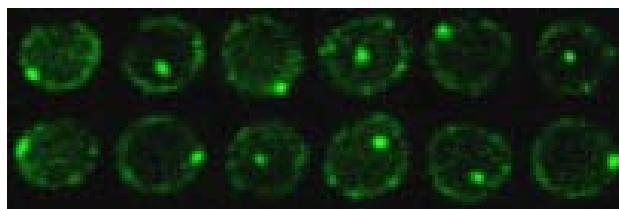


ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Μελέτη της μετατόπισης προς την πυρηνική περιφέρεια των γονιδίων *GAL1/10* σε συνθήκες μεταγραφικής ενεργοποίησης στο *S. cerevisiae*

Γιάννης Βαγγελάτος



Υπεύθυνος ερευνητής: Δρ. Δ. Τζαμαρίας

Ηράκλειο Κρήτης  
2006

Αφιερώνεται στη μαμά, στο μπαμπά  
και τον αδερφό μου

## Ευχαριστίες

Λίγες μόνο μέρες απομένουν για να ολοκληρωθεί αυτό το master. Στιγμή κατάλληλη για να ξαποστάσει κανείς λίγο από το δύσκολο οδοιπορικό που ακούει στο όνομα έρευνα και να αναρωτηθεί «τι γίνεται;...»

Όπως και να' ναι, η εργασία αυτή δεν θα είχε πάρει «σάρκα και οστά» χωρίς την καθοδήγηση και την υποστήριξη του Δημήτρη Τζαμαρία. Τον ευχαριστώ που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και που με εμπιστεύτηκε σε αρκετές πειραματικές προκλήσεις. Το πολύστροφο μυαλό του και η ευαισθησία του ήταν πάντα στη διάθεσή μου, όταν σύννεφα αγωνίας, πειραματικά και όχι μόνο, σκέπαζαν τη σκέψη μου.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη νοιώθω προς τον Γιώργο Θηραίο, η παρουσία του οποίου, αν και αόρατη στους προς τα έξω, ήταν πολυτιμότερη για εμένα σε όλη τη διάρκεια της διατριβής αυτής. Εκεί που συχνά εγώ έβλεπα ζούγκλα και αδιέξοδο, εκείνος με τη διαπεραστική βιολογική ματιά του, υποδείκνυε μονοπάτια και νέες προσεγγίσεις.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δέσποινα Αλεξανδράκη τόσο ως διορθώτρια αυτής της εργασίας, αλλά κυρίως γιατί ήταν πάντα δεκτική σε εισβολές μου στο γραφείο της. Την εκτιμώ και τη σέβομαι πολύ. Άνθρωπος σταθερός σε αξίες και μαχητής από τους λίγους.

Ένα πελώριο ευχαριστώ οφείλω στη Νίκη Γουναλακη για τη τεχνική της υποστήριξη και όχι μόνο. Η ζεστασιά και η ευαισθησία της είναι καλά φυλαγμένες στην καρδιά μου.

Δύσκολα ένα ευχαριστώ μπορεί να κλείσει τα όσα βιώθηκαν με το Θωμά Γληγόρη. Η βοήθειά του και οι συζητήσεις μας έπαιξαν το δικό τους ρόλο στην έκβαση αυτής της εργασίας. Πήρα πολλά από το Θωμά, αρκετά από αυτά χωρίς να το αντιλαμβάνεται (δεν εννοώ φυσικά όσα βούτηξα από τον πάγκο του).

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τους γονείς μου, που περισσότερο από όλους έχουν γνωρίσει το ακανθώδες πρόσωπο του εαυτού μου. Χάρης αυτούς μορφώθηκα και έχω την πολυτέλεια να προβληματίζομαι σε επιστημονικά και αλλά ενδιαφέροντα, όταν άλλοι άνθρωποι υποφέρουν και ματώνουν καθημερινά για να επιβιώσουν.

Τους αδερφικούς μου φίλους Γιώργο και Σωτήρη, που η παρουσία τους, είτε με τη μορφή συζητήσεων, είτε στο θησαυρό των αναμνήσεών μου με στηριξε πολύ.

Για το κοριτσάκι μου το όμορφο, γλυκό και αγαπημένο μου τι να πω. Μόνο εκείνη ξέρει τι υπομονή έχει καταθέσει και τι υπερβάσεις έχει κάνει αγκαλιάζοντας το δύστροπο, αφηρημένο και τραγικά χαστικό μυαλό μου. Η στήριξή της ήταν απίστευτη ειδικά σε σκοτεινές στιγμές αυτού του master.

Ευγνωμονώ όλους, ορατούς και αοράτους, που συνέβαλαν στο να γίνει ο,τι έγινε.

## Περίληψη

Είναι πλέον καλά εδραιωμένη η συσχέτιση μεταγραφικής ρύθμισης και υποπυρηνικής τοπολογίας, ειδικά όσον αφορά την πυρηνική περιφέρεια η οποία κυρίως έχει συσχετιστεί με γονιδιακή αποσιώπηση. Παρόλο αυτά δείχθηκε πρόσφατα ότι γονίδια που είτε εκφράζονται μονίμως σε υψηλά επίπεδα, είτε επάγονται σε ορισμένες συνθήκες είναι επίσης εντοπισμένα στην πυρηνική περιφέρεια. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σχέση των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων *GAL1/10* με την ενδοπυρηνική τοπολογία τους παρουσία διαφορετικών υδατανθράκων, όπως η γλυκόζη, η ραφινόζη και η γαλακτόζη που αντίστοιχα καταστέλλουν, από-καταστέλλουν ή ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων *GAL1/10*. Βρέθηκε ότι η περιπυρηνική τους τοποθέτηση δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή τους, ούτε αποτέλεσμα της έκφρασης τους. Ειδικότερα υποδεικνύεται ότι η μετατόπισή των γονιδίων *GAL1/10* προς την πυρηνική περιφέρεια καθορίζεται περισσότερο από τη μεταγραφική αποκαταστολή τους ελλείψει γλυκόζης, παρά από τη μεταγραφική ενεργοποίησή τους παρουσία γαλακτόζης. Σε κάθε περίπτωση η μετατόπισή των γονιδίων *GAL1/10* προς την πυρηνική περιφέρεια εξαρτάται από τον συν-καταστολεα *Tup1*, μέσω κατά πάσα πιθανότητα του συν-ενεργοποιητικού τρόπου δράσης του .

## Abstract

Gene transcriptional activity is well correlated with intra-nuclear position, especially relative to the nuclear periphery, which is a region classically associated with gene silencing. Recently however, actively transcribed genes or inducible genes upon activation have also been found localized to the nuclear periphery in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Here we studied the correlation between the nuclear topology and the transcriptional status of the glucose repressed, raffinose derepressed and galactose induced *GAL* gene locus. We found that the perinuclear confinement of this locus is neither necessary for transcription nor the consequence of mRNA synthesis. Furthermore, we have evidence suggesting that glucose derepression of the *GAL1/10* promoter, even in the absence of galactose activation, is sufficient for the relocalization of the locus to the nuclear periphery. In any case, Tup1 is required for the perinuclear localization of the *GAL1/10* genes, probably through its co activator rather than the co repressor mode of action.

# Περιεχόμενα

<b>1</b>	<b>Εισαγωγή</b>	<b>1</b>
1.1	Ενδοπυρηνική αρχιτεκτονική και γονιδιωματική λειτουργία	1
1.2	Πυρηνική περιφέρεια: από τη μεταγραφική καταστολή στη μεταγραφική ενεργοποίηση	2
1.3	<i>cis-</i> και <i>trans-</i> παράγοντες που μεσολαβούν στην περιπυρηνική εντόπιση μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων	4
1.4	Βιολογική σημασία της στόχευσης μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια	5
1.5	Στόχος της παρούσας εργασίας	7
<b>2.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>9</b>
2.1	Παρακολούθηση της υποπυρηνικής τοποθέτησης του <i>GAL1-GAL10</i> γενετικού τόπου με συνεστιακή laser μικροσκοπία φθορισμού	9
2.2	Υποπυρηνική εντόπιση των γονιδίων <i>GAL1/10</i> , <i>SUC2</i> και <i>RDS1</i> σε διάφορες πηγές άνθρακα.	12
2.3	Κινητική της στόχευσης/απομάκρυνσης των <i>GAL1/10</i> γονιδίων από την πυρηνική περιφέρεια	14
2.4	Αναζήτηση παραγόντων που επηρεάζουν την υποπυρηνική τοπολογία των <i>GAL1/10</i> γονιδίων	15
2.5	Συσχέτιση της μεταγραφής ενός εκφραζόμενου γονιδίου αναφοράς με την υποπυρηνική του εντόπιση	17
<b>3.</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>19</b>
3.1	Η μεταγραφή δεν καθορίζει την υποπυρηνική θέση των <i>GAL1/10</i> γονιδίων	19
3.2	Η μεταγραφή δεν καθορίζει την υποπυρηνική θέση των <i>GAL1/10</i> γονιδίων	22
<b>4.</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>24</b>
4.1	Υλικά	24
4.2	Μοριακές τεχνικές	27

4.3	Τεχνικές ειδικές για τον σακχαρομήκητα	32
4.4	Μικροσκοπία φθορισμού-Συνεστιακή μικροσκοπία laser	32
<b>5.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>34</b>



# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Ενδοπυρηνική αρχιτεκτονική και γονιδιωματική λειτουργία

Το κυρίαρχο και συμβατικό μοντέλο που φαίνεται να χαρακτηρίζει το σύνολο του μεταβολισμού του DNA, υποστηρίζει ότι πρωτεϊνικά σύμπλοκα κατά την αντιγραφή, μεταγραφή και επιδιόρθωση του γενετικού υλικού στρατολογούνται και συναρμολογούνται σε ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης του DNA [1-4]. Σύμφωνα με την DNA-κεντρική αυτή αντίληψη το γονίδιο θεωρείται ως μια ακινητοποιημένη πλατφόρμα, εκτεθειμένη στους ελεύθερα διαχεόμενους πρωτεϊνικούς παράγοντες του πυρηνοπλάσματος. Κατά τη μεταγραφική ενεργοποίηση, η πρόσδεση ή η τροποποίηση ήδη προσδεδεμένων μεταγραφικών παραγόντων θα πυροδοτήσει διαδοχικά τη συγκρότηση του εναρκτήριου συμπλόκου, του συμπλόκου επιμήκυνσης και του συμπλόκου τερματισμού της μεταγραφής.

Ωστόσο, σύγχρονες μελέτες μικροσκοπίας φθορισμού αποκάλυψαν, αφενός ότι το DNA δεν είναι στατικό και ακινητοποιημένο στον πυρήνα, αφετέρου ότι ο πυρήνας επιδεικνύει μια ιδιαίτερα πολύπλοκη κι ετερογενή τρισδιάστατη αρχιτεκτονική δομή [5-7]. Η σχετική θέση των γονιδίων ως προς υποπυρηνικές εστίες-σωμάτια και χρωματινικές επικράτειες, συσχετίζεται άμεσα με τη χρωματινική τους κατάσταση καθώς και με τη συχνότητα ανασυνδυασμού ή μεταγραφής τους [8-10]. Τα ευρήματα αυτά ενθαρρύνουν μια άλλη υπόθεση, ότι ίσως τα γονίδια είναι αυτά που στρατολογούνται σε σταθμούς-εργοστάσια μεταγραφής, αντιγραφής και επιδιόρθωσης και όχι το αντίστροφο (reverse recruitment)[11]. Αυτό που διαφαίνεται προς το παρόν είναι ότι ετεροχρωματινικές (μεταγραφικά σιωπηρές) περιοχές αλλά και μεταγραφικά ενεργοποιημένα γονίδια λαμβάνουν συγκεκριμένη υποπυρηνική τοποθέτηση, χωρίς ακόμη να έχει δειχθεί πειστικά αν κάτι τέτοιο είναι αιτία ή το αποτέλεσμα της μεταγραφικής τους κατάστασης. Το παράδοξο ωστόσο είναι ότι και στις δυο περιπτώσεις η τοποθέτηση αυτή είναι κοινή και συνιστά την πυρηνική περιφέρεια [12].

## 1.2 Πυρηνική περιφέρεια: από τη μεταγραφική καταστολή στη μεταγραφική ενεργοποίηση

Η περιοχή του πυρήνα που επενδύει το εσωτερικό του πυρηνικού φακέλου θεωρείται, ως επί το πλείστον, ζώνη μεταγραφικής καταστολής κυρίως γιατί εκεί εντοπίζονται εκτεταμένες περιοχές μεταγραφικά σιωπηρής χρωματίνης (ετεροχρωματίνης στους ανώτερους οργανισμούς) [13]. Η αποσιώπηση αυτή οφείλεται στην πρόσδεση, κατά μήκος των νουκλεοσωμάτων των χρωματινικών αυτών περιοχών, συμπλόκων αποσιώπησης (SIR στο σακχαρομύκητα, HP1 στα μετάζωα), τα οποία τις καθιστούν απρόσιτες σε DNA προσδεδεμένους (πχ μεταγραφικούς) παράγοντες. Η ένθεση γονιδίων σε τέτοιου είδους περιοχές, οδηγεί στην καταστολή τους ανεξάρτητα του όποιου μεταγραφικού προτύπου επιδεικνύουν στον ενδογενή τους τόπο. Όμως και η γεινίαση στο χώρο γονιδίων με ετεροχρωματινικές επικράτειες συσχετίζεται με τη μεταγραφική τους καταστολή. Για παράδειγμα το γονίδιο *CFTR* του ανθρώπου όταν είναι μεταγραφικά ανενεργό εντοπίζεται στην περιπυρηνική ετεροχρωματίνη, ενώ όταν εκφράζεται μετατοπίζεται προς το εσωτερικό του πυρήνα [14]. Στην εκβλαστανούσα ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* τα μεταγραφικά σιωπηρά τελομερή επίσης συγκρατούνται στην πυρηνική περιφέρεια μέσω αλληλεπιδράσεων με τους πυρηνικούς πόρους, οι οποίες φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη διατήρηση του μεταγραφικά ανενεργού τους χαρακτήρα [15].

Οι πυρηνικοί πόροι της ζύμης έχουν μέγεθος ~50 MDa και αποτελούνται από ~30 νουκλεοπορίνες, που συγκροτούν ένα κανάλι οκταεδρικής συμμετρίας, μέσω του οποίου καρυοφερίνες (ιμπορτίνες και εξπορτίνες) μεταφέρουν το φορτίο τους (RNA, πρωτεΐνες) μέσα και έξω από τον πυρήνα [16,17]. Ο ρόλος των πυρηνικών πόρων δεν φαίνεται να εξαντλείται στην πυρηνική μεταφορά και τη μεταγραφική αποσιώπηση, καθώς βρέθηκε ότι η τεχνητή στρατολόγηση νουκλεοπορινών ή καρυοφερινών εκατέρωθεν ενός γονιδίου αναφοράς είναι ικανή να επάγει την έκφραση του, αν και ενσωματωμένο στο μεταγραφικά ανενεργό περιβάλλον του *HML* γενετικού τόπου [18,19]. Ένα φυσιολογικό ισοδύναμο παραγόντων ικανών να απομονώνουν ένα γονίδιο από το μεταγραφικό καθεστώς που προτάσσουν γειτονικές αλληλουχίες, αποτελεί η αλληλουχία *gypsy* της *Drosophila* και οι προσδεδεμένες σε αυτή πρωτεΐνες, οι οποίες επίσης εμφανίζουν περιπυρηνική εντόπιση [20,21]. Στον ίδιο οργανισμό

στην πυρηνική περιφέρεια κατανέμονται και οι πρωτεΐνες MSL, οι οποίες ευθύνονται για την υπερμεταγραφή του X χρωμοσώματος στα αρσενικά σωματικά κύτταρα, ώστε η X σχετιζόμενη γονιδιακή έκφραση να είναι ισότιμη με εκείνη των θηλυκών κυττάρων που διαθέτουν δυο φυλετικά χρωμοσώματα [22].

Η συσχέτιση μεταξύ πυρηνικής περιφέρειας και μεταγραφικής ενεργοποίησης στοιχειοθετήθηκε ακόμη περισσότερο όταν μετά από μελέτες γονιδιωματικού πλάτους (ChIP to chip) στη ζύμη, βρέθηκε ότι νουκλεοπορίνες, ποροσυνδεόμενες πρωτεΐνες και καρυοφερίνες, αλληλεπιδρούν με υψηλά μεταγραφόμενα γονίδια (γλυκολυτικά γονίδια, γονίδια ριβοσωμικών πρωτεϊνών), εκτός των προβλεπόμενων μεταγραφικά σιωπηρών χρωματινικών περιοχών (τελομερή, *HML* και *HMR* γενετικοί τόποι) [23]. Παράλληλα, με βιοχημικές μεθόδους και μικροσκοπία ανοσοφθορισμού δείχθηκε ότι μεταγραφικά επαγόμενα γονίδια (*INO1*, *GAL* γενετικός τόπος, γονίδια επαγόμενα από τη φερομόνη α), σε συνθήκες επαγωγής εμφανίζουν αυξημένη περιπυρηνική εντόπιση [23-25].

Κατά ένα στατιστικά σημαντικό ποσοστό, τα γονίδια που αλληλεπιδρούν με νουκλεοπορίνες ή καρυοφερίνες φέρουν μοτίβα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Rap1 στο 5' ρυθμιστικό άκρο τους [23]. Ο Rap1 είναι γενικός ρυθμιστής της μεταγραφής, ικανός να επάγει τόσο αποσιώπηση όσο και ενεργοποίηση. Πρόσφατα δείχθηκε ότι, εκτός από το σύμπλοκο αποσιώπησης Rap1/Yku70-80/Sir2-4, το ενεργοποιητικό σύμπλοκο Rap1/Gcr1/Gcr2 επίσης εντοπίζεται στην πυρηνική περιφέρεια, μέσω αλληλεπιδράσεων με νουκλεοπορίνες του υποσυμπλόκου Nur84, καθιστώντας έτσι τον Rap1 υποψήφιο μεσολαβητή στόχευσης γενετικών τόπων στην πυρηνική περιφέρεια [11]. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι ίδιες νουκλεοπορίνες, όταν συντηχθούν με ετερόλογα DNA προσδεδεμένα μοτίβα, μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή ενός γονιδίου αναφοράς που φέρει αλληλουχίες αναγνώρισης για τα μοτίβα αυτά. Το παθολογικό ισοδύναμο του ενεργοποιητικού αυτού δυναμικού αποτελεί η ογκογενετική φύση γονιδιακών ανακατατάξεων μεταξύ νουκλεοπορινών και μεταγραφικών παραγόντων σε λευχαιμίες του ανθρώπου [26,27].

Συνολικά επομένως, η εσωτερική πλευρά του πυρηνικού φακέλου συνδέεται τόσο με μεταγραφικά ενεργά όσο και ανενεργά γονίδια. Άγνωστο, ωστόσο, παραμένει τι εξυπηρετεί κάτι τέτοιο, πως μεσολαβείτε και πως δομικά

και χωροταξικά συνυπάρχουν τέτοιες περιοχές [12]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει τα επαγόμενα γονίδια, τα οποία σε συνθήκες ενεργοποίησης εμφανίζουν αυξημένη περιπυρηνική εντόπιση, καθώς αποτελούν το κατάλληλο πεδίο μελέτης για το λειτουργικό διαχωρισμό και κατά συνέπεια την κατανόηση της συμβολής της πυρηνικής περιφέρειας στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

### **1.3 *cis-* και *trans-* παράγοντες που μεσολαβούν στην περιπυρηνική εντόπιση μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων**

Τα τελευταία δυο χρόνια πολλές ερευνητικές εργασίες έχουν δημοσιευτεί με σκοπό την εύρεση των μοριακών καθοριστών της στόχευσης στους πυρηνικούς πόρους γονιδίων που έχουν μεταγραφικά επαχθεί. Τα αποτελέσματα τους ωστόσο περισσότερο διαφωνούν παρά συμφωνούν μεταξύ τους, μάλλον γιατί το ίδιο ερώτημα απαντάται με διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις και σε διαφορετικά γονίδια-μοντέλα. Συνοπτικά με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση νουκλεοπορινών στα φερομονο-επαγόμενα γονίδια είναι εξαρτώμενη από τη μεταγραφή τους, καθώς χάνεται μετά από μεταχείριση των κυττάρων με RNάση [25]. Σε συμφωνία με αυτό η αλληλεπίδραση αυτή χαρτογραφείται περισσότερο προς το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο τους, γεγονός που υποδεικνύει ότι μεσολαβείτε μέσω παραγόντων που εμπλέκονται στην επεξεργασία ή/και πυρηνική έξοδο των mRNA που κωδικοποιούν. Μάλιστα αν αυτό το άκρο αφαιρεθεί από το γονίδιο *HXK1* (*hxk1-3'UTRΔ*), τότε η περιπυρηνική του εντόπιση χάνεται σε συνθήκες ενεργοποίησης του [28]. Το ίδιο συμβαίνει και για τα *GAL* γονίδια, ελλείπει των παραγόντων mRNA πυρηνικής εξόδου Mex67 και Sac3 [29-31].

Από την άλλη πλευρά, με μια εναλλακτική μέθοδο ανίχνευσης των γονιδιωματικών θέσεων αλληλεπίδρασης μιας πυρηνικής πρωτεΐνης (ChEC αντι για ChIP [32]), βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων με τη νουκλεοπορίνη Nur2 κατά μήκος του χρωμοσώματος VI, χαρτογραφείται στον υποκινητή τους κι όχι στο 3' άκρο τους [33]. Για τα *GAL* γονίδια υποστηρίζεται ότι τόσο η αλληλεπίδραση αυτή όσο και γενικότερα η περιπυρηνική τους στόχευση αν και συμμεταγραφικές είναι ανεξάρτητες από τη σύνθεση των mRNA τους, καθώς εξακολουθούν να υφίστανται σε στελέχη που η

έκφραση των γονιδίων αυτών έχει δραματικά ελαττωθεί παρά τη μεταγραφική τους ενεργοποίηση (*spt20Δ* για το *GAL1*, *gal2-3'UTRΔ* για το *GAL2*) [29,33].

Συγκεκριμένος επομένως παραμένει προς το παρόν ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου μεταγραφικά ενεργά γονίδια στοχεύονται στην πυρηνική περιφέρεια, καθιστώντας εν πολλοίς αινιγματική τη βιολογική σημασία του φαινομένου αυτού. Παρόλο αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για το τι μπορεί να εξυπηρετεί η στόχευση αυτή στη μεταγραφή.

#### **1.4 Βιολογική σημασία της στόχευσης μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια**

Αυτό που διαφαίνεται ξεκάθαρα είναι ότι η περιπυρηνική εντόπιση μεταγραφικά ενεργών γονιδίων στη ζύμη δεν συνιστά ικανή και αναγκαία συνθήκη για την έκφραση τους, καθώς, αφενός η τεχνητή στρατολόγηση γονιδίων (*INO1*, *HXK1*) στην πυρηνική περιφέρεια δεν αρκεί για να μεταγραφούν απουσία των συνθηκών που τα ενεργοποιούν, αφετέρου η μεταγραφή τους δεν επηρεάζεται σε μεταλλαγμένα στελέχη στα οποία η περιπυρηνική τους εντόπιση χάνεται σε συνθήκες επαγωγής [24,28]. Παρόλο αυτά ή εξαναγκασμένη περιπυρηνική τοποθέτηση του γονιδίου *INO1* επιτρέπει τη μεταγραφή του εν απουσία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης του πυρηνικού φακέλλου Scs2, η οποία χρειάζεται για την αποκαταστολή του γονιδίου από τον Opi1 καταστολέα σε συνθήκες επαγωγής. Αντίστοιχη μεταχείριση του γονιδίου *HXK1* οδήγησε σε δραματική αύξηση της έκφρασης του πάντα όμως σε συνθήκες επαγωγής.

Βάσει συνολικά των παραπάνω, δυο μοντέλα έχουν προταθεί για την σκοπιμότητα της αυξημένης περιπυρηνικής εντόπισης μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων. Το πρώτο διατυπώνει ότι η πυρηνική περιφέρεια παρέχει τη δομική επιφάνεια για τη συγκρότηση μεταγραφικά ενεργών (επιτρεπτών) ή μεταγραφικά ανενεργών (μη επιτρεπτών) νησίδων, είτε μέσω της δημιουργίας μικροεπικρατειών πλούσιων σε μεταγραφικούς ενεργοποιητές ή καταστολείς, είτε μέσω της δημιουργίας συνόρων κατά μήκος της χρωματίνης, ώστε το μεταγραφικό δυναμικό κάθε αυτονομημένης περιοχής να μην επηρεάζει και να μην επηρεάζεται από εκείνο γειτονικών αλληλουχιών. Στην περίπτωση αυτή, μια χρωματινική περιοχή προορισμένη να αποσιωπηθεί, κατευθυνόμενη στην πυρηνική περιφέρεια θα κατασταλεί περισσότερο, ενώ κατά αντιστοιχία ένα

γονίδιο προορισμένο να ενεργοποιηθεί, θα μεταγραφεί περισσότερο [12]. Το δεύτερο μοντέλο αντιτάσσει ότι η περιπυρηνική εντόπιση μεταγραφικά ενεργών γονιδίων οργανώνει με πιο αποδοτικό και γρήγορο τρόπο την επεξεργασία και έξοδο των mRNA που συντίθενται στο πυρήνα. Όσο πιο μικρός είναι ο χρόνος για τη διάθεση των mRNA από το τόπο σύνθεσης τους στα ριβοσώματα, τόσο περισσότερο αφιερώνεται ο πεπερασμένος χρόνος ζωής τους για πρωτεϊνο σύνθεση, αυξάνοντας έτσι τη παραγωγή του τελικού πρωτεϊνικού προϊόντος [34].

Οι δυο προτεινόμενοι μηχανισμοί δεν αλληλοαναιρούνται και μπορεί να συνυπάρχουν ή να ισχύουν κατά περίπτωση. Πάντως η ιδέα ότι η πυρηνική περιφέρεια αποτελεί το κέντρο σύζευξης και κατά συνέπεια βελτιστοποίησης της μεταγραφής, ωρίμανσης και πυρηνικής εξόδου του mRNA ενός γονιδίου, ακούγεται σίγουρα συναρπαστική. Μηχανιστικές ενδείξεις για την ύπαρξη τέτοιας σύζευξης συγκεντρώνονται διαρκώς [35-43], όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση του παράγοντα mRNA πυρηνικής εξόδου Dbp5 με το γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIH [44] ή η συμμετοχή της πρωτεΐνης Sus1 τόσο στο σύμπλοκο ακετυλίωσης ιστονών SAGA που εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση, όσο και στο σύμπλοκο Sac3-Thp1 που εμπλέκεται στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα [45].

Πάντως η έρευνα στο συγκεκριμένο προς το παρόν πεδίο της γονιδιακής τοπολογίας και της μεταγραφικής ρύθμισης θα πρέπει να μείνει ανοιχτή σε απρόβλεπτα ευρήματα, συμπεριλαμβάνοντας και απροκατάληπτες (unbiased) πειραματικές προσεγγίσεις. Είναι πιθανό η αυξημένη περιπυρηνική εντόπιση μεταγραφικά ενεργοποιημένων γονιδίων να μη συνδέεται τόσο με αυτό κάθε αυτό το ρυθμό της μεταγραφής τους όσο με παράπλευρες υποστηρικτικές λειτουργίες, που ο αφαιρετικός συλλογισμός του ανθρώπου προσπερνά. Λόγου χάρη η πυρηνική περιφέρεια μπορεί να συσχετίζεται με την επιδιόρθωση και διατήρηση της ακεραιότητας πυκνομεταγραφόμενων αλληλουχιών ή με αύξηση της πιστότητας των παραγόμενων mRNAs. Το σίγουρο είναι ότι η συστηματική και διεξοδική μελέτη του φαινομένου θα οδηγήσει σε μια πιο εκλεπτυσμένη αντίληψη της πυρηνικής πραγματικότητας.

## 1.5 Στόχος της παρούσας εργασίας

Το αντικείμενο μελέτης της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής ήταν η μελέτη της περιπυρηνικής στόχευσης μεταγραφικά ενεργών γονιδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Για το σκοπό αυτό ως πρότυπο σύστημα επαγόμενων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το σύμπλεγμα γονιδίων *GAL1-GAL10*, για τα οποία είναι ήδη γνωστό ότι μετατοπίζονται στην πυρηνική περιφέρεια σε συνθήκες ενεργοποίησης [23]. Τα γονίδια αυτά έχουν κοινή ρυθμιστική περιοχή και κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για τον καταβολισμό της γαλακτόζης [43]. Η ρύθμιση τους είναι διπλή και περιλαμβάνει καταστολή από γλυκόζη μέσω του συμπλόκου καταστολής Mig1-Tup1-Ssn6 [47,48], και επαγωγή από γαλακτόζη μέσω του μεταγραφικού ενεργοποιητή Gal4 [49]. Κατά συνέπεια η έκφραση τους επιτυγχάνεται απουσία γλυκόζης και παρουσία γαλακτόζης. Στις συνθήκες αυτές ο επαγωγέας Gal3 δεσμεύει μόρια γαλακτόζης προκαλώντας άρση της καταστολής του προσδεδωμένου στον υποκινητή Gal4 από τον αναστολέα Gal80 [50]. Στη συνέχεια ο Gal4 στρατολογεί τα συνενεργοποιητικά σύμπλοκα SAGA και Mediator, τα οποία με τη σειρά τους στρατολογούν τη βασική μεταγραφική μηχανή, με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής [51-55]. Από την άλλη πλευρά, απουσία γλυκόζης ο Mig1 καταστολέας φωσφορυλιώνεται από την Snf1 κινάση, με αποτέλεσμα την άρση της αλληλεπίδρασης με το συν-καταστολέα Tup1-Ssn6 [56,57] και τον τερματισμό της καταστολής (υποακετυλίωση ιστονών, στοίχιση νουκλεοσωμάτων, παρεμβολή στη λειτουργία του Mediator) [58-60]. Εντυπωσιακό είναι ότι το σύμπλοκο Tup1-Ssn6 αναλαμβάνει πλέον ενεργοποιητική δράση συμβάλλοντας στη στρατολόγηση του συμπλόκου SAGA στον *GAL1-10* υποκινητή μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Cti6 [61,62].

Η εκτεταμένη γνώση της μεταγραφικής ρύθμισης των *GAL1-10* γονιδίων σε μοριακό επίπεδο, επιτρέπει τη διερεύνηση σε πολλαπλά επίπεδα της σχέσης μεταξύ της πυρηνικής τους τοπολογίας και της μεταγραφικής τους κατάστασης. Συγκεκριμένα μπορεί να μελετηθεί:

- Ποια είναι η υποπυρηνική κατανομή τους σε πηγές άνθρακα που αποκαταστέλλουν, αλλά δεν ενεργοποιούν την έκφραση τους (ραφινόζη)

- Ποια είναι η κινητική της περιπυρηνικής εντόπισής τους σε σχέση με την κινητική της έκφρασής τους κατά το πέρασμα από συνθήκες καταστολής σε συνθήκες ενεργοποίησης και αντίστροφα.
- Ποιοι από τους παράγοντες που προσδένονται και επιδρούν στον υποκινητή τους επηρεάζουν την περιπυρηνική τους στόχευση, κι ποιοι από αυτούς μπορούν να παρακαμφθούν στρατολογώντας τεχνητά τα γονίδια αυτά στην πυρηνική περιφέρεια.
- Ποια είναι η συμβολή της πυρηνικής περιφέρειας στη μεταγραφή, όπως μπορεί να ελεγχτεί από τα επίπεδα μεταγραφής ενός εκφραζόμενου γονιδίου αναφοράς που έχει εισαχθεί δίπλα στα *GAL1-GAL10* γονίδια, ακολουθώντας έτσι την υποπυρηνική τους κατανομή χωρίς όμως να ρυθμίζεται από γαλακτόζη.



## 2. Αποτελέσματα

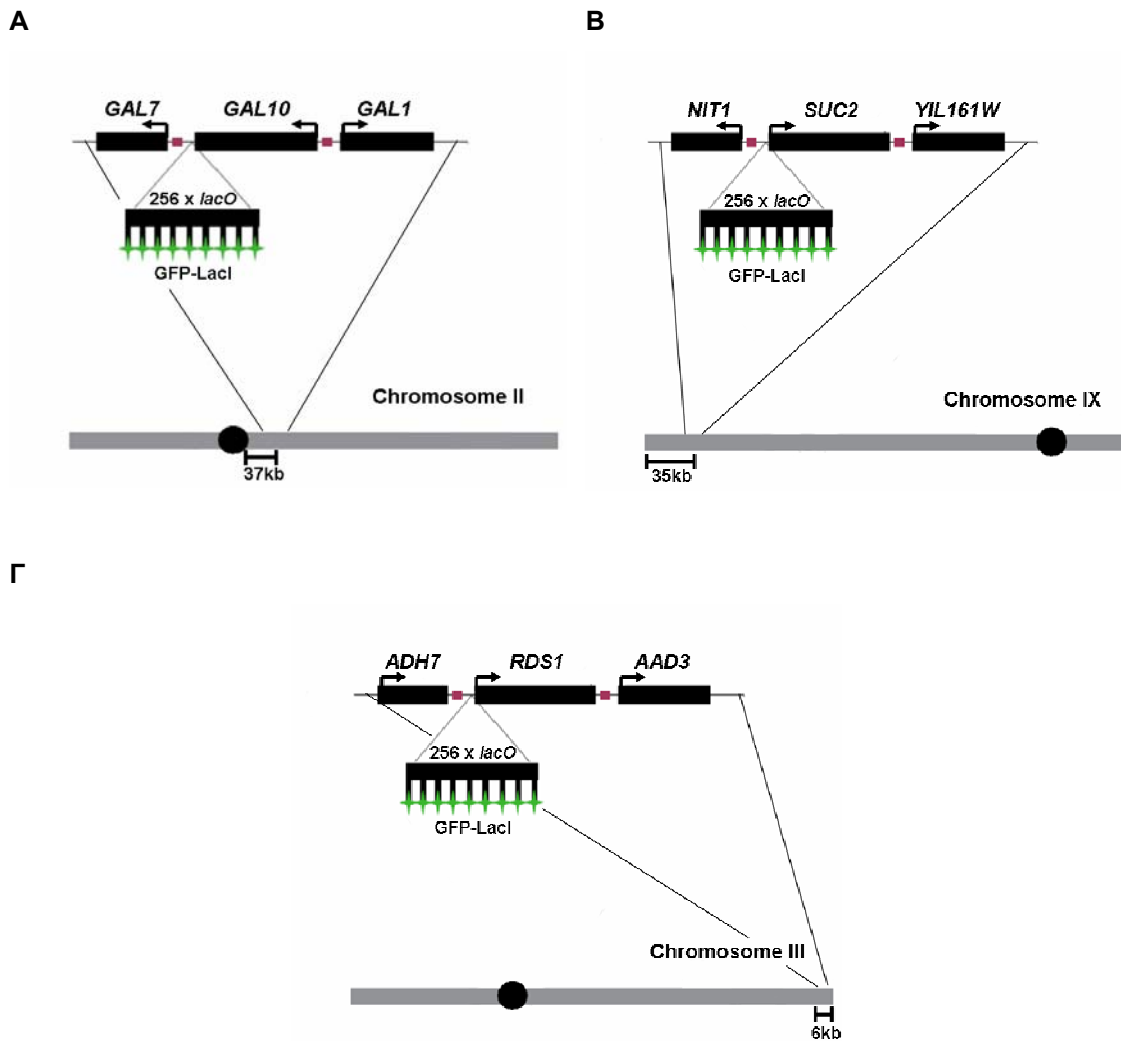
### 2.1 Παρακολούθηση της υποπυρηνικής τοποθέτησης του *GAL1-GAL10* γενετικού τόπου με συνεστιακή laser μικροσκοπία φθορισμού

Για να μελετηθεί η δυναμική της υποπυρηνική θέσης των γονιδίων *GAL1-GAL10* σε σχέση με τη μεταγραφή, ο γενετικός τους τόπος σημάνθηκε με GFP στο απλοειδές στέλεχος FT5 της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Για να επιτευχθεί αυτό, μεταξύ των γονιδίων *GAL7* και *GAL10* ενσωματώθηκε μια σειρά από 256 επαναλήψεις του *lac* χειριστή (*lacO*), συνεκφράζοντας ταυτόχρονα το χιμαιρικό καταστολέα GFP-LacI (Εικόνα 2.1.1A). Η πρόσδεση του καταστολέα κατά μήκος των επαναλήψεων *lacO*, επιτρέπει με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού την παρατήρηση του *GAL* γενετικού τόπου ως ένα πράσινο στίγμα (Εικόνα 2.1.2.B ή Γ).

Πιο συγκεκριμένα, η αλληλουχία μήκους 1 kb μεταξύ των γονιδίων *GAL7* και *GAL10* του χρωμοσώματος II με συντεταγμένες 275580 ως 276580 ενισχύθηκε με PCR από γενωμικό DNA και κλωνοποιήθηκε ως *BamHI/KpnI* ένθεμα στο πλασμίδιο pAFS059 (*stb12*) (ευγενική προσφορά της Debra Bressan [63])<sup>1</sup>. Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου p59G10 με *NcoI* κόβει το πλασμίδιο μοναδικά στο μέσο της 1 kb αλληλουχίας επιτρέποντας με ομόλογο ανασυνδυασμό τη στοχευμένη ενσωμάτωση των *lacO* επαναλήψεων στον *GAL* γενετικό τόπο, χωρίς να επηρεάζονται τα 5' και 3' ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων *GAL7* και *GAL10* αντίστοιχα (στέλεχος FG59, Εικόνα 2.1.2.B). Το πλασμίδιο pDB030 που κωδικοποιεί για τον GFP-LacI αναστολέα (ευγενική προσφορά της Debra Bressan [63]) είναι σχεδιασμένο, ώστε να εκφράζεται στη ζύμη μετά από ενσωμάτωση στο γενετικό τόπο *His3*. Καθώς το πατρικό στέλεχος FT5 είναι *his3Δ*, ως τόπος ενσωμάτωσης του pDB030 επιλέχθηκε το βακτηριακό γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη *AmpR* που βρίσκεται στο <sup>1</sup>πλασμίδιο p59G10 που είναι ενσωματωμένο στον *GAL* γενετικό τόπο. Ακολούθησε μερική παρασκευαστική πέψη του πλασμιδίου pDB030 με *ScaI* (αναγνωρίζει δυο θέσεις στο πλασμίδιο, εκ των οποίων η μια στο μέσο του γονιδίου *AmpR*) και

<sup>1</sup> Ο χειρισμός του πλασμιδίου pAFS059 και των πλασμιδίων που προέρχονται από αυτό έγινε σε βακτηριακά κύτταρα STBL2 τα οποία ανέχονται τις *lacO* επαναλήψεις χωρίς να τις αποκόπτουν από το πλασμίδιο με ανασυνδυασμό όπως τα DH5α [74].

καθαρίστηκαν τα μοναδικά κομμένα πλασμιδιακά μέρια για μετασχηματισμό του στελέχους FG59. Το στέλεχος που προέκυψε, FG5930 (Εικόνα 2.1.2.A), μετασχηματίστηκε με κατάλληλα σχεδιασμένη κασέτα με σκοπό τη σύζευξη της νουκλεοπορίνης Nur49 με GFP και κατ' επέκταση τη σήμανση του πυρηνικού φακέλου (στέλεχος FG5931).

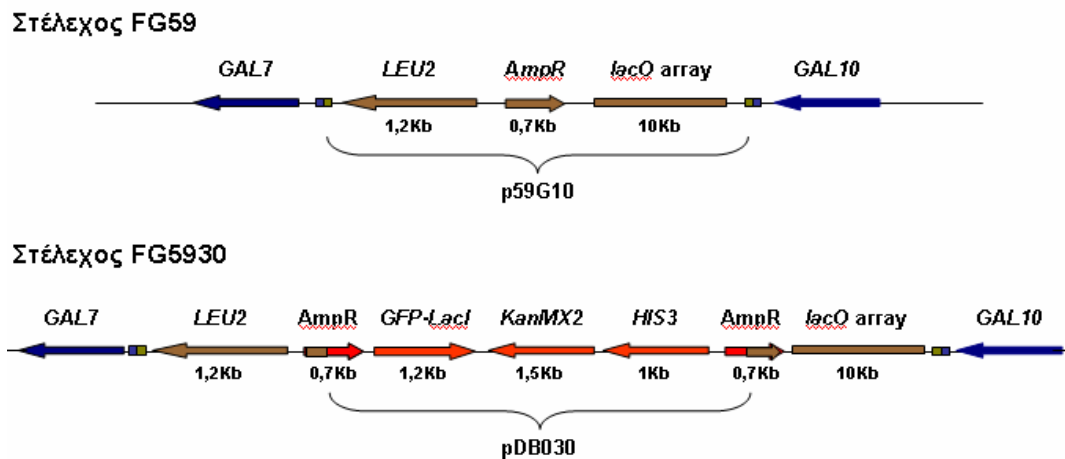


**Εικόνα 2.1.1** Α. Απεικόνιση της χρωμοσωμικής θέσης των γονιδίων *GAL* (Α), *SUC2* (Β) και *RDS1* (Γ) και της θέσης ενσωμάτωσης των *lacO* επαναλήψεων

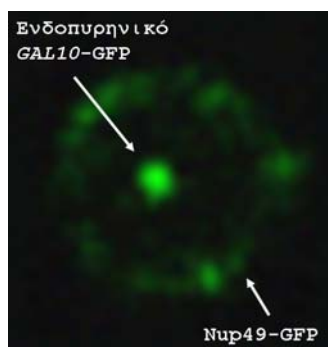
Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε για τη σήμανση με GFP των γονιδίων *SUC2* και *RDS1* (τελικά στελέχη FS5931 και FR5931 αντίστοιχα, (Εικόνα 2.1.B και Γ), μόνο που η περιοχή ομολογίας που κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pAFS059 για τη στοχευμένη ενσωμάτωση των *lacO* επαναλήψεων είχε συντεταγμένες 38900 ως 39900 στο χρωμόσωμα IX για το *SUC2* και 309700 ως

310700 στο χρωμόσωμα III για το *RDS1*. Επίσης τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια p59S2 και p59R1 έγιναν γραμμικά, πριν τη χρήση τους προς μετασχηματισμό, μετά από πέψη τους με *Sna*BI και *Nsi*II που κόβουν μοναδικά στο μέσο των περιοχών ομολογίας για το *SUC2* και το *RDS1* αντίστοιχα. Το *SUC2*, όπως τα *GAL1/10* γονίδια, είναι επίσης Mig1-Tup1-Ssn6 ρυθμιζόμενο [64], με τη διαφορά ότι η αποκαταστολή του απουσία γαλακτόζης είναι αρκετή για τη μεταγραφή του. Κατά συνέπεια μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο θετικό μάρτυρα περιπυρηνικής τοποθέτησης για τον έλεγχο της τοπολογίας των *GAL1/10* σε συνθήκες αποκαταστολής (πχ ανάπτυξη σε ραφινόζη). Το *RDS1* είναι το δεύτερο σε σειρά

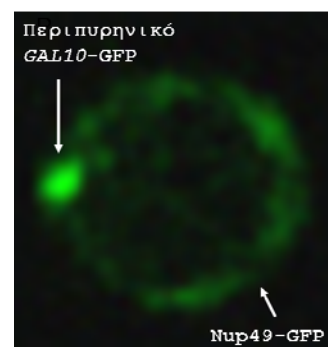
A



B



Γ



Εικόνα 2.1.2 Α. Απεικόνιση της θέσης και του προσανατολισμού των γονιδίων και αλληλουχιών που έχουν ενσωματωθεί μεταξύ των γονιδίων *GAL7* και *GAL1* στα στελέχη FG59 και FG5930 Β,Γ. Ενδεικτικοί πυρήνες για τους οποίους το *GAL10*-(*lacO*-*LacI*)-*GFP* στίγμα αξιολογήθηκε ως ενδο- και περι-πυρηνικό αντίστοιχα.

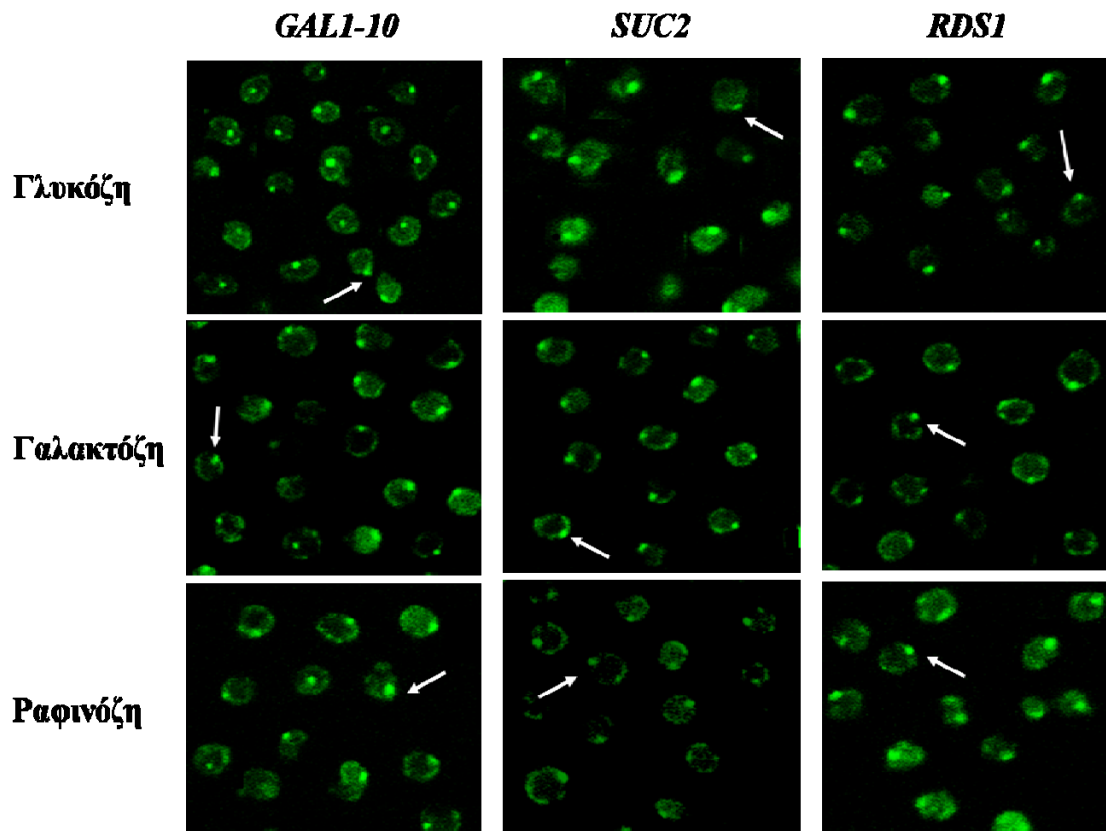
διαδοχής γονίδιο από το δεξί άκρο του χρωμοσώματος III. Επομένως αναμένεται να είναι διαρκώς περιπυρηνικό, καθώς τα τελομερή οργανώνονται στην πυρηνική περιφέρεια [65]. Επιπλέον το γονίδιο αυτό όπως πολλά άλλα υποτελομερικά (PAU) είναι Tur1 ρυθμιζόμενα [66], αφήνοντας έτσι ανοιχτό το ενδεχόμενο ο καταστολέας αυτός με κάποιο τρόπο να συμμετέχει στην περιπυρηνική τους στόχευση.

Για την εκτίμηση της θέσης (ενδο- ή περι-πυρηνικής) των GFP σημασμένων γενετικών τόπων *GAL1/10*, *SUC2* και *RDS1* συλλέχθηκαν με συνεστιακή laser μικροσκοπία z τομές πυρήνων, στις οποίες ο σημασμένος πυρηνικός φάκελος (Nup49-GFP) ήταν στο ίδιο επίπεδο με το γονιδιακό στίγμα. Στίγματα πυρηνικών τομών που δεν εμφάνιζαν καμία επικάλυψη με τον πυρηνικό φάκελο θεωρήθηκαν ενδοπυρηνικά (Εικόνα 2.1.2.B) ενώ στίγματα που διαπερνούσε ο πυρηνικός φάκελος θεωρήθηκαν περιπυρηνικά (Εικόνα 2.1.2.Γ).

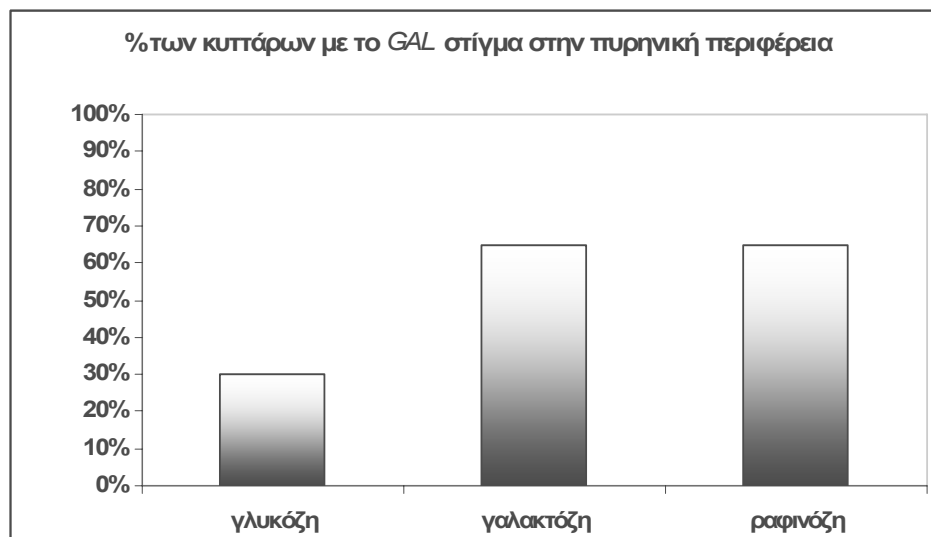
## **2.2 Υποπυρηνική εντόπιση των γονιδίων *GAL1/10*, *SUC2* και *RDS1* σε διάφορες πηγές άνθρακα.**

Αποικίες από τα στελέχη FG5931, FS5931 και FR5931 αναπτύχθηκαν ολονύκτια σε πλήρες θρεπτικό μέσο (YEP) με πηγές άνθρακα γλυκόζη (καταστολή), γαλακτόζη (επαγωγή-έκφραση) και ραφινόζη (αποκαταστολή) και στη συνέχεια ανακαλλιεργήθηκαν στα ίδια θρεπτικά μέσα μέχρι το μέσο της λογαριθμικής τους αύξησης. Περίπου 400 κύτταρα μετρήθηκαν για κάθε στέλεχος και για κάθε συνθήκη ως προς την υποπυρηνική θέση των σημασμένων γονιδίων. Η θέση των *GAL1/10* γονιδίων βρέθηκε περιπυρηνική σε ποσοστό ~30% των μετρούμενων κυττάρων σε γλυκόζη, ~65% σε γαλακτόζη και επίσης ~65% σε ραφινόζη (Εικόνα 2.2 A και B). Το ίδιο ποσοστό βρέθηκε και σε θρεπτικό μέσο πολύ χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (0,05% αντί για 2%) επιβεβαιώνοντας ότι το παρατηρούμενο αποτέλεσμα σε ραφινόζη είναι εξαιτίας της απουσίας γλυκόζης (δεν παρουσιάζεται). Κατά συνέπεια η αποκαταστολή των *GAL1/10* γονιδίων απουσία γλυκόζης επαρκεί για τη μετατόπισή τους προς την πυρηνική περιφέρεια, υποδεικνύοντας ότι το επαγωγικό σινιάλο της γαλακτόζης και κατ' επέκταση η μεταγραφή τους δεν απαιτούνται για τη μετατόπιση τους αυτή.

A



B



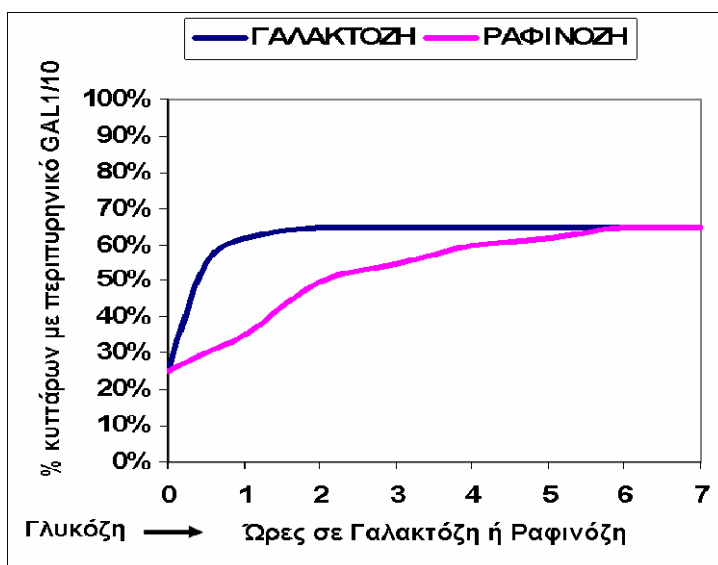
**Εικόνα 2.2 Α.** Ενδεικτικές Z τομές συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού όπου φαίνεται η υποπυρηνική κατανομή των σημασμένων με GFP *GAL1/10*, *SUC2* και *RDS1* γονιδίων σε θρεπτικό μέσο με γλυκόζη, γαλακτόζη και ραφινόζη ως πηγές άνθρακα **Β.** Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των *GAL* σημασμένων γενετικών τόπων που βρέθηκαν να συμπίπτουν με την πυρηνική περιφέρεια.

Τα γονίδια *SUC2* και *RDS1* επιδεικνύουν περιπυρηνική κατανομή σε ποσοστό >90% των κυττάρων σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες (δεν παρουσιάζεται). Κάτι τέτοιο αναμενόταν για το *RDS1* όχι όμως για το *SUC2* που μάλλον ερμηνεύεται από το ότι η εγγύτητα του *SUC2* (35 kb) στο αριστερό τελομερές του χρωμοσώματος IX εξασφαλίζει τη σταθερή του στόχευση στην πυρηνική περιφέρεια ανεξάρτητα της μεταγραφικής του κατάστασης.

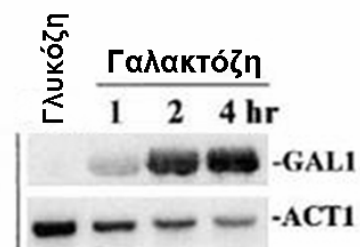
### 2.3 Κινητική της στόχευσης/απομάκρυνσης των *GAL1/10* γονιδίων από την πυρηνική περιφέρεια

Κατά το πέρασμα από θρεπτικό μέσο με γλυκόζη σε γαλακτόζη απαιτούνται περισσότερο από τρεις ώρες, ώστε η έκφραση του γονιδίου *GAL1* να φτάσει στο μέγιστο επίπεδο, όπως μπορεί να ελεγχτεί με ανάλυση κατά Northern. Μισή με μια ώρα όμως επαγωγής αρκεί για να σημειωθεί η μέγιστη περιπυρηνική κατανομή του *GAL1/10* στίγματος (65% των κυττάρων), διάστημα στο οποίο είναι γνωστό ότι ελάχιστο *GAL1* mRNA έχει συσσωρευτεί (Εικόνα 2.3 A και B) [67]. Για να σημειωθεί η αντίστοιχη κατανομή κατά το πέρασμα από γλυκόζη σε ραφινόζη απαιτούνται 5-6 ώρες. Επομένως, η κινητική της στόχευσης στην πυρηνική περιφέρεια προηγείται της κινητικής της μεταγραφής σε συνθήκες επαγωγής.

A

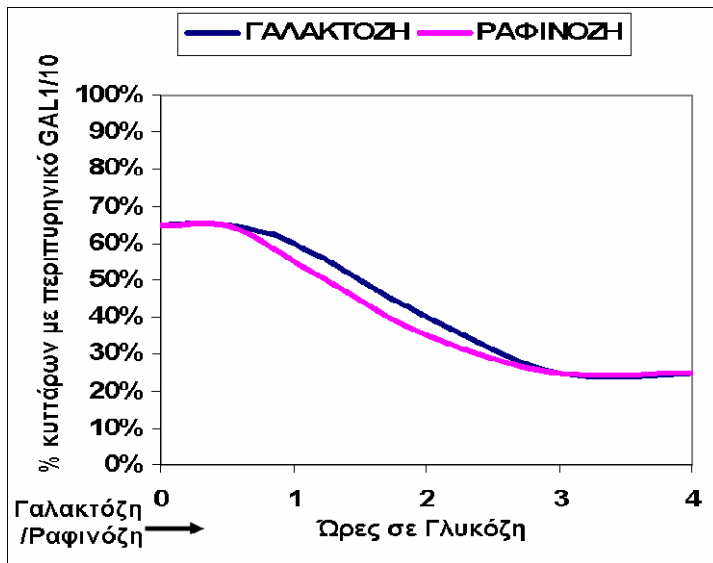


B



Προσαρμοσμένη από Gligoris *et al.*, 2006

Γ



Δ



Προσαρμοσμένη από Gligoris *et al.*, 2006 [67]

**Εικόνα 2.3.** Κινητική της περιπυρηνικής κατανομής και της μεταγραφής των *GAL* σημασμένων γενετικών τόπων σε συνάρτηση με το χρόνο κατά το πέρασμα από θρεπτικό μέσο με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα σε γαλακτόζη ή ραφινόζη (Α, Β) και το αντίστροφο (Γ, Δ)

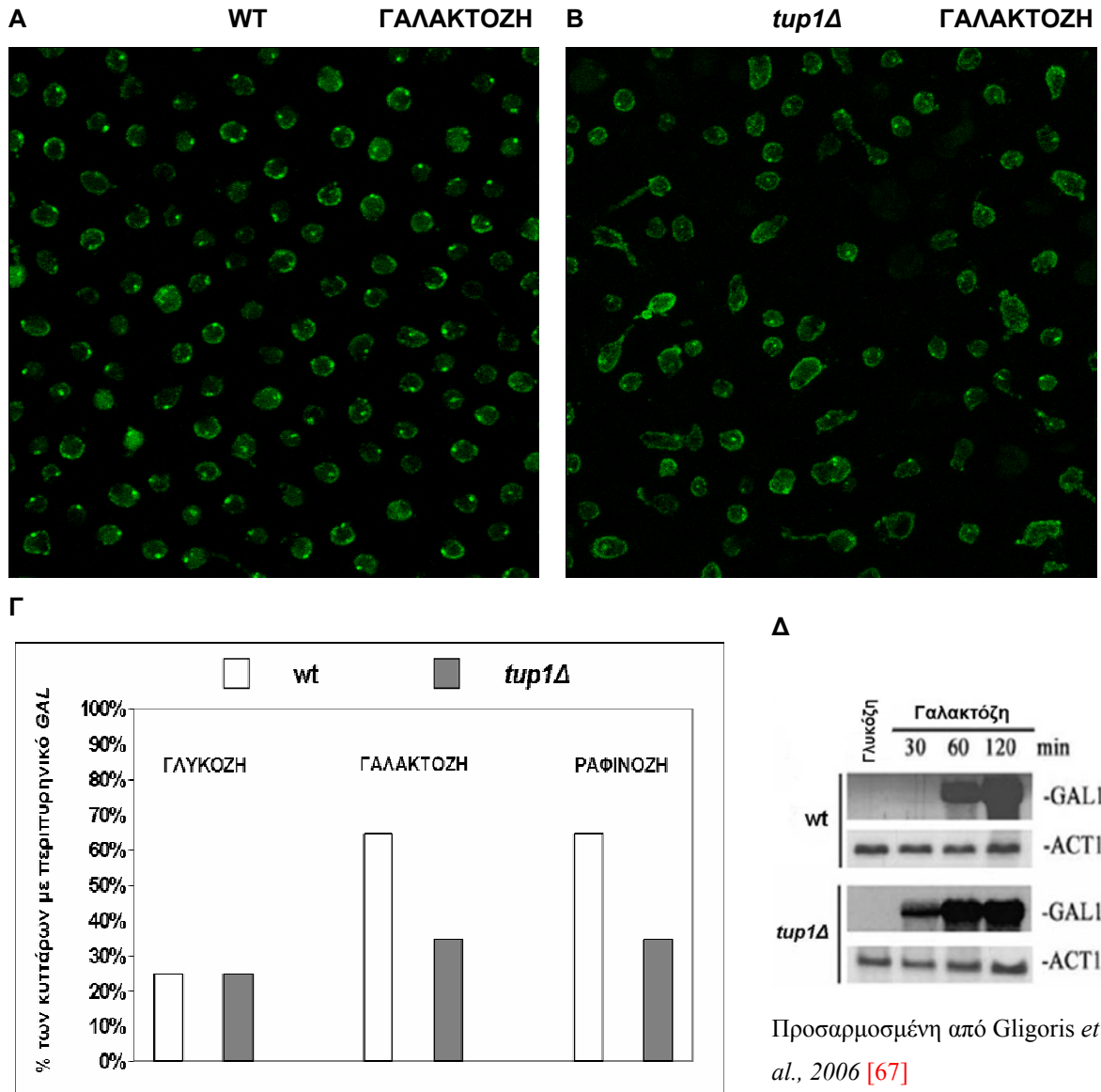
ενώ διαφαίνεται ότι και η επαγωγή (Gal4 μεσολαβούμενο μονοπάτι ενεργοποίησης), εκτός της αποκαταστολής, συνεισφέρει στην μετατόπιση των *GAL1/10* στην πυρηνική περιφέρεια.

Κατά το πέρασμα από θρεπτικό μέσο με γαλακτόζη σε γλυκόζη, έχει βρεθεί ότι το *GAL1* mRNA παύει να ανιχνεύεται μέσα σε 10 λεπτά [67]. Η παραμονή τους όμως στην πυρηνική περιφέρεια εξακολουθεί ακόμη και μετά από μίση ώρα παραμονής σε γλυκόζη, ενώ ανακτά πλήρως τυχαία ενδοπυρηνική κατανομή μετά το πέρασμα ~3 ωρών (Εικόνα 2.3 Γ και Δ).

#### 2.4 Αναζήτηση παραγόντων που επηρεάζουν την υποπυρηνική τοπολογία των *GAL1/10* γονιδίων

Σε συνθήκες αποκαταστολής από γλυκόζη (ραφινόζη/γαλακτόζη), η κινάση Snf1 φωσφορυλιώνει τον καταστολέα Mig1 με αποτέλεσμα την έξοδο από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα των μη προσδεδεδμένων στο DNA Mig1 μορίων, μέσω της εξπορτίνης Msn5 [68]. Η φωσφορυλίωση του προσδεδεδμένου Mig1 στον υποκινητή *GAL1/10* δεν οδηγεί στην αποδέσμευση του [57],

υποδεικνύοντας ότι ίσως το σύμπλοκο Mig1-Msn5 είναι αυτό που μεσολαβεί στη στρατολόγηση του *GAL1/10* γενετικού τόπου στους πυρηνικούς πόρους σε συνθήκες αποκαταστολής (ραφινόζη) ή και επαγωγής-έκφρασης (γαλακτόζη). Παρόλο αυτά βρέθηκε ότι η απουσία του Mig1 (στέλεχος FG5931-*Mig1Δ*) δεν επηρεάζει την περιπυρηνική κατανομή των *GAL1/10* γονιδίων στις συνθήκες αυτές (δεν παρουσιάζεται).



**Εικόνα 2.4.** Ενδεικτικές Z τομές συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού όπου φαίνεται η υποπυρηνική κατανομή του σημασμένου με GFP *GAL1/10* γενετικού τόπου σε θρεπτικό μέσο με γαλακτόζη ως πηγή άνθρακα σε ένα WT (**A**) και σε ένα *tup1Δ* (**B**) στέλεχος. **Γ.** Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των *GAL* σημασμένων γενετικών τόπων που βρέθηκαν να συμπίπτουν με την πυρηνική περιφέρεια σε ένα wt και σε ένα *tup1Δ* στέλεχος σε θρεπτικό μέσο με γλυκόζη, γαλακτόζη και ραφινόζη ως πηγή άνθρακα. **Δ.**



Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα πρόσφατης ερευνητικής εργασίας που δείχνουν ότι σε θρεπτικό μέσο με γαλακτόζη δεν παρατηρείται άρση της αλληλεπίδραση της νουκλεοπορίνης Nur2 με τον υποκινητή *GAL1/10* σε ένα *Mid1Δ* στέλεχος [33].

Ο Tur1 συν-καταστολέας επίσης είναι προσδεμένος στον υποκινητή των γονιδίων αυτών σε συνθήκες αποκαταστολής, χωρίς όμως να αλληλεπιδρά με το φωσφορυλιωμένο Mig1 για να ασκήσουν από κοινού καταστολή [57,62]. Μάλιστα πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο Tur1 στις συνθήκες αυτές αναλαμβάνει πλέον συνενεργοποιητική δράση για να αναιρέσει την καταστολή που είχε επιβάλλει σε γλυκόζη [61,62,69]. Ελλείψει του Tur1, (στέλεχος FG5931-*Tur1Δ*) η περιπυρηνική κατανομή του *GAL1/10* γενετικού τόπου ελαττώνεται δραματικά (από 65% σε 40% των κυττάρων) τόσο σε θρεπτικό μέσο με ραφινόζη (αποκαταστολή, δεν παρουσιάζεται) όσο και με γαλακτόζη (επαγωγή) (Εικόνα 2.4 Α-Γ). Από την άλλη πλευρά είναι γνωστό ότι η μεταγραφή των *GAL1/10* γονιδίων σε γαλακτόζη σε ένα *tur1Δ* στέλεχος όχι μόνο δεν ελαττώνεται αλλά επάγεται πιο γρήγορα (Εικόνα 2.4 Δ) [62,67], υποδεικνύοντας ότι η έκφραση τους δεν εξαρτάται από την παρουσία τους στην πυρηνική περιφέρεια.

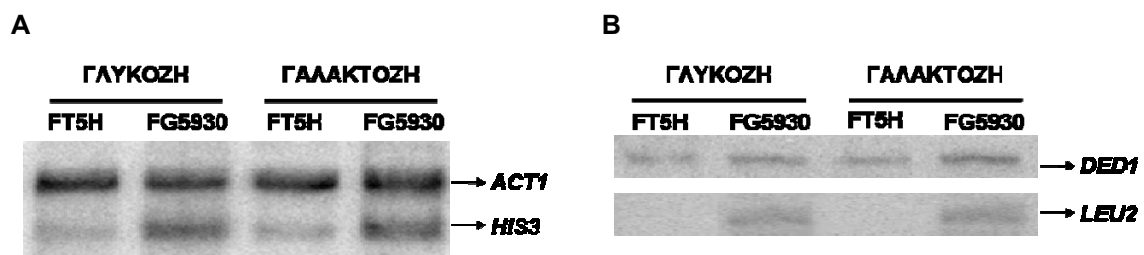
Όσον αφορά τα γονίδια *SUC2* και *RDS1* αυτά εξακολουθούν να επιδεικνύουν σταθερή περιπυρηνική εντόπιση ακόμη και σε ένα *tur1Δ* στέλεχος, υποδηλώντας ότι ο Tur1 δεν είναι απαραίτητος για την πρόσδεση υποτελομερικών γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια.

## **2.5 Συσχέτιση της μεταγραφής ενός εκφραζόμενου γονιδίου αναφοράς με την υποπυρηνική του εντόπιση**

Τα γονίδια *HIS3* και *LEU2* των πλασμιδίων pDB030 και p59G10 που έχουν ενσωματωθεί στον *GAL* γενετικό τόπο στο στέλεχος FG5930 (Εικόνα 2.1.2 Α) ακολουθούν την υποπυρηνική εντόπιση των *GAL1/10* χωρίς όμως να ρυθμίζονται από γαλακτόζη ή γλυκόζη. Εφόσον τα *GAL* γονίδια σε συνθήκες επαγωγής στοχεύονται στην πυρηνική περιφέρεια για να βρεθούν σε ένα μεταγραφικά πιο επιτρεπτό / ευνοϊκό υποπεριβάλλον, τότε θα περίμενε κανείς ότι κάτι τέτοιο θα επηρέαζε θετικά την έκφραση των *HIS3* και *LEU2*. Παρόλο αυτά, όπως δείχθηκε με ανάλυση κατά Northern, τα επίπεδα έκφρασης και των δυο γονιδίων σε γαλακτόζη παραμένουν παρόμοια με αυτά σε γλυκόζη (Εικόνα 2.5 Α

και B). Κάτι τέτοιο ασφαλώς δεν αποκλείει κάποια συνεισφορά της πυρηνικής περιφέρειας στη μεταγραφή, αλλά προτείνει ότι αυτή η συνεισφορά δεν ανάγεται σε μια γενικά αυξημένη διαθεσιμότητα μεταγραφικών συμπλόκων ή προτείνει ότι αν αυτή η διαθεσιμότητα υφίσταται, η μεταγραφική ρύθμιση των *HIS3* και *LEU2* δεν είναι σε θέση να την αφομοιώσει.

Αξιοσημείωτο ωστόσο είναι το γεγονός ότι το γονίδιο *HIS3* εκφράζεται πολύ περισσότερο (ανεξαρτήτως πηγής άνθρακα) στην χρωμοσωμική θέση του FG5930 στελέχους από ότι στον ενδογενή γενετικό του τόπο στο FT5H στέλεχος. Άγνωστο παραμένει αν αυτό αποτελεί τοπολογική επίδραση (position effect) του *GAL* γενετικού τόπου ή κάποιου από τα στοιχεία της τεχνητής κασέτας γονιδίων και αλληλουχιών που έχουν εισαχθεί μεταξύ των γονιδίων *GAL7* και *GAL10*. Για το *LEU2* δεν ελέγχθηκε αν υπήρχε αντίστοιχη επίδραση, καθώς δεν υπήρχε διαθέσιμο στέλεχος που να εκφράζει *LEU2* mRNA από τον ενδογενή του τόπο.



**Εικόνα 2.5 A.** Ολικό mRNA απομονώθηκε από τα στελέχη FT5H και FG5930 σε συνθήκες ανάπτυξης με γλυκόζη ή γαλακτόζη ως πηγή άνθρακα, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη Nylon και υβριδοποιήθηκε με ραδιοενεργό ανιχνευτή ειδικό για το γονίδιο *HIS3* και για το συστατικά εκφραζόμενο γονίδιο *ACT1*. **B.** Ίδιο με το A μόνο που η υβριδοποίηση έγινε για το *LEU2* και το συστατικά εκφραζόμενο γονίδιο *DED1*. Το FT5H στέλεχος δεν εκφράζει *LEU2* mRNA.

### 3. Συζήτηση

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε το φαινόμενο της αυξημένης εντόπισης στην πυρηνική περιφέρεια επαγόμενων γονιδίων σε συνθήκες μεταγραφικής ενεργοποίησης. Ως πρότυπο σύστημα τέτοιων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το σύμπλεγμα των γονιδίων *GAL1* και *GAL10*, τα οποία διαθέτουν κοινή ρυθμιστική περιοχή. Για τα συγκεκριμένα γονίδια δείχθηκε ότι η περιπυρηνική στόχευσή τους δεν εξαρτάται από την έκφρασή τους, αλλά ούτε είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή τους. Μάλιστα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποστηρίζουν ότι μάλλον η *Tup1* μεσολαβούμενη αποκαταστολή από γλυκόζη παρά η μεταγραφική ενεργοποίηση είναι αυτή που απαιτείται για την μετατόπισή τους προς την πυρηνική περιφέρεια.

#### 3.1 Η μεταγραφή δεν καθορίζει την υποπυρηνική θέση των *GAL1/10* γονιδίων

Ειδικότερα, συνθήκες αποκαταστολής από γλυκόζη απουσία γαλακτόζης (ανάπτυξη σε ραφινόζη), όπου τα *GAL1/10* γονίδια δεν εκφράζονται, επαρκούν για να μεταβληθεί η εντόπισή τους από τυχαία ενδοπυρηνική σε περιπυρηνική. Στην ίδια κατεύθυνση, πειράματα κινητικής έδειξαν ότι κατά το πέρασμα από θρεπτικό μέσο με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα σε γαλακτόζη, το ποσοστό των κυττάρων όπου το *GAL1/10*-GFP στίγμα επιδεικνύει περιπυρηνική κατανομή φτάνει στο μέγιστο δυνατό επίπεδο (65%) σε χρονικό διάστημα στο οποίο είναι γνωστό ότι ελάχιστο *GAL1* mRNA έχει συσσωρευτεί [62, 69]. Από την άλλη πλευρά κατά το πέρασμα από γαλακτόζη σε γλυκόζη το ποσοστό αυτό διατηρείται για αρκετό διάστημα, για το οποίο έχει βρεθεί ότι *GAL1* mRNA δεν ανιχνεύεται πλέον [69].

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία σε θρεπτικό μέσο με γαλακτόζη δεν παρατηρήθηκε άρση της αλληλεπίδραση της νουκλεοπορίνης *Nup2* με τον υποκινητή *GAL1/10* σε ένα *spt20Δ* στέλεχος, όπου το σύμπλοκο ακετυλίωσης ιστονών SAGA αποσυνκροτείται και ως εκ τούτου το γονίδιο *GAL1* σταματά να εκφράζεται [33]. Επίσης στις ίδιες συνθήκες έχειδειχθεί για το γονίδιο *GAL2* ότι η

περιπυρηνική του εντόπιση δεν επηρεάζεται ακόμα κι όταν απουσιάζει η κωδική του αλληλουχία, οπότε η μεταγραφή μειώνεται κατά 90%, ενώ δραματικά ελαττώνεται όταν απουσιάζει ο υποκινητής του [29]. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση των GAL γονιδίων είναι απαραίτητη για τη στόχευσή τους στην πυρηνική περιφέρεια κι όχι αυτή κάθε αυτή η έκφρασή τους, χωρίς όμως να έχει ελεγχθεί ποια είναι η υποπυρηνική τους κατανομή, σε συνθήκες αποκαταστολής από γλυκόζη απουσία γαλακτόζης, όπου δεν υφίσταται ενεργοποίηση. Τα αποτελέσματα ωστόσο που παρουσιάζονται εδώ προτείνουν ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση των GAL1/10 γονιδίων συνεισφέρει κινητικά στη στόχευσή τους στην πυρηνική περιφέρεια, κατά το πέρασμα από συνθήκες καταστολής σε επαγωγής, αλλά δεν είναι απαραίτητη, αφού η αποκαταστολή τους μόνο αρκεί αν και με κάποια χρονική υστέρηση. Πέρα όμως από ικανή είναι και αναγκαία η αποκαταστολή για την περιπυρηνική εντόπιση των γονιδίων αυτών. Κάτι τέτοιο θα ίσχυε αν η εντόπισή τους παρέμενε ενδοπυρηνική σε γλυκόζη (καταστολή) σε ένα στέλεχος με συστατικά ενεργό το Gal4 μεσολαβούμενο μονοπάτι επαγωγής<sup>2</sup>.

Αν η καταστολή είναι αυτή που επιβάλλει στα γονίδια GAL1/10 να περιπλανιούνται τυχαία στον πυρήνα, τότε θα περίμενε κανείς ελλείψει των καταστολέων μέσω των οποίων αυτή μεσολαβείτε, τα γονίδια να στοχεύονται στην πυρηνική περιφέρεια, όπως έχει δειχθεί για τα γονίδια *INO1* και *HXK1* [24,28]. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε για τον Mig1, ίσως γιατί η καταστολή επιτυγχάνεται και με Mig1 ανεξάρτητους τρόπους [70-72]. Ο συνκαταστολέας Tup1 δεν βρέθηκε να είναι αναγκαίος για την τυχαία ενδοπυρηνική κατανομή των γονιδίων GAL1/10 σε γλυκόζη, αλλά αντίθετα απαραίτητος για την περιπυρηνική τους στόχευση σε ραφινόζη ή γαλακτόζη. Κάτι τέτοιο συμβαδίζει με τη συνενεργοποιητική δράση που επιδεικνύει ο Tup1 σε συνθήκες αποκαταστολής [61,62,69]. Ειδικότερα σε γαλακτόζη το ίδιο το σύμπλοκο Tup1-Ssn6, μέσω της πρωτεΐνης Cti6, στρατολογεί στον υποκινητή GAL1/10 το συνενεργοποιητικό σύμπλοκο SAGA για να εξουδετερώσει την καταστολή που είχε επιβάλλει σε γλυκόζη. Επιπλέον, η υπομονάδα Sus1 του συμπλόκου SAGA έχει βρεθεί να

---

<sup>2</sup> Η μελέτη του επαγωγικού μονοπατιού της γαλακτόζης παρουσία καταστολής από γλυκόζη δεν μπορεί να μελετηθεί απλά προσθέτοντας σε θρεπτικό μέσο με γλυκόζη γαλακτόζη για οι θετικοί ρυθμιστές Gal3 και Gal4 υπόκεινται σε καταστολή από γλυκόζη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται στέλεχος που απουσιάζει ο καταστολέας Gal80 (*gal89Δ*) και εκφράζει τον Gal4 υπό τον έλεγχο ενός υψηλά εκφραζόμενου υποκινητή (πχ *ADHI*).

αλληλεπιδρά με το περιπυρηνικό σύμπλοκο mRNA πυρηνικής εξόδου Sac3-Thr1 [45], καθιστώντας την πρωτεΐνη αυτή τον επόμενο υποψήφιο, μετά τον Tur1, μεσολαβητικό κρίκο στόχευσης των *GAL1/10* γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια. Όμως ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον καθορισμό της υποπυρηνικής θέσης των γονιδίων αυτών παραμένει συγκεχυμένος καθώς έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τη στόχευση του *GAL1/10*-GFP στίγματος στην πυρηνική περιφέρεια [30] αλλά όχι την αλληλεπίδραση της νουκλεοπορίνης Nur2 με τον *GAL1-10* υποκινητή [33]. Πάντως υπό το πρίσμα των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται εδώ, ο Tur1 δε φαίνεται να ασκεί τη δράση του στην περιπυρηνική στόχευση των γονιδίων *GAL1/10* μέσω του συμπλόκου SAGA, καθώς το σύμπλοκο αυτό στρατολογείται στον *GAL1/10* υποκινητή ακόμη και απουσία του Tur1, μέσω του ενεργοποιημένου από γαλακτόζη Gal4 μονοπατιού επαγωγής (η πρωτεΐνη Cti6 είναι απαραίτητος για τη στρατολόγησή του μόνο παρουσία του συνκαταστολέα Tur1-Ssn6 [62]). Επίσης είναι γνωστό ότι σε ραφινόζη, όπου ο Tur1 είναι απαραίτητος για τη μετατόπιση των γονιδίων *GAL1/10* στην πυρηνική περιφέρεια, το σύμπλοκο SAGA δεν στρατολογείται στον υποκινητή τους [53].

Είναι εντυπωσιακό ότι το Gal4 μεσολαβούμενο μονοπάτι ενεργοποίησης αν και ικανό να επάγει την έκφραση των *GAL1/10* γονιδίων απουσία του συνενεργοποιητικού τρόπου δράσης του Tur1 δεν καταφέρνει το ίδιο για τη στόχευσή τους στην πυρηνική περιφέρεια. Άγνωστο εν πολλοίς παραμένει πώς ο Tur1 δρα σε συνθήκες αποκαταστολής, και αν ρόλος του δεν περιορίζεται μόνο στο να αναιρέσει την καταστολή του αλλά και στο να μεσολαβήσει σε επιπλέον γεγονότα τα οποία αν και δεν γίνονται πάντα αισθητά στο επίπεδο της έκφρασης των Tur1 ρυθμιζόμενων γονιδίων όταν απουσιάζει (*GAL1/10* για παράδειγμα σε αντίθεση με *GRE2* [69]), είναι απαραίτητα για την περιπυρηνική τους στόχευση. Αινιγματικό ωστόσο παραμένει το ποια είναι τα γεγονότα αυτά, αν αφορούν αλληλεπιδράσεις με υπομονάδες του συμπλόκου μεσολαβητή (Mediator), τη χρωματινική κατάσταση των γονιδίων αυτών κτλ. Το γεγονός ότι ο Tur1 είναι αναγκαίος για την περιπυρηνική εντόπιση των γονιδίων *GAL1/10* σε ραφινόζη και γαλακτόζη δεν σημαίνει ότι είναι και ικανός για κάτι τέτοιο. Σε ραφινόζη η στρατολόγησή του ενεργοποιητή Gal4 αυξάνει κατά πολύ στον υποκινητή των γονιδίων αυτών [52]. Το ότι σε αυτές τις συνθήκες ο Gal4 δεν είναι ενεργός για μεταγραφική επαγωγή, λόγω της Gal80 καταστολής, δεν αποκλείει κάποια

αμοιβαία συνεργασία με τον *Tup1* στην στόχευση των γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια. Ένα τέτοιο σενάριο συμφωνεί με την αναγκαιότητα του *Gal4* για την αλληλεπίδραση της νουκλεοπορίνης *Nup2* με τον *GAL1/10* υποκινητή σε γαλακτόζη [33].

### 3.2 Η περιπυρηνική μετατόπιση των *GAL1/10* γονιδίων δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή τους

Όσον αφορά τη βιολογική σημασία της εντόπισης στην πυρηνική περιφέρεια των ενεργοποιημένων *GAL1/10* τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας υποδεικνύουν ότι δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή τους καθώς σε ένα *tup1Δ* στέλεχος, όπου η εντόπιση τους αυτή σχεδόν χάνεται, είναι γνωστό ότι η μεταγραφή τους όχι μόνο δεν ελαττώνεται αλλά επάγεται πιο γρήγορα [62,69]. Βέβαια κάτι τέτοιο δεν αποκλείει κάποια συνεισφορά της πυρηνικής περιφέρειας στη μεταγραφή τους. Η απουσία της όμως, τουλάχιστον κατά την επαγωγή, δύσκολα μπορεί να γίνει αισθητή σε ένα *tup1Δ* στέλεχος, λόγω του μεταγραφικού πλεονεκτήματος που προσδίδει η απουσία *Tup1* καταστολής σε γλυκόζη [62,69]. Η έλλειψη άλλων παραγόντων που έχουν βρεθεί να είναι σημαντικοί για την περιπυρηνική στόχευση των *GAL1/10* γονιδίων, είτε επιδρά αρνητικά (*Sac3*, *Sus1*, *Mex67* [29,30]), είτε δεν επιδρά καθόλου (*Ada2*, *Nup1* [30]) στην έκφρασή τους. Το γεγονός ότι ισχύει το δεύτερο υποδεικνύει ότι το πρώτο μάλλον οφείλεται σε πρόσθετους ρόλους των πρωτεϊνών *Sac3*, *Sus1* και *Mex67* στην έκφραση των γονιδίων αυτών (επεξεργασία, σταθερότητα, έξοδο των mRNA μορίων) παρά σε αυτή κάθε αυτή τη συμμετοχή τους στη ρύθμιση της τοπολογίας τους. Υπέρ της μη ύπαρξης σημαντικής συμμετοχής της πυρηνικής περιφέρειας στη μεταγραφή συνηγορεί και η διαπίστωση ότι η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *HIS3*, όταν ενσωματωθεί στον *GAL* γενετικό τόπο, δεν αυξάνει σε γαλακτόζη αν και το γονίδιο εντοπίζεται στην πυρηνική περιφέρεια στις συνθήκες αυτές. Πάντως για τα γονίδια *HXK1* και *INO1* έχει βρεθεί ότι η τεχνητή πρόσδεσή τους στην πυρηνική περιφέρεια αυξάνει τη μεταγραφή τους σε συνθήκες επαγωγής [24,28]. Τέτοια πειράματα όμως απέχουν μακράν από την *in vivo* κατάσταση, όπου η στόχευση των επαγόμενων γονιδίων στην πυρηνική περιφέρεια είναι δυναμική, ποτέ στατική, και μπορεί να αφορά άλλους στόχους του πυρηνικού φακέλου από αυτούς που επιλέχθηκαν για αγκυροβόληση.

Ίσως η συμβολή της περιπυρηνικής εντόπισης μεταγραφικά ενεργών γονιδίων στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι πιο αισθητή στη σύνθεση του τελικού πρωτεϊνικού προϊόντος. Ένα γονίδιο που βρίσκεται κοντά στους πυρηνικούς πόρους εξασφαλίζει για το mRNA του λιγότερο χρόνο παραμονής στον πυρήνα και κατ' επέκταση περισσότερο χρόνο διάθεσης στα ριβοσωμάτα για πρωτεϊνοσύνθεση [34]. Από την άλλη πλευρά μπορεί οι πυρηνικοί πόροι να μονώνουν τα μεταγραφικά ενεργά γονίδια ώστε να μην επηρεάζονται γειτονικά γονίδια που ακολουθούν διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση. Πολλά μπορούν να προταθούν, το ποια ισχύουν αναμένεται να απαντήσει η συστηματική έρευνα στο πεδίο αυτό.

## 4. Υλικά και μέθοδοι

### 4.1 Υλικά

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες SIGMA, MERCK και FMC Bioproducts. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, τα ένζυμα τροποποίησης και πολυμερισμού του DNA προήλθαν από τις εταιρίες MINOTECH, NEW ENGLAND BIOLABS. Η μεταφορά ολικού RNA έγινε σε μεμβράνες νάιλον SuperCharge Nitran (Schleicher and Schuell).

#### 4.1.2 Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης

Τα θρεπτικά μέσα, υγρά και στερεά, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών (LB) αλλά και των στελεχών ζύμης (MIN, YEP) καθώς και τα διαλύματα αντιβιοτικών (αμπικιλίνη, καναμυκίνη), κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγχειριδίων *Current Protocols in Molecular Biology* [73] και *Molecular Cloning* [74]. Οι οδηγίες για την παρασκευή των διαλυμάτων αμινοξέων αναφέρονται στο *Guide to yeast Genetics and Molecular Biology* [75].

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τη καταστολή των *GAL1/10* γονιδίων ήταν YEPD (2% γλυκόζη), για την αποκαταστολή YEPR (2% ραφινόζη) ή YEPLD (0,05% γλυκόζη) και για την επαγωγή YPEG (2% γαλακτόζη). Μοναδικές αποικίες στελεχών ζύμης αφέθηκαν να αναπτυχθούν ολονύκτια στους 30°C στις 220 rpm στο επιθυμητό θρεπτικό υπόστρωμα και ανακαλλιεργήθηκαν σε αντίστοιχο φρέσκο υπόστρωμα μέχρι  $OD_{550nm} \sim 0,5$ . Για τα πειράματα κινητικής καλλιέργειας κυττάρων  $OD_{550nm} \sim 0,3$ , προτού μεταφερθούν από το ένα υπόστρωμα στο άλλο, ξεπλύθηκαν 1 φορά με αποσταγμένο νερό και παρέμειναν για 10 min σε YEP.



#### 4.1.3 Πίνακας πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν

Φορέας	Χρησιμότητα
pDB030	Εκφράζει το χιμαιρικό καταστολέα GFP-LacI [63]
pAFS059	Φέρει 256 <i>lacO</i> επαναλήψεις [63]
p59G10	Ανασυνδυασμένη έκδοχή του pAFS059 για ενσωμάτωση στο 3' άκρο του <i>GAL10</i> γονιδίου
p59S2	Ανασυνδυασμένη έκδοχή του pAFS059 για ενσωμάτωση στο 3' άκρο του <i>SUC2</i> γονιδίου
p59R1	Ανασυνδυασμένη έκδοχή του pAFS059 για ενσωμάτωση στο 3' άκρο του <i>RDS1</i> γονιδίου
pFA6a-GFP-His3MX6	Χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση με PCR της κασέτας <i>GFP-Sp.HIS3</i> με σκοπό την σήμανση της νουκλεοπορίνης Nup49 με GFP [76]
pRS306	Χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση με PCR της κασέτας <i>URA3</i> με σκοπό την απαλοιφή των γονιδίων <i>MIG1</i> και <i>TUP1</i> [77]

#### 4.1.4 Πίνακας ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα	Αλληλουχία 5'- 3'	Χρησιμότητα
LacAr_GAL10 Fw	CGG GAT CCC GTG CCC ATA AAT ATT TCC GAC C	Ενισχύουν από γενωμικό DNA την <i>GAL10</i> περιοχή ομολογίας για την κλωνοποίηση της ως <i>BamHI/KpnI</i> ένθεμα στο πλασμίδιο pAFS059
LacAr_GAL10 Rv	GGG GTA CCC CCC CAA AAA TCC CCA GTT TGA	
LacAr_SUC2 Fw	CGG GAT CCC GAA CGC TCT AGG ATC TGT GAA CA	Ενισχύουν από γενωμικό DNA την <i>SUC2</i> περιοχή ομολογίας για την κλωνοποίηση της ως <i>BamHI/KpnI</i> ένθεμα στο πλασμίδιο pAFS059
LacAr_SUC2 Rv:	GGG GTA CCC CTC AAA GAA ATC TTA CCG GAG TC	
LacAr_RDS1 Fw	CGG GAT CCC GAG TTT CCG AAA AGA ATG TCA AA	Ενισχύουν από γενωμικό DNA την <i>RDS1</i> περιοχή ομολογίας για την
LacAr_RDS1 Rv	GGG GTA CCC CAG GCA AAC CAA	

	TCT TAA CCG AG	κλωνοποίηση της ως <i>BamHI/KpnI</i> ένθεμα στο πλασμίδιο pAFS059
Nup49-F2	GCC GTG TTA CAT CAA AAA ACG AAA ACA CTG GCA TCA TTG AGC ATA CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA	Ενισχύουν από το πλασμίδιο pFA6a-GFP-HIS3 την <i>GFP-HIS3</i> κασέτα για τη σήμανση της νουκλεοπορίνης Nup49 με GFP
Nup49-R1	TTTGTACTTGTTATACGCACTATATA AACTTTTCAGGGCGATTTAC GAATTCGAGCTCGTTTAAAC	
Tup1ΔUra3 Fw	TGA TAA GCA GGG GAA GAA AGA AAT CAG CTT TCC ATC CAA ACC AAT CAG AAG GAA GAA CGA A	Ενισχύουν την <i>URA3</i> κασέτα του πλασμιδίου pRS306 για την απαλοιφή του γονίδιο <i>TUP1</i> με επιλογή σε ουρακίλη
Tup1ΔUra3 Rev	GTT TAG TTA GTT ACA TTT GTA AAG TGT TCC TTT TGT GTT CTG TTC TGA TAT AAT TAA ATT GAA GC	
Mig1 Del Ura FW	CTA CAC GAG AGT TGA GTA TAG TGG AGA CGA CAT ACT ACC ATA GCC CAG AAG GAA GAA CGA A	Ενισχύουν την <i>URA3</i> κασέτα του πλασμιδίου pRS306 για την απαλοιφή του γονίδιο <i>MIG1</i> με επιλογή σε ουρακίλη
Mig1 Del Ura RV	TAT TGT CTT TTG ATT TAT CTG CAC CGC CAA AAA CTT GTC AGC GTA TGA TAT AAT TAA ATT GAA GC	
His3 ORF FW	GAT CTT CCC AGA AAA AGA G	Ενισχύουν μια ~300 bp αλληλουχία μέσα στο <i>HIS3</i> ORF
His3 ORF RV	CCT GTT CGA AAG ATC TAC C	
Leu2 ORF FW	GTG GGA GGT ATT TAC TTT G	Ενισχύουν μια ~300 bp αλληλουχία μέσα στο <i>LEU2</i>
Leu2 ORF RV	CCA TTT AGG TGG GTT GG	

#### 4.1.5 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

Τα βακτηριακά στελέχη της *Escherchia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν DH5a και STBL2. Ο γονότυπός τους και οι συνθήκες ανάπτυξής τους αναφέρονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Current Protocols in Molecular Biology [73].

#### 4.1.6 Πίνακας στελεχών σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα	Γονότυπος
FT5	MATα, <i>ura3-52, trp1Δ-63, leu2::pet56, his3-Δ200</i> [78]
FT5H:	MATα, <i>ura3-52, trp1Δ-63, leu2::pet56</i>
FG59	<i>gal10:lacOx256 :amp<sup>R</sup> :LEU2 / FT5</i>
FS59	<i>suc2:lacOx256 :amp<sup>R</sup> :LEU2 / FT5</i>
FR59	<i>rds1:lacOx256 :amp<sup>R</sup> :LEU2 / FT5</i>
FG5930	<i>gal10:lacOx256 :amp<sup>R</sup> :HIS3 :KanMX2 :URA3<sub>pr</sub> :GFP-NLS-LacI :URA<sub>ter</sub> :amp<sup>R</sup> :LEU2 / FT5</i>
FS5930	<i>suc2:lacOx256 :amp<sup>R</sup> :HIS3 :KanMX2 :URA3<sub>pr</sub> :GFP-NLS-LacI :URA<sub>ter</sub> :amp<sup>R</sup> :LEU2 / FT5</i>
FR5930	<i>rds1:lacOx256 :amp<sup>R</sup> :HIS3 :KanMX2 :URA3<sub>pr</sub> :GFP-NLS-LacI :URA<sub>ter</sub> :amp<sup>R</sup> :LEU2 / FT5</i>
FG5931	<i>Nup49:GFP:HIS3 / FG5930</i>
FS5931	<i>Nup49:GFP:HIS3 / FS5930</i>
FR5931	<i>Nup49:GFP:HIS3 / FR5930</i>
FG5931 - <i>mig1Δ</i>	<i>mig1Δ::URA3 / FG5931</i>
FG5931 - <i>tup1Δ</i>	<i>tup1Δ::URA3 / FG5931</i>
FS5931 - <i>tup1Δ</i>	<i>tup1Δ::URA3 / FS5931</i>
FR5931 - <i>tup1Δ</i>	<i>tup1Δ::URA3 / FR5931</i>

## 4.2 Μοριακές τεχνικές

### 4.2.1 Μέθοδοι τροποποίησης των μορίων DNA

Στις γενικές μοριακές τεχνικές τροποποίησης των μορίων DNA περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και υδρόλυσης των 5' φωσφορικών ομάδων με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στα

συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και στους καταλόγους των αντίστοιχων εταιριών.

#### **4.2.2 Ανάλυση και απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο Molecular Cloning 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 ( $OD_{260nm}$ ). 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 *StyI*.

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.

#### **4.2.3 Αντίδραση σύνδεσης πλασμιδιακού φορέα με το κατάλληλο τμήμα DNA (ligation).**

Η αναλογία των μορίων του φορέα κλωνοποίησης προς τα μόρια του ενθέματος ήταν περίπου 1/10 και η συνολική ποσότητα του DNA, που επωάστηκε σε κάθε αντίδραση ήταν ~200ng. Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου λιγάση ήταν 0.2 u/λ. Οι αντιδράσεις σύνδεσης τυφλών άκρων (bland) επωάζονταν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C), ενώ οι αντιδράσεις με προεξέχοντα συμπληρωματικά άκρα επωάστηκαν για 4-16 ώρες στους 16°C. Το 1/10 της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό ηλεκτροεπιλεκτικών κυττάρων.

#### **4.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

Για την απομόνωση σε μικρή κλίμακα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης [74]. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε

μεσαία κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατακρήμνισης με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) 8000 [74]

#### **4.2.5 Παρασκευή ηλεκτροεπιδεκτικών κυττάρων (electrocompetent cells)**

Υγρή καλλιέργεια στελεχών βακτηριών επωάζεται σε θρεπτικό μέσο LB, στους 30°C και στις 230 rpm μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων ( $OD_{600nm}$ ) να γίνει 0.6-0.8. Στην συνέχεια, συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C και στις 3000 στροφές. Το ίζημα των κύτταρων επαναδιαλύεται με ήπιο τρόπο σε H<sub>2</sub>O αντίστασης 18MΩ, ίσου όγκου με την αρχική καλλιέργεια και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα ξεπλένονται ακόμα μια φορά με H<sub>2</sub>O και συμπύσσονται 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 -80°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Όλα τα υλικά και τα μέσα, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και όλοι οι χειρισμοί έγιναν στους 4°C.

#### **4.2.6 Μετασχηματισμός ηλεκτροεπιδεκτικών κυττάρων (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.

#### 4.2.7 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 MgCl<sub>2</sub>, 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<sub>m</sub> 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

#### 4.2.8 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα ζύμης

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα ζύμης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εκχύλισης RNA με χρήση ζεστής, όξινης φαινόλης όπως ακριβώς αναφέρεται στο CPMB. Μετά από την κατακρήμνιση, το RNA επαναδιαλύεται σε 30-40μl του διαλύματος φόρτωσης (loading buffer: 50% φορμαμίδιο, 6% φορμαλδεύδη, 1X MOPS, 0,04% Bromophenol blue, 0,04% Xylene cyanol). Ποσότητα 5μl από το RNA που απομονώνεται με την παραπάνω διαδικασία αναλύεται, ποσοτικοποιείται και ελέγχεται η ποιότητά του με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% αφού προηγουμένως αποδιαταχθεί για 5 λεπτά με θέρμανση στους 65°C. Εναλλακτικά ή συμπληρωματικά καθορίζεται η συγκέντρωσή του με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του στα 260 και στα 280nm.

#### 4.2.9 Ανάλυση και μεταφορά σε μεμβράνη ολικού RNA (κατά Northern).

Ποσότητα που να αντιστοιχεί σε 10μg από το RNA που απομονώνεται ηλεκτροφορεύεται και αναλύεται σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης (1.5% αγαρόζη, 1X ρυθμιστικό διάλυμα MOPS, 5% φορμαλδεύδη). Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης είναι 1X MOPS. Μετά από την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η διαδικασία μεταφοράς του RNA σε μεμβράνη νάυλον (Nytran super charge). Συγκεκριμένα το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Watmann 3MM του οποίου τα δύο άκρα είναι βυθισμένα σε διάλυμα 20X SSC (3M NaCl, 0.3M κιτρικό νάτριο). Πάνω στο πήκτωμα τοποθετείται η ειδική μεμβράνη καθώς και ένα κομμάτι Watmann αφού προηγουμένως εμβαπτιστούν σε 5X SSC. Πάνω από αυτά τοποθετούνται 9 στεγνά κομμάτια Watmann, πολλές χαρτοπετσέτες καθώς και ένα βάρος. Μετά από περίπου 16 ώρες ολοκληρώνεται η μεταφορά του RNA στη μεμβράνη οπότε και τα μόρια ακινητοποιούνται σ' αυτήν με ομοιοπολική σύνδεση (UV crosslinking) με έκθεση της μεμβράνης για 5 λεπτά στα 254nm και σε απόσταση 15-20cm από την πηγή.

#### **4.2.10 Κατασκευή ραδιοσημασμένων μορίων DNA-ανιχνευτών**

Η μέθοδος στηρίζεται στην επιδιόρθωση και τον πολυμερισμό τυχαίων εγκοπών (nick translation) που δημιουργούνται με τη συνδυασμένη δράση των ενζύμων DNA polymerase I και Dnase I, αντίστοιχα, στο προς σήμανση δίκλωνο τμήμα DNA. Η αντίδραση σήμανσης γίνεται σε ~100ng DNA παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (10mM Tris-HCl pH:7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM DTT), 25μM dGTP και dTTP, 25μM α<sup>32</sup>P-dATP και α<sup>32</sup>P-dCTP, 0.2μg/μl Dnase I, 0.5u DNA polymerase I (*E.coli*). Η αντίδραση επωάζεται στους 16οC για μία ώρα και διακόπτεται με προσθήκη 100μl νερού. Το ραδιοσημασμένο πλέον κομμάτι DNA αποδιατάσσεται με βρασμό για 5 λεπτά και είναι έτοιμο για υβριδοποίηση.

Η προυβριδοποίηση όπως και η υβριδοποίηση της μεμβράνης που έχει προσδεδεμένα τα νουκλεϊκά οξέα (DNA ή RNA) γίνεται στους 65οC και για τουλάχιστον 16 ώρες, σε διάλυμα που περιέχει 1% αλβουμίνη, 0.5M NaHPO<sub>4</sub> και 7% SDS. Μετά την υβριδοποίηση η μεμβράνη ξεπλένεται για τουλάχιστον δύο μισά της ώρας με 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 1% SDS με ανακίνηση. Η μεμβράνη είναι έτοιμη για να εκτεθεί σε αυτοραδιογραφικό φιλμ KODAK X-OMAT R, αφού τυλιχθεί σε ειδικό διαφανές χαρτί (wrap) για να αποφευχθεί η εξάτμιση.

### **4.3 Τεχνικές ειδικές για τον σακχαρομύκητα**

#### **4.3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης**

Για την εισαγωγή πλασμιδίου ή κασέτας DNA σε κύτταρα ζύμης εφαρμόστηκε η μέθοδος δημιουργίας επιδεκτικών κυττάρων ζύμης με χρησιμοποίηση χλωριούχου λιθίου (LiAc TRAF0) όπως ακριβώς περιγράφεται από τους Gietz *et al.* [79].

#### **4.3.2 Έλεγχος μετασχηματισμένων στελεχών *S. cerevisiae* με τη μέθοδο της PCR (single colony PCR)**

Αποικία του υπό έλεγχο στελέχους του *S. cerevisiae* λύεται σε 15 μl 0,02 N NaOH. Ακολουθεί επώαση για 15 min στους 95°C, σύντομο vortex, φυγοκέντρηση για 2 min στις 4000 rpm και άμεση μεταφορά στους 4°C. 2 μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιούνται ως μήτρα για αντίδραση PCR με κατάλληλους εκκινητές.

### **4.4 Μικροσκοπία φθορισμού-Συνεστιακή μικροσκοπία laser**

Κύτταρα καλλιεργειών συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση και ξεπλύθηκαν 1 φορά με αντίστοιχο MIN υποστρώμα (και επαναδιαλυκαν σε κατάλληλο όγκο MIN, ώστε να επιστρωθούν 5 μl κυττάρων  $OD_{550nm} \sim 1$  σε επιστρωμένες με 1% αγαρόζη αντικειμενοφόρους πλάκες (agarose pads). Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκαν για την παρατήρηση των καλλιεργειών ήταν συνεστιακό μικροσκόπιο laser BIO-RAD MRC 1024 CONFOCAL SYSTEM (Laser Sharp Version 3.2 Bio-Rad software, zoom  $\times 2$ , 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,  $\times 60$  (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).



## 5. Βιβλιογραφία

1: Morrison AJ, Shen X.

**DNA repair in the context of chromatin.**

Cell Cycle. 2005 Apr;4(4):568-71. Epub 2005 Apr 21. Review.

2: Waga S, Stillman B.

**The DNA replication fork in eukaryotic cells.**

Annu Rev Biochem. 1998;67:721-51. Review.

3: Cosma MP.

**Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation.**

Mol Cell. 2002 Aug;10(2):227-36. Review.

4: Peterson CL, Logie C.

**Recruitment of chromatin remodeling machines.**

J Cell Biochem. 2000 May;78(2):179-85. Review.

5: Parada L, Misteli T.

**Chromosome positioning in the interphase nucleus.**

Trends Cell Biol. 2002 Sep;12(9):425-32. Review.

6: Misteli T.

**Concepts in nuclear architecture.**

Bioessays. 2005 May;27(5):477-87. Review.

7: Verschure PJ.

**Positioning the genome within the nucleus.**

Biol Cell. 2004 Oct;96(8):569-77. Review.

PMID: 15519692 [PubMed - indexed for MEDLINE]

8: Cockell M, Gasser SM.

**Nuclear compartments and gene regulation.**

Curr Opin Genet Dev. 1999 Apr;9(2):199-205. Review.

PMID: 10322139 [PubMed - indexed for MEDLINE]

9: Verschure PJ, van Der Kraan I, Manders EM, van Driel R.

**Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories.**

J Cell Biol. 1999 Oct 4;147(1):13-24.

10: Isogai Y, Tjian R.

**Targeting genes and transcription factors to segregated nuclear compartments.**

Curr Opin Cell Biol. 2003 Jun;15(3):296-303. Review.

11: Menon BB, Sarma NJ, Pasula S, Deminoff SJ, Willis KA, Barbara KE, Andrews B, Santangelo GM.

**Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 19;102(16):5749-54. Epub 2005 Apr 7.

12: Misteli T.  
**Spatial positioning; a new dimension in genome function.**  
Cell. 2004 Oct 15;119(2):153-6. Review.

13: Moazed D.  
**Common themes in mechanisms of gene silencing.**  
Mol Cell. 2001 Sep;8(3):489-98. Review.

14: Zink D, Amaral MD, Englmann A, Lang S, Clarke LA, Rudolph C, Alt F, Luther K, Braz C, Sadoni N, Rosenecker J, Schindelbauer D.  
**Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei.**  
J Cell Biol. 2004 Sep 13;166(6):815-25.

15: Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R.  
**Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing.**  
Nature. 1998 Aug 6;394(6693):592-5. Erratum in: Nature 1998 Oct 1;395(6701):525.

16: Rout MP, Blobel G.  
**Isolation of the yeast nuclear pore complex.**  
J Cell Biol. 1993 Nov;123(4):771-83.

17: Tran EJ, Wentz SR.  
**Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge.**  
Cell. 2006 Jun 16;125(6):1041-53. Review.

18: Ishii K, Arib G, Lin C, Van Houwe G, Laemmli UK.  
**Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection.**  
Cell. 2002 May 31;109(5):551-62.

19: Pai CY, Corces VG.  
**The nuclear pore complex and chromatin boundaries.**  
Trends Cell Biol. 2002 Oct;12(10):452-5. No abstract available.

20: Gerasimova TI, Byrd K, Corces VG.  
**A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA.**  
Mol Cell. 2000 Nov;6(5):1025-35.

21: Capelson M, Corces VG.  
**Boundary elements and nuclear organization.**  
Biol Cell. 2004 Oct;96(8):617-29. Review.

22: Mendjan S, Taipale M, Kind J, Holz H, Gebhardt P, Schelder M, Vermeulen M, Buscaino A, Duncan K, Mueller J, Wilm M, Stunnenberg HG, Saumweber H, Akhtar A.

**Nuclear pore components are involved in the transcriptional regulation of dosage compensation in *Drosophila*.**

Mol Cell. 2006 Mar 17;21(6):811-23.

23: Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA.  
**Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization.**

Cell. 2004 May 14;117(4):427-39.

24: Brickner JH, Walter P.

**Gene recruitment of the activated *INO1* locus to the nuclear membrane.**

PLoS Biol. 2004 Nov;2(11):e342. Epub 2004 Sep 28.

25: Casolari JM, Brown CR, Drubin DA, Rando OJ, Silver PA.

**Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes.**

Genes Dev. 2005 May 15;19(10):1188-98.

26: Cronshaw JM, Matunis MJ.

**The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations.**

Trends Endocrinol Metab. 2004 Jan-Feb;15(1):34-9. Review.

27: Ghannam G, Takeda A, Camarata T, Moore MA, Viale A, Yaseen NR.

**The oncogene *Nup98-HOXA9* induces gene transcription in myeloid cells.**

J Biol Chem. 2004 Jan 9;279(2):866-75. Epub 2003 Oct 15.

28: Taddei A, Van Houwe G, Hediger F, Kalck V, Cubizolles F, Schober H, Gasser SM.

**Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene.**

Nature. 2006 Jun 8;441(7094):774-8.

29: Dieppo G, Iglesias N, Stutz F.

**The mRNA export receptor *Mex67p* contributes to nuclear pore anchoring by its early RNA-independent recruitment to activated genes.**

Mol Cell Biol. 2006 Sep 5; [Epub ahead of print]

30: Cabal GG, Genovesio A, Rodriguez-Navarro S, Zimmer C, Gadal O, Lesne A, Buc H, Feuerbach-Fournier F, Olivo-Marin JC, Hurt EC, Nehrbass U.

**SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope.**

Nature. 2006 Jun 8;441(7094):770-3.

31: Drubin DA, Garakani AM, Silver PA.

**Motion as a phenotype: the use of live-cell imaging and machine visual screening to characterize transcription-dependent chromosome dynamics.**

BMC Cell Biol. 2006 Apr 24;7:19.

32: Schmid M, Durussel T, Laemmli UK.

- ChIC and ChEC; genomic mapping of chromatin proteins.**  
Mol Cell. 2004 Oct 8;16(1):147-57.
- 33: Schmid M, Arib G, Laemmli C, Nishikawa J, Durussel T, Laemmli UK.  
**Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast.**  
Mol Cell. 2006 Feb 3;21(3):379-91.
- 34: Blobel G.  
**Gene gating: a hypothesis.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Dec;82(24):8527-9.
- 35: Vinciguerra P, Stutz F.  
**mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores.**  
Curr Opin Cell Biol. 2004 Jun;16(3):285-92. Review.
- 36: Darzacq X, Singer RH, Shav-Tal Y.  
**Dynamics of transcription and mRNA export.**  
Curr Opin Cell Biol. 2005 Jun;17(3):332-9. Review.
- 37: Vargas DY, Raj A, Marras SA, Kramer FR, Tyagi S.  
**Mechanism of mRNA transport in the nucleus.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 22;102(47):17008-13. Epub 2005 Nov 11.
- 38: Cole CN, Scarcelli JJ.  
**Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm.**  
Curr Opin Cell Biol. 2006 Jun;18(3):299-306. Epub 2006 May 8. Review.
- 39: Lei EP, Krebber H, Silver PA.  
**Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription.**  
Genes Dev. 2001 Jul 15;15(14):1771-82.
- 40: Vinciguerra P, Stutz F.  
**mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores.**  
Curr Opin Cell Biol. 2004 Jun;16(3):285-92. Review.
- 41: Erkmann JA, Kutay U.  
**Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm.**  
Exp Cell Res. 2004 May 15;296(1):12-20. Review.
- 42: Jimeno S, Rondon AG, Luna R, Aguilera A.  
**The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability.**  
EMBO J. 2002 Jul 1;21(13):3526-35.
- 43: Strasser K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondon AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, Hurt E.  
**TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export.**  
Nature. 2002 May 16;417(6886):304-8. Epub 2002 Apr 28.

- 44: Estruch F, Cole CN.  
**An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components.**  
Mol Biol Cell. 2003 Apr;14(4):1664-76.
- 45: Rodriguez-Navarro S, Fischer T, Luo MJ, Antunez O, Brettschneider S, Lechner J, Perez-Ortin JE, Reed R, Hurt E.  
**Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery.**  
Cell. 2004 Jan 9;116(1):75-86.
- 46: Lohr D.  
**Organization of the GAL1-GAL10 intergenic control region chromatin.**  
Nucleic Acids Res. 1984 Nov 26;12(22):8457-74.  
PMID: 6095201 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 47: Nehlin JO, Carlberg M, Ronne H.  
**Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response.**  
EMBO J. 1991 Nov;10(11):3373-7.
- 48: Treitel MA, Carlson M.  
**Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Apr 11;92(8):3132-6.
- 49: Traven A, Jelacic B, Sopta M.  
**Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited.**  
EMBO Rep. 2006 May;7(5):496-9.  
PMID: 16670683 [PubMed - in process]
- 4: Sil AK, Alam S, Xin P, Ma L, Morgan M, Lebo CM, Woods MP, Hopper JE.  
**The Gal3p-Gal80p-Gal4p transcription switch of yeast: Gal3p destabilizes the Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP.**  
Mol Cell Biol. 1999 Nov;19(11):7828-40.
- 51: Lemieux K, Gaudreau L.  
**Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II.**  
EMBO J. 2004 Oct 13;23(20):4040-50. Epub 2004 Sep 23.
- 52: Bhaumik SR, Green MR.  
**SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p.**  
Genes Dev. 2001 Aug 1;15(15):1935-45.
- 53: Larschan E, Winston F.  
**The S. cerevisiae SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4.**  
Genes Dev. 2001 Aug 1;15(15):1946-56.

- 54: Larschan E, Winston F.  
**The Saccharomyces cerevisiae Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription.**  
Mol Cell Biol. 2005 Jan;25(1):114-23.
- 55: Bryant GO, Ptashne M.  
**Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription.**  
Mol Cell. 2003 May;11(5):1301-9.
- 56: Treitel MA, Kuchin S, Carlson M.  
**Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in Saccharomyces cerevisiae.**  
Mol Cell Biol. 1998 Nov;18(11):6273-80.
- 57: Papamichos-Chronakis M, Gligoris T, Tzamarias D.  
**The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor.**  
EMBO Rep. 2004 Apr;5(4):368-72. Epub 2004 Mar 12.
- 58: Zhang Z, Reese JC.  
**Redundant mechanisms are used by Ssn6-Tup1 in repressing chromosomal gene transcription in Saccharomyces cerevisiae.**  
J Biol Chem. 2004 Sep 17;279(38):39240-50. Epub 2004 Jul 14.
- 59: Malave TM, Dent SY.  
**Transcriptional repression by Tup1-Ssn6.**  
Biochem Cell Biol. 2006 Aug;84(4):437-443.
- 60: Smith RL, Johnson AD.  
**Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes.**  
Trends Biochem Sci. 2000 Jul;25(7):325-30. Review.
- 61: Conlan RS, Gounalaki N, Hatzis P, Tzamarias D.  
**The Tup1-Cyc8 protein complex can shift from a transcriptional co-repressor to a transcriptional co-activator.**  
J Biol Chem. 1999 Jan 1;274(1):205-10.
- 62: Papamichos-Chronakis M, Petrakis T, Ktistaki E, Topalidou I, Tzamarias D.  
**Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1.**  
Mol Cell. 2002 Jun;9(6):1297-305.
- 63: Bressan DA, Vazquez J, Haber JE.  
**Mating type-dependent constraints on the mobility of the left arm of yeast chromosome III.**  
J Cell Biol. 2004 Feb 2;164(3):361-71. Epub 2004 Jan 26.

- 64: Bu Y, Schmidt MC.  
**Identification of cis-acting elements in the SUC2 promoter of Saccharomyces cerevisiae required for activation of transcription.**  
Nucleic Acids Res. 1998 Feb 15;26(4):1002-9.
- 65: Taddei A, Gartenberg MR, Neumann FR, Hediger F, Gasser SM.  
**Multiple pathways tether telomeres and silent chromatin at the nuclear periphery: functional implications for sir-mediated repression.**  
Novartis Found Symp. 2005;264:140-56; discussion 156-65, 227-30. Review.
- 66: Green SR, Johnson AD.  
**Genome-wide analysis of the functions of a conserved surface on the corepressor Tup1.**  
Mol Biol Cell. 2005 Jun;16(6):2605-13. Epub 2005 Mar 23.
- 67: Gligoris T, Thireos G, Tzamarias D.  
**The Tup1 co repressor directs Htz1 deposition at a specific promoter nucleosome marking the GAL1 gene for rapid activation**  
Mol Cell Biol submitted
- 68: DeVit MJ, Johnston M.  
**The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of Saccharomyces cerevisiae.**  
Curr Biol. 1999 Nov 4;9(21):1231-41.
- 69: Proft M, Struhl K.  
**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. 2002 Jun;9(6):1307-17.
- 70: Zhou H, Winston F.  
**NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of Saccharomyces cerevisiae.**  
BMC Genet. 2001;2:5. Epub 2001 Mar 19.
- 71: Alberti A, Lodi T, Ferrero I, Donnini C.  
**MIG1-dependent and MIG1-independent regulation of GAL gene expression in Saccharomyces cerevisiae: role of Imp2p.**  
Yeast. 2003 Oct 15;20(13):1085-96.
- 72: Lutfiyya LL, Iyer VR, DeRisi J, DeVit MJ, Brown PO, Johnston M.  
**Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in Saccharomyces cerevisiae.**  
Genetics. 1998 Dec;150(4):1377-91.
- 73: Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman J.G, Smith J.A, Struhl K,  
**Current protocols in molecular biology.**  
John. Wiley and Sons, Inc., New York (1999)

- 74: Sambrook, J., Russel D,  
**Molecular Cloning: A Laboratory Manual.**  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (2001).
- 75: Guthrie, C., Fink, G.R.  
**Methods in Enzymology-Guide to yeast Genetics and Molecular Biology**  
Academic press (1991).
- 76: Sheff MA, Thorn KS.  
**Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in Saccharomyces cerevisiae.**  
Yeast. 2004 Jun;21(8):661-70.
- 77: Sikorski RS, Hieter P.  
**A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae.**  
Genetics. 1989 May;122(1):19-27.
- 78: Syntichaki P, Thireos G.  
**The Gcn5.Ada complex potentiates the histone acetyltransferase activity of Gcn5.**  
J Biol Chem. 1998 Sep 18;273(38):24414-9.
- 79: Gietz, R.D., Schiestl, R.H.  
**Transforming yeast with DNA.**  
Methods in Molecular and Cellular Biology. **5**, 255-269 (1995).