <td>gal1 URS</td> <td>gal1 URS</td> </tr> </table>	glucose 1	glucose 2	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP	gal1 URS	gal1 URS	<p style="text-align: center;">Ch-IP 15</p> <table border="1"> <tr> <th>glucose 1</th> <th>glucose 2</th> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 INP</td> <td>wt Δtup1 INP</td> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 IP</td> <td>wt Δtup1 IP</td> </tr> <tr> <td>gal1 ORF</td> <td>gal1 ORF</td> </tr> </table>	glucose 1	glucose 2	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP	gal1 ORF	gal1 ORF	<p style="text-align: center;">Ch-IP 15</p> <table border="1"> <tr> <th>glucose 1</th> <th>glucose 2</th> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 INP</td> <td>wt Δtup1 INP</td> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 IP</td> <td>wt Δtup1 IP</td> </tr> <tr> <td>suc2</td> <td>suc2</td> </tr> </table>	glucose 1	glucose 2	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP	suc2	suc2		<p style="text-align: center;">Ch-IP 15</p> <table border="1"> <tr> <th>glucose 1</th> <th>glucose 2</th> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 INP</td> <td>wt Δtup1 INP</td> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 IP</td> <td>wt Δtup1 IP</td> </tr> <tr> <td>ste6 ORF</td> <td>ste6 ORF</td> </tr> </table>	glucose 1	glucose 2	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP	ste6 ORF	ste6 ORF
glucose 1	glucose 2																																				
wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP																																				
wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP																																				
gal1 URS	gal1 URS																																				
glucose 1	glucose 2																																				
wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP																																				
wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP																																				
gal1 ORF	gal1 ORF																																				
glucose 1	glucose 2																																				
wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP																																				
wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP																																				
suc2	suc2																																				
glucose 1	glucose 2																																				
wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP																																				
wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP																																				
ste6 ORF	ste6 ORF																																				

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nic96 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων στο συγκεκριμένο πείραμα περιελάμβαναν την παρουσία Γλυκόζης. Πρόκειται για ένα πείραμα εις διπλούν για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.

	pho5	trp3	aktin								
Ch-IP 15	<p style="text-align: center;">Ch-IP 15</p> <table border="1"> <tr> <th>glucose 1</th> <th>glucose 2</th> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 INP</td> <td>wt Δtup1 INP</td> </tr> <tr> <td>wt Δtup1 IP</td> <td>wt Δtup1 IP</td> </tr> <tr> <td>pho5</td> <td>pho5</td> </tr> </table>	glucose 1	glucose 2	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP	wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP	pho5	pho5		
glucose 1	glucose 2										
wt Δtup1 INP	wt Δtup1 INP										
wt Δtup1 IP	wt Δtup1 IP										
pho5	pho5										

Εικόνα 0: Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Ch-IP) σε στελέχη αγρίου τύπου και *Δtup1*, στα οποία η νουκλεοπορίνη Nic96 είναι σημασμένη με τον επίτοπο myc. Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων στο συγκεκριμένο πείραμα περιελάμβαναν την παρουσία Γλυκόζης. Πρόκειται για ένα πείραμα εις διπλούν για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**: 751–762.
2. Gotta, M. and Gasser, S.M. (1996). Nuclear organization and transcriptional silencing in yeast. *Experientia* **52**: 1136–1147.
3. Laroche, T., Martin, S.G., Gotta, M., Gorham, H.C., Pryde, F.E., Louis, E.J., and Gasser, S.M. (1998). Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr. Biol.* **8**: 653–656.
4. Galy, V., Olivo-Marin, J.C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N., and Nehrbass, U. (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* **403**: 108–112.
5. Feuerbach, F., Galy, V., Trelles-Sticken, E., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Gilson, E., Olivo-Marin, J.C., Scherthan, H., and Nehrbass, U. (2002). Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat. Cell. Biol.* **4**: 214–221.
6. Andrulis, E.D., Neiman, A.M., Zappulla, D.C., and Sternglanz, R. 1998. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* **394**: 592–595.
7. Andrulis, E.D., Zappulla, D.C., Ansari, A., Perrod, S., Laiosa, C.V., Gartenberg, M.R., and Sternglanz, R. (2002). Esc1, a nuclear periphery protein required for Sir4-based plasmid anchoring and partitioning. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 8292–8301.
8. Jason M. Casolari, Christopher R. Brown, Suzanne Komili, Jason West, Haley Hieronymus, and Pamela A. Silver (2004). Genome-Wide Localization of the Nuclear Transport Machinery Couples Transcriptional Status and Nuclear Organization. *Cell* **117**: 427-439
9. Brickner JH, Walter P (2004). Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol* **2**: 1843-1853
10. Ishii K, Arib G, Lin C, Van Houwe G, Laemmli UK (2002) Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* **109**: 551-562

11. Lohr, D., Venkov, P., Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *Faseb J.* **9**: 777-787
12. Manolis Papamichos-Chronakis, Theodoros Petrakis, Eleni Ktistaki, Irini Topalidou and Dimitris Tzamarias (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.
13. Erica Larschan and Fred Winston (2001). The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes & Dev.* **15**, 1946-1956.
14. Suresh R. Bhaumik and Michael R. Green (2002). Differential Requirement of SAGA Components for Recruitment of TATA-Box-Binding Protein to Promoters In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7365–7371.
15. H. Th. Marc Timmers and Laszlo Tora (2005). SAGA unveiled. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 7-10
16. Gene O. Bryant and Mark Ptashne (2003). Independent Recruitment In Vivo by Gal4 of Two Complexes Required for Transcription. *Mol. Cell*, **11**: 1301–1309
17. Jose Perez-Martin (1999). Chromatin and transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Rev.* **23**: 503-523
18. Irini Topalidou, Manolis Papamichos-Chronakis, George Thireos and Dimitris Tzamarias (2004). Spt3 and Mot1 cooperate in nucleosome remodelling independently of TBP recruitment. *EMBO J.* **23**: 1943-1948
19. Brian A. Lewis² and Danny Reinberg (2003). The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation *Journal of Cell Science*, **116**: 3667-3675
20. Claes M. Gustafsson and Tore Samuelsson (2001). Mediator – a universal complex in transcriptional Regulation *Molecular Microbiology*, **41**: 1–8
21. Dimaano and Katharine S. Ullman (2004) Nucleocytoplasmic Transport: Integrating mRNA Production and Turnover with Export through the Nuclear Pore *Mol. And Cellular Biol.* **24**: 3069–3076
22. Angela Taddei¹, Florence Hediger¹, Frank R Neumann¹, Christoph Bauer and Susan M. Gasser (2004) Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins *The EMBO Journal* **23**:1301–1312

23. Andre' s Aguilera (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 242–250
24. David L Bentley (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 251–256
25. Stephen Buratowski (2005) Connections between mRNA 3(end processing and transcription termination *Current Opinion in Cell Biology* **17**:257–261
26. Robin Reed and Hong Cheng (2005) TREX, SR proteins and export of mRNA *Current Opinion in Cell Biology* **17**:269–273
27. Cyril Saguez, Jens Raabjerg Olesen and Torben Heick Jensen (2005) Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction *Current Opinion in Cell Biology* **17**:287–2930
28. Xavier Darzacq Robert H Singer¹ and Yaron Shav-Tal¹ (2005) Dynamics of transcription and mRNA export *Current Opinion in Cell Biology* **17**:332–339
29. Peter Sommer¹ and Ulf Nehrbass (2005). Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore *Current Opinion in Cell Biology* **17**:294–301
30. Karen M. Arndt and Caroline M. Kane (2003) Running with RNA polymerase: eukaryotic transcript elongation *Trends in Genetics* **19**: 543-550
31. Grant A Hartzog (2003) Transcription elongation by RNA polymerase II *Current Opinion in Genetics & Development* **13**:119–126
32. Robin Reed and Ed Hurt (2002) A Conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing *Cell Press* **108**: 523–531
33. Robin Reed (2003) Coupling transcription, splicing and mRNA export *Current Opinion in Cell Biology* **15**: 326–331
34. Elisa Izaurralde (2004) Directing mRNA export *Nature Structural & Molecular Biology* **11**: 210-212
35. Françoise Stutz¹ and Elisa Izaurralde (2003) The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export *Trends in Cell Biology* **13**: 319-327
36. Patrizia Vinciguerra and Françoise Stutz¹ (2004) mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores *Current Opinion in Cell Biology* **16**:285–292
37. Angela Taddei, Susan M. Gasser(2004) Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation *Biochimica et Biophysica Acta* **1677**: (2004) 120–128

38. Bryan R. Cullen (2003) Nuclear RNA export *Journal of Cell Science* **116**: 587-597
39. Marc R. Gartenberg, Frank R. Neumann, Thierry Laroche, Marek Blaszczyk, and Susan M. Gasser (2004) Sir-Mediated Repression Can Occur Independently of Chromosomal and Subnuclear Contexts *Cell* **119**: 955–967
40. Adrienne E. McKee and Pamela A. Silver (2004) REF-ereeing the Cytoplasmic Fate of mRNA via Nuclear Export *Developmental Cell* **7**: 740-742
41. Yingqun Huang and Joan A. Steitz (2005) SRprises along a Messenger's Journey *Molecular Cell* **17**: 613–615
42. Charls E. Duker and Robert T. Simpson (2000) The organized chromatin domain of the repressed yeast a cell-specific gene STE6 contains two molecules of the corepressor Tup 1p per nucleosome **19**:400-409
43. Rebecca L. Smith and Alexander D. Johnson (2000) Turning genes off by Ssn6–Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes *TiBS* **25**: 325-330
44. Cynthia A. Keleher, Michael J. Redd, Janet Schultz, Marian Carlson, and Alexander D. Johnson (1992) Ssn6-Tup1 Is a General Repressor of Transcription in Yeast *Cell* **68**: 709-719
45. Irini Topalidou, Manolis Papamichos-Chronakis, and George Thireos (2003) Post-TATA Binding Protein Recruitment Clearance of Gcn5-Dependent Histone Acetylation within Promoter Nucleosomes *Mol. and Cel. Biology* **23**: 7809-7817
46. Manolis Papamichos-Chronakis, Theodoros Petrakis, Elenh Ktistaki, Irini Topalidou, and Dimitris Tzamarias (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
47. Jesper Q Svejstrup (2002) Chromatin elongation factors *Current Opinion in Genetics & Development* **12**: 156-161
48. Michael Knop, Katja Siegers, Gislene Pereira, Wolfgang Zachariae, Barbara Winsor, Kim Nasmyth and Elmar Schiebel (1999) Epitope Tagging of Yeast Genes using a PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines *Yeast* **15**: 963-972
49. Carlson, M. (1997) Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 1-23.

50. 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.
51. 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.
52. Tzamarias, D. and Struhl, K. (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, **369**: 758-761.
53. Gavin, I. M., Kladde, M., P. and Simpson, R., T. (2000). Tup1p represses Mcm1p transcriptional activation and chromatin remodeling of an a-cell-specific gene. *Embo J* **19**: 5875-5883.
54. 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.
55. Weis, K. (2003). Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle. *Cell* **112**: 441-451
56. Manuel S. Rodriguez , Catherine Dargemont , Françoise Stutz. (2004) Nuclear export of RNA. *Biology of the Cell* **96**: 639-655.
57. Damelin, M. and Silver, P.A. (2002) In situ analysis of spatial relationships between proteins of the nuclear pore complex. *Biophys J*, **83**: 3626-3636.

