

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μεταγραφική μελέτη της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού
στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae***

Γεώργιος Σ. Φραγκιαδάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

**DEPARTMENT OF BIOLOGY
SCHOOL OF SCIENCE
UNIVERSITY OF CRETE**

**INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY
FOUNDATION OF RESEARCH AND TECHNOLOGY**

PhD THESIS

**Transcriptional study of iron and copper homeostasis in
*Saccharomyces cerevisiae***

George S. Fragiadakis

HERAKLIO 2004

Ευχαριστίες...

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Σακχαρομύκητα του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας - Ι.Τ.Ε. και του Τμήματος Βιολογίας - Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την καθοδήγηση της Αν. Καθηγήτριας Δέσποινας Αλεξανδράκη.

Ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου τη Δέσποινα Αλεξανδράκη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπαιδευτώ επιστημονικά και ερευνητικά ως μέλος της ομάδας της και για τη σταθερή ενθάρρυνση, βοήθεια, συμπαράσταση, υποστήριξη και υπομονή της σε όλο το διάστημα της συνεργασίας μας. Ευχαριστώ επίσης τα δύο ιδρύματα (Ι.Μ.Β.Β. και Π.Κ.) που με φιλοξένησαν και ιδιαίτερα το πρώτο για τη χορηγία του.

Οφείλω, ακόμη, πολλές ευχαριστίες στους Γιώργο Θηραίο και Γιώργο Χαλεπάκη που παρακολούθησαν την επιστημονική μου πορεία από την αρχή ως μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, αλλά και στους Χρήστο Δελιδάκη, Βασίλη Μπουριώτη, Νίκο Πανόπουλο και Σήφη Παπαματθαϊάκη που μαζί με τους δύο πρώτους αποτέλεσαν τα μέλη της επταμελούς επιτροπής μου, για την υποστήριξη και την εποικοδομητική κριτική τους.

Θα ήθελα να τονίσω ιδιαίτερα την καθοριστική βοήθεια που μου προσέφεραν η Αλεξάνδρα Βουτσινά, η Έλενα Γεωργιάτσου και ο Δημήτρης Τζαμαριάς στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας και να ευχαριστήσω θερμά και τους τρεις. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τους Γιάννη Παπανικολάου, Τάσο Γεωργακόπουλο, Γιάννη Ταλιανίδη, Γιάννη Καγιαμπάκη, Ειρήνη Τοπαλίδου και Μανόλη Παπαμίχο για την ιδιαίτερη συνδρομή τους, αλλά και όλους τους συναδέλφους, παλαιότερους και νέους, της ομάδας Μοριακής Γενετικής Σακχαρομύκητα και άλλων ερευνητικών ομάδων των Ι.Μ.Β.Β. και Π.Κ., καθώς και τους εργαζόμενους με κάθε ιδιότητα στα δύο ιδρύματα, για την πραγματικά καλή σχέση και συνεργασία που είχα μαζί τους.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στη γυναίκα μου για την υπομονή και τη συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια και να αφιερώσω τη διατριβή αυτή σε εκείνη, στην κόρη μας και στη μνήμη του πατέρα μου.

ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ

Περίληψη	v
Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 1: Μεταγραφικοί συρρυθμιστές της ομοιοστασίας σιδήρου/χαλκού...	16
Κεφάλαιο 2: Ο σιδηρορυθμιζόμενος μεταγραφικός ενεργοποιητής Aft1.....	41
Κεφάλαιο 3: Ο χαλκορυθμιζόμενος μεταγραφικός ενεργοποιητής Mac1	80
Υλικά και μέθοδοι.....	95
Αναφορές.....	116
Δημοσιεύσεις	129

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός είναι απαραίτητα για τη ζωή, ωστόσο, όταν βρίσκονται σε περίσσεια, έχουν τοξικές συνέπειες για το κύτταρο. Συνεπώς, η κυτταρική πρόσληψη και ενδοκυτταρική κατανομή τους αποτελούν διαδικασίες στενά ελεγχόμενες και ρυθμιζόμενες, με σκοπό την επίτευξη ομοιοστασίας. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, από τους μύκητες μέχρι τα φυτά και τα θηλαστικά, έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς ομοιοστασίας των δύο μετάλλων, οι οποίοι παρουσιάζουν σημαντική συντήρηση. Στην παρούσα μελέτη, εξετάζουμε τον αντίστοιχο μηχανισμό ενός οργανισμού μοντέλου, του σακχαρομύκητα, στο επίπεδο της μεταγραφικής ρύθμισης, χρησιμοποιώντας τρία βασικά γονίδια αναφοράς, τα *FRE1*, *FRE2* και *CTR1*. Τα δύο πρώτα κωδικοποιούν απαραίτητες για την πρόσληψη των δύο μετάλλων αναγωγάσες της πλασματικής μεμβράνης και επάγονται μεταγραφικά από την έλλειψη σιδήρου μέσω του σιδηροεξαρτώμενου ενεργοποιητή Aft1. Το *FRE1* επάγεται επιπλέον από την έλλειψη χαλκού μέσω του χαλκοεξαρτώμενου ενεργοποιητή Mac1. Το *CTR1* κωδικοποιεί το βασικό μεταφορέα χαλκού της πλασματικής μεμβράνης και επάγεται μεταγραφικά επίσης από την έλλειψη του μετάλλου μέσω του Mac1.

Διερευνήσαμε το μηχανισμό της εξαρτώμενης από τον παράγοντα Aft1 μεταγραφικής ενεργοποίησης χρησιμοποιώντας το γονίδιο *FRE2* ως βασικό μοντέλο, καθώς αυτό επάγεται αποκλειστικά και σε υψηλά επίπεδα από τον παράγοντα αυτόν. Βρήκαμε ότι οι τύπου HMG-box χρωματινικοί αρχιτεκτονικοί παράγοντες Nhr6a/b και ο μεταγραφικός συγκαταστολέας Ssn6 αποτελούν βασικούς συνενεργοποιητές της μεταγραφής του. Ο Nhr6 αλληλεπιδρά άμεσα με τον Aft1, συγκεκριμένα με το αμινοτελικό μισό του που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, διευκολύνοντας την πρόσδεσή του πάνω στον υποκινητή του γονιδίου. Ο Ssn6 επίσης αλληλεπιδρά άμεσα με το αμινοτελικό μισό του Aft1 και στρατολογείται στον υποκινητή *FRE2* μόνο όταν οι Aft1 και Nhr6 είναι παρόντες, έχοντας βασικό και αποκλειστικά θετικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Ο ρόλος των Nhr6 και Ssn6 στην επαγόμενη από τον Aft1 μεταγραφή είναι ειδικός για το συγκεκριμένο υποκινητή, στον οποίο, σε συνθήκες επαγωγής, διαπιστώσαμε ότι γίνεται χρωματινική αναδιοργάνωση που εξαρτάται από τους παράγοντες αυτούς. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης παρέχουν την πρώτη βιοχημική ένδειξη *in vivo* ότι

μια πρωτεΐνη τύπου HMG-box διευκολύνει την πρόσδεση στο DNA ενός ειδικού μεταγραφικού ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα και ότι επίσης επάγει τη στρατολόγηση του Ssn6 πάνω σε έναν υποκινητή. Συνεπώς, η αποκρινόμενη στη διαθεσιμότητα σιδήρου μεταγραφική ενεργοποίηση στο σακχαρομύκητα, γίνεται μέσω πολλαπλών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ειδικού σιδηροεξαρτώμενου παράγοντα Aft1 και γενικών μεταγραφικών συρρυθμιστών όπως οι Nhr6 και Ssn6.

Διερευνήσαμε επίσης το μηχανισμό λειτουργίας του χαλκοεξαρτώμενου μεταγραφικού ενεργοποιητή Mac1. Η περιοχή ενεργοποίησης του Mac1 περιλαμβάνει δύο λειτουργικά διακριτά επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνών, τα REPI και REPII. Έχει βρεθεί ότι το πρώτο είναι υπεύθυνο για τη χαλκοεξαρτώμενη ρύθμιση της ενεργότητας του παράγοντα. Εμείς βρήκαμε ότι το δεύτερο ρυθμίζει την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA. Συγκεκριμένα, δείξαμε, *in vitro*, ότι έχει αρνητική επίδραση στην προσδετική του ικανότητα πάνω στον υποκινητή *CTRL*, η οποία, *in vivo*, αντισταθμίζεται από το γεγονός της πρόσδεσής του ως διμερούς πάνω σε δύο διαδοχικά στοιχεία-στόχους του υποκινητή. Ο ειδικός ρόλος της περιοχής REPII υποδηλώνει ότι, *in vivo*, η λειτουργία του Mac1 ενδεχομένως τροποποιείται από δομικές διαμορφώσεις που επηρεάζουν τις ιδιότητες πρόσδεσής του παράγοντα στο DNA και που πιθανώς οφείλονται σε μοριακές αλληλεπιδράσεις της συγκεκριμένης περιοχής με άλλες πρωτεΐνες ή μέταλλα.

Αποκαλύψαμε, τέλος, ένα νέο ρόλο του Aft1, κατασταλτικό, στη μεταγραφή του εξαρτώμενου από τον Mac1 γονιδίου *CTRL*, ο οποίος βασίζεται σε έμμεση στρατολόγηση και όχι άμεση πρόσδεσή του στον υποκινητή του γονιδίου. Ο ρόλος αυτός ενδεχομένως υποδηλώνει αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων Aft1 και Mac1 πάνω στο συγκεκριμένο υποκινητή. Μια τέτοια αλληλεπίδραση δεν είναι απίθανη με δεδομένη την αλληλεξάρτηση των μεταβολισμών σιδήρου και χαλκού στη ζύμη, η οποία συμβάλλει στην κυτταρική ομοιοστασία των δύο μετάλλων.

ABSTRACT

Transition metals, like iron and copper, are essential for life but, in excess, they can be toxic for cells. Therefore, their uptake and intracellular distribution are tightly controlled and regulated by cells in order to achieve homeostasis. Eukaryotic organisms, from yeasts to plants and animals, have developed complex mechanisms of metal homeostasis which display a significant conservation. In the present study, we look at the iron and copper homeostasis mechanism of *Saccharomyces cerevisiae*, a model organism for physiological and genetic studies. We examine this mechanism at the transcriptional level, using three reference genes: *FRE1*, *FRE2* and *CTR1*. *FRE1* and *FRE2* encode two plasma membrane metal reductases necessary for iron and copper uptake. Both genes are transcriptionally induced in the absence of iron by the iron-responsive DNA-binding activator Aft1, with *FRE1* being additionally induced in the absence of copper by the copper-responsive DNA-binding activator Mac1. *CTR1* encodes the main plasma membrane copper transporter and is also transcriptionally induced in the absence of copper by Mac1.

We investigated the mechanism of Aft1-mediated transcriptional activation, using *FRE2* gene as a model since *FRE2* transcription solely depends on Aft1. We found that Nhp6a/b yeast HMG-box chromatin-associated architectural factors and Ssn6 (Cyc8) corepressor are crucial coactivators of *FRE2* transcription. Nhp6 interacts directly with the Aft1 N-half, including the DNA-binding region, to facilitate Aft1 binding at *FRE2* UAS. Ssn6 also interacts directly with the Aft1 N-half and is recruited on *FRE2* promoter only in the presence of both Aft1 and Nhp6, playing a critical explicitly positive role in transcriptional activation. The Nhp6/Ssn6 role in Aft1-mediated transcription is specific for *FRE2* promoter context and both regulators are required on this promoter for activation-dependent chromatin remodeling. Our results provide the first *in vivo* biochemical evidence for nonsequence-specific HMG-box protein-facilitated recruitment of a yeast gene-specific transactivator to its DNA target site and for Nhp6-mediated Ssn6 promoter recruitment. Therefore, in *Saccharomyces cerevisiae*, transcriptional activation in response to iron availability involves multiple protein interactions between the Aft1 iron-responsive DNA-binding factor and global transcriptional coregulators such as Nhp6 and Ssn6.

We also examined the function of Mac1 copper-responsive DNA-binding activator. Mac1 C-terminal activation region includes two functionally distinct cysteine-rich repeats, termed REPI and REPII respectively. It has been shown that REPI is responsible for the copper-dependent regulation of factor's activity. We found that REPII modulates the efficiency of Mac1 binding to DNA. In particular, we showed *in vitro* that REPII negatively affects Mac1 binding on *CTR1* promoter, an effect that is compromised *in vivo* by the fact that Mac1 binds as a dimer on two consecutive promoter target sites. This REPII domain effect implies that Mac1 function could be altered *in vivo* by structural modulations affecting its binding properties and possibly resulting from independent molecular interactions between this domain and other proteins or metals.

Finally, we revealed a new repressive role of Aft1 in the transcription of the Mac1-dependent *CTR1* gene. This role is based on the indirect recruitment and not direct binding of Aft1 on *CTR1* promoter and probably implies an Aft1-Mac1 interaction. The latter is not unlikely given the fact that in yeast a link between iron and copper metabolism exists, contributing to cellular homeostasis of the two metals.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

0.1	Γενικά.....	1
0.2	Τοξικές συνέπειες του σιδήρου και του χαλκού.....	2
0.3	Πρόσληψη του σιδήρου και του χαλκού στο σακχαρομύκητα...	3
0.4	Μεταφορά και αποθήκευση του σιδήρου και του χαλκού.....	6
0.5	Ο σίδηρος και ο χαλκός στα μιτοχόνδρια.....	7
0.5.1	Μεταβολισμός του σιδήρου στα μιτοχόνδρια.....	9
0.5.2	Μεταβολισμός του χαλκού στα μιτοχόνδρια.....	12
0.6	Επίδραση του σιδήρου και του χαλκού στον κυτταρικό μεταβολισμό.....	13
0.7	Η ζύμη ως πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της κυτταρικής ομοιοστασίας του σιδήρου και του χαλκού.....	15

0.1 Γενικά

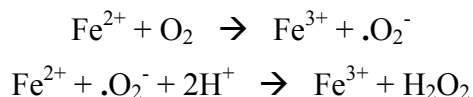
Η επιβίωση σχεδόν όλων των οργανισμών πάνω στη γη βασίζεται σε μεταβατικά μεταλλικά στοιχεία, δηλαδή σε στοιχεία που έχουν ασυμπλήρωτη την εξωτερική ηλεκτρονιακή υποστοιβάδα d και καταλαμβάνουν το κεντρικό τμήμα (τον τομέα d) του Περιοδικού Πίνακα. Από τα μεταβατικά μέταλλα, ο σίδηρος και ο χαλκός, κατά πρώτο λόγο, αλλά και το μαγγάνιο, το κοβάλτιο και ο ψευδάργυρος έχουν τη μεγαλύτερη φυσιολογική σημασία. Κυρίως τα δύο πρώτα, αλλά και τα δύο επόμενα, δίνουν και δέχονται ηλεκτρόνια εύκολα λόγω των ιδιαίτερων χημικών ιδιοτήτων τους και συμμετέχουν ως συμπαράγοντες σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και οξειδοαναγωγής. Ο ψευδάργυρος δεν είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, όμως αποτελεί βασικό καταλυτικό ή/και δομικό στοιχείο πολλών ενζύμων και πρωτεϊνικών περιοχών αλληλεπίδρασης με DNA ή άλλες πρωτεΐνες.

Ο σίδηρος και ο χαλκός, στους οποίους επικεντρώνεται η παρούσα μελέτη, αποτελούν βασικά στοιχεία ενός μεγάλου αριθμού ζωτικών λειτουργιών των οργανισμών όπως είναι η μεταφορά οξυγόνου, ο μεταβολισμός της ενέργειας, η μιτοχονδριακή αναπνοή, η σύνθεση DNA και η αποτοξίνωση από τις ελεύθερες ρίζες. Η παρουσία τους σε περίσσεια, όμως, είναι βλαπτική για τα κύτταρα λόγω της ευκολίας με την οποία αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο, επάγοντας το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι οργανισμοί, συνεπώς, έχουν αναπτύξει ρυθμιστικούς (ομοιοστατικούς) μηχανισμούς για να διατηρούν τα μέταλλα αυτά σε μη τοξικά

επίπεδα. Ο μεταβολισμός του σιδήρου και του χαλκού παρουσιάζει σημαντική συντήρηση από το σακχαρομύκητα ως τα φυτά και τον άνθρωπο, τόσο σε επίπεδο μεμονωμένων πρωτεϊνών όσο και ολόκληρων μονοπατιών [55, 159]. Για παράδειγμα, οι βασικές για το μεταβολισμό των δύο μετάλλων πρωτεΐνες Fet3, Yfh1 και Ccc2 του σακχαρομύκητα, παρουσιάζουν δομική και λειτουργική ομολογία με τις πρωτεΐνες σεουλοπλασμίνη, φραταξίνη και MNK (πρωτεΐνη Menkes) ή WD (πρωτεΐνη Wilson) του ανθρώπου αντίστοιχα, των οποίων μεταλλάξεις προκαλούν σοβαρές παθολογικές διαταραχές σχετιζόμενες με έλλειψη ή υπερεπάρκεια σιδήρου ή χαλκού [6]. Η κατανόηση, συνεπώς, της φυσιολογίας των δύο μετάλλων στο σακχαρομύκητα, βοηθά σημαντικά να κατανοηθούν αντίστοιχοι μηχανισμοί των ανώτερων οργανισμών, διευκολύνοντας παράλληλα το έργο της ιατρικής αλλά και της γεωργικής και περιβαλλοντικής επιστήμης.

0.2 Τοξικές συνέπειες του σιδήρου και του χαλκού

Η ικανότητα του σιδήρου και του χαλκού να αποδίδουν ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο και να δημιουργούν, με αυτόν τον τρόπο, αντιδρώντα είδη οξυγόνου (**Reactive Oxygen Species - ROS**) καθιστά τα μέταλλα αυτά δυνητικά τοξικά για το κύτταρο [160]. Ο ελεύθερος Fe(II) ή Cu(I) καταλύει, με την αυτοοξειδωσή του, την παραγωγή αρχικά ριζών σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και στη συνέχεια υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) [101] ως εξής:

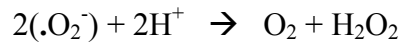


Το τελευταίο επίσης οξειδώνει το Fe(II) ή Cu(I) με αποτέλεσμα την παραγωγή των πολύ δραστικών ριζών υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) [101] ως εξής:



Οι ρίζες σουπεροξειδίου έχει δείχτεί ότι προωθούν την οξείδωση των συμπλεγμάτων [4Fe-4S] πολλών ενζύμων, προκαλώντας την απελευθέρωση Fe(II) ο οποίος ανατροφοδοτεί την αντίδραση Fenton [100]. Οι ρίζες υδροξυλίου προσβάλλουν και καταστρέφουν βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA και οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση [112]. Τα κύτταρα αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της οξειδωτικής καταστροφής αφενός μέσω μηχανισμών αποτοξίνωσης από τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου ελέγχοντας στενά τις συγκεντρώσεις ελευθέρου σιδήρου και χαλκού. Η δισμουτάση-Cu,Zn του σουπεροξειδίου, που αποτελεί βασικό ένζυμο της

κυτταρικής άμυνας κατά του οξειδωτικού στρες, καταλύει τη μετατροπή των ριζών σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου [36] ως εξής:

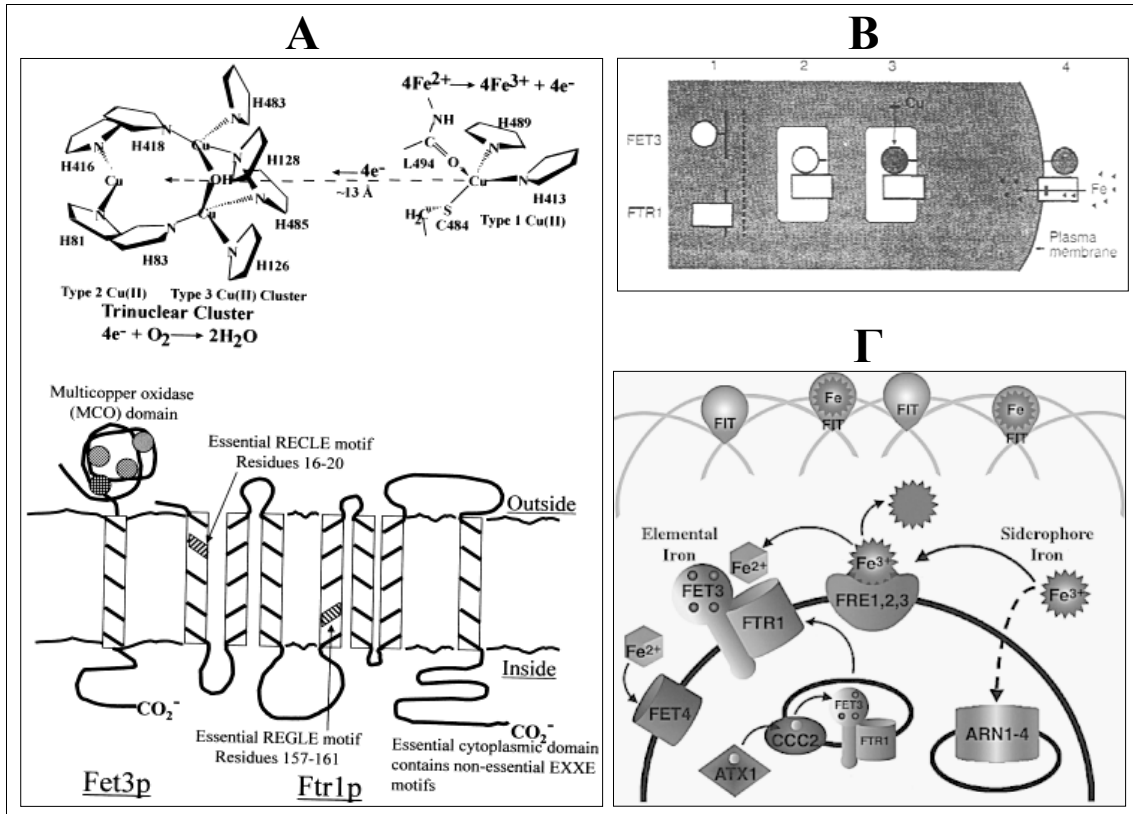


Με αυτόν τον τρόπο προστατεύει τα ένζυμα που διαθέτουν συμπλέγματα [4Fe-4S] και παράλληλα αποτρέπει τη χημική συσσώρευση ελεύθερου σιδήρου στο κύτταρο. Η περίσσεια υπεροξειδίου του υδρογόνου που δημιουργείται από τη δράση της εξαλείφεται από υπεροξειδάσες όπως η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η διατήρηση των συγκεντρώσεων του ελεύθερου σιδήρου και χαλκού σε μη τοξικά επίπεδα μέσα στο κύτταρο επιτυγχάνεται μέσω ενός ομοιοστατικού μηχανισμού ρύθμισης της πρόσληψης, μεταφοράς και αποθήκευσης των μετάλλων, ο οποίος περιγράφεται παρακάτω.

0.3 Η πρόσληψη του σιδήρου και του χαλκού στο σακχαρομύκητα

Ο σίδηρος και ο χαλκός απαντούν στη φύση στην οξειδωμένη μορφή τους (Fe^{3+} και Cu^{2+} αντίστοιχα) η οποία, στην περίπτωση του πρώτου, είναι ιδιαίτερα δυσδιάλυτη. Επομένως, για να καταστεί δυνατή η μεταφορά του σιδήρου στο εσωτερικό του κυττάρου είναι απαραίτητη η αναγωγή του στη διαλυτή δισθενή μορφή Fe^{2+} ενώ και η αντίστοιχη μεταφορά του χαλκού διευκολύνεται από την αναγωγή του, πριν ή κατά την πρόσληψη, στη (χαλαρότερα δεσμευόμενη και συνεπώς ευκολότερα μεταφερόμενη) μονοσθενή μορφή Cu^{1+} . Η αναγωγή των δύο μετάλλων πραγματοποιείται στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης από τις μεμβρανικές αναγωγάσες Ftr1 και Ftr2 [23, 24, 40, 50].

Η μεταφορά του ανηγμένου σιδήρου δια μέσου της πλασματικής μεμβράνης διαμεσολαβείται από μεμβρανικούς μεταφορείς υψηλής ή χαμηλής αγγιστείας για το μέταλλο (δηλαδή περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητους στη συγκέντρωσή του). Το σύμπλοκο Fet3/Ftr1 ανήκει στην πρώτη κατηγορία ($K_m=0.15\mu\text{M}$) και είναι εξειδικευμένο για το σίδηρο. Αποτελείται από την οξειδάση Fet3 [5] η οποία είναι μια χαλκοπρωτεΐνη που παγιδεύει και επανοξειδώνει τον ανηγμένο σίδηρο και την περμεάση Ftr1 [147] που τον μεταφέρει στη συνέχεια μέσα στο κύτταρο (εικόνα 0.1A). Επίσης, ο Fet4, ένας (μη εξειδικευμένος για το σίδηρο) μεταφορέας μεταλλικών κατιόντων χαμηλής αγγιστείας ($K_m>30\mu\text{M}$), είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη σιδήρου σε αναερόβιες συνθήκες [31, 30, 60, 164] αφού το σύμπλοκο Fet3/Ftr1 χρειάζεται οξυγόνο για να καταλύσει την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου



Εικόνα 0.1

Συστήματα πρόσληψης σιδήρου στο σακχαρομύκητα. (A) Το σύμπλοκο οξειδάσης-περμεάσης σιδήρου Fet3/Ftr1 [76]. Πάνω: η οξειδάση Fet3 έχει μια θέση χαλκού τύπου 1 (blue copper site), μια τύπου 2 (non-blue copper site) και μια τύπου 3 (binuclear copper cluster). Η οξειδωση του Fe²⁺ γίνεται στη θέση τύπου 1 ενώ η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου στο τριπυρηνικό σύμπλοκο. Κάτω: το σύμπλοκο Fet3/Ftr1 απεικονίζεται στην πλασματική μεμβράνη. Δύο διαμεμβρανικά μοτίβα REXLE και η καρβοξυτελική κυτταροπλασματική περιοχή του Ftr1 αποτελούν περιοχές απαραίτητες για τη λειτουργία πρόσληψης σιδήρου (η τελευταία περιέχει μη λειτουργικά απαραίτητα μοτίβα EXXE). (B) Στάδια συγκρότησης του συμπλόκου Fet3/Ftr1 [147]. (1) Βιοσύνθεση των δύο πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, (2) συνάθροισή τους σε κυστίδιο Golgi, (3) “φόρτωμα” της Fet3 με χαλκό ο οποίος αντλείται στο κυστίδιο από την ATPάση Ccc2 και (4) μετατόπιση του συμπλόκου στην πλασματική μεμβράνη. Μεταλλαγές στις Ccc2 ή Ftr1 παρεμποδίζουν ειδικά την κυτταρική υψηλής αγγιστείας πρόσληψη σιδήρου. (Γ) Πρόσληψη σιδήρου μέσω σιδηροφόρων [127]. Οι μαννοπρωτεΐνες Fit παγιδεύουν τα σύμπλοκα σιδήρου-σιδηροφόρων στο κυτταρικό τοίχωμα. Ο δεσμευμένος σίδηρος μπορεί να αναχθεί και να ελευθερωθεί από το σιδηροφόρο από τις αναγωγάσες Fre και στη συνέχεια να προσληφθεί από το σύστημα υψηλής αγγιστείας Fet3/Ftr1 ή το μεταφορέα χαμηλής αγγιστείας Fet4. Εναλλακτικά, τα συμπλόκα σιδήρου-σιδηροφόρων μπορούν να προσληφθούν από τους ειδικούς για κάθε τύπο σιδηροφόρου μεταφορείς Arn. Το κατά πόσο η ενδοκυττάρωση εμπλέκεται στη διαδικασία πρόσληψης μέσω των μεταφορέων Arn είναι υπό διερεύνηση.

[51]. Τέλος, οι μεταφορείς μαγγανίου της πλασματικής μεμβράνης Smf1 και Smf2 εμπλέκονται πιθανώς και στην πρόσληψη σιδήρου καθώς βρέθηκε ότι η έλλειψή τους

επιδεινώνει τη στέρηση του μετάλλου σε ένα στέλεχος *fet3Δ fet4Δ* [97].

Ο ανηγμένος χαλκός μεταφέρεται μέσα στο κύτταρο από τους μεταφορείς υψηλής αγκιστείας ($K_m=1-4\mu\text{M}$) Ctr1 και Ctr3 [25, 22, 71, 126]. Είναι αξιοσημείωτο ότι η έκφραση του γονιδίου *CTR3*, το οποίο απομονώθηκε ως καταστολέας του φαινοτύπου πείνας για χαλκό του στελέχους *ctr1Δ* [71], είναι εξουδετερωμένη σε πολλά εργαστηριακά στελέχη σακχαρομύκητα. Αυτό οφείλεται στο ότι στα στελέχη αυτά υπάρχει ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου Ty2 στον υποκινητή του γονιδίου, μεταξύ του κουτιού TATA και του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Η αιτιολόγηση του φαινομένου πιθανώς βρίσκεται στην προέλευση των στελεχών αυτών από έναν κοινό πρόγονο στον οποίο το *CTR3* σίγησε εξαιτίας ενός τυχαίου γεγονότος μετάθεσης [71]. Οι μεταφορείς Ctr1 και Ctr3 έχουν πολύ μικρή αμινοξική ομολογία παρά το ότι είναι λειτουργικά ανταλλάξιμοι και μέχρι τώρα δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι έχουν (αλληλεπικαλυπτόμενους) διακριτούς ρόλους. Επιπλέον, οι μεταφορείς της πλασματικής μεμβράνης Fet4, Smf1 και Smf2 βρέθηκε ότι σχετίζονται με χαμηλής αγκιστείας πρόσληψη ιόντων χαλκού χωρίς να έχουν διευκρινιστεί οι φυσιολογικές συνθήκες κάτω από τις οποίες την πραγματοποιούν [49, 103].

Η υψηλής αγκιστείας μεταφορά σιδήρου μέσω της πλασματικής μεμβράνης εξαρτάται άμεσα από το χαλκό καθώς η ενσωμάτωση χαλκού στην οξειδάση Fet3, που γίνεται σε εκκριτικά κυστίδια του συστήματος Golgi, είναι καθοριστική για τη λειτουργία του συμπλόκου Fet3/Ftr1 [147, 179]. Ο χαλκός μεταφέρεται και αντλείται στα κυστίδια από τη σαπερόνη Atx1 και την (ομόλογη των πρωτεϊνών Menkes και Wilson των θηλαστικών) ATPάση Ccc2 αντίστοιχα και ακολουθεί η ενσωμάτωσή του στην apoFet3 του συμπλόκου Fet3/Ftr1 το οποίο μετατοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη όταν το κύτταρο χρειάζεται σίδηρο [99, 134, 180] (εικόνα 0.1B). Στη διαδικασία της ενσωμάτωσης απαιτείται η παρουσία ιόντων γλωρίου (ως αλλοστερικών τροποποιητών) η οποία εξασφαλίζεται μέσα στα κυστίδια από την αντλία Gef1 [26]. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η έλλειψη χαλκού οδηγεί σε έλλειψη σιδήρου στο κύτταρο.

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός πρόσληψης σιδήρου στηρίζεται σε χαμηλού μοριακού βάρους οργανικά μόρια που δεσμεύουν τρισθενή σίδηρο ειδικά και με ιδιαίτερα υψηλή αγκιστεία, τα σιδηροφόρα. Ο σακχαρομύκητας δε διαθέτει την ικανότητα να συνθέτει και να εκκρίνει αυτούς τους ισχυρούς χηλικούς δεσμευτές του μετάλλου (κάτι που κάνουν οι περισσότεροι μικροοργανισμοί και μερικά φυτά), όμως

μπορεί να προσλαμβάνει τα σιδηροφόρα άλλων οργανισμών εφαρμόζοντας μια καιροσκοπική στρατηγική πρόσληψης σιδήρου [90]. Στα πλαίσια της στρατηγικής αυτής, οι μαννοπρωτεΐνες Fit1-3 [133] του κυτταρικού τοιχώματος παγιδεύουν τα σύμπλοκα σιδηροφόρων-σιδήρου στον περιπλασματικό χώρο και στη συνέχεια είτε αυτά αναγνωρίζονται και προσλαμβάνονται από τους ειδικούς μεταφορείς σιδηροφόρων της πλασματικής μεμβράνης Arn1, Arn2/Taf1, Arn3/Sit1 και Arn4/Enb1 [182] είτε ο δεσμευμένος σε αυτά σίδηρος ανάγεται από τις αναγωγάσες Fre και απελευθερώνεται για να μεταφερθεί έπειτα στο εσωτερικό του κυττάρου από τους μεταφορείς ανηγμένου σιδήρου της πλασματικής μεμβράνης (εικόνα 0.1Γ). Έχει βρεθεί ότι οι αναγωγάσες Fre1 και Fre2, εκτός από άλατα τρισθενούς σιδήρου, ανάγουν και σίδηρο που είναι δεσμευμένος σε διάφορους τύπους σιδηροφόρων [181]. Παράλληλα το γένωμα του σακχαρομύκητα περιέχει πέντε ακόμα γονίδια ομόλογα των *FRE1* και *FRE2*, τα *FRE3-7* [109, 41], από τα οποία τα *FRE3* και *FRE4* έχει δειχτεί ότι κωδικοποιούν αναγωγάσες της πλασματικής μεμβράνης με εξειδίκευση σε συγκεκριμένους τύπους σιδηροφόρων [181] ενώ η λειτουργία των υπολοίπων παραμένει προς το παρόν αδιευκρίνιστη. Έχει διαπιστωθεί ότι όταν η συγκέντρωση σιδηροφόρων στον εξωκυτταρικό χώρο είναι χαμηλή, το κύτταρο χρησιμοποιεί το σύστημα των μεταφορέων Arn για την πρόσληψη του δεσμευμένου σε αυτά σιδήρου ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τους, ενεργοποιεί παράλληλα και το μηχανισμό αναγωγικής πρόσληψης [127].

Δεδομένου ότι οι μεταφορείς μετάλλων της πλασματικής μεμβράνης δεν έχουν δράση ATPάσης, η απαραίτητη ενέργεια για την εισαγωγή μεταλλοκατιόντων στο κύτταρο θα πρέπει να εξασφαλίζεται με άλλο τρόπο. Πιθανώς, η μεταφορά τους μέσω της πλασματικής μεμβράνης είναι ενεργειακά συζευγμένη με την αντίστοιχη μεταφορά (συμμεταφορά ή αντιμεταφορά) άλλων ιόντων (π.χ. H^+ , K^+ ή Na^+). Σε συμφωνία με αυτό, μια παλαιότερη μελέτη που έγινε *in vitro* έδειξε ότι στο σακχαρομύκητα η πρόσληψη ιόντων χαλκού συνδέεται με την εκροή ιόντων καλίου στα πλαίσια μηχανισμού αντιμεταφοράς [29].

0.4 Μεταφορά και αποθήκευση του σιδήρου και του χαλκού στο κύτταρο

Μέσα στο κύτταρο, οι νεοεισερχόμενοι σίδηρος και χαλκός απομονώνονται σε υποκυτταρικά διαμερίσματα ή δεσμεύονται σε ειδικές πρωτεΐνες για αποφυγή των τοξικών συνεπειών τους και μελλοντική χρήση. Τα βακτήρια και τα θηλαστικά δεσμεύουν το σίδηρο στη φερριτίνη στο διαλυτό κυτταρόπλασμα [2] ενώ τα φυτά

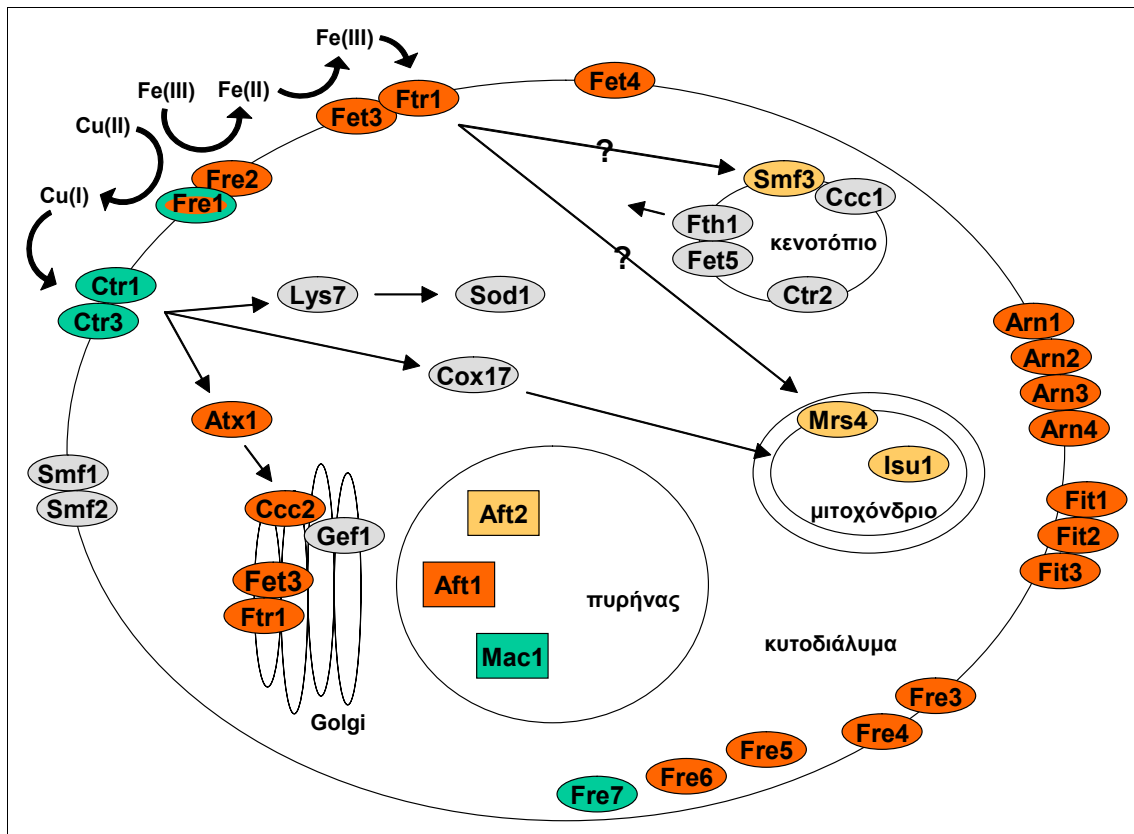
στην πλαστιδιακή φυτοφερριτίνη [12]. Ο σακχαρομύκκτος, ωστόσο, δε διαθέτει φερριτίνη και έτσι πιθανώς απομονώνει το σίδηρο μέσα σε κενοτόπια, εισάγοντάς τον σε αυτά μέσω των καναλιών Ccc1 και Smf3 [94, 130]. Το σύμπλοκο οξειδάση/περμεάσης Fet5/Fth1 πιθανώς εξάγει τον αποθηκευμένο σίδηρο των κενοτοπίων στο κυτοδιάλυμα όταν η συγκέντρωση του μετάλλου στο τελευταίο μειωθεί σημαντικά [158]. Ο χαλκός, από την άλλη, δεσμεύεται στο κυτοδιάλυμα σε μεταλλοθειονίνες (μικρές πλούσιες σε κυστεΐνες πρωτεΐνες, όπως οι Cup1 και Crs5), των οποίων η μεταγραφή επάγεται από τον ενεργοποιητή Ace1 σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης του μετάλλου [102], ή απομονώνεται σε κενοτόπια [32, 150] από τα οποία πιθανώς εξάγεται μέσω του μεμβρανικού χαμηλής αγκιστείας μεταφορέα Ctr2 [65, 131].

Το πώς ο σίδηρος μεταφέρεται στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα και οργανίδια, δεν είναι γνωστό. Για το χαλκό, όμως, έχουν ταυτοποιηθεί τρεις σαπερόνες οι οποίες τον διανέμουν σε μόρια-στόχους ή σε κυτταρικά οργανίδια, ελαχιστοποιώντας την τοξική επίδρασή του στο κύτταρο. Η Atx1, όπως συζητήσαμε στην προηγούμενη ενότητα, τον μεταφέρει σε κυστίδια του συστήματος Golgi στα οποία τον αντλεί η ATPάση Ccc2. Η Lys7 τον μεταφέρει στη δισμουτάση-Cu,Zn του σουπεροξειδίου (Sod1) ενώ η Cox17 στο μιτοχόνδριο [125]. Έχουν βρεθεί ομόλογες των τριών αυτών πρωτεϊνών στον άνθρωπο, οι HAH1, CCS και hCox17 αντίστοιχα [125]. Μάλιστα, η διανομή του χαλκού από τη CCS στη Cu,Zn-SOD βρέθηκε ότι εμποδίζεται από την αλληλεπίδραση της πρώτης με την X11a, μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά και με το πεπτιδίο APP της Alzheimer [110]. Ομόλογη της X11a δεν έχει βρεθεί στη ζύμη.

Μέχρι τώρα έγινε μια γενική περιγραφή του κυτταρικού μεταβολισμού του σιδήρου και του χαλκού στο σακχαρομύκητα, ο οποίος απεικονίζεται συνολικά και απλουστευτικά στην εικόνα 0.2. Η έκφραση των βασικών στοιχείων του μεταβολισμού των δύο μετάλλων επάγεται μεταγραφικά από την έλλειψη του σιδήρου ή/και του χαλκού. Η μεταγραφική αυτή ρύθμιση διαμεσολαβείται από τους ενεργοποιητές Aft1, Aft2 και Mac1 από τους οποίους οι δύο πρώτοι σχετίζονται με το σίδηρο και ο τελευταίος με το χαλκό και δε συζητείται στην εισαγωγή, καθώς αποτελεί το αντικείμενο των τριών κεφαλαίων που την ακολουθούν.

0.5 Ο σίδηρος και ο χαλκός στα μιτοχόνδρια

Ο σίδηρος και ο χαλκός είναι απαραίτητα συστατικά πολλών οξειδοαναγωγικών



Εικόνα 0.2

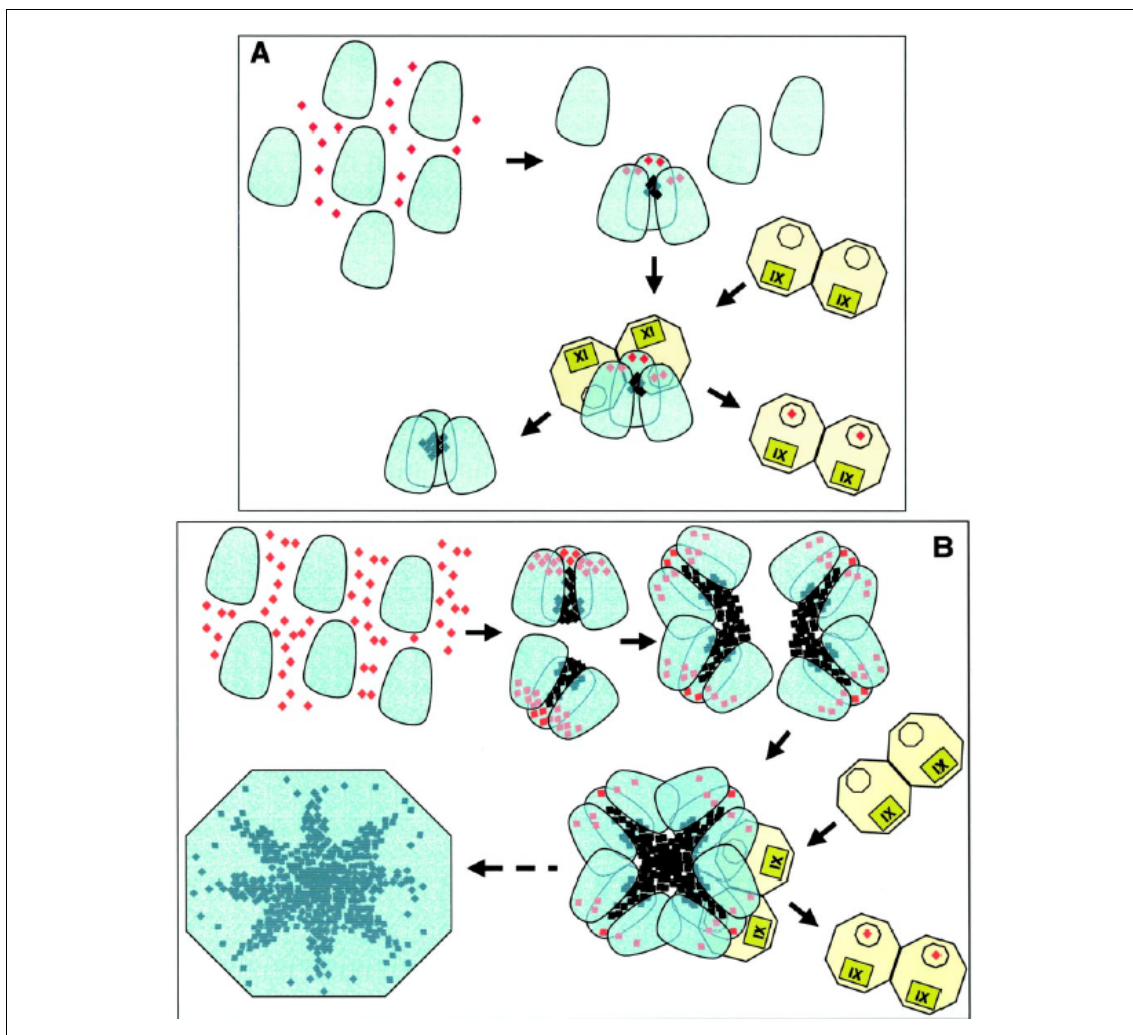
Μεταβολισμός σιδήρου και χαλκού στο σακχαρομύκητα. Γενικό σχήμα που απεικονίζει το μεταβολισμό των δύο μετάλλων στο σακχαρομύκητα. Για σχετικές λεπτομέρειες βλ. στο κείμενο. Οι πρωτεΐνες που εξαρτώνται από τους μεταγραφικούς ενεργοποιητές Aft1 και Aft2 (ή από τον Aft1 αποκλειστικά) σημειώνονται με κόκκινο χρώμα. Οι αποκλειστικά εξαρτώμενες από τον Aft2 σημειώνονται με κίτρινο και οι αποκλειστικά εξαρτώμενες από τον Mac1 με πράσινο (η Fre1 εξαρτάται και από τον Aft1 και από τον Mac1). Η έκφραση των σημειωμένων με γκριζό χρώμα πρωτεϊνών δε ρυθμίζεται από τους παραπάνω μεταγραφικούς παράγοντες.

ενζύμων λόγω της ιδιότητάς τους να δίνουν και να δέχονται ηλεκτρόνια. Είναι φυσιολογικό, επομένως, να απαντώνται στα μιτοχόνδρια όπου συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση ως βασικά συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας. Ενώ όμως ο σίδηρος αφθονεί στα οργανίδια αυτά κυρίως με τη μορφή συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου (Fe-S clusters) και αίμης, ο μόνος γνωστός μιτοχονδριακός ρόλος του χαλκού είναι, ως συστατικού της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου η οποία αποτελεί το τελευταίο στάδιο της αναπνευστικής μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο μεταβολισμός του σιδήρου στα μιτοχόνδρια είναι πολύ σημαντικός για την κυτταρική ομοιοστασία του μετάλλου ενώ και ο ρόλος του χαλκού σε αυτά είναι καθοριστικός για την αναπνευστική λειτουργία.

0.5.1 Ο μεταβολισμός του σιδήρου στα μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι ο αποκλειστικός τόπος σύνθεσης συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου μέσα στο κύτταρο τα οποία στη συνέχεια ενσωματώνονται είτε σε πρωτεΐνες των συμπλόκων I, II και III της αναπνευστικής αλυσίδας είτε, αφού εξαχθούν από το οργανίδιο, σε πρωτεΐνες του κυτοδιαλύματος [98]. Επίσης στα μιτοχόνδρια γίνεται η ενσωμάτωση του σιδήρου στην πορφυρίνη που αποτελεί το τελικό στάδιο στη βιοσύνθεση της αίμης. Η αίμη στη συνέχεια, με τη σειρά της, είτε ενσωματώνεται στα κυτοχρώματα της αναπνευστικής αλυσίδας είτε εξάγεται από το οργανίδιο με προορισμό πρωτεΐνες του κυτοδιαλύματος [87]. Ο καθοριστικός ρόλος των μιτοχονδρίων στη διαδικασία ενσωμάτωσης του σιδήρου στις σιδηροπρωτεΐνες τα καθιστά μαγνήτες του μετάλλου μέσα στο κύτταρο. Η παρεμπόδιση, για οποιοδήποτε λόγο, της σύνθεσης συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου και αίμης οδηγεί στη συσσώρευση ελευθέρου σιδήρου μέσα σε αυτά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Παράλληλα, προκαλεί γενική έλλειψη χρηστικού σιδήρου μέσα στο κύτταρο και συνεπώς απώλεια των μεταβολικών και αναπνευστικών λειτουργιών. Ο σίδηρος διατηρείται σε μη τοξικά επίπεδα μέσα στα μιτοχόνδρια, κάτω από κανονικές συνθήκες, με την εξασφάλιση ισορροπίας μεταξύ της εισόδου του και της εξόδου συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου και αίμης.

Ο τρόπος μεταφοράς του μετάλλου στο μιτοχόνδριο δεν είναι γνωστός. Με την εισαγωγή του σε αυτό, πάντως, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τέσσερις μεμβρανικές πρωτεΐνες, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο ακριβής τους ρόλος. Πρόκειται για τους μιτοχονδριακούς μεταφορείς σιδήρου Mmt1 και Mmt2 [96, 4]) και τους μεταφορείς τύπου MCP (mitochondrial carrier proteins) Mrs3 και Mrs4 [35, 116]. Σημαντικό συστατικό της κυτταρικής και μιτοχονδριακής ομοιοστασίας του σιδήρου στη ζύμη αποτελεί η πρωτεΐνη Yfh1 που είναι ομόλογη της φραταξίνης του ανθρώπου (υπεύθυνη για το νευροεκφυλιστικό σύνδρομο Friedreich's ataxia) [8]. Η απώλεια της Yfh1 προκαλεί συσσώρευση σιδήρου στο μιτοχόνδριο και ταυτόχρονη έλλειψή του στο κυτοδιάλυμα, παρεμπόδιση της αναπνοής και οξειδωτική καταστροφή του μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA [8, 34, 167, 66]. Η υπερέκφραση του γονιδίου *CCCI* (που όπως είδαμε εμπλέκεται στην μεταφορά σιδήρου στα κενοτόπια) σε ένα στέλεχος *yfh1Δ*, αποκαθιστά πλήρως την αναπνοή, μειώνοντας τα επίπεδα χρηστικού σιδήρου στο κυτοδιάλυμα και αποτρέποντας τη συσσώρευση σιδήρου στο μιτοχόνδριο [18]. Ο φαινότυπος που σχετίζεται με τη Yfh1 εξηγείται από μια σειρά

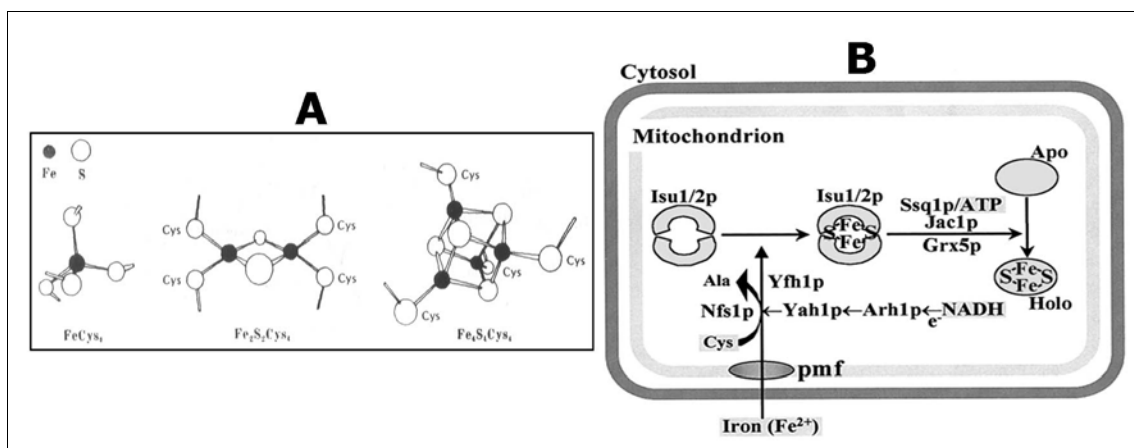


Εικόνα 0.3

Η φραταξίνη του σακχαρομύκητα λειτουργεί παράλληλα ως σαπερόνη και αποθηκευτική πρωτεΐνη μιτοχονδριακού σιδήρου. Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης σε συνθήκες χαμηλής (A) ή υψηλής (B) διαθεσιμότητας σιδήρου [121]: Μονομερή φραταξίνης ενεργοποιούνται, παρουσία οξυγόνου, από το δισθενή σίδηρο και σχηματίζουν τριμερή που διαθέτουν αρνητικά φορτισμένες εσωτερικές επιφάνειες. Πάνω σε αυτές δεσμεύεται δισθενής σίδηρος και καταλύεται η οξείδωση του στην τρισθενή μορφή με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικροκρυστάλλων ενυδατωμένων σιδηροοξειδίων (ferrihydrite crystallites). Όταν η συγκέντρωση του διαλυτού δισθενούς σιδήρου υπερβεί αυτή των διαθέσιμων θέσεων σιδηροοξείδωσης, αρχίζει μια αργή διαδικασία αυτοοξείδωσης στην επιφάνεια των μικροκρυστάλλων. Σε υψηλές πια συγκεντρώσεις του μετάλλου, οι διογκωμένοι μικροκρύσταλλοι ευθυγραμμίζονται και συνδέονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των τριμερών και το σχηματισμό πολυμερών. Σε όλη τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών, η φραταξίνη λειτουργεί ως σαπερόνη παρέχοντας δισθενή σίδηρο είτε στη σιδηροχηλάση που καταλύει την ενσωμάτωση του στην αίμη είτε σε πρωτεΐνες Isu που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση συμπλεγμάτων Fe-S. Με κόκκινα και μαύρα τετράγωνα συμβολίζονται οι Fe(II) και Fe(III) αντίστοιχα. Η σιδηροχηλάση φαίνεται ως διαλυτό διμερές με ένα μόριο πρωτοπορφυρίνης IX και μια θέση δέσμευσης Fe(II) σε κάθε υπομονάδα.

ευρημάτων που δείχνουν ότι είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των συμπλεγμάτων Fe-S [17, 115] και της αίμης [92] στο μιτοχόνδριο. Πρόσφατα αποδόθηκε στην πρωτεΐνη αυτή ο παράλληλος ρόλος της σαπερόνης και αποθηκευτικής πρωτεΐνης μιτοχονδριακού σιδήρου και περιγράφηκε ο τρόπος δράσης της [121] (εικόνα 0.3). Εκτός από το *YFH1*, έχει βρεθεί στη ζύμη, με χρήση γενετικών σχημάτων, ένας αρκετά μεγάλος αριθμός γονιδίων που παίζουν βασικό ρόλο στη μιτοχονδριακή ομοιοστασία σιδήρου. Αυτά σχετίζονται με τη σύνθεση ή την επιδιόρθωση *in vivo* των συμπλεγμάτων Fe-S και πολλά προέρχονται εξελικτικά από τα οπερόνια *nif* (nitrogen fixation) και *isc* (iron-sulfur cluster assembly) που είναι υπεύθυνα στα βακτήρια για το σχηματισμό της νιτρογενάσης και άλλων σιδηροθιοπρωτεϊνών αντίστοιχα. Τα προϊόντα τους περιλαμβάνουν τη δεσουλφουράση κυστεΐνης Nfs1 [149, 70], τις πρωτεϊνικές “σκαλωσιές” (scaffold proteins) Isu1/Isu2 [38], Nfu1 [140] και Isa1/Isa2 [59, 67, 124], τις σαπερόνες πρωτεϊνών Ssq1(Ssc2) (τύπου Hsp70) και Jac1 (τύπου J) [72, 149, 163, 106, 69, 162], τη γλουταρεδοξίνη Grx5 [136], τη φερρεδοξίνη Yah1 [86] και την αναγωγή της φερρεδοξίνης Arh1 [93]¹. Πρόσφατα, προσδιορίστηκε *in vivo*, με χρήση των κατάλληλων μεταλλαγών σε κύτταρα ζύμης ραδιοσημασμένα με ⁵⁵Fe, η διαδοχή της πρωτεϊνικής δράσης που οδηγεί στη σύνθεση των συμπλεγμάτων Fe-S [114] (εικόνα 0.4). Την ευθύνη της εξαγωγής των συμπλεγμάτων αυτών από το μιτοχόνδριο στο κυτοδιάλυμα έχουν δύο μεταφορείς της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, ο Atm1 (τύπου ABC) [70] και ο Yhm1 (τύπου MCP) [91] μαζί με τη σουλφυδρυλοξειδάση Ern1 [88] που βρίσκεται στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Η έλλειψη οποιασδήποτε πρωτεΐνης από τις προαναφερθείσες οδηγεί σε μιτοχονδριακή συσσώρευση σιδήρου ενώ ειδικά οι Isu1 και Isu2 (μαζί) και η Ern1 είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα. Έχει βρεθεί, τέλος, ότι η γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των σιδηροθιοπρωτεϊνών του κυτοδιαλύματος [145]. Η δράση της ακολουθεί αυτή του μεταφορέα Atm1 και σχετίζεται είτε με τη σταθεροποίηση του συμπλέγματος Fe-S για αποτελεσματικότερη μεταφορά του στην αποπρωτεΐνη είτε με την ίδια τη μεταφορά ή ενσωμάτωσή του σε αυτή είτε, τέλος, με την αποτροπή σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των ελεύθερων κυστεϊνών της αποπρωτεΐνης που πρόκειται να “υποδεχτούν” το σύμπλεγμα [145].

¹Ομόλογες βακτηριακές πρωτεΐνες υπάρχουν για τις Nfs1 (NifS/IscS), Isu1/Isu2 (IscU/NifU), Nfu1 (NifU), Isa1/Isa2 (IscA), Ssq1 (HscA), Jac1 (HscB) και Yah1(Fdx).



Εικόνα 0.4

Λειτουργικό μοντέλο βιογένεσης των συμπλεγμάτων Fe-S στα μιτοχόνδρια [114].

(A) Δομές συμπλεγμάτων Fe-S. (B) Στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, ο δισθενής σίδηρος προσδένεται στις απαραίτητες για τη βιωσιμότητα πρωτεΐνες Isu1/2 που χρησιμεύουν ως “σκαλωσιά” για τη συγκρότηση *de novo* ενός συμπλέγματος Fe-S. Απαραίτητη είναι η συνδρομή της δεσουλφουράσης κυστεΐνης Nfs1 που παρέχει το απαιτούμενο θείο στην αντίδραση και του συμπλόκου φερρεδοξίνης/αναγωγάσης της φερρεδοξίνης Yah1/Arh1 που πιθανώς ανάγει το θείο κατά την ενσωμάτωση του στο σύμπλεγμα. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Yfh1 (φραταξίνη) παίζει καθοριστικό ρόλο στο “φόρτωμα” των Isu με σίδηρο. Οι σαπερόνες Ssq1 και Jac1 και η γλουταρεδοξίνη Grx5 δρουν σε επόμενο στάδιο και είναι υπεύθυνες για την απόσπαση του συμπλέγματος Fe-S από τις Isu ή/και την εισαγωγή του στην αποπρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες Isu1/2 έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τις Isu αλλά παίζουν λιγότερο σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της βιογένεσης. Η αναγκαιότητα για κυστεΐνη, NADH και ATP τεκμηριώθηκε με την ανασύσταση της διαδικασίας *in vitro*. Ο δισθενής σίδηρος εισάγεται στο μιτοχόνδριο μέσω μη προσδιορισμένου μεταφορέα, οδηγούμενος από κινητήρια δύναμη πρωτονίων (proton motive force).

Οι μέχρι τώρα γνώσεις μας για το μεταβολισμό του σιδήρου στη ζύμη δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική ομοιοστασία του. Ενώ, λοιπόν, η είσοδος και η αποθήκευση του σιδήρου μέσα στο κύτταρο ρυθμίζεται ανάλογα με τη διαθεσιμότητά του στο θρεπτικό μέσο, η κατάλληλη επεξεργασία του στα μιτοχόνδρια φαίνεται ότι αποτελεί τον παράγοντα κλειδί για τη διατήρηση της κυτταρικής συγκέντρωσής του σε ισορροπία.

0.5.2 Ο μεταβολισμός του χαλκού στα μιτοχόνδρια

Ο χαλκός δεν είναι τόσο άφθονος όσο ο σίδηρος μέσα στο κύτταρο, όμως ο ρόλος του στον κυτταρικό μεταβολισμό είναι καθοριστικός. Δρα ως συμπαράγοντας τελικών οξειδασών σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Στα μιτοχόνδρια, εντοπίζεται αποκλειστικά στην οξειδάση του κυτοχρώματος c, στο σύμπλοκο IV της

αναπνευστικής αλυσίδας. Δύο άτομα χαλκού βρίσκονται στο διπυρηνικό κέντρο CuA της υπομονάδας 2 και ένα στο μονοπυρηνικό κέντρο CuB της υπομονάδας 1 του ενζύμου. Η μεταφορά του μετάλλου στα μιτοχόνδρια γίνεται από τη σαπερόνη Cox17 [43]. Αυτή είναι μια μικρή πρωτεΐνη, πλούσια σε κυστεΐνες, που απαντάται τόσο στο κυτοδιάλυμα όσο και στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο [9] και έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει δύο άτομα χαλκού και να ομοολιγομερίζεται συγκροτώντας πολυχαλκόςυμπλοκα [52]. Η Cox17 χρειάζεται μεν για τη φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία του κυττάρου, αφού ένα στέλεχος *cox17Δ* αναπτύσσεται προβληματικά, όμως δεν είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα καθώς η περίσσεια χαλκού επαναφέρει την ανάπτυξη του στελέχους στα φυσιολογικά επίπεδα [43]. Η διαδικασία με την οποία ο χαλκός μεταφέρεται από την Cox17, που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο, στην οξειδάση του κυτοχρώματος μέσα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου δεν είναι γνωστή. Τρεις πρωτεΐνες της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι Sco1, Sco2 και Cox11 πιστεύεται ότι εμπλέκονται σε αυτή [44, 56]. Η υπερέκφραση της πρώτης σε κύτταρα *cox17Δ* αποκαθιστά την αναπνευστική λειτουργία τους, όμως δεν υπάρχει μέχρι τώρα ένδειξη ότι αλληλεπιδρά με την Cox17. Η ύπαρξη ομοιοτήτων μεταξύ των περιοχών δέσμευσης χαλκού της Sco1 και της Cox2 (δεύτερης υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c) υποδηλώνουν πιθανή αλληλεπίδραση, μέσω χαλκού, μεταξύ των δύο πρωτεϊνών [104]. Η Sco2 είναι ομόλογη με τη Sco1 και μπορεί επίσης να αποκαταστήσει την αναπνευστική ανάπτυξη του μεταλλάγματος *cox17Δ*, όμως ο ρόλος και αυτής στη μεταφορά του χαλκού και στη συγκρότηση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c είναι ασαφής. Τέλος, η Cox11 ενδεχομένως εμπλέκεται στη διαδικασία προσθήκης χαλκού στην οξειδάση του κυτοχρώματος c, όντας ομόλογη με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του *Rhodobacter sphaeroides* η οποία σχετίζεται με ένα από τα τελικά στάδια συγκρότησης της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, πιθανώς με το σχηματισμό του κέντρου CuB.

0.6 Επίδραση του σιδήρου και του χαλκού στον κυτταρικό μεταβολισμό

Πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο ή χαλκό συμμετέχουν σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές μεταβολικές διεργασίες [27] (πίνακας 0.1). Ο μεγαλύτερος αριθμός σιδηρο- ή χαλκο-πρωτεϊνών χρησιμοποιείται σε μονοπάτια μεταβολισμού ενέργειας, γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά ευαίσθητα σε διαταραχές της ομοιοστασίας του

Μεταβολισμός σιδήρου και χαλκού	23 %
Αναπνευστική αλυσίδα	15 %
Αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης	13 %
Μεταβολισμός νουκλεοτιδίων	12 %
Μεταβολισμός αμινοξέων	9 %
Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος και κύκλος τρικαρβονικών οξέων	9 %
Μεταβολισμός λιπαρών οξέων	8 %
Βιοσύνθεση αίμης	3 %
Απόκριση σε στρες	3 %
Άλλες	5 %

Πίνακας 0.1

Ποσοστιαία κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο ή χαλκό ανάλογα με την κυτταρική διεργασία στην οποία συμμετέχουν [27].

ενός ή του άλλου μετάλλου. Για παράδειγμα, η ακονιτάση και η ηλεκτρική δεϋδρογονάση του κύκλου Krebs χρειάζονται αίμη ή συμπλέγματα σιδήρου-θείου ως συμπαραγόντες ενώ το 15% των γνωστών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις αναπνευστικές λειτουργίες επίσης περιέχει αίμη ή συμπλέγματα σιδήρου-θείου και στην περίπτωση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και χαλκό. Επιπλέον, πολλές πρωτεϊνικές φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης, που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, διαθέτουν θέσεις δέσμευσης σιδήρου ενώ και διεργασίες όπως η επιδιόρθωση του DNA και η σύνθεση νουκλεοτιδίων *de novo* (συγκεκριμένα η ριβονουκλεοτιδική αναγωγή) χρειάζονται ως συμπαραγόντες συμπλέγματα σιδήρου-θείου και σίδηρο αντίστοιχα. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια πολλών αμινοξέων, όπως αμινοξέων με διακλαδισμένες αλυσίδες, αρωματικών αμινοξέων, λυσίνης, αργινίνης, κυστεΐνης και μεθειονίνης, επηρεάζονται από την έλλειψη χαλκού [57]. Σε συμφωνία με αυτό, ένα ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεση της κυστεΐνης και της μεθειονίνης και κωδικοποιείται από το ORF *YFR055w*, βρέθηκε ότι ρυθμίζεται μεταγραφικά από τον χαλκοεξαρτώμενο ενεργοποιητή Mac1 [47]. Ο σίδηρος και ο χαλκός εμπλέκονται επίσης στην κυτταρική απόκριση σε διάφορα είδη στρες. Ο σίδηρος, για παράδειγμα, αποτελεί συμπαραγόντα ενός ενζύμου της βιοσύνθεσης της στεροειδούς αλκοόλης εργοστερόλης η οποία είναι γνωστό ότι

σχετίζεται με την απόκριση σε καταστάσεις στρες [95]. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι οι μεταβολές στην ομοιοστασία του σιδήρου και του χαλκού είναι δυνατό να επηρεάσουν πολλά διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια μέσα στο κύτταρο.

0.7 Η ζύμη ως πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού

Πολλά βασικά συστατικά των μονοπατιών ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού είναι συντηρημένα σε ζύμη, φυτά και ζώα. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη χρήση της ζύμης ως πρότυπου συστήματος για τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών επίδρασης των δύο μετάλλων στα κύρια μεταβολικά μονοπάτια των ανώτερων οργανισμών. Η πλήρης χαρτογράφηση του γονιδιώματος της ζύμης και η ολοένα διευρυνόμενη γνώση της λειτουργίας του, σε συνδυασμό με την ευκολία γενετικών χειρισμών στον οργανισμό αυτό, παρέχουν τα αποτελεσματικότερα εργαλεία διεύρυνσης της γνώσης μας για την ομοιοστασία σιδήρου και χαλκού σε πιο πολύπλοκους οργανισμούς. Υποθέσεις για τη λειτουργία γονιδίων των φυτών και των θηλαστικών μπορούν να γίνουν με βάση τη λειτουργία των ομολόγων τους στη ζύμη. Αυτές μπορούν να ελεγχθούν εύκολα με μελέτες συμπληρωματικότητας ή υπερέκφρασης που ακολουθούνται από φαινοτυπικές και γενωμικές αναλύσεις. Η κατανόηση των μηχανισμών της ευκαρυωτικής κυτταρικής πρόσληψης και ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού είναι απολύτως απαραίτητη για την αντιμετώπιση μεγάλων ιατρικών, γεωργικών και περιβαλλοντικών προβλημάτων της εποχής μας. Πολλές και σοβαρές παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο σχετίζονται με ανωμαλίες στο μεταβολισμό του σιδήρου και του χαλκού. Επιπλέον, η έλλειψη σιδήρου αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα διατροφικά προβλήματα παγκοσμίως που τόσο η ιατρική όσο και η γεωργία καλούνται να αντιμετωπίσουν ενώ η μόλυνση εδαφών και υδάτων από μέταλλα είναι ένα άλλο μεγάλο οικολογικό πρόβλημα που η περιβαλλοντική επιστήμη μπορεί να περιορίσει αναπτύσσοντας φυτά και μικρόβια ικανά να αποτοξινώνουν το έδαφος και το νερό.

Σε αυτό το γενικό πλαίσιο, η συνεισφορά της παρούσας εργασίας στη μελέτη της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού συνίσταται στην καλύτερη κατανόηση του πώς αυτή ρυθμίζεται στο μεταγραφικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, στα τρία επόμενα κεφάλαια διερευνώνται οι μηχανισμοί της εξαρτώμενης από τη διαθεσιμότητα σιδήρου και χαλκού και διαμεσολαβούμενης από τους ειδικούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές Aft1 και Mac1 μεταγραφικής ενεργοποίησης στο σακχαρομύκητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Μεταγραφικοί συρρυθμιστές της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού

1.1	Εισαγωγικά.....	16
1.2	Η επαγόμενη μεταγραφή του γονιδίου <i>FRE2</i> είναι σημαντικά μειωμένη σε ένα στέλεχος <i>gar1Δ*</i>	22
1.3	Η μειωμένη επαγόμενη μεταγραφή του <i>FRE2</i> στο στέλεχος <i>gar1Δ*</i> οφείλεται σε ημιεπικρατή μεταλλαγή που δεν εντοπίζεται στα γονίδια <i>AFT1</i> ή <i>MAC1</i>	22
1.4	Γενετικό σχήμα για την απομόνωση καταστολέων της άγνωστης μεταλλαγής.....	25
1.5	Επίδραση του <i>NHP6A</i> και άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες στη μεταλλοεξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση.....	30
1.5.1	<i>NHP6A, NHP6B</i>	30
1.5.2	<i>SWI6</i>	30
1.5.3	<i>SSN6, TUP1</i>	31
1.5.4	<i>GCN5, ESA1</i>	32
1.6	Διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεταγραφικών ρυθμιστών και συρρυθμιστών της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού.....	36
1.7	Ο παράγοντας Nhr6 δεν αποτελεί υπόστρωμα των ακετυλοτρανσφερασών ιστονών Gcn5 και Esa1 <i>in vitro</i>	37
1.8	Η Esa1 αυτοακετυλιώνεται <i>in vitro</i> ενώ, στις ίδιες συνθήκες, ο Nhr6 φαίνεται να επηρεάζει την ενζυμική της λειτουργία...	38

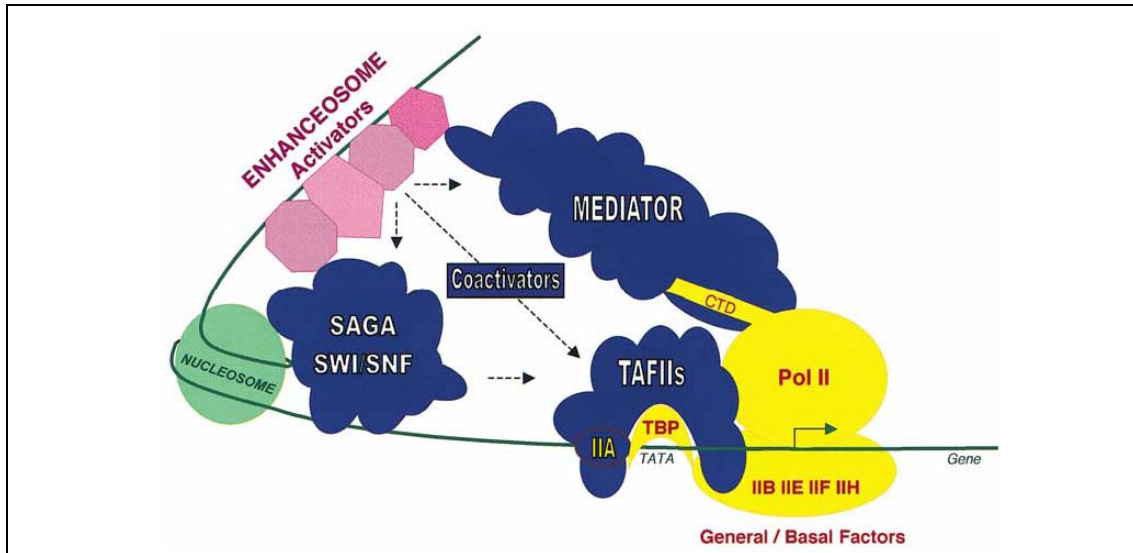
1.1 Εισαγωγικά

Ο τρόπος με τον οποίο ένας ευκαρυωτικός οργανισμός ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του αποτελεί ένα από τα βασικά αντικείμενα έρευνας στη μοριακή βιολογία. Το ευκαρυωτικό κύτταρο συντονίζει μια πληθώρα λειτουργιών, από την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση μέχρι την απόκριση σε φυσιολογικά ή περιβαλλοντικά ερεθίσματα, μέσω πολύπλοκων μηχανισμών ελεγχόμενης ενεργοποίησης ή

καταστολής της έκφρασης των γονιδίων του. Η γονιδιακή ρύθμιση μπορεί να γίνεται σε διάφορα επίπεδα, από το μεταγραφικό μέχρι και το μετα-μεταφραστικό. Για τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνη είναι η RNA πολυμεράση II και απαιτείται η συντονισμένη λειτουργία ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων οι οποίοι κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- (1) στους προσδεδεμένους στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής γενικούς ή βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες (**general transcription factors - GTFs**),
- (2) στους προσδεδεμένους σε ειδικές αλληλουχίες DNA που βρίσκονται πριν (upstream) από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής μεταγραφικούς ρυθμιστές (ενεργοποιητές και καταστολείς) (**sequence-specific DNA-binding transcriptional activators/repressors**) και
- (3) στους μεταγραφικούς συρρυθμιστές (συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς) (**transcriptional coactivators/corepressors**).

Προϋπόθεση για την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II αποτελεί η συγκρότηση του προεναρκτικού συμπλόκου (**pre-initiation complex - PIC**) στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής (**core promoter**). Το σύμπλοκο αυτό προκύπτει από τη συνεργατική συνάθροιση πολλών παραγόντων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η ίδια η πολυμεράση και οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIIF και TFIIH (εικόνα 1.1). Η συγκρότηση του προεναρκτικού συμπλόκου ρυθμίζεται από τους ειδικούς μεταγραφικούς ρυθμιστές που βρίσκονται σε μικρή ή μεγαλύτερη απόσταση από το σημείο έναρξης της μεταγραφής και δρουν με τη διαμεσολάβηση (ή τη διευκόλυνση) των μεταγραφικών συρρυθμιστών. Οι τελευταίοι είναι παράγοντες ή πολυπαραγοντικά σύμπλοκα που δεν προσδένονται (ή προσδένονται μη ειδικά) στο DNA αλλά στρατολογούνται στους υποκινητές μέσω αλληλεπιδράσεων με τους ειδικούς ρυθμιστές ή/και με συστατικά του γενικού μεταγραφικού μηχανισμού. Σε αυτούς περιλαμβάνονται, μεταξύ πολλών άλλων, παράγοντες που συνδέονται με το γενικό μεταγραφικό μηχανισμό και εντοπίζονται πάνω στους περισσότερους υποκινητές όπως ο TFIIA, οι TAFs (**TBP-associated factors**) και το σύμπλοκο Mediator όπως και παράγοντες που συνδέονται με ειδικούς ρυθμιστές και συχνά έχουν ενζυματικές ενεργότητες που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης (ακετυλοτρανσφεράσες ή απακετυλάσες ιστονών και ειδικές ATPάσες) (εικόνα 1.1). Πρέπει να σημειωθεί ότι συρρυθμιστές που συνδέονται με το βασικό μεταγραφικό μηχανισμό έχουν επίσης βρεθεί να αλληλεπιδρούν με ειδικούς ρυθμιστές ή/και να τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης ενώ συρρυθμιστές που



Εικόνα 1.1

Η ενεργοποίηση της μεταγραφής από τους ενεργοποιητές γίνεται με τη συνδρομή πληθώρας συνενεργοποιητών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Ενεργοποιητές (ροζ) δεσμεύονται στους υποκινητές και στρατολογούν συνενεργοποιητές (μπλε) που επιδρούν στη χρωματινική δομή (πράσινο) ή/και διαμεσολαβούν για τη στρατολόγηση στοιχείων του γενικού μεταγραφικού μηχανισμού (κίτρινο) κατά την έναρξη και την επιμήκυνση της μεταγραφής. Σε γενικές γραμμές, οι συνενεργοποιητές περιλαμβάνουν παράγοντες και πολυπαραγοντικά σύμπλοκα που είτε επικοινωνούν με το γενικό μεταγραφικό μηχανισμό, όπως οι TAFs του συμπλόκου TFIID, ο TFIIA και το σύμπλοκο SRB/Mediator, είτε τροποποιούν/αναμορφώνουν τη χρωματίνη μετριάζοντας ή και καταργώντας τη γενικά κατασταλτική επίδρασή της στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, όπως τα σύμπλοκα SAGA και SWI/SNF. Είναι πιθανό, επίσης, συνενεργοποιητικά σύμπλοκα να εμπλέκονται τόσο στη χρωματινική τροποποίηση όσο και σε αλληλεπιδράσεις με συστατικά του γενικού μεταγραφικού μηχανισμού (π.χ. SAGA, TFIID) [108].

συνδέονται με ειδικούς ρυθμιστές έχουν επίσης βρεθεί να αλληλεπιδρούν με συστατικά του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού. Η οργάνωση του DNA των υποκινητών σε νουκλεοσώματα και χρωματινικές δομές ανώτερης τάξης αποτελεί ανασταλτικό στοιχείο για τη διαδικασία της μεταγραφής. Για τη δημιουργία ευνοϊκού για τη μεταγραφή χρωματινικού περιβάλλοντος, καθοριστικός είναι ο ρόλος των ενζύμων τροποποίησης της χρωματινικής δομής τα οποία στρατολογούνται στους υποκινητές από τους μεταγραφικούς ενεργοποιητές. Στην πραγματικότητα, στοιχεία όπως η ιδιαίτερη χρωματινική δομή του κάθε υποκινητή και η φάση του κυτταρικού κύκλου καθορίζουν τον τρόπο συνεργασίας των διαφόρων ενζύμων τροποποίησης της χρωματινικής δομής πάνω σε αυτόν και τα χρονικά σημεία δράσης τους (πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά τη συγκρότηση του προεναρκτικού συμπλόκου) στην πορεία της

FRE2

-1000 ATAACCTCTT TGAATTTCAA GATTTTTCAA GCTGCCTCCT TAATGATTTT ATGGATTGTA GGAGGAAAAA CCTTAGCGTG
-920 GTATTTCTGG AACACGGATA AGGGAAGATG CTGATTTTGT GCCGTCTTGA ATACCCCTTT GAGTATTGGA CACTGTTTAG
-840 ACGAACGAAT AATTCGAAAC TTATTGAGTG TTTTGTATAG GGGGATGTAT GAATACTTCC ATTTTGGTTT TTAAATAAGT
-760 ACAAGAAATTT CACTATGAAA TGGTCAAGAA TGTATTGAG AGAAAAAACT TTTTATAGGA GAAATAAGCA GCATGAGCTA
-680 CAGAGATATC CATAACAATG AATAACATCA TAATGTCTCT CAGCCAGAAA ACACAGCTAG **ACAAA**TACTG **ACTTTGCGaA**
-600 TGCACCAGAA ATGAACCATA TGGGCTAGAA TCCATTGTAC CAAAAGTTGC CTGTTCTTTA CGTTTACCAA AGAATATCGC
-520 ACAGAAAACCT GTCAAAATTC ATTGCGTTGT GTGACTCTAA CTGGAAGTTT **ACTatGCAAA** CAGGATGATT ATTGTACATT
-440 TATTGTAAT **TGCACCCAGG** TCTTT**TTTGC** **ctt**TATTTTCG GGTTCACAG AAAACAAGTA AATTTGACG TGATAAAAAA
-360 GTAGACTCGT TAAATCAGGA TGAAGTACCG GTAATGGTTG CATT**GACAAA** TAGTTGGCTC AATGATGCTA GTGGGTATTG
-280 ATTTTGTGTA AAATA**TGGGT** **GTA**TCATTTC TGCCATAATA GAATTAGCAA GCAACCTATC ATTCTACATT CTAAACGATA
-200 GTACTGTTTC CTTGCTTTTC TGAATTTCTT TCTGATGAAC AAAATCCCTC CTTTCTTGGa CAACATACTC TAAATTCGGT
-120 TATTGCAAGG TATCATTAAT **TTGCcactAA** ATATATA**gt** **CGCAAAA**AAAT GAACATGATT **TTTGCTacA** GTTGTAATAA
-40 AGTCTTTTTT ATCCAAGCT TATGAAACCC AACGAATATA **ATG**

FRE1

AATTTAGCTC CCCTTCTACT
-1000 **ACACCCA**CTT TGGTAT**TTTGC** **ctt**ATTCCGGT CCATTTCCCT CTCTTATTGG TGGCTTAGGT TGATAGTTCA CAATAAATTT
-920 AGGAACCTTT GGTGTGCTAA CAAATTCAG TTTTGTACTG GCGACTAATG CAGGTATAGG AGCACAGCTT TCCTCGTCGA
-840 AAGATGACCT CACGTTGAG CCACCGACAC ATATCGGTCC AGCGCCACAT TCATTATACG GCGAGCAGCA CGGCCATTCT
-760 GCGGACAAAG GGTATTATTG AGAACAAGAA ATGAGATTTT TGGGTTTGTa TAATTCTCCC **aGtGCAAA**TC CGATGTAGCC
-680 AACAAACCGGC ACCAGCTGTA ATATTGATAT TCTCATATTT TTATTT**CGtG** **CAAA**AGCCCT TGATGATACT CTAAACTAAA
-600 CGACTGTCTT TGTATTTCTG TATTAATCGA TAATTATTAG CTGGTATTGT CTTTTTTTTT TTTTCTCTAC ATGATCGTCG
-520 CGAGGCTTTA CATAATTTTT GTGACGCCCT TAAAGTATA GTAGAACGAG CACATAAGAA GTAAATGAA AGTACGGCAG
-440 ATGCAATGTA CAGTAAAGAG CGGTACAATA GTTGAAGAAT ACCCGATAAA AATGTATTTA GGTGCTTGA CGGG**TTTGCa**
-360 **gc**AAATGCCA AGAACACTAA CTGTGGCAAT CTGTGTGAGA ATCTACTCCC AACCCAAACA TTTTCGCCGA TATTT**TTGCT**
-280 **CAC**CTTTTTT **TTTTGCTCAT** CGAAAATTGT TATAGCGGCT CGACTTTGAT TACTAA**PAC** **ACCCA**ATTT TAATATCCTC
-200 AAGGCTAGAT CGTCTCTCA AGGAACTTAA AGTGCCTGAT CTTGCGATGA TTAATCTACA GCGATGATA CTTAAATCAT
-120 GTAAAAATCT CAGTTTTGAA GTCG**TTTGCT** **Ct**CTTCCATG CTTTCTCC CTTTGGAAAG GTAATATAAT CATCTAATTT
-40 CTCGCATATT CACGCCGACG GAAGAACGAG CCGGATCAAT **ATG**

CTR1

-550 AGGCCGCATT TTGAACCGTA **TTTTGCTCGT** TCCAGCCTTT CCACGTTTTT GTTATCTAAG CAACTTGGCA CATTTCCTTA
-470 CTATACTACA AACCGATACG TAAATACTTC CCTAAATAGC ATATGAATTA TTCAGTAATT TTTAAGGATC GAAACTGCAC
-390 CTCAACTATT CGTTACTGTG GTTATGTTCT CATGTATT**ga** **tGCAAA**TCAT GGGATATTG **CTCAAG**ACGA CGGTA**AAATG**
-310 **AGCAAAA**ATG GCACGATCCT GAAAAGAGCA CTTTTCAAGA TTTCCGGCTAC AAAATGCAAC ATAAAAAATG TTGTATTGTC
-230 ATCTCGAGAG GGTCTGTAT GTTTTATTCC TCTTATGATT AGTTTACATT AGTAAAACAG ATACGCAGTG TGCTCTTAAT
-150 AAACAACCTAC TCCATAGCTT TAT**TTGCatA** ACAAACCTTT TAAGCACAAA CTTAAACAGG TGGAGTAATA GTTCGGCGGC
-70 GACTCAAATT ACATTTGTTG GAAGAATCGA ATAGAAAATA AAAAAAAGTG TATTATATTT GACATTCAAA **ATG**

Εικόνα 1.2

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των ρυθμιστικών περιοχών των κυρίων γονιδίων αναφοράς της παρούσας μελέτης. Σημειώνονται: με κόκκινο ή μπλέ χρώμα τα λειτουργικά στοιχεία FeRE ή CuRE αντίστοιχα, με κόκκινα ή μπλέ γράμματα τα υπονήφια στοιχεία FeRE ή CuRE αντίστοιχα και με πράσινα γράμματα τα υπονήφια στοιχεία-στόχοι του Mac1 ως μεταγραφικού καταστολέα (βλ. ενότητα 3.3). Τα βέλη δείχνουν σε ποιόν κλώνο του DNA βρίσκονται τα διάφορα στοιχεία-στόχοι ενώ τα μικρά γράμματα υπογραμμίζουν τις αποκλίσεις από τις αλληλουχίες consensus. Τα σκιασμένα με γκριζό χρώμα υπονήφια στοιχεία-στόχοι έχουν ελεγχθεί για πρόσδεση στην παρούσα μελέτη.

Αλληλουχίες consensus:

FeRE

5' - (T/C) (G/A) C A C C C (A/G) -3'

3' - (A/G) (C/T) G T G G G (T/C) -5'

CuRE

5' -T T T G C (G/T) C (G/A) -3'

3' -A A A C G (C/A) G (C/T) -5'

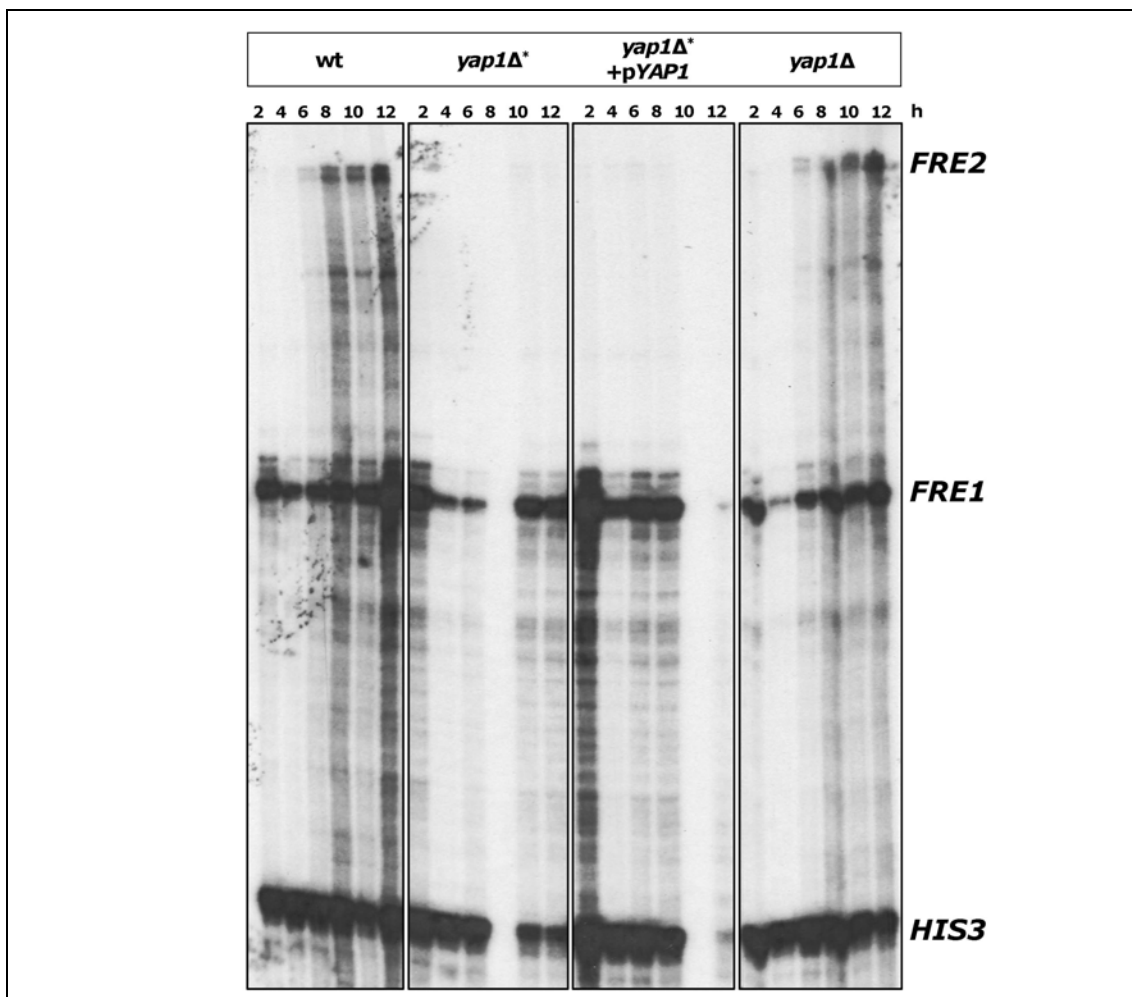
Στοιχείο-στόχος του παράγοντα Cuf1 ως μεταγραφικού καταστολέα στον *S. pombe*

5' -T T T G T C -3'

3' -A A A C A G -5'

μεταγραφικής διαδικασίας [37]. Σε κάθε περίπτωση, η ύπαρξη πολλών διαφορετικών πολυπαραγοντικών συρρυθμιστικών συμπλόκων που παρουσιάζουν, σε ένα βαθμό, δομική και λειτουργική αλληλεπικάλυψη, βοηθάει στο συντονισμό της μεταγραφικής ρύθμισης ομάδων γονιδίων και στη σύζευξη της μεταγραφής με άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί τον ιδανικό ευκαρυωτικό μικροοργανισμό για κάθε είδους βιολογική μελέτη, συμπεριλαμβανομένης και της μεταγραφικής, λόγω των μοναδικών δυνατοτήτων γενετικού χειρισμού που προσφέρει αλλά και του γεγονότος της συντήρησης των βασικών κυτταρικών διεργασιών μεταξύ ζυμών και ανώτερων οργανισμών. Το ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μεταγραφική ρύθμιση της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού στο σακχαρομύκητα. Το γονίδιο *FRE2*, κατά κύριο λόγο, αλλά και τα *FRE1* και *CTR1* που, όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, κωδικοποιούν βασικά συστατικά του κυτταρικού μηχανισμού πρόσληψης μετάλλων, αποτελούν τα γονίδια αναφοράς αυτής της μεταγραφικής μελέτης. Το ερέθισμα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής τους είναι η έλλειψη σιδήρου (*FRE1*, *FRE2*) ή χαλκού (*FRE1*, *CTR1*) στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω δύο προσδεδεμένων σε ειδικές αλληλουχίες των υποκινητών τους μεταγραφικών ενεργοποιητών: του σιδηροεξαρτώμενου Aft1 (*FRE1*, *FRE2*) με τον οποίο ασχολούμαστε στο δεύτερο



Εικόνα 1.3

Έλεγχος της επαγόμενης μεταγραφής των *FRE1* και *FRE2* απουσία του γονιδίου *YAP1*. Ανάλυση προστασίας από RNάση A ολικού RNA από τα στελέχη αγρίου τύπου, *yap1Δ**, *yap1Δ** μετασχηματισμένου με την πλασμιδιακή κατασκευή YCr50-*YAP1* και *yap1Δ*, με χρήση ραδιοσημασμένων αντιπαράλληλων RNA ανιχνευτών ειδικών για τα γονίδια *FRE1*, *FRE2* και *HIS3* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης συσσώρευσης mRNA). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη σιδήρου (SCBPS) και συλλέχθηκαν τμηματικά ανά 2h από την επιβολή των επαγωγικών συνθηκών.

κεφάλαιο και του χαλκοεξαρτώμενου Mac1 (*FRE1*, *CTR1*) για τον οποίο συζητάμε στο τρίτο κεφάλαιο (εικόνα 1.2).

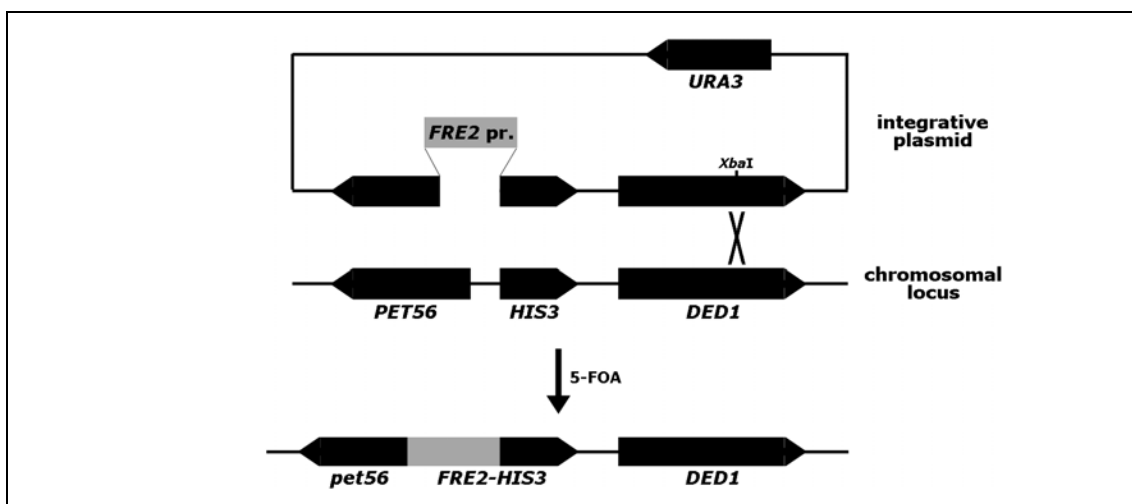
Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται το πώς, χρησιμοποιώντας τον φαινομενικά απλά ρυθμιζόμενο υποκινητή *FRE2*, επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε συρρυθμιστές (ή και πρόσθετους ρυθμιστές) που, μαζί με τους ήδη γνωστούς ειδικούς μεταλλοεξαρτώμενους παράγοντες, ελέγχουν μεταγραφικά το μηχανισμό ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού του σακχαρομύκητα.

1.2 Η επαγόμενη μεταγραφή του γονιδίου *FRE2* είναι σημαντικά μειωμένη σε ένα στέλεχος *yap1Δ**

Ο προσδεδεμένος στο DNA μεταγραφικός παράγοντας Yap1 (yeast AP1) [48] ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την προσαρμοστική απόκριση του σακχαρομύκητα σε διάφορα είδη στρες (π.χ. οξειδωτικό στρες, στρες από τοξικές χημικές ουσίες, βαριά μέταλλα κ.λπ.) [81, 45, 166, 169]. Επειδή η χαμηλή ή υψηλή διαθεσιμότητα σιδήρου και χαλκού συνιστά μια στρεσογόνα κατάσταση για το κύτταρο, επιχειρήσαμε να εξετάσουμε αν ο Yap1 σχετίζεται με την προσαρμοστική απόκρισή του σε αυτή, δηλαδή με την ανάλογη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη των δύο μετάλλων από τον εξωκυτταρικό χώρο. Γι' αυτό το λόγο, ελέγξαμε τη μεταγραφή των γονιδίων *FRE1* και *FRE2*, σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας σιδήρου, σε δύο ελλειμματικά ως προς το γονίδιο *YAPI* στελέχη: στο *yap1Δ** [45] από το οποίο έχει απαλειφτεί η νουκλεοτιδική περιοχή -200/+186 του γονιδίου και στο *yap1Δ* (Έλενα Γεωργιάτσου) από το οποίο έχει απαλειφτεί ολόκληρη η κωδική περιοχή του. Τα μεταγραφικά επίπεδα του *FRE1* ήταν αμετάβλητα στα δύο μεταλλαγμένα στελέχη, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, γεγονός που έδειξε ότι ο Yap1 δεν εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου (εικόνα 1.3). Τα επίπεδα του *FRE2* όμως, ενώ δε μεταβλήθηκαν στο στέλεχος *yap1Δ*, βρέθηκαν δραματικά μειωμένα στο *yap1Δ**, παραμένοντας μειωμένα και μετά την πλασμιδιακή εισαγωγή του *YAPI* (εικόνα 1.3). Σύμφωνα με τα παραπάνω, τρία ενδεχόμενα είναι πιθανά:

- (1) είτε να παράγεται στο στέλεχος *yap1Δ** ελλειμματικό πεπτίδιο Yap1 που εμπλέκεται ειδικά στη μεταγραφική ρύθμιση του *FRE2* με επικρατή αρνητικό τρόπο,
- (2) είτε το στέλεχος αυτό να φέρει μεταλλαγή σε άλλο γονίδιο που κωδικοποιεί κάποιο ρυθμιστικό ή συρρυθμιστικό παράγοντα ο οποίος επιδρά με ειδικό τρόπο στη μεταγραφή του *FRE2*,
- (3) είτε, τέλος, το *yap1Δ** να φέρει μεταλλαγή στο ίδιο το *FRE2*. Το πρώτο ενδεχόμενο θεωρήθηκε λιγότερο πιθανό εφόσον μεγάλο τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής καθώς και τα πρώτα 186 νουκλεοτίδια του γονιδίου *YAPI* έχουν απαλειφτεί στο στέλεχος *yap1Δ**. Τα άλλα δύο εξετάστηκαν στη συνέχεια.

1.3 Η μειωμένη επαγόμενη μεταγραφή του *FRE2* στο στέλεχος *yap1Δ** οφείλεται σε ημιεπικρατή μεταλλαγή που δεν εντοπίζεται στα γονίδια *AFT1* ή *MAC1*

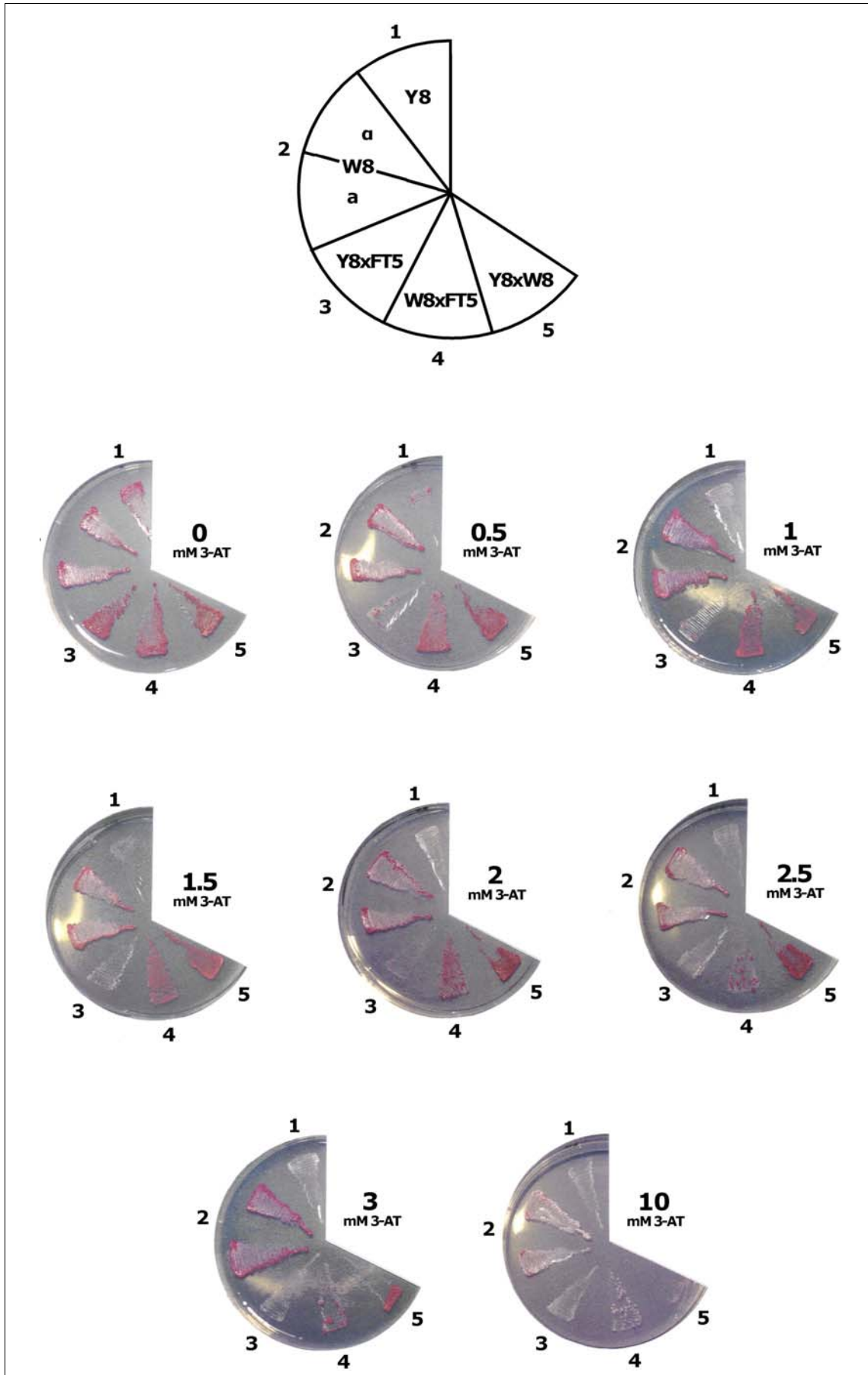


Εικόνα 1.4

Διαδικασία αντικατάστασης του γονιδίου *HIS3* με το *FRE2-HIS3* στο στέλεχος *yap1Δ.** Το αυξότροφο για ουρακίλη στέλεχος *yap1Δ** μετασηματίστηκε με ειδικό πλασμιδιακό φορέα γενωμικής ενσωμάτωσης (yeast integrative plasmid) που έφερε το γονίδιο *URA3* και το γενετικό τόπο *PET56-HIS3-DED1* στον οποίο η ρυθμιστική περιοχή του *HIS3* είχε αντικατασταθεί από την περιοχή -816/-1 του *FRE2*. Προηγήθηκε πέψη του πλασμιδίου με κατάλληλο ένζυμο (*XbaI*) έτσι ώστε να ευνοηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός στην επιθυμητή γενωμική περιοχή. Οι αποικίες που προέκυψαν μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 5-FOA για ανάκτηση της αυξοτροφίας για ουρακίλη και τελικά έγινε επιλογή εκείνων που παρουσίασαν σιδηροεξαρτώμενη αυξοτροφία για ιστιδίνη. Η γενωμική ενσωμάτωση του *FRE2-HIS3* στις αποικίες αυτές επιβεβαιώθηκε με ανάλυση Southern και υβριδοποίηση με κατάλληλους ραδιοσημασμένους ανιχνευτές.

Προκειμένου να εντοπίσουμε την αιτία μείωσης της επαγόμενης μεταγραφής του *FRE2* στο στέλεχος *yap1Δ**, το στέλεχος αυτό, καθώς και το ισογενές αγρίου τύπου, τροποποιήθηκαν έτσι ώστε να παρουσιάζουν εξαρτώμενη από το *FRE2* αυξοτροφία για το αμινοξύ ιστιδίνη. Αυτό επιτεύχθηκε με την αντικατάσταση του ενδογενούς γονιδίου τους *HIS3* (που κωδικοποιεί ένα βασικό ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της ιστιδίνης) με το χμαιρικό *FRE2-HIS3* στο οποίο η κωδική περιοχή *HIS3* βρίσκεται υπό τον έλεγχο της ρυθμιστικής περιοχής -816/-1 του *FRE2* (εικόνα 1.4). Με αυτόν τον τρόπο, η ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο χωρίς ιστιδίνη έγινε άμεσα εξαρτώμενη από την περιεκτικότητα του μέσου σε σίδηρο. Το τροποποιημένο *yap1Δ** (Y8) δε μπόρεσε να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο χωρίς ιστιδίνη και σίδηρο που περιείχε τουλάχιστον 0,5mM 3-AT¹, σε αντίθεση με το αντίστοιχο στέλεχος

¹ Συναγωνιστικός αναστολέας της πρωτεΐνης His3 που χρησιμοποιείται για την καταστολή της βασικής έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου.



	στέλεχος	σ.τ.	mM 3-AT							
			0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	10
1	Y8	a	+	+/-	-	-	-	-	-	-
2	W8	α, α	++	++	++	++	++	++	++	-
3	Y8xFT5	διπλ.	+	+/-	-	-	-	-	-	-
4	W8xFT5	διπλ.	++	++	++	+	+	+/-	+/-	+/-
5	Y8xW8	διπλ.	+	+	+	+	+	+	+	-

Εικόνα 1.5

Φαινοτυπική ανάλυση στελεχών με σιδηροεξαρτώμενη αυξοτροφία για ιστιδίνη. Τα διάφορα στελέχη (για σχετικές λεπτομέρειες βλ. στο κείμενο) αναπτύχθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε σίδηρο (MIN + 100μM BPS) και στο οποίο προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα 3-AT (συναγωνιστικός αναστολέας της πρωτεΐνης His3) με σκοπό την καταστολή της βασικής έκφρασης του γονιδίου *HIS3*.

αγρίου τύπου (W8) και, επιπλέον, το διπλοειδές στέλεχος που προέκυψε από τη διασταύρωση του Y8 με το W8 εμφάνισε ενδιάμεσο φαινότυπο ανάπτυξης σε σύγκριση με τα δύο απλοειδή στελέχη (εικόνα 1.5-1, 2, 5). Τα παραπάνω έδειξαν ότι η μείωση της επαγόμενης μεταγραφής του *FRE2* στο στέλεχος *gap1Δ*^{*} δεν οφείλεται σε μεταλλαγή στο ίδιο το γονίδιο αλλά σε άλλη (άγνωστη) μεταλλαγή που μάλιστα έχει ημιεπικρατή χαρακτήρα. Μια ανάλογη μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *AFT1* ή κέρδους λειτουργίας του *MAC1*² θα μπορούσε να είναι η ζητούμενη. Κάτι τέτοιο διαπιστώσαμε ότι δε συμβαίνει, καθώς προσδιορίστηκαν οι πλήρεις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του *AFT1*, αλλά και του *MAC1*, στα στελέχη *gap1Δ*^{*} και αγρίου τύπου αντίστοιχα και βρέθηκαν πανομοιότυπες.

1.4 Γενετικό σχήμα για την απομόνωση καταστολέων της άγνωστης μεταλλαγής

Με δεδομένο τον ημιεπικρατή χαρακτήρα της, αναζητήσαμε γενετικούς καταστολείς

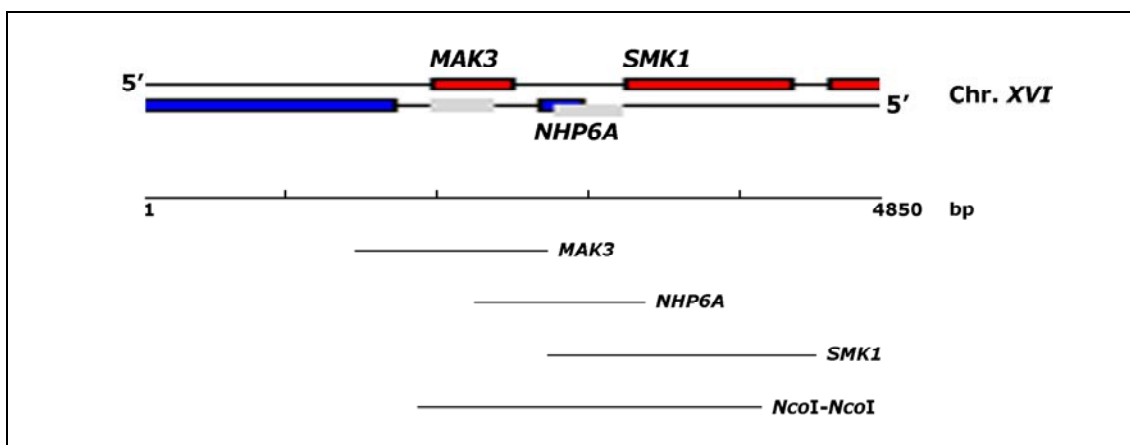
² Ο παράγοντας Mac1 έχει φαινομενικά κατασταλτική επίδραση στη μεταγραφή του *FRE2* (βλ. κεφ. 3). Πάντως, αν ο Mac1 ήταν μόνιμα ενεργός στο *gap1Δ*^{*} τότε και η μεταγραφή του *FRE1* θα ήταν μόνιμα ενεργοποιημένη στο στέλεχος αυτό, κάτι που δεν παρατηρήθηκε.

βιβλιοθήκη			
γενωμική βιβλιοθήκη σακχαρομύκητα που περιλαμβάνει ενθέματα μήκους 5-10kb κλωνοποιημένα στη θέση <i>Bam</i> HI του πλασμιδιακού φορέα πολλαπλών αντιγράφων YEp13 (<i>LEU2</i>) (Kim Nasmyth)			
στελέχος που μετασχηματίστηκε			
Y8xFT5 (<i>leu2, ura3, FRE2-HIS3</i>)			
θρεπτικό μέσο επιλογής			
MIN + 0,2mM ουρακίλη + 1mM 3-AT + 100μM BPS ελέγχθηκε η ικανότητα ανάπτυξης στο μέσο αυτό ~20.000 πρωτότροφων για λευκίνη μετασχηματισμένων με τη βιβλιοθήκη αποικιών			
φαινοτυπική ανάλυση συλλεχθέντων αποικιών			
ανάπτυξη	+BPS	-BPS	
	1mM 3-AT	0mM 3-AT	5mM 3-AT
-	0	0	9
+/-	0	9	53
+	92	83	30

Πίνακας 1.1

Γενετικό σχήμα για την απομόνωση καταστολέων της σχετιζόμενης με το *FRE2* μεταλλαγής. Για σχετικές λεπτομέρειες βλ. στο κείμενο. Με δεδομένο ότι το μέγεθος του γενώματος του σακχαρομύκητα είναι 13.000kb και ότι το ελάχιστο μήκος ενθέματος της βιβλιοθήκης είναι 5kb, προκύπτει ότι υπάρχει τουλάχιστον $20.000/(13.000/5) = 7,69$ φορές (υπερ)αντιπροσώπευση του γενώματος στο συγκεκριμένο γενετικό σχήμα.

της σχετιζόμενης με το *FRE2* άγνωστης μεταλλαγής, επιλέγοντας αποικίες του στελέχους Y8xFT5, μετασχηματισμένες με μια γενωμική βιβλιοθήκη πολλαπλών αντιγράφων του σακχαρομύκητα, που αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο μέσο χωρίς σίδηρο (πίνακας 1.1). Η χρήση του απλοειδούς στελέχους Y8 στο παραπάνω γενετικό σχήμα ήταν προβληματική εξαιτίας του αργού ρυθμού ανάπτυξης του σε ελάχιστο μέσο ο

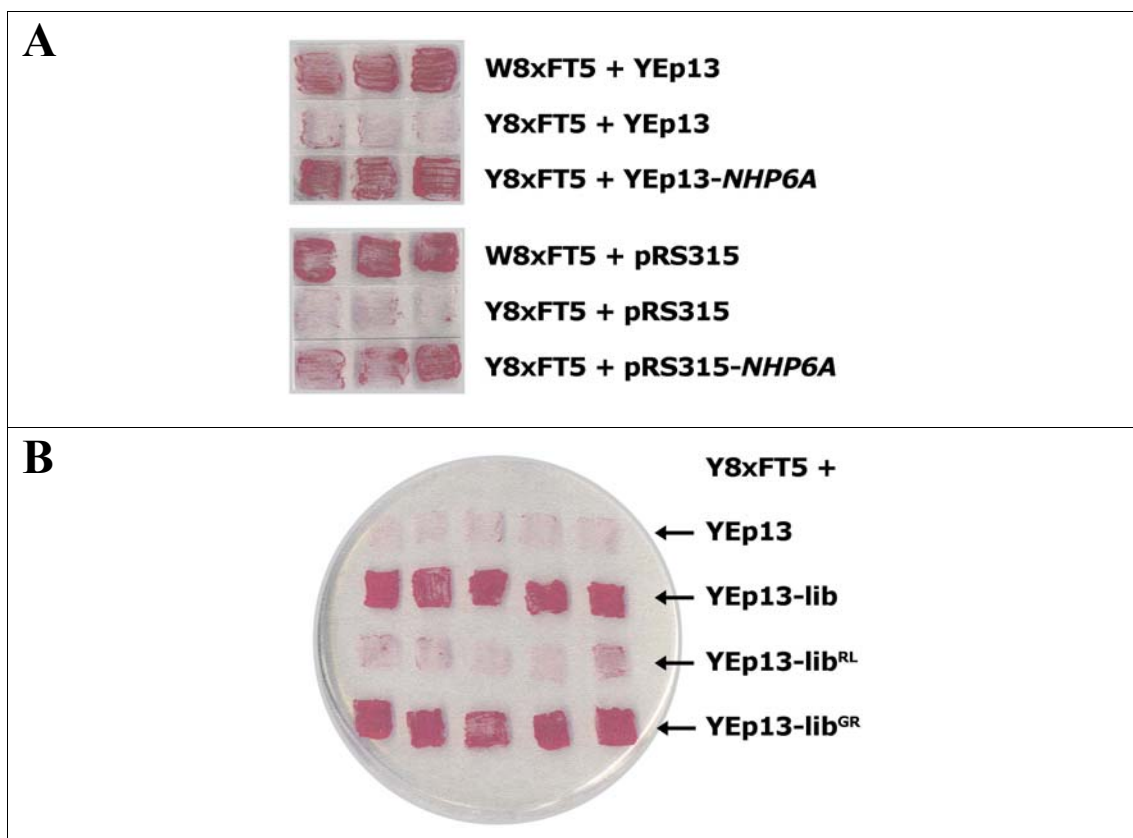


Εικόνα 1.6

Κλώνος καταστολής της σχετιζόμενης με το *FRE2* μεταλλαγής. Για σχετικές λεπτομέρειες βλ. στο κείμενο. Σημειώνονται οι τρεις περιοχές του κλώνου που περιλαμβάνουν τα γονίδια *MAK3*, *NHP6A* και *SMK1* αντίστοιχα και απομονώθηκαν με χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων (ή στην περίπτωση του *NHP6A* με PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές) προκειμένου να υποκλωνοποιηθούν στο φορέα YEp13. Σημειώνεται επίσης η περιοχή *NcoI-NcoI* σχετικά με την οποία βλ. στην εικόνα 1.7.

οποίος οφειλόταν στο ότι το γονίδιο του *PET56*³, το οποίο γειτνιάζει με το *HIS3*, είχε καταστραφεί κατά τη διαδικασία αντικατάστασης του τελευταίου από το *FRE2-HIS3* (εικόνα 1.4). Αντίθετα το διπλοειδές Y8xFT5, που προέκυψε από τη διασταύρωση του Y8 με το στέλεχος αγρίου τύπου FT5, είχε τη δυνατότητα απόλυτα φυσιολογικής ανάπτυξης σε ελάχιστο μέσο διότι διέθετε το *PET56* του FT5 ενώ παράλληλα παρέμενε αυξότροφο για την ιστιδίνη με σιδηροεξαρτώμενο τρόπο (καθότι το *HIS3* του FT5 ήταν καταστραμμένο) και διατηρούσε αντίστοιχο φαινότυπο με αυτόν του Y8 σε σχέση με το *FRE2* (λόγω του ημιεπικρατούς χαρακτήρα της μεταλλαγής) (εικόνα 1.5-3, 4). Συνολικά 92 αποικίες συλλέχθηκαν από το μέσο επιλογής από τις οποίες 83 ήταν ικανές να αναπτυχθούν και σε συνθήκες παρουσίας σιδήρου και μόνο 9 παρουσίασαν σαφή σιδηροεξαρτώμενη ανάπτυξη (πίνακας 1.1). Από τις 83, μερικές αναλύθηκαν ενδεικτικά με PCR και βρέθηκαν να περιέχουν πλασμίδια με το γονίδιο *HIS3*. Από τις 9, απομονώθηκαν τα πλασμίδια της βιβλιοθήκης και έγινε επανεισαγωγή τους στο στέλεχος Y8xFT5. 5 κλώνοι πέτυχαν να επανακαταστείουν

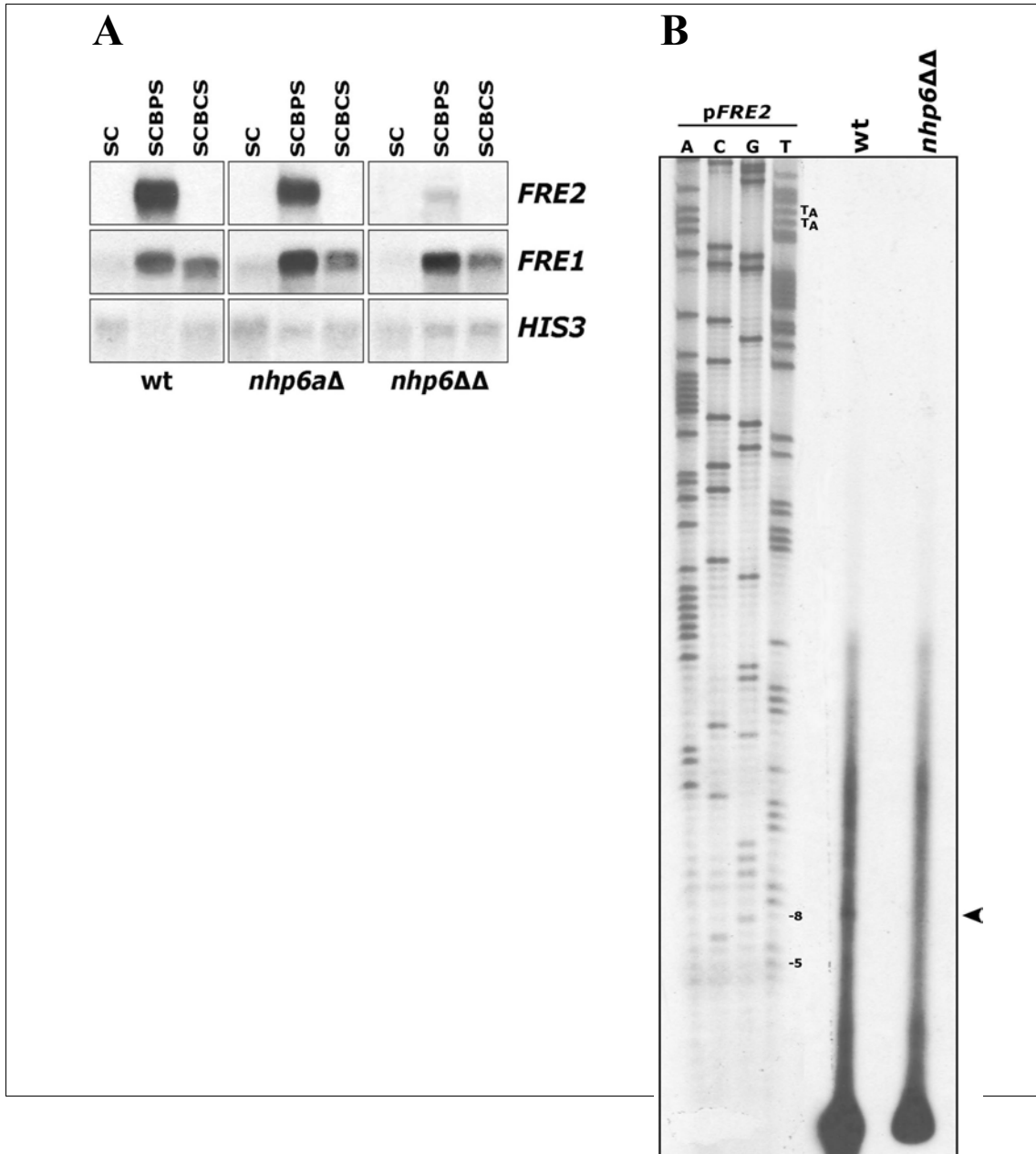
³ Το *PET56* κωδικοποιεί μια μεθυλάση του μιτοχονδριακού 21S rRNA η έλλειψη της οποίας από το κύτταρο προκαλεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κατά συνέπεια αδυναμία ανάπτυξης σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν μη ζυμώσιμες πηγές άνθρακα (π.χ. γλυκερόλη) ή αργή ανάπτυξη σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν γλυκόζη.



Εικόνα 1.7

Έλεγχος συμπλήρωσης της σχετιζόμενης με το *FRE2* μεταλλαγής από το γονίδιο *NHP6A*. (A) και (B) Σε τριβλία με θρεπτικό μέσο SC + 100μM BPS + 3mM 3-AT, εξετάστηκε η ανάπτυξη αποικιών των στελεχών W8xFT5 και Y8xFT5 μετασηματισμένων όπως φαίνεται παραπάνω. Οι YEp13 και pRS315 είναι πλασμιδιακοί φορείς πολλαπλών ή λίγων αντιγράφων αντίστοιχα. Το πλασμίδιο YEp13-lib περιλαμβάνει τον κλώνο καταστολής της σχετιζόμενης με το *FRE2* μεταλλαγής ο οποίος φαίνεται στην εικόνα 1.6. Το YEp13-lib^{RL} προέκυψε από την πέψη του YEp13-lib με *NcoI*, απομάκρυνση του τμήματος *NcoI-NcoI* που περιέχει το γονίδιο *NHP6A* (βλ. εικόνα 1.6) και επανασύνδεση (**ReLigation**) του πλασμιδίου. Το YEp13-lib^{GR} προέκυψε από την κλωνοποίηση του αλληλομόρφου *NHP6A* του στέλεχους *yap1Δ** στο YEp13-lib^{RL} η οποία έγινε με ομόλογο ανασυνδυασμό (**Gar Repair**).

τη μεταλλαγή σε αυτό και η ανάλυσή τους με περιοριστικά ένζυμα έδειξε ότι είχαν παρόμοια πρότυπα πέψης. Στη συνέχεια, ο μερικός προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους φανέρωσε ότι ήταν αλληλοεπικαλυπτόμενοι και ότι όλοι περιείχαν μια περιοχή του χρωμοσώματος *XVI* του σακχαρομύκητα που περιλάμβανε τα γονίδια *MAK3*, *NHP6A* και *SMK1* (εικόνα 1.6). Αυτά κωδικοποιούν μια κυτταροπλασματική ακετυλοτρανσφεράση, μια ομόλογη με την HMGB1 των θηλαστικών μη ιστονική χρωμοσωμική πρωτεΐνη και μια σχετιζόμενη με τη sporίωση MAP κινάση αντίστοιχα. Κάθε γονίδιο ξεχωριστά υποκλωνοποιήθηκε στον



	<p>Εικόνα 1.8 Επίδραση των γονιδίων <i>NHP6A</i> και <i>NHP6B</i> στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. (Α) Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνυόμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επάρκεια μετάλλων (SC) ή έλλειψη σιδήρου (SCBPS) ή έλλειψη χαλκού (SCBCS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια <i>FRE2</i>, <i>FRE1</i> και <i>HIS3</i> (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). (Β) Προσδιορισμός του σημείου έναρξης της μεταγραφής του <i>FRE2</i> στα στελέχη αγρίου τύπου και <i>nhr6ΔΔ</i> που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη σιδήρου (SCBPS), με ανάλυση επέκτασης μιας αλληλουχίας-εκκινητή ειδικής για το γονίδιο.</p>	
--	--	--

πλασμιδιακό φορέα YEp13 (εικόνα 1.6) και έγινε επανεισαγωγή του στο στέλεχος Y8xFT5. Διαπιστώθηκε ότι υπεύθυνο για την καταστολή της σχετιζόμενης με το *FRE2* μεταλλαγής ήταν το *NHP6A*. Είναι αξιοσημείωτο ότι το γονίδιο αυτό δε συμπλήρωσε τη μεταλλαγή παρά το ότι και ένα μόνο αντίγραφο του ήταν αρκετό για την καταστολή της (εικόνα 1.7A). Αυτό αποδείχτηκε από το γεγονός ότι το αλληλόμορφο *NHP6A* του στελέχους *gar1Δ** πέτυχε να την καταστείλει στο στέλεχος Y8xFT5 (εικόνα 1.7B).

1.5 Επίδραση του *NHP6A* και άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες στη μεταλλοεξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση

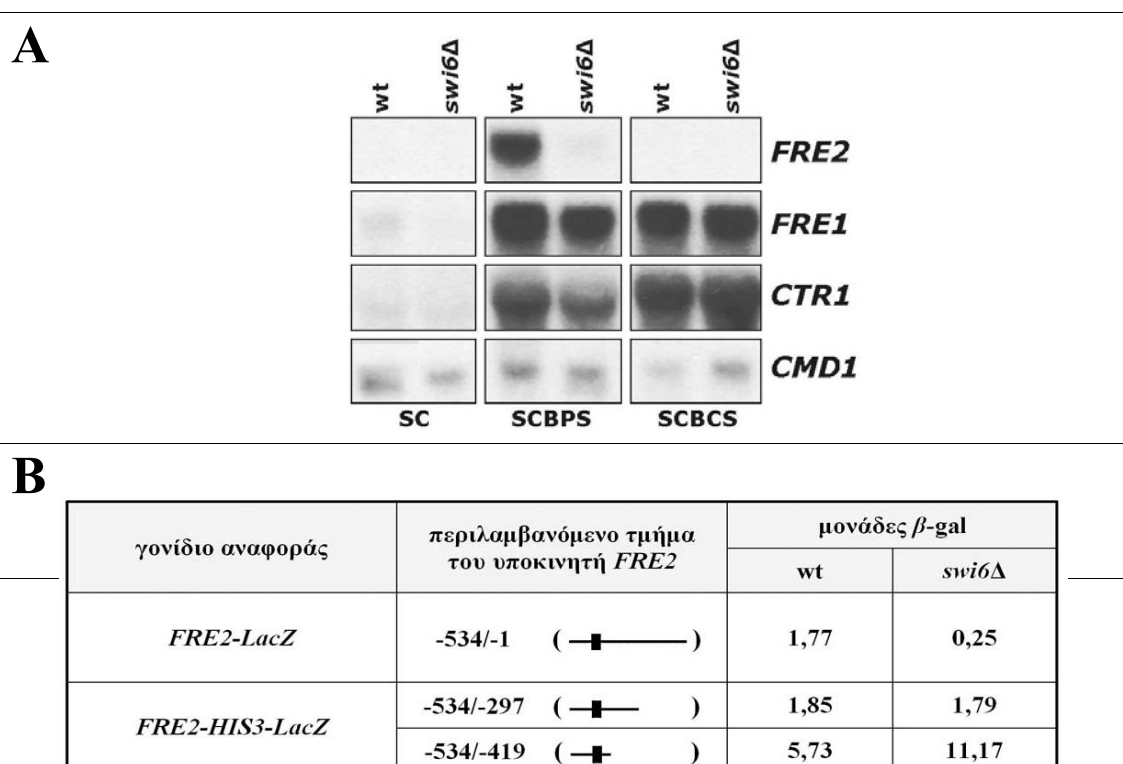
Η αποκάλυψη της εμπλοκής του *NHP6A* στη μεταγραφική ρύθμιση του *FRE2* αποτέλεσε το έναυσμα για τη διερεύνηση της επίδρασης μιας σειράς γονιδίων που κωδικοποιούν γνωστούς μεταγραφικούς παραγόντες της ζύμης στη μεταγραφική ρύθμιση του μηχανισμού ομοιοστασίας μετάλλων. Τα δεδομένα που ακολουθούν προέκυψαν από προκαταρκτικές αναλύσεις της επίδρασης των γονιδίων αυτών στο συγκεκριμένο μηχανισμό. Λεπτομερώς αναλύθηκε ο ρόλος των *NHP6* και *SSN6* και τα σχετικά δεδομένα παραθέτονται στο κεφάλαιο 2.

1.5.1 *NHP6A*, *NHP6B*

Τα ομόλογα γονίδια *NHP6A* και *NHP6B* του σακχαρομύκητα κωδικοποιούν δύο σχεδόν όμοιες δομικά και πλεονάζουσες λειτουργικά μη ιστονικές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες (βλ. κεφ. 2). Λόγω της λειτουργικής αλληλοσυμπλήρωσης των δύο πρωτεϊνών, η μεταγραφή του *FRE2* ελέγχθηκε τόσο στο μονό μετάλλαγμα *nhr6aΔ* όσο και στο διπλό *nhr6aΔ nhr6bΔ*. Διαπιστώθηκε δραματική μείωση της επαγωγής της στο δεύτερο, συγκριτικά με τα επίπεδα αγρίου τύπου, πράγμα που δε συνέβη με αυτή του *FRE1* η οποία ελέγχθηκε παράλληλα (εικόνα 1.8A). Επιπλέον, με δεδομένο τον αρχιτεκτονικό ρόλο του παράγοντα Nhr6 στη χρωματίνη (βλ. κεφ. 2), εξετάστηκε το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης εναλλακτικού σημείου έναρξης για τη μεταγραφή του *FRE2* όταν αυτός απουσιάζει από το κύτταρο. Δυστυχώς, δεν κατέστη δυνατό να διαπιστωθεί αν κάτι τέτοιο συμβαίνει, λόγω των πολύ χαμηλών επιπέδων της επαγόμενης μεταγραφής του γονιδίου στο στέλεχος *nhr6aΔ nhr6bΔ* (εικόνα 1.8B). Ο ρόλος των *NHP6A* και *NHP6B* στη σιδηροεξαρτώμενη μεταγραφική ρύθμιση εξετάζεται στο κεφάλαιο 2.

1.5.2 *SWI6*

Υπάρχει μια ακόμα (και μοναδική) περίπτωση απομόνωσης του *NHP6A* ως γενετικού καταστολέα, εκτός αυτής της παρούσας μελέτης: έχει απομονωθεί ως καταστολέας πολλαπλών αντιγράφων θερμοευαίσθητων μεταλλαγών του γονιδίου *SWI6*, το οποίο κωδικοποιεί έναν κρίσιμο μεταγραφικό ενεργοποιητή της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου [144]. Με δεδομένη, λοιπόν, τη σχέση μεταξύ *NHP6A* και *FRE2*, εξετάστηκε το ενδεχόμενο επίδρασης του *SWI6* στην έκφραση του τελευταίου. Η επαγόμενη μεταγραφή του *FRE2* (και όχι των *FRE1* και *CTR1*) βρέθηκε δραματικά μειωμένη



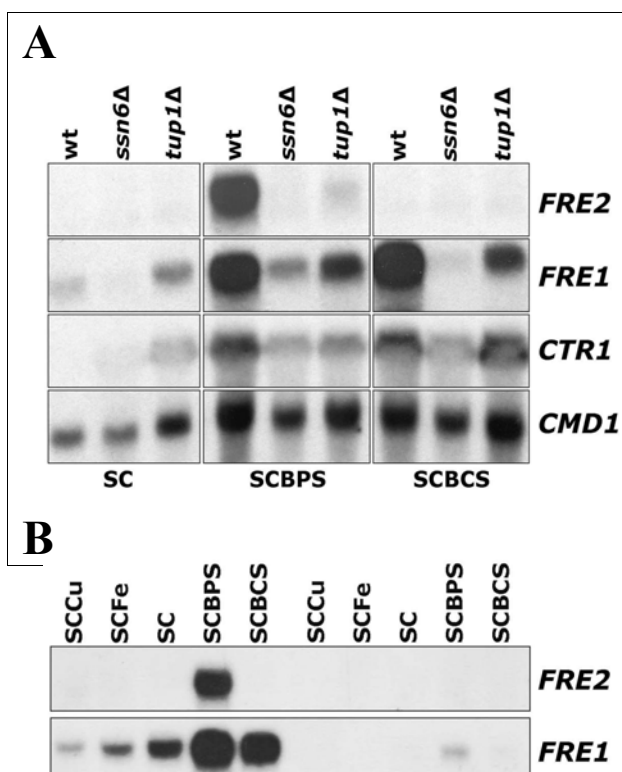
Εικόνα 1.9

Επίδραση του γονιδίου *SWI6* στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. (A) Ανάλυση Northern ολικού RNA των στελεχών αγρίου τύπου και *swi6Δ* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επάρκεια μετάλλων (SC) ή έλλειψη σιδήρου (SCBPS) ή έλλειψη χαλκού (SCBCS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE2*, *FRE1*, *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). (B) Ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης των γονιδίων αναφοράς *FRE2-LacZ* και *FRE2-HIS3-LacZ*, που περιλαμβάνουν τα ενδεικνύμενα τμήματα του υποκινητή *FRE2*, σε αναπτυγμένα σε SCBPS κύτταρα αγρίου τύπου ή *swi6Δ*. Με κουτάκι σημειώνεται η θέση πρόσδεσης του παράγοντα Aft1 πάνω στον υποκινητή.

στο μετάλλαγμα *swi6Δ* (εικόνα 1.9A), με τη δράση του παράγοντα Swi6 να εντοπίζεται στην περιοχή -300/-1 του υποκινητή του γονιδίου (εικόνα 1.9B). Το *SWI6*, λοιπόν, επιδρά με σαφή θετικό τρόπο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του *FRE2*, παρέχοντας έτσι μια ένδειξη για πιθανή σχέση του τελευταίου με τον κυτταρικό κύκλο.

1.5.3 *SSN6*, *TUP1*

Έχει αναφερθεί ότι κύτταρα ζύμης από τα οποία απουσιάζουν οι μεταγραφικοί συγκαταστολείς Ssn6 ή Tup1 (βλ. κεφ. 2) παρουσιάζουν μειωμένη αναγωγική πρόσληψη του σιδήρου σε συνθήκες επάρκειας του μετάλλου [90]. Με αυτό το

**Εικόνα 1.10**

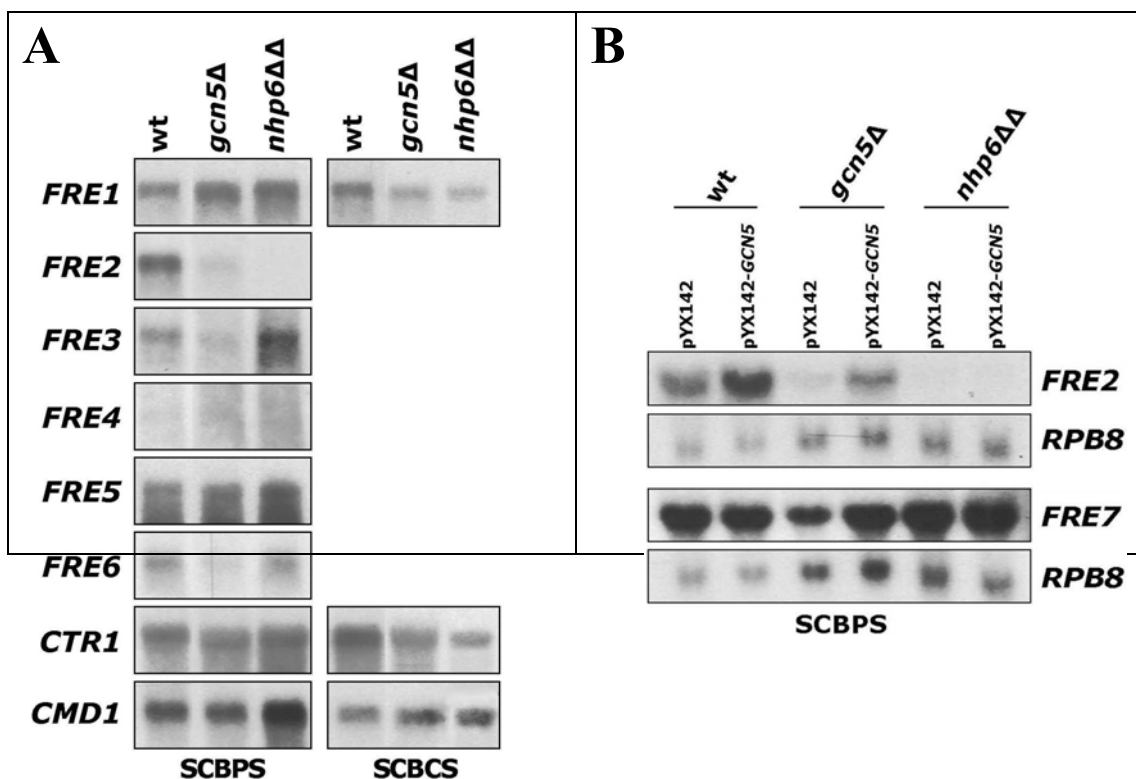
Επίδραση των γονιδίων *SSN6* και *TUP1* στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. (A) Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνύμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επάρκεια μετάλλων (SC) ή έλλειψη σιδήρου (SCBPS) ή έλλειψη χαλκού (SCBCS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE2*, *FRE1*, *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). (B) Παρόμοια ανάλυση των στελεχών αγρίου τύπου και *ssn6Δ* σε συνθήκες

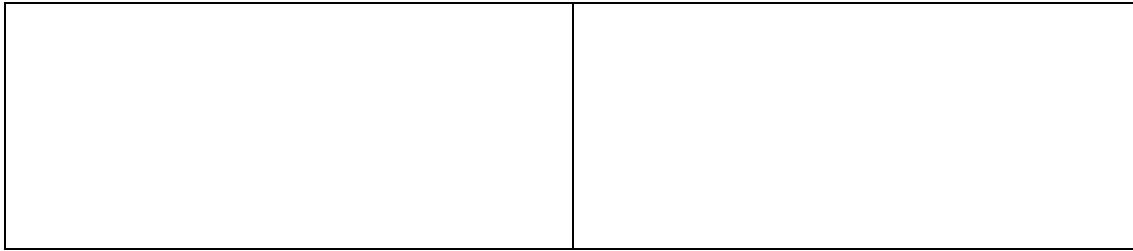
υπερεπάρκειας χαλκού (SCCu) ή υπερεπάρκειας σιδήρου (SCFe) ή επάρκειας μετάλλων (SC) ή έλλειψης σιδήρου (SCBPS) ή έλλειψης χαλκού (SCBCS). Τα στελέχη στα (A) και (B) προέρχονται από τα γενετικά υπόβαθρα FT5 και S288C αντίστοιχα.

δεδομένο, έγινε έλεγχος της μεταγραφής του *FRE2* (και των *FRE1*, *CTR1*) στα στελέχη *ssn6Δ* και *tup1Δ*, σε διάφορες συνθήκες διαθεσιμότητας μετάλλων (εικόνα 1.10). Η επαγόμενη μεταγραφή του *FRE2* βρέθηκε δραματικά μειωμένη στα δύο μεταλλάγματα (περισσότερο στο πρώτο), συγκριτικά με τα επίπεδα αγρίου τύπου, ενώ και αυτή του *FRE1* (και όχι του *CTR1*) μειώθηκε σημαντικά κυρίως στο *ssn6Δ*. Ο ρόλος του *SSN6* στη σιδηροεξαρτώμενη μεταγραφική ρύθμιση εξετάζεται στο κεφάλαιο 2.

1.5.4 GCN5, ESA1

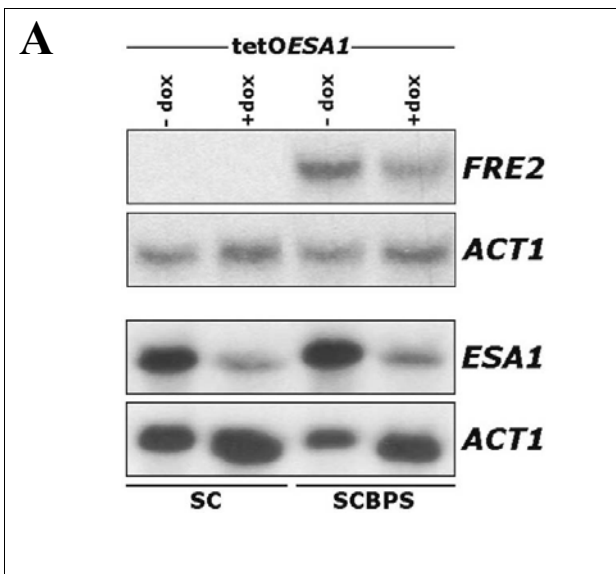
Η ακετυλίωση των ιστονών είναι μια διαδικασία στενά συνδεδεμένη με τη γονιδιακή ρύθμιση. Στο σακχαρομύκητα, οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών Gcn5 και Esa1 [148] αποτελούν τις καταλυτικές υπομονάδες δύο μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων νουκλεοσωμικής τροποποίησης, του SAGA και του NuA4 αντίστοιχα, τα οποία στρατολογούνται στους υποκινητές από μεταγραφικούς ενεργοποιητές. Η Gcn5



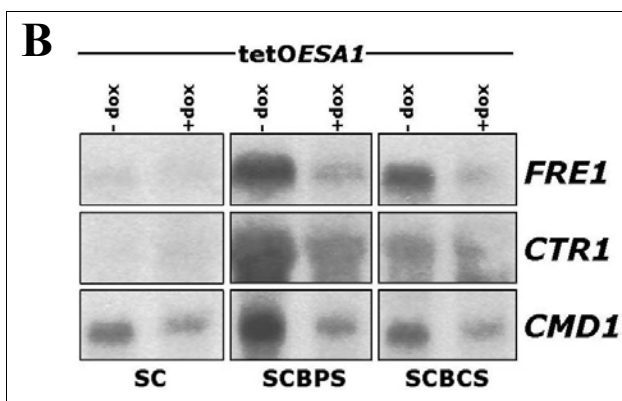
**Εικόνα 1.11**

Επίδραση του γονιδίου *GCN5* στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. (Α) Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνύμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη σιδήρου (SCBPS) ή χαλκού (SCBCS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE1-6*, *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). (Β) Παρόμοια ανάλυση σε ίδια στελέχη, αναπτυγμένα σε SCBPS, στα οποία υπερέκφραστηκε (+pYX142-*GCN5*) ή όχι (+pYX142) το γονίδιο *GCN5*, με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE2*, *FRE7* και *RPB8* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης).

είναι η καλύτερα μελετημένη ακετυλοτρανσφεράση ιστονών και έχει σημαντικό συνενεργοποιητικό ρόλο στη μεταγραφή πολλών γονιδίων. Η *Esa1*, από την άλλη, έχει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και αποτελεί τη μοναδική απαραίτητη για τη βιωσιμότητα ακετυλοτρανσφεράση ιστονών στη ζύμη, γεγονός που δείχνει τη σημασία της. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.11A, η έλλειψη του γονιδίου *GCN5* (αλλά και αυτή των *NHP6A* και *NHP6B*) επέδρασε στη μεταγραφική ενεργοποίηση μιας σειράς γονιδίων του μηχανισμού ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού με διαφορετικό κατά περίπτωση τρόπο. Ειδικά σε σχέση με το *FRE2*, προκάλεσε πολύ σημαντική μείωση της επαγόμενης μεταγραφής του, συγκριτικά με τα επίπεδα αγρίου τύπου. Είναι χαρακτηριστικό ότι η υπερέκφραση του *GCN5* στο

**Εικόνα 1.12**

Επίδραση του γονιδίου *ESA1* στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. Ανάλυση Northern ολικού RNA ενός “υπό όρους” μεταλλάγματος *esa1* (Susana Rodriguez) που αναπτύχθηκε παρουσία ή απουσία του αντιβιοτικού deoxycycline (2,5 µg/ml), σε συνθήκες επάρκειας μετάλλων (SC) ή έλλειψης σιδήρου (SCBPS) ή έλλειψης χαλκού (SCBCS). Χρησιμοποιήθηκαν ραδιοσημασμένοι ανιχνευτές για τα γονίδια (Α) *FRE2*, *ESA1*, *ACT1* και (Β) *FRE1*, *CTR1*, *CMD1*. Στο συγκεκριμένο μέταλλαγμα, που προέρ-



χεται από το στέλεχος FY1679, το ενδογενές γονίδιο *ESAI* βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της τετρακυκλίνης, με αποτέλεσμα η έκφρασή του να καταστέλλεται σε συνθήκες παρατεταμένης ανάπτυξης παρουσία του αντιβιοτικού.

στέλεχος αγρίου τύπου προκάλεσε περαιτέρω επαγωγή της μεταγραφής του *FRE2*, φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στο στέλεχος *nhr6ΔΔ* (εικόνα 1.11B). Συμπερασματικά, το γονίδιο *GCN5* έχει θετικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση του *FRE2* ενώ η δράση του φαίνεται να “ακολουθεί” εκείνη του *NHP6*.

Δεδομένης της μη βιωσιμότητας της μεταλλαγής *esa1Δ*, η μεταγραφή του *FRE2* (και των *FRE1*, *CTR1*) ελέγχθηκε σε ένα ειδικά τροποποιημένο στέλεχος (Susana Rodríguez). Σε αυτό, η κωδική περιοχή του γονιδίου *ESAI* βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της τετρακυκλίνης με αποτέλεσμα η προσθήκη της κατάλληλης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού deoxycyclin στο μέσο ανάπτυξης του να περιορίζει σημαντικά την παραγωγή πρωτεΐνης *Esa1* (εικόνα 1.12A). Σε συνθήκες καταστολής της έκφρασης του *ESAI*, λοιπόν, παρατηρήθηκε μείωση της επαγόμενης μεταγραφής του *FRE2* (και κατά δεύτερο λόγο αυτής των *FRE1* και *CTR1*), συγκριτικά με τα επίπεδα αγρίου τύπου (εικόνα 1.12B), γεγονός που έδειξε ότι το γονίδιο αυτό συμβάλλει στην πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση του *FRE2*.

ζεύγος πρωτεϊνών	υβριδιακά πεπτίδια		αλληλ/δραση
Aft1-Aft1	LexA-Aft1	Gal4AD-Aft1	2-5x
	LexA-Aft1	Gal4AD-N-Aft1	-
	LexA-N-Aft1	Gal4AD-C-Aft1	-
Aft1-Mac1	LexA-Aft1	Gal4AD-Mac1	2-4x
	LexA-Mac1	Gal4AD-Aft1	2,5-25x
	LexA-Mac1	Gal4AD-N-Aft1	1,5x
	LexA-Mac1	Gal4AD-C-Aft1	-
	LexA-N-Mac1	Gal4AD-Aft1	-
	LexA-N-Mac1	Gal4AD-N-Aft1	-

Aft1-Ssn6	LexA-Aft1	Gal4AD-N-Ssn6(10T)	3-6x
	LexA-Aft1	N-Ssn6(7T)-VP16	2-5x
	LexA-N-Aft1	Gal4AD-N-Ssn6(10T)	3-8x
	LexA-N-Aft1	N-Ssn6(7T)-VP16	2,5-40x
	LexA-Ssn6	Gal4AD-Aft1	-
	LexA-Ssn6	Gal4AD-N-Aft1	-
	LexA-N-Ssn6(10T)	Gal4AD-Aft1	-
	LexA-N-Ssn6(10T)	Gal4AD-N-Aft1	-
	LexA-N-Ssn6(10T)	Gal4AD-C-Aft1	-
	LexA-N-Ssn6(7T)	Gal4AD-Aft1	-
LexA-N-Ssn6(7T)	Gal4AD-N-Aft1	-	
Aft1-Tup1	LexA-Tup1	Gal4AD-Aft1	-
	LexA-Tup1	Gal4AD-N-Aft1	-
	LexA-Tup1	Gal4AD-C-Aft1	-
Aft1-Swi6	LexA-Aft1	Gal4AD-Swi6	-
	LexA-N-Aft1	Gal4AD-Swi6	-
Mac1-Ssn6	LexA-Mac1	Gal4AD-N-Ssn6(10T)	-
	LexA-Mac1	N-Ssn6(7T)-VP16	2-6x
	LexA-N-Mac1	N-Ssn6(7T)-VP16	-
	LexA-Ssn6(10T)	Gal4AD-Mac1	-
	LexA-N-Ssn6(7T)	Gal4AD-Mac1	-
Mac1-Tup1	LexA-Tup1	Gal4AD-Mac1	-
Mac1-Mac1 ©	LexA-Mac1	Gal4AD-Mac1	20-80x
Ssn6-Gcn5	LexA-Gcn5	N-Ssn6(7T)-VP16	-
Ssn6-Tup1 ©	LexA-Ssn6	Tup1-VP16	35-55x
	LexA-N-Ssn6(10T)	Tup1-VP16	140x
	LexA-Tup1	N-Ssn6(7T)-VP16	15-40x

Nhp6a-Aft1	LexA-Aft1	Gal4AD-Nhp6a	*
	Gal4DBD-Nhp6a	Gal4AD-Aft1	-
	Gal4DBD-Nhp6a	Gal4AD-N-Aft1	-
Nhp6a-Mac1	Gal4DBD-Nhp6a	Gal4AD-Mac1	-
	Gal4DBD-Nhp6a	Gal4AD-N-Mac1	-
Nhp6a-Ssn6	Gal4DBD-Nhp6a	N-Ssn6(7T)-VP16	-
Nhp6a-Esa1	Gal4DBD-Esa1	Gal4AD-Nhp6a	**
Nhp6a-Gcn5	LexA-Gcn5	Gal4AD-Nhp6a	**
Nhp6a-Swi6	Gal4DBD-Nhp6a	Gal4AD-Swi6	-
Nhp6a-Nhp6a	Gal4DBD-Nhp6a	Gal4AD-Nhp6a	-

Πίνακας 1.2

Προκαταρκτικός έλεγχος πιθανών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη μέθοδο των δύο υβριδίων. Τα παραπάνω υβριδιακά πεπτίδια εκφράστηκαν από ειδικούς πλασμιδιακούς φορείς στα κατάλληλα στελέχη ως εξής (βλ. στοιχεία για φορείς, κατασκευές και στελέχη στα Y&M):

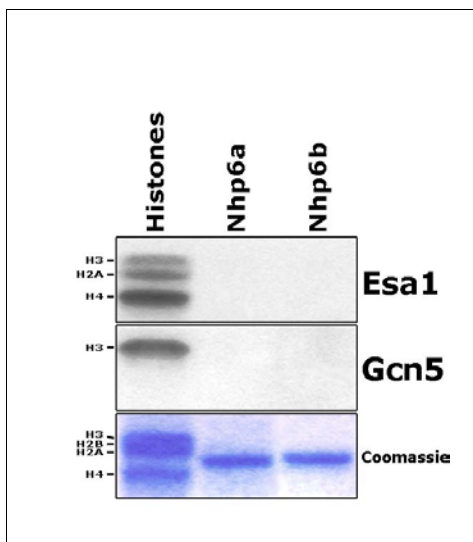
πλασμίδιο με DBD	πλασμίδιο με AD	στέλεχος	γονίδιο αναφοράς
pAS (LexA-X)	pACT2 (Gal4AD-Y)	L9FT5 (+pJK103)	<i>4xLexAop-GAL1_{TATA}-LacZ</i>
pGBT9 (Gal4DBD-X)	pACT2 (Gal4AD-Y)	PJ694a	<i>GAL7-LacZ</i>

DBD = DNA-Binding Domain, AD = Activation Domain

Οι έλεγχοι των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο SC με μέτρηση της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης υγρών καλλιέργειών μετασηματισμένων κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν τα δύο υποψήφια αλληλεπιδρώντα πεπτίδια μαζί ή ξεχωριστά. Η εκτίμηση για την ύπαρξη ή όχι αλληλεπίδρασης, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, βασίστηκε στη σύγκριση της ενεργότητας κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν και τα δύο πεπτίδια με την αντίστοιχη κυττάρων στα οποία εκφράστηκε μόνο το προσδεδεμένο στο DNA πεπτίδιο (στήλη 4). Ο έλεγχος αλληλεπιδράσεων του παράγοντα Nhr6a (πίνακας με διακεκομμένες γραμμές) ήταν προβληματικός καθότι ο μετασηματισμός κυττάρων με την κατασκευή pACT2-NHP6A είτε δεν ήταν δυνατός (*) είτε έδωσε λίγες αποικίες στις οποίες το πεπτίδιο Gal4AD-Nhr6a, μόνο του, παρουσίαζε ισχυρή ενεργοποίηση (**). (© = αλληλεπίδραση θετικού ελέγχου).

1.6 Διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεταγραφικών ρυθμιστών και συρρυθμιστών της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού

Μια προκαταρκτική διερεύνηση της ύπαρξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ παραγόντων που συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων της ομοιοστασίας σιδήρου και χαλκού έγινε με τη μέθοδο των δύο υβριδίων. Στον πίνακα 1.2 παραθέτονται όλα τα ζευγάρια πεπτιδίων που εξετάστηκαν για αλληλεπίδραση και τα αποτελέσματα της εξέτασης αυτής.



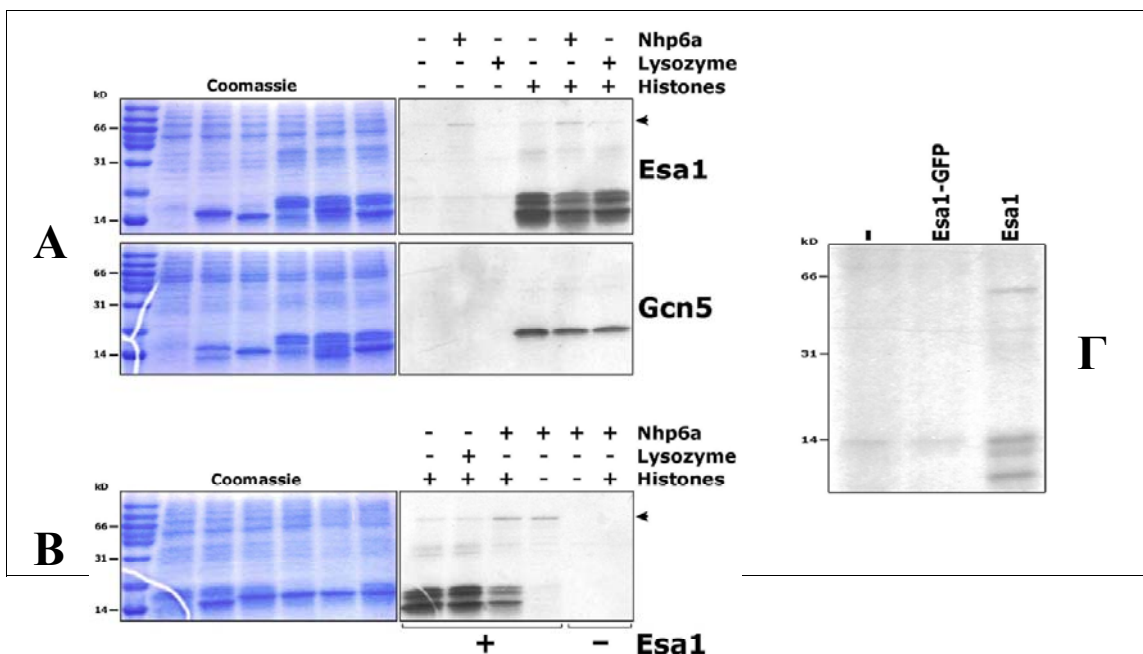
Εικόνα 1.13

Έλεγχος της ακετυλίωσης των παραγόντων Nhr6a και Nhr6b *in vitro*. 1μl βακτηριακού εκχυλίσματος (από συνολικά 250μl που αντιστοιχούν σε κυτταρική καλλιέργεια 50ml), στο οποίο υπερεκφράστηκε πρωτεΐνη Esa1 ή Gcn5, επώαστηκε με 2μg καθαρής πρωτεΐνης Nhr6a ή Nhr6b που εκφράστηκε από κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα στην *E. coli* και απομονώθηκε σε στήλη χιτίνης (με το σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών IMPACT) ή με 10μg μίγματος καθαρών ελεύθερων ιστονών (θετικός μάρτυρας), παρουσία τριτωμένου ακετυλοσυνενζύμου. Μετά από 30min στους 30°C, οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πή-

κτωμα πολυακρυλαμίδης 15%, το οποίο στη συνέχεια βάφτηκε με coomassie, ξηράνθηκε και αυτοραδιογραφήθηκε.

1.7 Ο παράγοντας Nhp6 δεν αποτελεί υπόστρωμα των ακετυλοτρανσφερασών ιστονών Gcn5 και Esa1 *in vitro*

Πολλές ακετυλοτρασφεράσες ακετυλιώνουν και άλλες πρωτεΐνες εκτός από ιστόνες από τις οποίες οι περισσότερες είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές και συρρυθμιστές [148, 77]. Η επίδραση της ακετυλίωσης των παραγόντων αυτών στη μεταγραφή είναι τις περισσότερες φορές θετική, ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις είναι αρνητική ενώ σε άλλες δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί [148]. Στα υποστρώματα ακετυλοτρανσφερασών συμπεριλαμβάνονται και αρκετοί αρχιτεκτονικοί παράγοντες. Για παράδειγμα, ο θετικός μεταγραφικός συρρυθμιστής HMG17 των θηλαστικών [15] βρέθηκε *in vitro* ότι ακετυλιώνεται από την ακετυλοτρανσφεράση PCAF με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας πρόσδεσής του στα νουκλεοσώματα [54]. Ακόμα, ο HMGI(Y), βασικό αρχιτεκτονικό συστατικό του ενισχυοσώματος στον υποκινητή του γονιδίου IFN- β του ανθρώπου, ακετυλιώνεται από την p300/CBP με αποτέλεσμα την αποσυγκρότηση του ενισχυοσώματος και το “κλείσιμο” της μεταγραφής του γονιδίου ενώ η ακετυλίωση διαφορετικών καταλοίπων λυσίνης του ίδιου συστατικού από την PCAF έχει αντίθετο αποτέλεσμα [118, 117]. Στη ζύμη, η HMGB πρωτεΐνη Sin1(Spt2), που αρχικά προσδιορίστηκε ως αρνητικός συρρυθμιστής της μεταγραφής του γονιδίου *HO* [78], έχει βρεθεί *in vitro* ότι ακετυλιώνεται από τη Gcn5 χωρίς να έχει προσδιοριστεί η λειτουργική σημασία αυτής της τροποποίησης [129].



Εικόνα 1.14

Έλεγχος της ενζυμικής ενεργότητας της ακετυλοτρανσφεράσης Esa1 *in vitro*. (A) 1μl βακτηριακού εκχυλίσματος στο οποίο υπερεκφράστηκε Esa1 ή Gcn5 επώαστηκε με τα ενδεικνυόμενα καθαρά υποστρώματα (Nhr6a ή λυσοζύμη: 2μg, ιστόνες: 10μg), παρουσία τριτιωμένου ακετυλοσυνενζύμου A, στους 30°C για 30min. (B) 1μl βακτηριακού εκχυλίσματος με (στήλες 1-4) ή χωρίς Esa1 (στήλες 5 και 6) και τα ενδεικνυόμενα υποστρώματα (Nhr6a ή λυσοζύμη: 2μg, ιστόνες: 5μg) επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες. (Γ) 1μl βακτηριακού εκχυλίσματος με ή χωρίς Esa1 ή με Esa1-GFP και 5μg μίγματος καθαρών ελεύθερων ιστονών επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες. Τις επώσεις ακολούθησε ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15%, βαφή με coomassie, ξήρανση και αυτοραδιογραφία.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και με δεδομένη τη συμμετοχή των αρχιτεκτονικών παραγόντων Nhr6a και Nhr6b και των ακετυλοτρανσφερασών Gcn5 και Esa1 στη μεταγραφική ρύθμιση του *FRE2*, εξετάσαμε *in vitro* το ενδεχόμενο ακετυλίωσης των πρώτων από τις δεύτερες. Στα σχετικά πειράματα χρησιμοποιήσαμε βακτηριακό εκχύλισμα με υπερεκφρασμένη Gcn5 ή Esa1 ως ένζυμο και απομονωμένη από βακτήρια Nhr6a ή Nhr6b ή μίγμα καθαρών ιστονών (θετικός μάρτυρας) ως υπόστρωμα. Στις συγκεκριμένες συνθήκες, οι Nhr6a και Nhr6b δεν ακετυλώθηκαν από τις Gcn5 και Esa1 (εικόνα 1.13).

1.8 Η Esa1 αυτοακετυλιώνεται *in vitro* ενώ, στις ίδιες συνθήκες, ο Nhr6a φαίνεται να επηρεάζει την ενζυμική της λειτουργία

Σε πειράματα ακετυλίωσης αντίστοιχα με τα παραπάνω, δεν ανιχνεύτηκε μεν ακετυλίωση του Nhr6a, ωστόσο διαπιστώθηκε αυτοακετυλίωση της Esa1 (και όχι της Gcn5) η οποία μάλιστα, ειδικά με την προσθήκη του Nhr6a στην αντίδραση, έγινε εντονότερη και παράλληλα συνοδεύτηκε από μείωση της ακετυλίωσης των ιστονών (εικόνα 1.14A-B). Όπως ήταν αναμενόμενο, σε πείραμα ελέγχου στο οποίο το βακτηριακό εκχύλισμα με την υπερεκφρασμένη Esa1 αντικαταστάθηκε από αντίστοιχο εκχύλισμα στο οποίο δεν εκφραζόταν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (εικόνα 1.14B) δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική δράση. Ωστόσο, σε δεύτερο πείραμα ελέγχου, η παράλληλη χρήση εκχυλισμάτων με υπερεκφρασμένη Esa1 ή Esa1-GFP (διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας), δεν ήταν πληροφοριακή καθώς η χμιαϊκή πρωτεΐνη είχε απωλέσει την ενζυμική της ενεργότητα (εικόνα 1.14Γ). Τα

παραπάνω, αφενός φανέρωσαν ότι η ακετυλοτρανσφεράση ιστονών Esa1 αυτοακετυλιώνεται και αφετέρου έδωσαν μια *in vitro* ένδειξη επίδρασης του παράγοντα Nhr6a στην ενζυμική της λειτουργία. Η πρώτη διαπίστωση συμφωνεί με το αποδεδειγμένο γεγονός της συμμετοχής ενός αυτοακετυλιωμένου ενδιάμεσου προϊόντος (συμπλόκου ενζύμου-ακετυλοσυνενζύμου) στον καταλυτικό μηχανισμό της Esa1, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στον αντίστοιχο μηχανισμό της Gen5 [174]. Έχουν αναφερθεί και άλλες περιπτώσεις αυτοακετυλίωσης ακετυλοτρανσφερασών ιστονών που όμως είναι άγνωστο αν είναι φυσιολογικά σημαντικές ή απλώς δημιουργήματα των πειραματικών συνθηκών [148]. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η καταλυτική ενεργότητα της p300 των θηλαστικών αυξάνεται μέσω αυτοακετυλίωσης όπως αντίστοιχα πολλές κινάσες ενεργοποιούνται μέσω αυτοφωσφορυλίωσης [153].

Η παρατηρηθείσα ειδική επίδραση του Nhr6a στην ενζυμική λειτουργία της Esa1 πρέπει να διερευνηθεί με βάση τη βιολογική της σημασία. Είναι πιθανό να μην είναι αληθινή αλλά δημιούργημα των συγκεκριμένων πειραματικών συνθηκών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ακετυλοτρανσφερασών ιστονών των οποίων η ενζυμική ενεργότητα ρυθμίζεται από ένα μεταγραφικό παράγοντα αποτελούν οι Tip60 (που είναι ομόλογη με την Esa1) και TAF_{II}250 του ανθρώπου. Ο ενεργοποιητής Tat του ιού HIV-1 αλληλεπιδρά με τις καταλυτικές περιοχές των δύο πρωτεϊνών εμποδίζοντας την ενζυμική τους δραστηριότητα, με συνέπεια την καταστολή της εξαρτώμενης από αυτές έκφρασης κυτταρικών γονιδίων που παρεμποδίζουν τον υϊκό πολλαπλασιασμό (όπως του Mn-SOD και γονιδίων MHC τάξης I) [21, 165]. Είναι χαρακτηριστικό ότι η Tip60 δεν ακετυλιώνει τον παράγοντα Tat ενώ αυτοακετυλιώνεται ανεξάρτητα από την αλληλεπίδρασή της με αυτόν [21].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ο σιδηρορυθμιζόμενος μεταγραφικός ενεργοποιητής Aft1

2.1	Εισαγωγικά.....	42
2.2	Ανάλυση δομής-λειτουργίας του Aft1.....	45
2.3	Οι μεταγραφικοί συρρυθμιστές Nhr6 και Ssn6 προάγουν την επαγόμενη από τον Aft1 μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου <i>FRE2</i>	47
2.3.1	Στοιχεία για τον παράγοντα Nhr6.....	48
2.3.2	Στοιχεία για τον παράγοντα Ssn6.....	52
2.3.3	Τα γονίδια <i>SSN6</i> και <i>NHP6A/B</i> είναι απαραίτητα για την επαγωγή της μεταγραφής του <i>FRE2</i>	53
2.3.4	Τα γονίδια <i>SSN6</i> και <i>NHP6A/B</i> προάγουν την εξαρτώμενη από τον παράγοντα Aft1 μεταγραφή.....	55
2.3.5	Οι συνέπειες της έλλειψης των γονιδίων <i>SSN6</i> και <i>NHP6A/B</i> δεν είναι ίδιες σε κάθε σιδηροεξαρτώμενο υποκινητή.....	56
2.3.6	Τα γονίδια <i>SSN6</i> και <i>NHP6A/B</i> είναι απαραίτητα για την εξαρτώμενη από τη μεταγραφική ενεργοποίηση χρωματινική αναδιοργάνωση στον υποκινητή <i>FRE2</i>	58
2.3.7	Η παρουσία του Nhr6 είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση του Aft1 στον υποκινητή <i>FRE2</i>	61
2.3.8	Ο Ssn6 στρατολογείται στον υποκινητή <i>FRE2</i> με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία και του Aft1 και του Nhr6.....	62
2.3.9	Οι Ssn6 και Nhr6 αλληλεπιδρούν με τον Aft1 άλλα όχι μεταξύ τους <i>in vivo</i>	65
2.3.10	Οι Ssn6 και Nhr6 αλληλεπιδρούν άμεσα με το αμινοτελικό μισό του Aft1 <i>in vitro</i>	67
2.3.11	Συζήτηση.....	68
2.3.11.1	Ο Nhr6 δρα στην περιοχή UAS του υποκινητή <i>FRE2</i> και ρυθμίζει, κατά κύριο λόγο, την πρόσδεση του Aft1 σε αυτή.....	69
2.3.11.2	Ο Ssn6 στρατολογείται στον υποκινητή <i>FRE2</i> σε συνθήκες επαγωγής και προάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση.....	70
2.3.11.3	Ο σχηματισμός ενός τριμερούς συμπλόκου Aft1-Nhr6-DNA	

	πάνω στον υποκινητή <i>FRE2</i> επιτρέπει την κρίσιμη για την ενεργοποίηση στρατολόγηση του <i>Ssn6</i>	72
2.4	Ο <i>Aft1</i> εμπλέκεται στην εξαρτώμενη από το χαλκορυθμιζόμενο ενεργοποιητή <i>Mac1</i> μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου <i>CTR1</i>	74
2.4.1	Η μεταγραφή του <i>CTR1</i> αυξάνεται όταν απουσιάζει ο <i>Aft1</i>	74
2.4.2	Ο <i>Aft1</i> στρατολογείται στον υποκινητή <i>CTR1</i> με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία του <i>Mac1</i>	75
2.4.3	Ο <i>Ssn6</i> στρατολογείται στον υποκινητή <i>CTR1</i> ανεξάρτητα από την παρουσία των <i>Aft1</i> και <i>Nhr6</i>	76
2.4.4	Συζήτηση.....	77

2.1 Εισαγωγικά

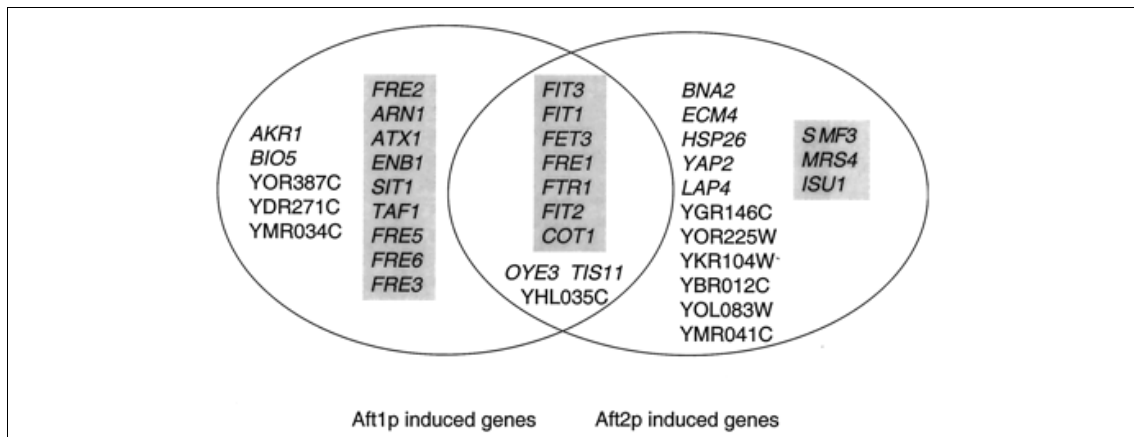
Η πρόσληψη και ομοιοστασία του σιδήρου στο σακχαρομύκητα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες όπως αναγωγάσες (*Fre1-6*), οξειδάσες (*Fet3*, *Fet5*) και περμεάσες (*Ftr1*, *Fth1*, *Fet4*) σιδήρου, μεταφορείς σιδηροφόρων (*Arn1-4*) και μαννοπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος (*Fit1-3*) κι ακόμα μια χαλκοσαπερόνη (*Atx1*) και μια ενδομεμβρανική περμεάση χαλκού (*Ccc2*) (βλ. εισαγωγή) [76]. Η μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων επάγεται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης σιδήρου, ρυθμιζόμενη με αυτόν τον τρόπο από τη διαθεσιμότητα του μετάλλου. Η σιδηροεξαρτώμενη ρύθμιση στο σακχαρομύκητα διαμεσολαβείται από δύο προσδεδεμένους στο DNA μεταγραφικούς παράγοντες: τον *Aft1* [170] ή/και τον πρόσφατα προσδιορισθέντα *Aft2* [10, 137, 138].

Ο *Aft1* προσδέεται, με σιδηροεξαρτώμενο τρόπο, στην αλληλουχία **FeRE** (**Fe-Responsive Element**) 5'-PyPuCACCCPu-3' που βρίσκεται στους υποκινητές των άμεσα ρυθμιζόμενων από αυτόν γονιδίων [172]. Αποτελείται από 690 αμινοξέα και περιέχει ένα αμινοτελικό βασικό τμήμα (αμινοξέα 140-280) που πιθανώς συνιστά την περιοχή δέσμευσης στο DNA (DNA-binding domain) και μια καρβοξυτελική, πλούσια σε γλουταμίνες, ισχυρή περιοχή ενεργοποίησης (activation domain) (αμινοξέα 413-572) [170]. Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του σιδήρου δεν επηρεάζει την έκφραση του *Aft1*, επηρεάζει όμως τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό του. Σε συνθήκες επάρκειας του μετάλλου, ο παράγοντας μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από μια αμινοτελική αλληλουχία πυρηνικής εξαγωγής NES (**Nuclear Export Signal**) (αμινοξέα 97-107) [173]. Η

εισαγωγή του Aft1 στον πυρήνα διαμεσολαβείται από την ιμφορτίνη Pse1/Kar121 η οποία αναγνωρίζει δύο αλληλουχίες πυρηνικής εισαγωγής NLS (Nuclear Localization Signal) (αμινοξέα 198-225 και 332-365 αντίστοιχα) του μορίου και δεσμεύεται σε αυτές ανεξάρτητα από τα ενδοκυτταρικά επίπεδα σιδήρου¹ [157]. Εκτός από τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό, η ενεργότητα του Aft1 ίσως ρυθμίζεται και με πιο άμεσο τρόπο μέσω μηχανισμών “αίσθησης” του σιδήρου που πιθανώς σχετίζονται με δέσμευση του μετάλλου σε αυτόν. Το μοτίβο CysXCys (αμινοξέα 291-293) για παράδειγμα, που έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει σίδηρο, έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την ενεργοποιητική λειτουργία του παράγοντα, καθώς η αντικατάσταση της Cys²⁹¹ με Phe τον καθιστά μόνιμα ενεργό² [170]. Επίσης, δύο πλούσιες σε ιστιδίνες περιοχές του, τοποθετημένες αμινοτελικά και καρβοξυτελικά αντίστοιχα, θα μπορούσαν, δεσμεύοντας σίδηρο, να αλληλεπιδρούν ενδομοριακά με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του, όπως έχει δείχθει για τον χαλκοεξαρτώμενο ενεργοποιητή Mac1 [62]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε φωσφορυλίωση του Aft1 σε ειδικές φάσεις της κυτταρικής ανάπτυξης όπως κατά τη μετάβαση από το μεταβολισμό γλυκόζης στο μεταβολισμό αιθανόλης (diauxic shift), η οποία συμβαίνει όταν τα αποθέματα γλυκόζης των κυττάρων αρχίζουν να εξαντλούνται, ή στις συνθήκες στάσης της ανάπτυξης *cdc* μεταλλαγμάτων, κατά τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Όσο ο Aft1 παρέμεινε υπερφωσφορυλιωμένος, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή των εξαρτώμε-

¹ Εκτός του ότι η αλληλεπίδραση *in vivo* του Aft1 με την Pse1 δεν εμποδίζεται παρουσία σιδήρου, ούτε και η δράση των δύο αλληλουχιών NLS του Aft1 φαίνεται να παρεμποδίζεται στις ίδιες συνθήκες, καθώς ένα παράγωγο του παράγοντα που φέρει καρβοξυτελικά μια αλληλουχία NLS του ιού SV40 και στο οποίο αυτές είναι μεταλλαγμένες μπορεί να εισαχθεί φυσιολογικά στον πυρήνα [157]. Συνεπώς, φαίνεται ότι μόνο το στάδιο της εξαγωγής του Aft1 από τον πυρήνα είναι σιδηροεξαρτώμενο. Δε θα μπορούσε ωστόσο να αποκλειστεί η πιθανότητα δέσμευσης του Aft1 σε μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (anchor protein) παρουσία σιδήρου και αποδέσμευσής του, για να μετατοπιστεί στον πυρήνα μέσω της Pse1, απουσία του μετάλλου [157].

² Η συγκεκριμένη υπερέχουσα μεταλλαγή (*AFT1-I^{up}*) έχει ως αποτέλεσμα τη μόνιμη ενεργοποίηση του κυτταρικού μηχανισμού πρόσληψης σιδήρου, γεγονός που, σε συνθήκες υψηλής διαθεσιμότητας του μετάλλου, προκαλεί στάση της ανάπτυξης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Η τελευταία βρέθηκε ότι οφείλεται σε παρεμπόδιση της έκφρασης των κυκλινών Cln1 και Cln2, στις συγκεκριμένες συνθήκες, που γίνεται στο μεταφραστικό επίπεδο [128].



Εικόνα 2.1

Γονίδια που επάγονται από τον Aft1 ή/και τον Aft2. Προέκυψαν από τη γενωμική ανάλυση των Rutherford et al. [138]. Τα γονίδια στην τομή των δύο συνόλων επάγονται και από τους δύο παράγοντες ενώ τα σκιασμένα κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ομοιοστασία του σιδήρου.

νων από αυτόν γονιδίων σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, γεγονός που υποδήλωσε ότι η φωσφορυλίωση πιθανώς αποτελεί μηχανισμό απενεργοποίησης του παράγοντα σε ειδικές μεταβολικές συνθήκες [16].

Υπάρχει και ένας δεύτερος ενεργοποιητής της σιδηρορυθμιζόμενης μεταγραφής στο σακχαρομύκητα που κωδικοποιείται από το (παράλογο του *AFT1*) γονίδιο *AFT2*. Ο Aft2 [10, 137] αποτελείται από 416 αμινοξέα και είναι σε ποσοστό 39% ομόλογος με το αμινοτελικό μισό του Aft1 το οποίο περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης στο DNA καθώς και το μοτίβο CysXCys. Η απαλοιφή του *AFT2* από το γένωμα δε δίνει φαινότυπο σιδηροεξάρτησης, ωστόσο η υπερέκφρασή του συμπληρώνει ως ένα βαθμό τη μεταλλαγή *aft1Δ* ενώ παράλληλα η διπλή μεταλλαγή *aft1Δ aft2Δ*, συγκρινόμενη με την *aft1Δ*, παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στις συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Συνεπώς, ο Aft2 υποστηρίζει την έκφραση εξαρτώμενων από τον Aft1 γονιδίων του μηχανισμού εξειδικευμένης πρόσληψης και μεταφοράς του σιδήρου. Η ανάλυση, με χρήση μικροσειρών cDNA, της γονιδιακής έκφρασης σε ένα στέλεχος *aft1Δ aft2Δ* στο οποίο υπερεκφράστηκαν ξεχωριστά τα γονίδια *AFT1* και *AFT2* φανέρωσε ότι οι παράγοντες Aft1 και Aft2 έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενη αλλά μη πλεονάζουσα λειτουργία καθώς ενεργοποιούν τη μεταγραφή δύο ξεχωριστών (μερικά αλληλεπικαλυπτόμενων) ομάδων γονιδίων [138] (εικόνα 2.1). Επιπλέον, μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν ότι οι δύο παράγοντες δεσμεύονται σε κοινές αλληλουχίες των εξαρτώμενων από αυτούς υποκινητών [138]. Ενδεχομένως, η

επιλεκτική δράση του Aft1 ή του Aft2 πάνω στους επηρεαζόμενους και από τους δύο παράγοντες υποκινητές να προσφέρει πλεονεκτήματα στο κύτταρο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

2.2 Ανάλυση δομής-λειτουργίας του Aft1

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, επιχειρήσαμε μια γενική ανάλυση δομής-λειτουργίας του Aft1. Συγκεκριμένα, εκφράστηκαν:

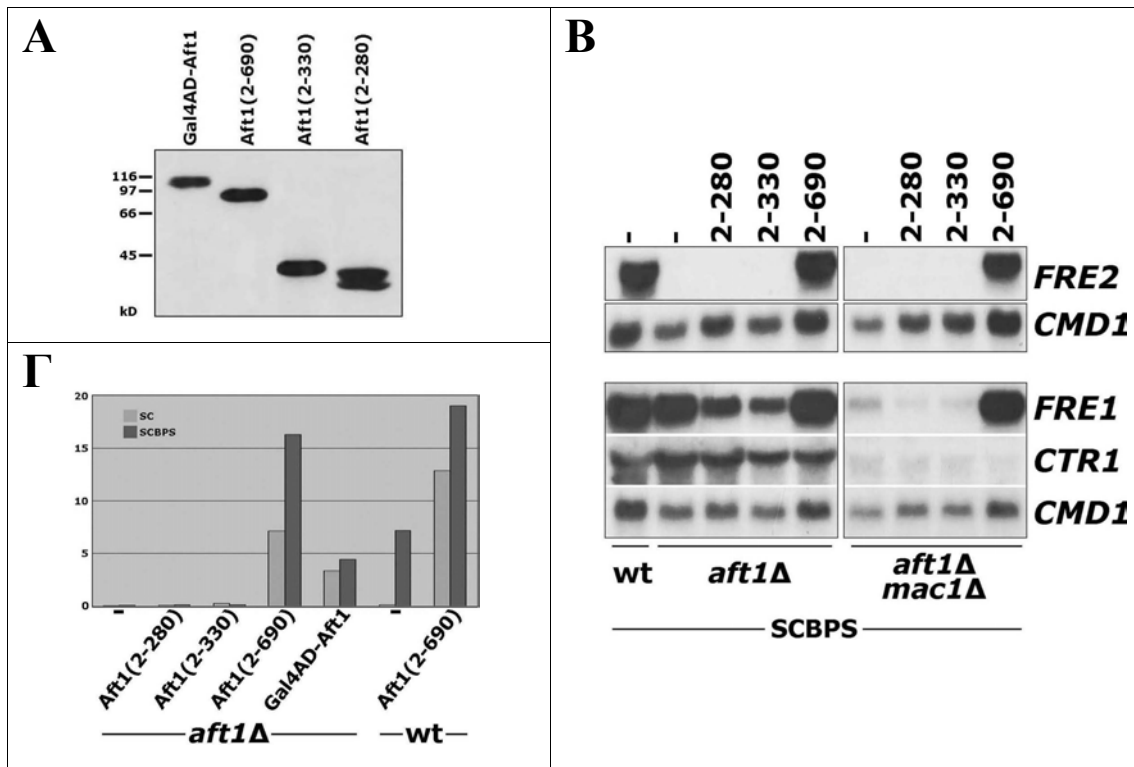
(α) το ελλειμματικό πεπτίδιο N-Aft1(2-280) που περιλαμβάνει την πιθανολογούμενη περιοχή δέσμευσης του παράγοντα στο DNA,

(β) το N-Aft1(2-330) που περιέχει επιπλέον το μοτίβο CysXCys το οποίο έχει βρεθεί να επηρεάζει την ενεργοποιητική του λειτουργία και

(γ) η ακέραια πρωτεΐνη Aft1(2-690),

σε ένα στέλεχος *aft1Δ* (εικόνα 2.2A) και συγκρίθηκε η ικανότητα τους να ενεργοποιούν τη μεταγραφή σε αυτό, με την αντίστοιχη του ενδογενούς Aft1 στο στέλεχος αγρίου τύπου. Παράλληλα, εξετάστηκε η ενεργοποιητική ικανότητα τους και σε ένα διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *aft1Δ mac1Δ* έτσι ώστε να διαπιστωθεί η καθαρή μεταγραφική συνεισφορά του πρόσφατα προσδιορισθέντος ενεργοποιητή Aft2. Ως γονίδια αναφοράς στην παραπάνω ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν το αποκλειστικά σιδηροεπαγόμενο *FRE2*, το σιδηροεπαγόμενο και χαλκοεπαγόμενο *FRE1* και το αποκλειστικά χαλκοεπαγόμενο *CTR1*. Οι κατάλληλες συνθήκες για την ταυτόχρονη επαγωγή της μεταγραφής τους εξασφαλίστηκαν με την προσθήκη του χηλικού δεσμευτή BPS στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των στελεχών (βλ. Y&M).

Τα αποτελέσματα του πειράματος ήταν διαφωτιστικά σε σχέση τόσο με την εξάρτηση των τριών γονιδίων από τους παράγοντες Aft1, Aft2 και Mac1 όσο και με τη λειτουργικότητα των παραγώγων του Aft1 (εικόνα 2.2B). Συγκεκριμένα, επιβεβαιώθηκε ότι η μεταγραφική ρύθμιση του *FRE2* γίνεται αποκλειστικά από τον Aft1 και ότι σε αυτή του *FRE1*, εκτός των Aft1 και Mac1, συμμετέχει κατά χαρακτηριστικό τρόπο και ο Aft2. Ελλείψει του Mac1 ή του Aft1, η επαγόμενη μεταγραφή του *FRE1* σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε να μειώνεται, γεγονός που προφανώς οφείλεται στην αναπλήρωση της απουσίας από τους εναπομείναντες ενεργοποιητές. Εξάλλου, η έκφραση του γονιδίου *AFT1* έχει βρεθεί αυξημένη σε ένα στέλεχος *mac1Δ* [28] κι ακόμα, όπως εμείς δείξαμε, περισσότερος Aft1 προσδένεται στον υποκινητή *FRE1* όταν απουσιάζει ο Mac1 (βλ. παρακάτω). Δεν υπάρχουν ενδεί-



Εικόνα 2.2

Λειτουργική ανάλυση παραγώγων του Aft1. (A) Τα πρωτεϊνικά επίπεδα διαφόρων παραγώγων του Aft1 όπως προέκυψαν από ανάλυση Western με χρήση αντισώματος anti-HA. Οι αντίστοιχες πλασμδιακές κατασκευές περιγράφονται στα Υ&Μ. (B) Ανάλυση Northern ολικού RNA από αναπτυγμένα σε SCBPS στελέχη αγρίου τύπου, *aft1Δ* και *aft1Δ mac1Δ*, στα οποία εκφράστηκαν ή όχι τα ενδεικνυόμενα παράγωγα του Aft1, με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE1*, *FRE2*, *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). (C) Ενεργότητα β -γαλακτοσιδάσης του γονιδίου αναφοράς *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ* σε κύτταρα *aft1Δ* ή αγρίου τύπου, αναπτυγμένα σε SC ή SCBPS, στα οποία εκφράστηκαν ή όχι τα ενδεικνυόμενα παράγωγα του Aft1.

Ξεις ότι επηρεάζεται η έκφραση του γονιδίου *MAC1* σε ένα στέλεχος *aft1Δ* [143]. Η μεταγραφή του *CTR1* βρέθηκε, όπως αναμενόταν, να επάγεται από τον Mac1 ενώ, απρόσμενα, φάνηκε να επηρεάζεται και από τον Aft1 και μάλιστα αρνητικά. Αυτό είναι ένα ενδιαφέρον εύρημα το οποίο αναπτύσσεται σε παρακάτω ενότητα. Το πεπτίδιο N-Aft1(2-330), όπως και το N-Aft1(2-280), δεν αποδείχθηκε ικανό να επάγει τη μεταγραφή του *FRE2*, γεγονός που δείχνει ότι το μοτίβο CysXCys δεν έχει ενεργοποιητική δυνατότητα από μόνο του. Ωστόσο, τα δύο πεπτίδια επέδρασαν αρνητικά στη μεταγραφή του *FRE1*. Προφανώς, αυτό έγινε επειδή μπόρεσαν να προσδεθούν στον υποκινητή του γονιδίου και να εμποδίσουν σε κάποιο ποσοστό την πρόσδεση του Aft2 σε αυτόν. Συνεπώς, αφενός επιβεβαιώνεται η οριοθέτηση της

περιοχής δέσμευσης στο DNA (DNA-binding domain) του Aft1 μέχρι το αμινοξύ 280 της πρωτεΐνης και αφετέρου συμπεραίνεται έμμεσα ότι οι Aft1 και Aft2 προσδένονται σε κοινή θέση-στόχο (FeRE) πάνω στον υποκινητή *FRE1*, όπως έχει δειχθεί για τους υποκινητές *FET3* και *FIT3* [138].

Τα τρία πεπτίδια που περιγράφηκαν παραπάνω, καθώς και το Gal4AD-Aft1 στο οποίο ο Aft1 είναι συνδεδεμένος αμινοτελικά με την περιοχή ενεργοποίησης του παράγοντα Gal4, ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη μεταγραφή και του χιμαιρικού γονιδίου αναφοράς *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ*, σε κύτταρα *aft1Δ* που αναπτύχθηκαν σε μέσο με ή χωρίς σίδηρο. Η μη λειτουργικότητα των δύο πρώτων φάνηκε και στο πείραμα αυτό, ενώ είναι χαρακτηριστικό ότι η μεταγραφή που οφείλεται στο Gal4AD-Aft1 ήταν ανεξάρτητη από τη διαθεσιμότητα του σιδήρου, κάτι που φυσιολογικά δε συνέβη στην περίπτωση του Aft1(2-690) (εικόνα 2.2Γ). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την άποψη ότι, πέρα από το σιδηροεξαρτώμενο ενδοκυτταρικό εντοπισμό, υπάρχει ενδεχομένως και μηχανισμός απενεργοποίησης του πυρηνικού Aft1. Η προσθήκη της περιοχής ενεργοποίησης του Gal4 στον Aft1, επειδή ήταν αμινοτελική, φαίνεται ότι επηρέασε την πρόσδεσή του στο DNA. Γι' αυτό το λόγο το πεπτίδιο Gal4AD-Aft1 έδωσε χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφής απ' ό,τι το Aft1(2-690). Από την άλλη, πιθανώς εμπόδισε την πραγματοποίηση δομικών αλλαγών σε αυτόν, π.χ. ενδομοριακής αλληλεπίδρασης, που θα είχαν ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του. Σε συμφωνία με αυτό, προκαταρκτική ανάλυση με το σύστημα των δύο υβριδίων έδειξε πιθανή αλληλεπίδραση του Aft1 με τον εαυτό του (βλ. κεφάλαιο 1, πίνακας 1.2).

2.3 Οι μεταγραφικοί συρρυθμιστές Nhr6 και Ssn6 προάγουν την επαγόμενη από τον Aft1 μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *FRE2*

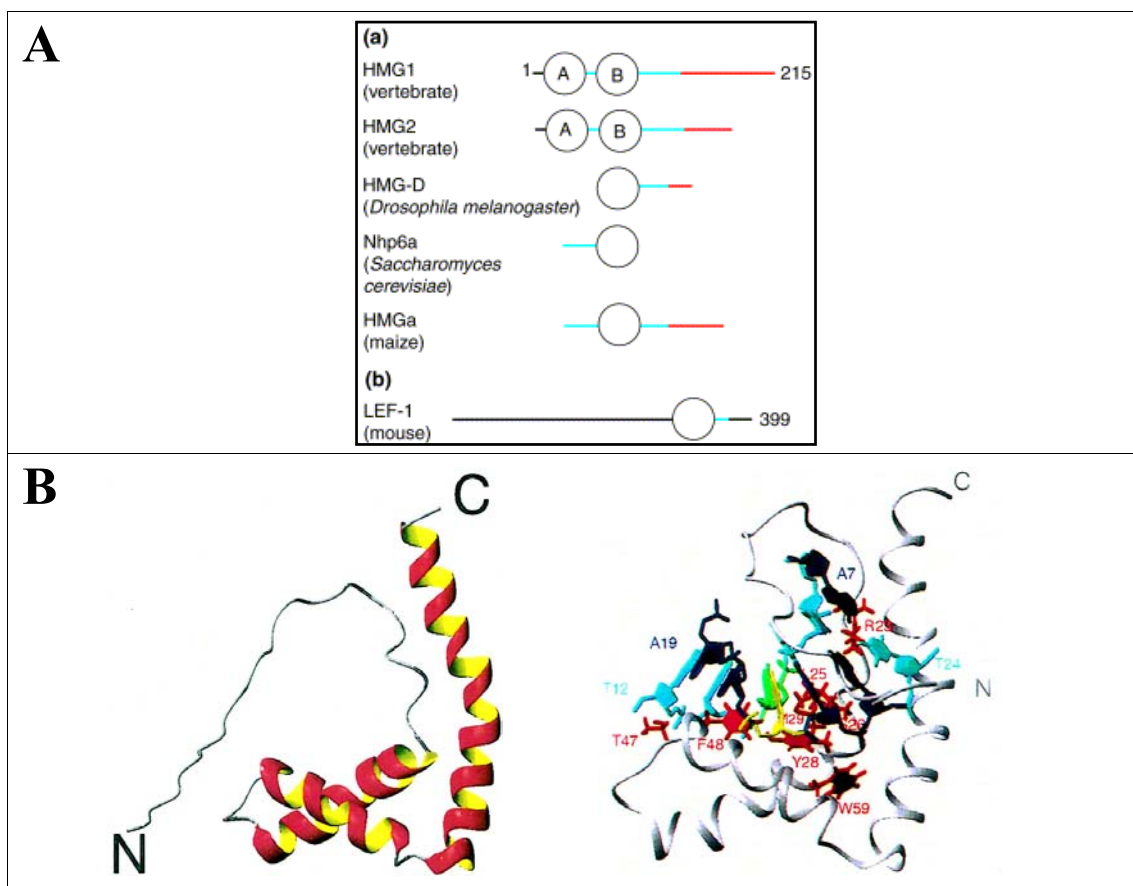
Τα *FRE1* και *FRE2* είναι τα πιο καλά μελετημένα γονίδια αναγωγασών σιδήρου. Όπως είδαμε παραπάνω, η μεταγραφή του δεύτερου εξαρτάται αποκλειστικά από τον παράγοντα Aft1. Το πρώτο επάγεται ακόμα από τον Aft2 [138] και, σε συνθήκες έλλειψης εξωκυτταρικού χαλκού, από τον χαλκορυθμιζόμενο, προσδεδεμένο στο DNA, μεταγραφικό ενεργοποιητή Mac1 [171]. Το *FRE2*, ως γονίδιο επαγόμενο σε υψηλά επίπεδα και ρυθμιζόμενο με απλό τρόπο, αποτελεί ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της ρύθμισης της μεταγραφής. Χρησιμοποιώντας ένα ειδικό γενετικό σχήμα, το οποίο περιγράφηκε αναλυτικά στο πρώτο κεφάλαιο, αναζητήσαμε θετικούς μεταγραφικούς ρυθμιστές του και απομονώσαμε το γονίδιο *NHP6A* ως καταστολέα

πολλαπλών αντιγράφων (high-copy suppressor) μιας γενωμικής μεταλλαγής που μειώνει σημαντικά την επαγόμενη μεταγραφή του (και όχι εκείνη του *FRE1*). Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν την ύπαρξη φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων Nhr6b και Tup1 [89] καθώς και την εμπλοκή των γονιδίων *SSN6* και *TUP1* στη διαδικασία αναγωγικής πρόσληψης σιδήρου στη ζύμη [90], αποτέλεσε το έναυσμα για τη διερεύνηση του ρόλου των *NHP6A*, *SSN6* και *TUP1* στη μεταγραφική ρύθμιση του *FRE2*. Η προκαταρκτική ανάλυσή της στα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη, αποκάλυψε ότι τα τρία γονίδια (τα δύο πρώτα κυρίως και το τρίτο σε μικρότερο βαθμό) έχουν ισχυρή θετική επίδραση στην επαγόμενη μεταγραφή του *FRE2* (βλ. πρώτο κεφάλαιο). Με βάση αυτό το δεδομένο, εστίασαμε τη μελέτη μας πάνω στον ειδικό θετικό μεταγραφικό ρόλο των γενικών συρρυθμιστών Nhr6 και Ssn6.

2.3.1 Στοιχεία για τον παράγοντα Nhr6

Οι παράγοντες Nhr6a και Nhr6b (ο όρος Nhr6 αναφέρεται και στους δύο) είναι μικρές (93 και 99 αμινοξέα αντίστοιχα - περίπου 11 kDa), ποσοτικά άφθονες, λειτουργικά αλληλεπικαλυπτόμενες, μη ιστονικές πρωτεΐνες του σακχαρομύκητα, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα πλεονάζοντα (75% νουκλεοτιδική ταυτότητα, 87% αμινοξική ταυτότητα) και μη απαραίτητα για τη βιωσιμότητα γονίδια *NHP6A* και *NHP6B* [74]. Ανήκουν στην οικογένεια HMGB (HMG-box) της ομάδας πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας, έχοντας δομική και λειτουργική ομολογία με τους παράγοντες HMGB1 και HMGB2 των θηλαστικών.

Οι τελευταίοι είναι ποσοτικά άφθονοι και πανταχού παρόντες και προσδένονται στο DNA μη ειδικά ως προς τη νουκλεοτιδική αλληλουχία, δείχνοντας όμως προτίμηση σε λυγισμένες (bent) ή παραμορφωμένες (distorted) δομές του. Παράλληλα, έχουν την ικανότητα να λυγίζουν το γραμμικό DNA *in vitro*. Περιέχουν δύο κουτιά HMG, τα A και B, με τα οποία διαμεσολαβείται η ενεργότητα πρόσδεσης και κάμψης, καθώς και μια μακριά όξινη καρβοξυτελική ουρά η οποία ρυθμίζει τη συγγένεια (δηλαδή το βαθμό ισχύος) της πρόσδεσης. Χαρακτηρίζονται ως αρχιτεκτονικοί παράγοντες που διευκολύνουν στην υπερνίκηση της ακαμψίας του DNA κατά τη συγκρότηση νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων σε μια ποικιλία διεργασιών όπως η μεταγραφή, η αντιγραφή, ο ανασυνδυασμός και η επιδιόρθωση [14, 152].



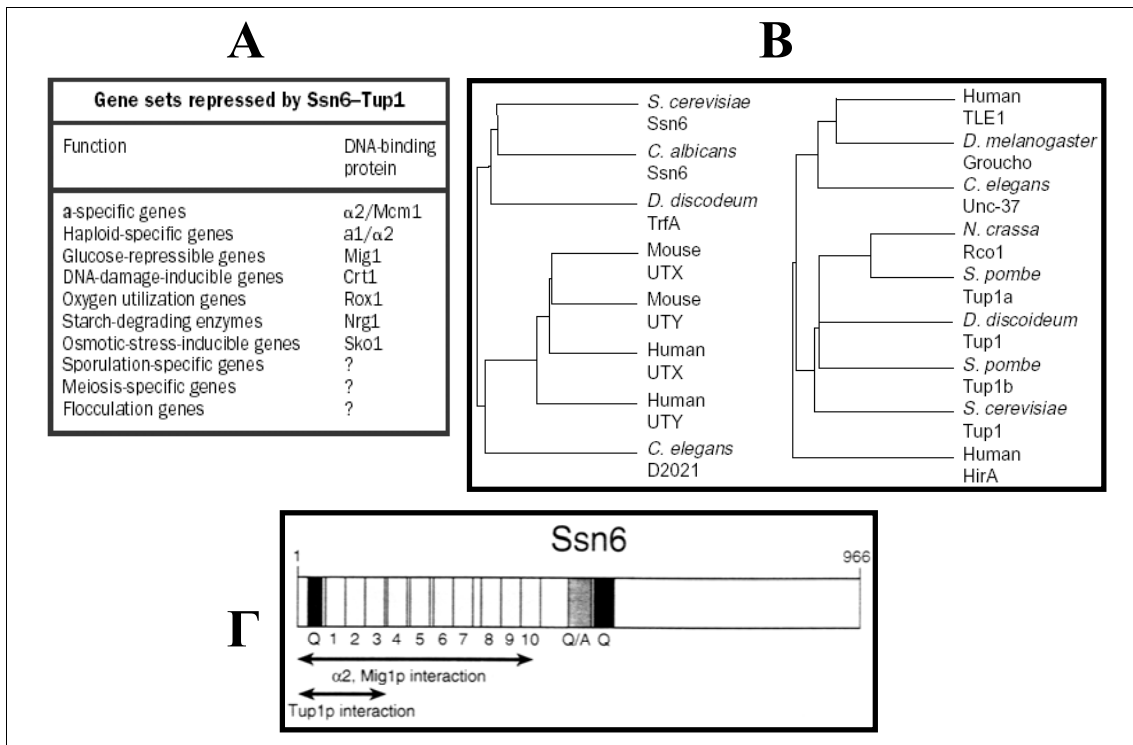
Εικόνα 2.3

Δομική απεικόνιση του παράγοντα Nhp6a. (A) Πρωτεΐνες τύπου HMGB μη ειδικής (a) ή ειδικής (b) αναγνώρισης, από διάφορους οργανισμούς [152]. Απεικονίζονται με κύκλους τα κουτιά HMG, με μπλέ γραμμές οι βασικές περιοχές, με κόκκινες οι όξινες ουρές και με μαύρες τα υπόλοιπα τμήματα των μορίων. (B) Τρισδιάστατο δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης Nhp6a (αριστερά) ή του συμπλόκου Nhp6a-DNA (δεξιά), όπως προέκυψε από ανάλυση NMR [3]. Οι υδροφοβικές επαφές πρωτεΐνης-DNA απεικονίζονται με διάφορα χρώματα (κόκκινο: αμινοξικά κατάλοιπα, γαλάζιο: dT, πράσινο: dG, μπλέ: dA, κίτρινο: dC).

Όπως ακριβώς οι HMGB1 και HMGB2, ο παράγοντας Nhp6 προσδένεται κατά προτίμηση σε παραμορφωμένες δομές του DNA (π.χ. μικροκυκλικό ή ενωμένο με cisplatin) και επάγει μια μεγάλη κάμψη στο γραμμικό DNA *in vitro* [123, 175, 168]. Αποτελείται από ένα μοναδικό κουτί HMG (ομόλογο κατά 40% με το κουτί B της HMGB1), το οποίο λειτουργεί ως μη εξειδικευμένη περιοχή δέσμευσης στο DNA (δηλαδή δεν αναγνωρίζει συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία) καθώς και μια κοντή βασική αμινοτελική ουρά, απαραίτητη για πρόσδεση υψηλής συγγένειας [175] (εικόνα 2.3A). Η δομή του Nhp6a σε διάλυμα, τόσο ελεύθερου όσο και σε σύμπλεγμα με το DNA, έχει προσδιοριστεί με ανάλυση NMR [3]. Σύμφωνα με αυτή, το κουτί

HMG (77 αμινοξέα) αναδιπλώνεται σε μια μορφή τριών α-ελίκων σχήματος L, που είναι χαρακτηριστική στις πρωτεΐνες HMGB1 και HMGB2, αλληλεπιδρώντας με το μικρό αυλάκι του DNA, ενώ η αμινοτελική ουρά (17 αμινοξέα), που είναι μη δομημένη όταν δεν υπάρχει DNA, τυλίγεται γύρω από το συμπιεσμένο μεγάλο αυλάκι, δημιουργώντας επαφές με το σκελετό φωσφορικών και σταθεροποιώντας, με αυτόν τον τρόπο, την επαγόμενη από το κουτί HMG κάμψη του DNA (εικόνα 2.3B).

Καθένα από τα μονά μεταλλάγματα *nhr6aΔ* και *nhr6bΔ* παρουσιάζει φαινότυπο αγρίου τύπου, φανερώνοντας τη λειτουργική αλληλεπικάλυψη που υπάρχει μεταξύ των παραγόντων Nhr6a και Nhr6b [20]. Μάλιστα, ο δεύτερος, που είναι ποσοτικά λιγότερος από τον πρώτο σε κύτταρα αγρίου τύπου, αυξάνεται σε κύτταρα *nhr6aΔ*, έτσι ώστε να αντισταθμίσει την απουσία του πρώτου από αυτά [75]. Από την άλλη, το διπλό μετάλλαγμα *nhr6ΔΔ* παρουσιάζει σειρά φαινοτύπων όπως αργή ανάπτυξη στους 30°C, σταμάτημα της ανάπτυξης απουσία οσμωτικής υποστήριξης (1M σορβιτόλης) στους 38°C και προβληματική κυτταρική-κυτταροσκελετική μορφολογία επίσης στους 38°C [20]. Αυτή η φαινοτυπική ποικιλία προιδαίνει ότι ο Nhr6 συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων. Πράγματι, το γενωμικό μεταγραφικό προφίλ του στελέχους *nhr6ΔΔ* έφερε στο φως έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων, που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές διεργασίες, των οποίων η βασική έκφραση επηρεάζεται, θετικά ή αρνητικά, από τον Nhr6 [113]. Επιπρόσθετα, ο Nhr6 είναι απαραίτητος για τη μεταγραφική ενεργοποίηση μιας ομάδας εξαρτώμενων από την RNA πολυμεράση II γονιδίων όπως τα *CUP1*, *CYCI*, *DDR2*, *GAL1* [122] και *CHAI* [113]. Με βιοχημικά πειράματα που έγιναν *in vitro*, βρέθηκε ότι επάγει τη μεταγραφή διευκολύνοντας το σχηματισμό προεναρκτικών συμπλόκων [122]. Ακόμα, εμπλέκεται στη ρύθμιση του εκτεταμένα μελετημένου γονιδίου *HO*. Αρχικά, με γενετικά πειράματα, βρέθηκε ότι ρυθμίζει την εξαρτώμενη από τον παράγοντα Swi6 μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς *HO-LacZ* [144], ενώ μεταγενέστερη γενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι δρα μαζί με τον παράγοντα Gcn5 στο ίδιο ενεργοποιητικό μονοπάτι πάνω στον υποκινητή *HO* προάγοντας την πρόσδεση του TBP [178, 177]. Επίσης, σχετίζεται με την εξαρτημένη από την RNA πολυμεράση III μεταγραφή. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου *SNR6*, που κωδικοποιεί το U6 snRNA, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Συγκεκριμένα, μάλιστα, διευκολύνει την πρόσδεση του παράγοντα TFIIIC στον υποκινητή *SNR6 in vitro* [80, 105, 107]. Το γονίδιο *BRF1* που κωδικοποιεί μια



Εικόνα 2.4

Ο παράγοντας Ssn6 είναι ένας βασικός μεταγραφικός συγκαταστολέας στη ζύμη. (Α) Ο Ssn6, σε σύμπλοκο με τον Tup1, καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν σε διαφορετικά φυσιολογικά μονοπάτια μέσω ειδικών, κατά περίπτωση, προσδεδεμένων στο DNA παραγόντων. (Β) Η πρωτεΐνη Ssn6, όπως και η Tup1, παρουσιάζει σημαντική εξελικτική συντήρηση. (Γ) Διαγραμματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής ακολουθίας του Ssn6. Σημειώνονται οι 10 επαναλήψεις TPR καθώς και οι περιοχές πολυ-γλουταμίνης και πολυ-γλουταμίνης/αλανίνης [στοιχεία από 146 και 135].

περιοριστική υπομονάδα του TFIIIB και το γονίδιο *SNR6* προσδιορίστηκαν ως καταστολείς πολλαπλών αντιγράφων του θερμοευαίσθητου φαινοτύπου του στελέχους *nhr6ΔΔ* [80].

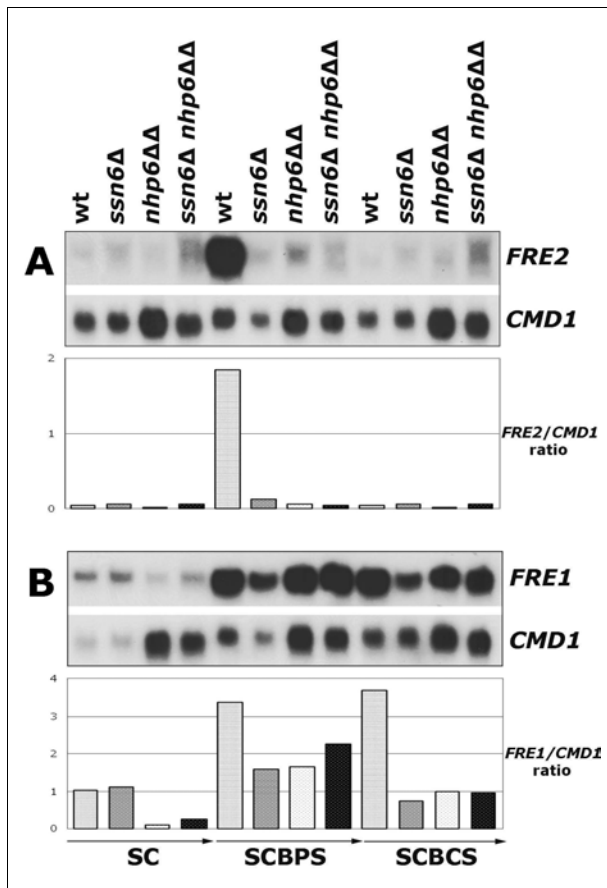
Σε κύτταρα *nhr6ΔΔ*, έχει παρατηρηθεί αλλαγή της χρωματινικής δομής σε ορισμένους υποκινητές, όπως στον μη ενεργοποιημένο *CHAI* [113] και στην περιοχή του κουτιού TATA του *SNR6*, στους 37°C [105]. Αυτό υποδηλώνει σχέση του Nhr6 και με τη διαμεσολαβούμενη από τη χρωματίνη ρύθμιση της (εξαρτώμενης από την RNA πολυμεράση II ή III) μεταγραφής. Δύο ενδείξεις, μάλιστα, εμπλέκουν άμεσα τον Nhr6 στη ρύθμιση της κατάστασης της χρωματίνης. Κατά πρώτον, εντοπίστηκε ως συστατικό του συντηρημένου ανάμεσα στους ευκαρυώτες συμπλόκου γ FACT (FAcilitates Chromatin Transactions) (Spt16/Cdc68-Pob3-Nhr6), το οποίο μεσολαβεί για το πέρασμα των πολυμερασών δια μέσου των νουκλεοσωμάτων και είναι

σημαντικό τόσο για τη μεταγραφή όσο και για την αντιγραφή του DNA [11, 33]. Κατά δεύτερον, αλληλεπιδρά με το ετεροδιμερές *Apr7/9*, που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου RSC (**R**emod**e**ls the **S**tructure of **C**hromatin) της οικογένειας SWI/SNF, διευκολύνοντας την πρόσδεση του συμπλόκου στα νουκλεοσώματα [151].

2.3.2 Στοιχεία για τον παράγοντα *Ssn6*

Ο παράγοντας *Ssn6* αποτελεί σημαντικό μεταγραφικό συρρυθμιστή στη ζύμη. Προσδιορίστηκε ως συγκαταστολέας που απαιτείται, σε σύμπλοκο με τον παράγοντα *Tup1*, για την παρεμπόδιση της μεταγραφής πολλών γονιδίων (περίπου του 3% των γονιδίων του *σακχαρομύκητα*) που συμμετέχουν σε ποικίλα φυσιολογικά μονοπάτια [146] (εικόνα 2.4A). Το σύμπλοκο αυτό, που αποτελείται από ένα μόριο *Ssn6* και τέσσερα *Tup1*, στρατολογείται πάνω στους διάφορους υποκινητές μέσω αλληλεπιδράσεων με ειδικούς προσδεδεμένους στο DNA ρυθμιστικούς παράγοντες. Εκεί, παρεμποδίζει τη μεταγραφή, με την υπομονάδα *Tup1* να αποτελεί τον καταστολέα, επηρεάζοντας άμεσα τη δράση του ενεργοποιητή ή αλλάζοντας την τοπική χρωματική δομή ή, τέλος, αλληλεπιδρώντας με το βασικό μεταγραφικό μηχανισμό [146]. Ο παράγοντας *Ssn6*, όπως και ο *Tup1*, παρουσιάζει αξιοσημείωτη συντήρηση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (εικόνα 2.4B). Αποτελείται από 966 αμινοξέα και περιλαμβάνει δέκα αμινοτελικές επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 34 αμινοξέων (tetra-trico-peptide repeats ή TPRs) καθώς και περιοχές πλούσιες σε γλουταμίνη ή γλουταμίνη/αλανίνη (εικόνα 2.4Γ). Οι επαναλήψεις TPR, που είναι απαραίτητες για τη λειτουργικότητα του μορίου [141], σχηματίζουν δομές περιελιγμένου σπειράματος (coiled coil) οι οποίες δρουν ως επιφάνειες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων [85]. Η αλληλεπίδραση με τον *Tup1*, για παράδειγμα, γίνεται με τις επαναλήψεις 1 έως και 3 [155].

Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά γονίδια αναφοράς έχουν δείξει ότι το σύμπλοκο *Ssn6-Tup1* μπορεί να δράσει και ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής, με αυτή τη λειτουργία να διαμεσολαβείται κατά κύριο λόγο από τον *Ssn6* [19]. Γενετικές και βιοχημικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει έναν αριθμό φυσικών γονιδίων που είναι στόχοι της θετικής δράσης του *Ssn6-Tup1* [183, 19, 120, 132] (βλ. παράγραφο 2.3.11.2).



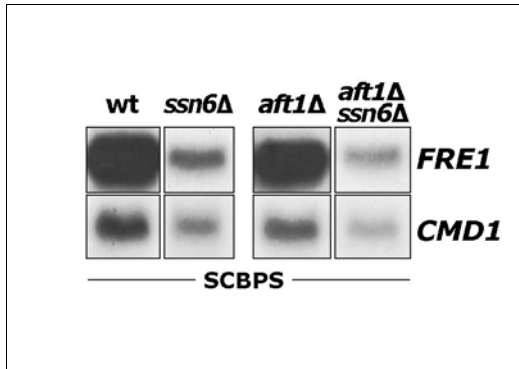
Εικόνα 2.5

Επίδραση των *SSN6* και *NHP6A/B* στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. (Α) Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνυόμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επάρκεια μετάλλων (SC) ή έλλειψη σιδήρου (SCBPS) ή έλλειψη χαλκού (SCBCS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE2* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). (Β) Αντίστοιχη ανάλυση με χρήση ανιχνευτών για τα *FRE1* και *CMD1*. Οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν στον PhosphorImager με χρήση του κατάλληλου λογισμικού (ImageQuant). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τους λόγους έντασης των αντίστοιχων ζωνών (κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA).

2.3.3 Τα γονίδια *SSN6* και *NHP6A/B* είναι απαραίτητα για την επαγωγή της μεταγραφής του *FRE2*

Προκειμένου να εξετάσουμε το ρόλο των γονιδίων *SSN6* και *NHP6A* στη μεταγραφική ρύθμιση του *FRE2*, συγκρίναμε τα επίπεδα μεταγραφής του (όπως και του *FRE1*) σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου, με τα αντίστοιχα στα ισογενή μεταλλαγμένα στελέχη *ssn6Δ*, *nhr6ΔΔ* και *ssn6Δ nhr6ΔΔ*, σε συνθήκες επάρκειας ή έλλειψης μετάλλων. Η χρήση της διπλής μεταλλαγής *nhr6ΔΔ* ήταν επιβεβλημένη καθώς για την παρατήρηση φαινοτύπων που σχετίζονται με την πρωτεΐνη Nhr6 είναι απαραίτητη η απαλοιφή τόσο του γονιδίου *NHP6A* όσο και του *NHP6B* από το γένωμα [20]

Τα σχετικά με τη μεταγραφή του *FRE2* αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 2.5A. Σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, η επαγόμενη μεταγραφή του γονιδίου μειώθηκε δραματικά στα τρία μεταλλαγμένα στελέχη, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου, γεγονός που έδειξε την περίπου εξίσου ισχυρή θετική επίδραση των *SSN6* και *NHP6A/B* σε αυτή. Σε συνθήκες επάρκειας μετάλλων, η βασική (μη επαγόμενη) μεταγραφή ήταν μόλις ανιχνεύσιμη στα τέσσερα στελέχη κι επομένως δεν ήταν



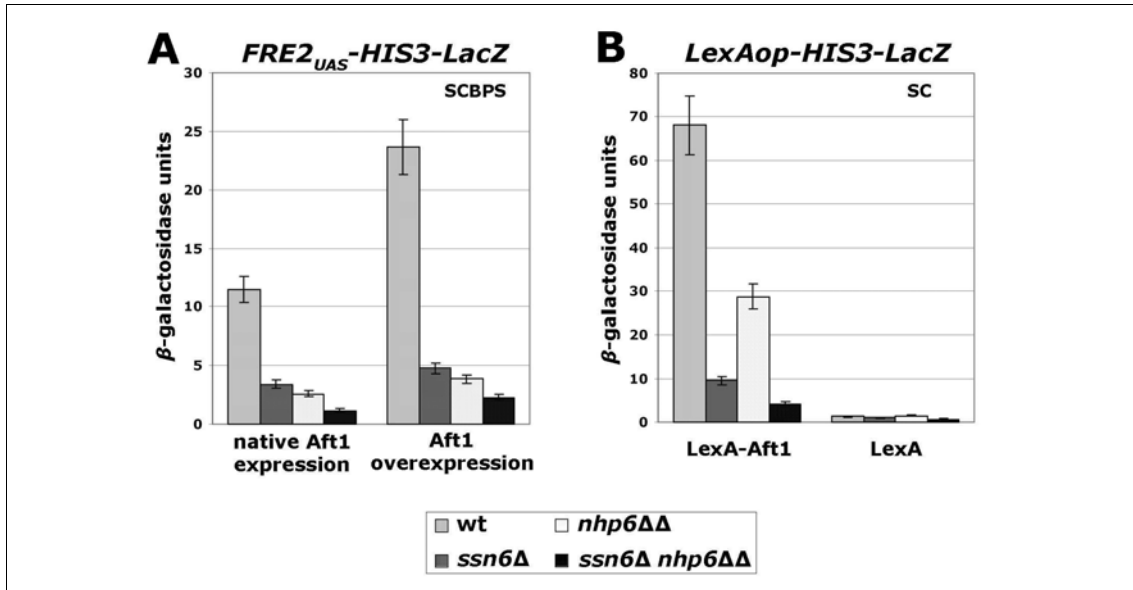
Εικόνα 2.6

Επίδραση του *SSN6* στην ανεξάρτητη από τον Aft1 μεταγραφή του *FRE1*. Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνυόμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν απουσία σιδήρου (SCBPS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης).

δυνατόν να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη επίδραση των *SSN6* και *NHP6A/B* σε αυτή. Τέλος, σε συνθήκες έλλειψης χαλκού, η μεταγραφή παρέμεινε στα βασικά επίπεδα σε όλα τα στελέχη, πράγμα αναμενόμενο καθώς είναι γνωστό ότι αυτή δεν επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα του χαλκού. Το τελευταίο είναι σημαντικό για τον έλεγχο του πειράματος μια και η χηλική ουσία BPS δεσμεύει εκτός από δισθενή σίδηρο και δισθενή χαλκό.

Τα αποτελέσματα που αφορούν στη μεταγραφή του *FRE1* (εικόνα 2.5B) φανέρωσαν μια πιο πολύπλοκη διαδικασία μεταγραφικής ρύθμισης, γεγονός σύμφωνα με τη γνωστή δράση περισσότερων του ενός προσδεδεμένων στο DNA μεταγραφικών ενεργοποιητών (Mac1, Aft1, Aft2) πάνω στον υποκινητή του γονιδίου. Στο στέλεχος *ssn6Δ*, η βασική μεταγραφή του *FRE1* παρέμεινε στα επίπεδα αγρίου τύπου ενώ η επαγόμενη μειώθηκε σημαντικά, κυρίως σε συνθήκες έλλειψης χαλκού. Στο στέλεχος *nhr6ΔΔ*, η βασική μεταγραφή μειώθηκε θεαματικά ενώ η επαγόμενη μειώθηκε μεν, κυρίως σε συνθήκες έλλειψης χαλκού, αλλά σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με την πρώτη. Η τριπλή μεταλλαγή *ssn6Δ nhr6ΔΔ* έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των *ssn6Δ* και *nhr6ΔΔ* σε επαγωγικές συνθήκες ενώ, σε μη επαγωγικές, φανέρωσε την ύπαρξη επιστατικής επίδρασης της μεταλλαγής *nhr6ΔΔ* πάνω στην *ssn6Δ*.

Τα παραπάνω δεδομένα αποκαλύπτουν ένα νέο ρυθμιστικό ρόλο των γονιδίων *SSN6* και *NHP6A/B*, αυτόν στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. Καθώς τα δύο γονίδια βρέθηκαν να είναι απαραίτητα για την επαγόμενη μεταγραφή του *FRE2*, το ερώτημα που προέκυψε στη συνέχεια ήταν αν ο ρόλος τους συνδέεται άμεσα με τη δράση του σιδηροεξαρτώμενου μεταγραφικού ενεργοποιητή Aft1. Στην περίπτωση του *FRE1* δε μπορεί να δοθεί εύκολα απάντηση μια και το γονίδιο ρυθμίζεται μεταγραφικά και από άλλους παράγοντες εκτός του Aft1. Πάντως, η επίδραση του Ssn6 στην επαγόμενη μεταγραφή του φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την παρουσία



Εικόνα 2.7

Επίδραση των *SSN6* και *NHP6A/B* στην εξαρτώμενη από τον *Aft1* μεταγραφή. (Α) Μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης από τα παραπάνω στελέχη τα οποία μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο που φέρει το χμαιρικό γονίδιο αναφοράς *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ* και με το pYX142 ή το pYX142-*AFT1* (πλασμίδιο υπερέκφρασης του *AFT1*) και αναπτύχθηκαν σε SCBPS. (Β) Μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης από τα παραπάνω στελέχη τα οποία μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο που φέρει το χμαιρικό γονίδιο αναφοράς *LexAop-HIS3-LacZ* και με πλασμίδιο έκφρασης LexA-Aft1 ή LexA και αναπτύχθηκαν σε SC (η ενεργότητα στο SCBPS ξεπερνά τα μετρήσιμα επίπεδα). Οι τιμές στα (Α) και (Β) αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

του παράγοντα αυτού (εικόνα 2.6). Αντίθετα το *FRE2* δεν επάγεται μεταγραφικά καθόλου σε ένα στέλεχος *aft1Δ* (εικόνα 2.2B). Συνεπώς, μπορούμε να υποθέσουμε την ύπαρξη άμεσης σχέσης των *SSN6* και *NHP6A/B* με την εξαρτώμενη από τον *Aft1* μεταγραφή του.

2.3.4 Τα γονίδια *SSN6* και *NHP6A/B* προάγουν την εξαρτώμενη από τον παράγοντα *Aft1* μεταγραφή

Με σκοπό τη διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης, εξετάσαμε την εξαρτώμενη από τον *Aft1* μεταγραφική ενεργοποίηση του χμαιρικού γονιδίου αναφοράς *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ* στα στελέχη αγρίου τύπου, *ssn6Δ*, *nhp6ΔΔ* και *ssn6Δ nhp6ΔΔ* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς σίδηρο. Αυτό περιλαμβάνει, μπροστά από την κωδική περιοχή του γονιδίου *LacZ*, ένα τμήμα του υποκινητή *FRE2* που περιέχει τη θέση-στόχο του *Aft1* και ένα τμήμα του υποκινητή *HIS3*, ο οποίος είναι γνωστό ότι δεν επηρεάζεται από τα *SSN6* και *NHP6A/B*, που περιέχει το κουτί TATA [122].

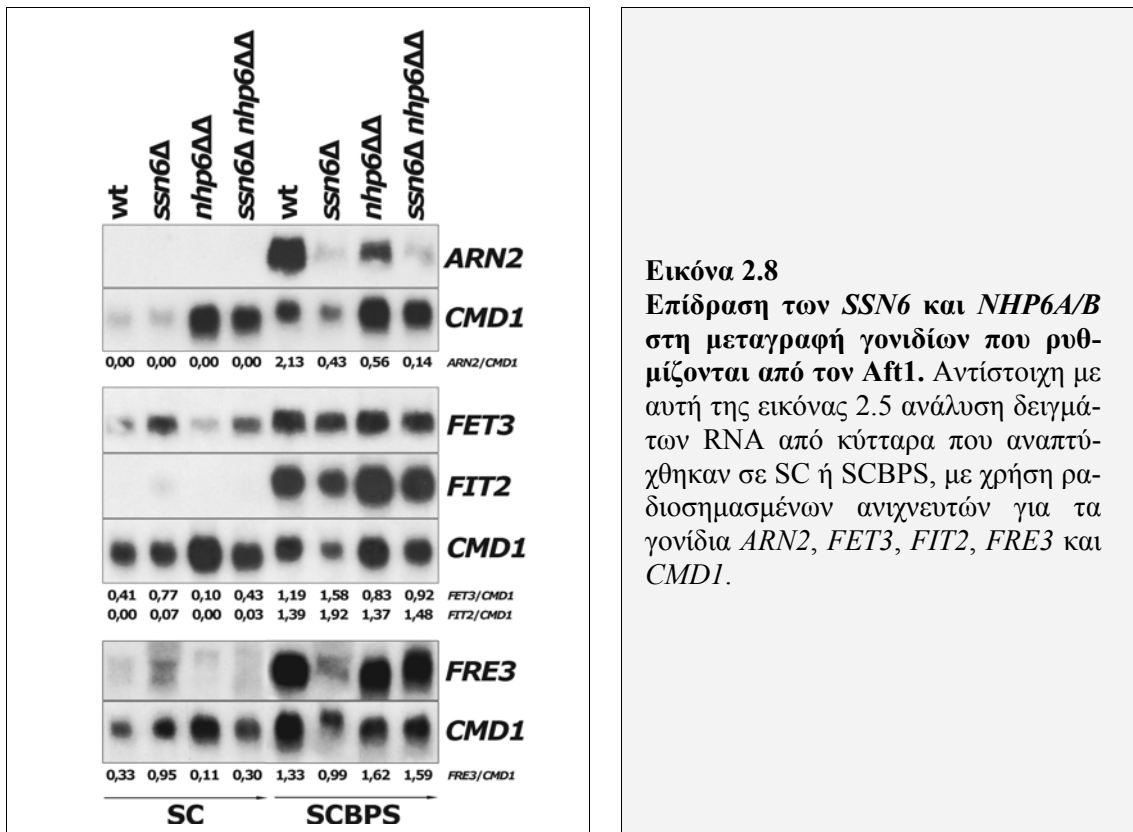
Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.7A, η ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης μειώθηκε δραστικά και κατά παρόμοιο τρόπο στα στελέχη *ssn6Δ* και *nhr6ΔΔ*, συγκριτικά με το αγρίου τύπου, φανερώνοντας μια σημαντική επίδραση των αντίστοιχων γονιδίων στη διαμεσολαβούμενη από τον Aft1 μεταγραφή. Μάλιστα, στο τριπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *ssn6Δ nhr6ΔΔ*, μειώθηκε ακόμα περισσότερο, αποκαλύπτοντας ένα συνεργατικό ρόλο για τα δύο γονίδια στη μεταγραφή. Επιπλέον, η υπερέκφραση του Aft1, αν και αύξησε σημαντικά την ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης στο στέλεχος αγρίου τύπου, δεν την επανέφερε σε φυσιολογικά επίπεδα στα τρία μεταλλαγμένα στελέχη, (εικόνα 2.7A), γεγονός που επιβεβαίωσε πως η παρατηρηθείσα επίδραση στη μεταγραφή στα στελέχη αυτά έχει άμεση σχέση με τον ενεργοποιητή Aft1.

Επιπλέον, ερευνήσαμε την επίδραση των *SSN6* και *NHP6A/B* στην ενεργοποιητική λειτουργία της πρωτεΐνης Aft1. Αυτό έγινε μέσω της τεχνητής πρόσδεσης της υβριδιακής πρωτεΐνης LexA-Aft1 σε ένα άλλο χιμαιρικό γονίδιο αναφοράς, το *LexAop-HIS3-LacZ*, που περιέχει μια θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης LexA μπροστά από το γονίδιο *HIS3-LacZ*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.7B, η ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης μειώθηκε κατά 85% στο στέλεχος *ssn6Δ*, συγκριτικά με το αγρίου τύπου, φανερώνοντας ότι το *SSN6* είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνο για τη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω της πρωτεΐνης LexA-Aft1. Από την άλλη, στο *nhr6ΔΔ* διατηρήθηκε σχεδόν το ήμισυ της ενεργότητας που παρατηρήθηκε στο στέλεχος αγρίου τύπου, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση του *NHP6A/B* στον Aft1 ασκείται εν μέρει στην ενεργοποιητική και κυρίως στη σχετική με τη δέσμευση στο DNA λειτουργία του.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα γονίδια *SSN6* και *NHP6A/B* προάγουν, καθένα με το δικό του ξεχωριστό τρόπο, τη λειτουργία του Aft1 πάνω στον υποκινητή *FRE2*.

2.3.5 Οι συνέπειες της έλλειψης των γονιδίων *SSN6* και *NHP6A/B* δεν είναι ίδιες σε κάθε σιδηροεξαρτώμενο υποκινητή

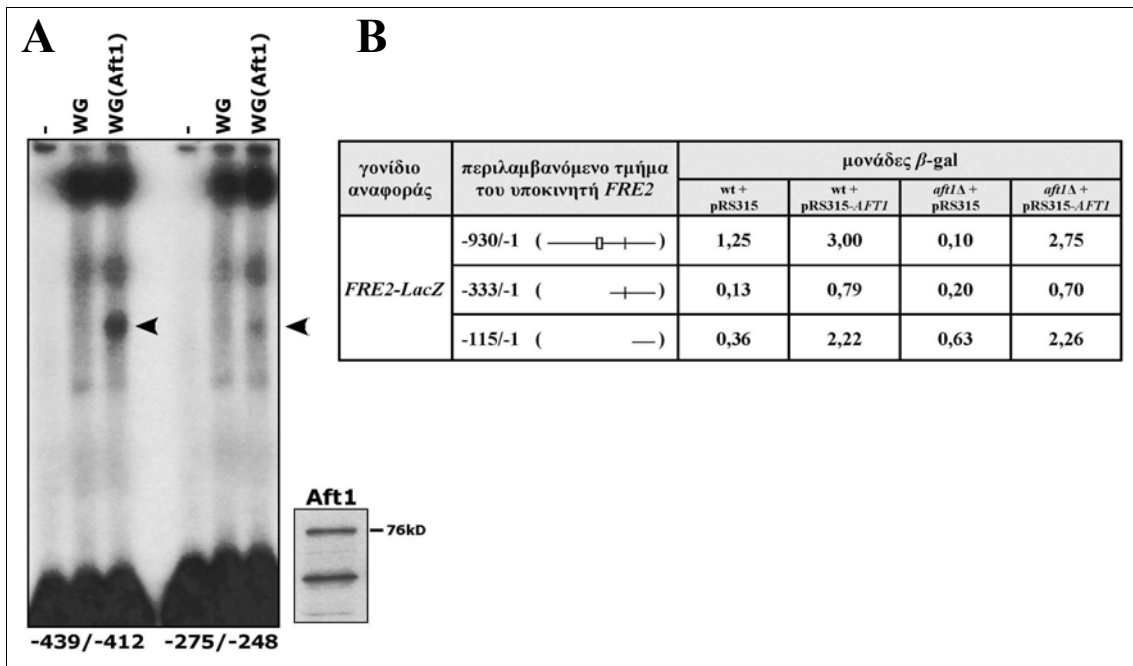
Προκειμένου να εξετάσουμε αν η επίδραση των γονιδίων *SSN6* και *NHP6A/B* είναι κοινή σε όλα τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον παράγοντα Aft1, αναλύσαμε τη μεταγραφή τεσσάρων ακόμα σιδηρορυθμιζόμενων γονιδίων, των *ARN2*, *FRE3*, *FIT2* και *FET3*. Αυτά επιλέχθηκαν με βάση τη σχετική με τη σιδηρορύθμιση βιβλιογραφία [138], ως εξής: το *ARN2* (*TAF1*) ως το μοναδικό γονίδιο, εκτός του *FRE2*, που



Εικόνα 2.8

Επίδραση των *SSN6* και *NHP6A/B* στη μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζονται από τον Aft1. Αντίστοιχη με αυτή της εικόνας 2.5 ανάλυση δειγμάτων RNA από κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε SC ή SCBPS, με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *ARN2*, *FET3*, *FIT2*, *FRE3* και *CMD1*.

επηρεάζεται από τον Aft1 με τρόπο έντονα θετικό και ενδεχομένως αποκλειστικό, το *FRE3* ως το πιο ομόλογο με το *FRE2* και το πιο χαρακτηριστικά ρυθμιζόμενο από τον Aft1 από όλα τα γονίδια *FRE* και τέλος τα *FIT2* και *FET3* ως γονίδια ρυθμιζόμενα κατά κύριο λόγο από τον Aft1 και λιγότερο από τον Aft2. Όπως δείχνει η εικόνα 2.8, μόνο η έκφραση του *ARN2* μειώθηκε δραστικά σε καθένα από τα στελέχη *ssn6Δ* και *nhr6ΔΔ* ενώ ουσιαστικά εξαφανίστηκε στο στέλεχος *ssn6Δ nhr6ΔΔ*, αναπαράγοντας τα αποτελέσματα του αντίστοιχου πειράματος για την έκφραση του *FRE2*. Το *ARN2*, όπως και το *FRE2*, πιθανώς ρυθμίζεται από τον Aft1 μέσω μόνο ενός στοιχείου FeRE (ο υποκινητής *FRE2* περιέχει και ένα δεύτερο λιγότερο λειτουργικό στοιχείο FeRE, εικόνα 2.9). Από την άλλη, οι υποκινητές *FET3* και *FIT2* και πιθανότατα ο *FRE3* ρυθμίζονται τόσο από τον Aft1 όσο και από τον Aft2 και επίσης περιέχουν πολλαπλά στοιχεία FeRE. Όλα αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι συνέπειες της έλλειψης των *SSN6* και *NHP6A/B* δεν είναι κοινές για κάθε σχετιζόμενο με τον Aft1 γονίδιο αλλά εξαρτώνται από το γενικό πλαίσιο (context) του κάθε υποκινητή.

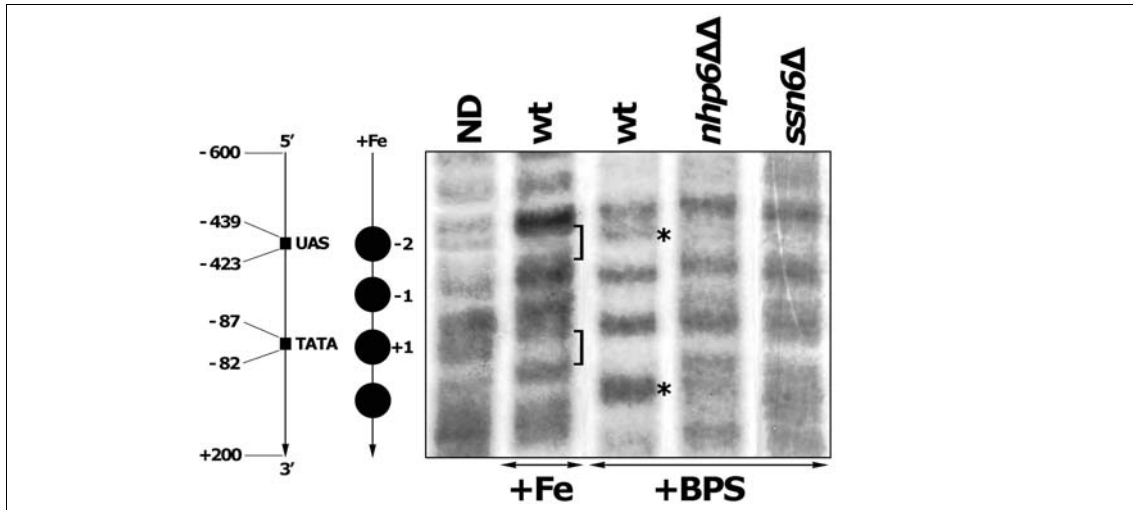


Εικόνα 2.9

Ανάλυση προσδεσιμότητας *in vitro* και λειτουργικότητας *in vivo* του δεύτερου FeRE του υποκινητή *FRE2*. (A) Αυτοραδιογράφημα κινητικά μετατοπισμένων ζωνών DNA που προέκυψαν από τη μίξη των ραδιοσημασμένων τμημάτων του υποκινητή *FRE2* -439/-412 (που περιλαμβάνει το ένα FeRE) ή -275/-248 (που περιλαμβάνει το δεύτερο FeRE) με εκχύλισμα σπερματοκυττάρων σιταριού στο οποίο εκφράστηκε (WG(Aft1)) ή όχι (WG) η πρωτεΐνη Aft1. Οι στήλες (-) περιέχουν μόνο τα αντίστοιχα ραδιοσημασμένα τμήματα DNA. Οι ειδικές μετατοπισμένες ζώνες DNA σημειώνονται με βέλος. Κάτω δεξιά φαίνεται το αυτοραδιογράφημα της πρωτεΐνης Aft1 που συντέθηκε στο εκχύλισμα σπερματοκυττάρων σιταριού παρουσία μεθειονίνης ^{35}S και αναλύθηκε με SDS-PAGE. (B) Ενεργότητα β -γαλακτοσιδάσης του γονιδίου αναφοράς *FRE2-LacZ*, το οποίο περιλαμβάνει τα ενδεικνυόμενα τμήματα του υποκινητή *FRE2*, σε κύτταρα αγρίου τύπου ή *aft1* Δ , αναπτυγμένα σε SCBPS, που εκφράζουν (+pRS315-*AFT1*) ή όχι (+pRS315) πλασμιδιακά το γονίδιο *AFT1*. Τα δύο FeRE σημειώνονται πάνω στον υποκινητή *FRE2* με κουτάκι και κάθετη γραμμή αντίστοιχα.

2.3.6 Τα γονίδια *SSN6* και *NHP6A/B* είναι απαραίτητα για την εξαρτώμενη από τη μεταγραφική ενεργοποίηση χρωματινική αναδιοργάνωση στον υποκινητή *FRE2*

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η μεταγραφική ενεργοποίηση του *FRE2* σχετίζεται με κάποια συγκεκριμένη οργάνωση της χρωματίνης στον υποκινητή του, υποβάλλαμε κύτταρα αγρίου τύπου, αναπτυγμένα σε συνθήκες επάρκειας ή έλλειψης σιδήρου, σε πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση και στη συνέχεια σε ανάλυση σήμανσης άκρου (indirect end-labeling analysis) (εικόνα 2.10, στήλες 2 και 3). Δύο διαφορετικά πρότυπα ζωνών DNA προέκυψαν, ένα για την κατάσταση καταστολής κι

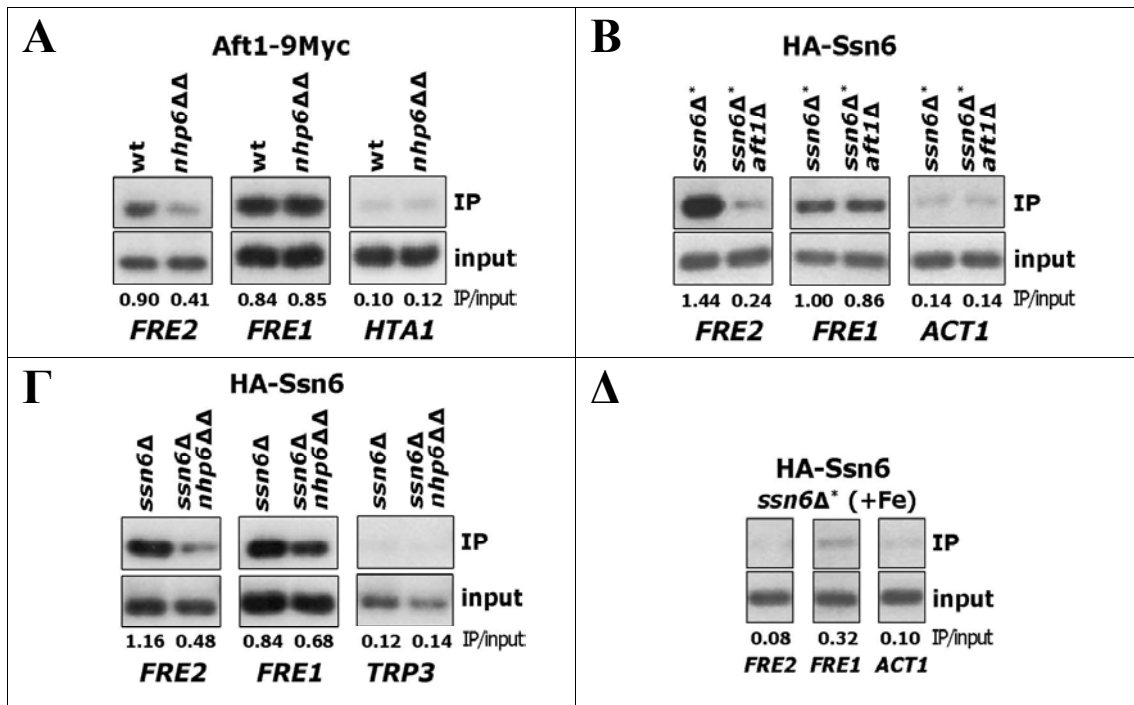


Εικόνα 2.10

Χρωματινική ανάλυση χαμηλής εκκρίσεως του υποκινητή *FRE2*. Κύτταρα αγρίου τύπου αναπτυγμένα σε συνθήκες καταστολής (+Fe, με προσθήκη 200μM FeCl₃ στο SC 30min πριν τη συλλογή τους) και αγρίου τύπου, *nhr6ΔΔ* ή *ssn6Δ* αναπτυγμένα σε επαγωγικές συνθήκες (+BPS) υποβλήθηκαν διαδοχικά σε πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση και ανάλυση σήμανσης άκρου. Αριστερά, απεικονίζονται με κύκλους νουκλεοσωμάτων οι προστατευμένες περιοχές του υπό καταστολή υποκινητή *FRE2*. Ο παράπλευρος χάρτης δείχνει τις σχετικές θέσεις του UAS_{Aff1} και του κουτιού TATA, οι αγκύλες τις αντίστοιχες προστατευμένες περιοχές και οι αστερίσκοι εξαρτώμενες από τις επαγωγικές συνθήκες θέσεις ευαισθησίας στη νουκλεάση του υποκινητή *FRE2*. Η στήλη ND περιέχει καθαρό γενωμικό DNA που έχει υποβληθεί σε πέψη με νουκλεάση.

ένα για την κατάσταση ενεργοποίησης, τα οποία είναι ενδεικτικά της ύπαρξης μιας εξαρτώμενης από τη μεταγραφική ενεργοποίηση χρωματινικής μεταβολής πάνω στον υποκινητή *FRE2*. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν νουκλεοσώματα σε καθορισμένες θέσεις πάνω στον υπό καταστολή υποκινητή. Μάλιστα, μια περιοχή που περιλαμβάνει την αλληλουχία UAS_{Aff1} βρέθηκε προστατευμένη στην κατάσταση καταστολής και υπερευαίσθητη στη νουκλεάση στην κατάσταση ενεργοποίησης, δείχνοντας καθαρά ότι, με την επαγωγή, έγινε αναδιοργάνωση του νουκλεοσώματος που περιέχει την αλληλουχία αυτή (nuc -2, πριν το κουτί TATA).

Για να διαπιστώσουμε αν η αναδιοργάνωση της χρωματίνης του υποκινητή *FRE2* επηρεάζεται από την έλλειψη των γονιδίων NHP6A/B ή SSN6, υποβάλαμε κύτταρα *nhr6ΔΔ* και *ssn6Δ*, που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επαγωγής, σε διαδικασίες ίδιες με τις παραπάνω. Τα πρότυπα ζωνών DNA που προέκυψαν (εικόνα 2.10, στήλες 4 και 5) έμοιαζαν με αυτό των υπό καταστολή κυττάρων αγρίου τύπου (εικόνα 2.10, στήλη 2), γεγονός που έδειξε ότι όταν λείπουν οι παράγοντες Nhr6 ή

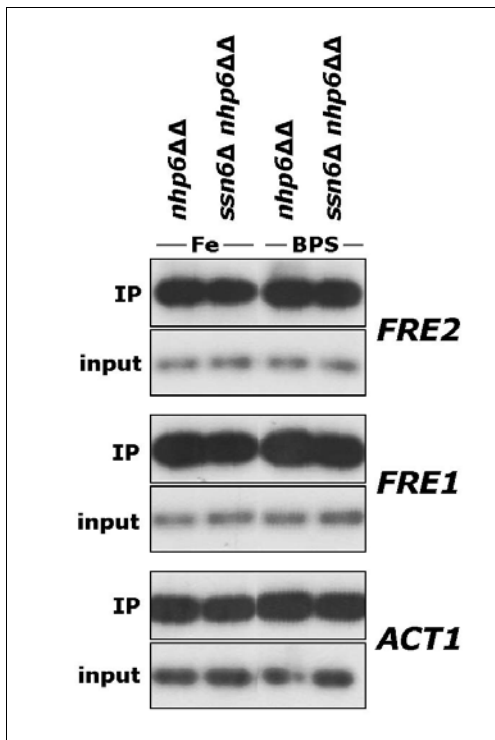


Εικόνα 2.11

Αλληλεπίδραση των Aft1 και Ssn6 με τους υποκινητές *FRE1* και *FRE2*. (A) Κύτταρα αγρίου τύπου και *nhp6ΔΔ*, με χρωμοσωμική ένθεση του γονιδίου *AFT1-9Myc* και αναπτυγμένα σε SCBPS, υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc και στη συνέχεια το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *FRE1*, *FRE2* και *HTA1*. (B) Κύτταρα *ssn6Δ** *ssn6Δ** *aft1Δ*, μετασχηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Ssn6, αναπτύχθηκαν και αναλύθηκαν όπως προηγουμένως με χρήση anti-HA και ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *FRE1* και *FRE2* και την κωδική περιοχή *ACT1*. (Γ) Κύτταρα *ssn6Δ* και *ssn6Δ nhp6ΔΔ* μετασχηματίστηκαν, αναπτύχθηκαν και αναλύθηκαν όπως προηγουμένως με χρήση anti-HA και ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *FRE1*, *FRE2* και *TRP3*. (Δ) Κύτταρα *ssn6Δ**, μετασχηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Ssn6 και αναπτυγμένα σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου (σε SC στο οποίο προστέθηκε FeCl_3 , σε τελική συγκέντρωση 200μM, 30min πριν από τη συλλογή των κυττάρων), αναλύθηκαν όπως προηγουμένως με χρήση anti-HA και ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *FRE1* και *FRE2* και την κωδική περιοχή *ACT1*. Όλες οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν στον PhosphorImager με χρήση του κατάλληλου λογισμικού (ImageQuant). Η ειδική στρατολόγηση του HA-Ssn6 στους υποκινητές *FRE1* και *FRE2* ήταν συγκρίσιμη σε κύτταρα *ssn6Δ* δύο διαφορετικών γενετικών υποβάθρων.

Ssn6 η χρωματινική αναδιοργάνωση εμποδίζεται. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το γεγονός της απώλειας της επαγόμενης μεταγραφής του *FRE2* στα στελέχη *nhp6ΔΔ* και *ssn6Δ*.

Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω, το συμπέρασμα είναι ότι υπάρχει καθορισμένη χρωματινική δομή στον υποκινητή *FRE2*, η οποία αναδιοργανώνεται με τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου και, μάλιστα, κατά τρόπο αυστηρά



Εικόνα 2.12

Αλληλεπίδραση του Nhr6α με τους υποκινητές *FRE1* και *FRE2*. Κύτταρα *nhr6ΔΔ* και *ssn6Δ nhr6ΔΔ*, μετασχηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Nhr6α και αναπτυγμένα σε SCFe (έγινε προσθήκη FeCl_3 , σε τελική συγκέντρωση $200\mu\text{M}$, 30min πριν τη συλλογή των κυττάρων) ή SCBPS, υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-HA και στη συνέχεια το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *FRE1* και *FRE2* και την κωδική περιοχή *ACT1*.

εξαρτώμενο από την παρουσία των παραγόντων Nhr6 και Ssn6.

2.3.7 Η παρουσία του Nhr6 είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση του Aft1 στον υποκινητή *FRE2*

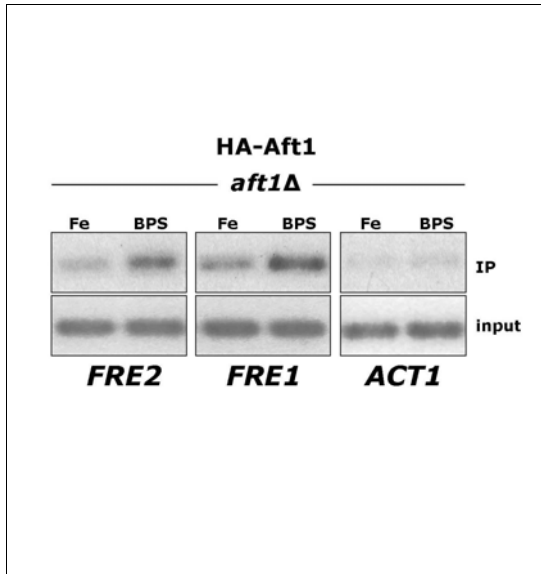
Για την πληρέστερη κατανόηση της διαδικασίας ενεργοποίησης πάνω στον υποκινητή *FRE2*, ελέγξαμε τη στρατολόγηση των παραγόντων Aft1 και Nhr6 σε αυτόν, *in vivo*, υποβάλλοντας κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου σε ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation – ChIP). Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.11A, η στρατολόγηση του ενδογενούς Aft1, σημασμένου καρβοξυτελικά με 9 επίτοπους Myc, βρέθηκε ότι εξαρτάται ποσοτικά από την παρουσία του Nhr6. Αντίθετα, η στρατολόγηση του Aft1-9Myc στον υποκινητή *FRE1*, που ελέγχθηκε παράλληλα, ήταν παρόμοια σε κύτταρα αγρίου τύπου και *nhr6ΔΔ*. Η χρήση σε ανάλογα πειράματα ενός παραγώγου του Aft1 που φέρει αμινοτελικά έναν επίτοπο HA, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα (εικόνα 2.18). Με δεδομένο ότι ο Aft1 προσδένεται τόσο στον υποκινητή *FRE2* όσο και στον *FRE1*, το παραπάνω εύρημα δείχνει ότι ο Nhr6 παρεμβαίνει στην πρόσδεση του Aft1 μόνο στον πρώτο από τους δύο, ενεργώντας με τρόπο εξαρτώμενο από το γενικό τους πλαίσιο (context). Πράγματι, εντοπίσαμε τον Nhr6 (συγκεκριμένα τον HA-Nhr6α) και στους δύο υποκινητές, όπως και σε μια κωδική αλληλουχία του γονιδίου *ACT1*,

σε συνθήκες τόσο ενεργοποίησης όσο και καταστολής (εικόνα 2.12). Η ανίχνευση του Nhr6 σε πολλές χρωμοσωμικές θέσεις ήταν, κατά κάποιον τρόπο, αναμενόμενη δεδομένου ότι πρόκειται για έναν παράγοντα που προσδένεται στο DNA μη ειδικά και του οποίου η αλληλεπίδραση με τη χρωματίνη είναι πιο σταθερή και μόνιμη από αυτή άλλων ρυθμιστικών παραγόντων που προσδένονται στο DNA παροδικά [14]. Από τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνεται ότι ο Nhr6 διευκολύνει την πρόσδεση του Aft1 ειδικά πάνω στον υποκινητή *FRE2*.

2.3.8 Ο Ssn6 στρατολογείται στον υποκινητή *FRE2* με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία και του Aft1 και του Nhr6

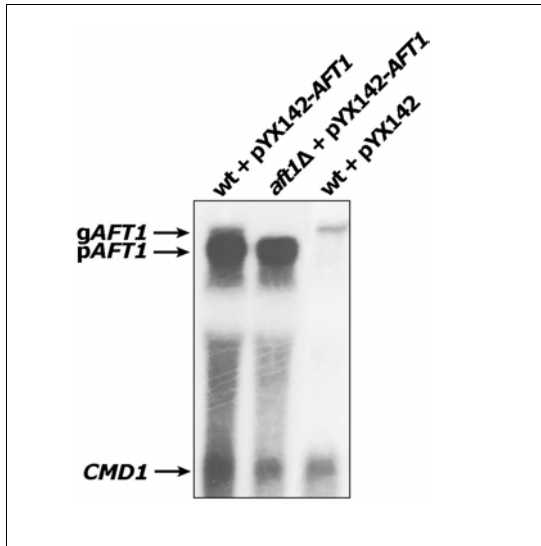
Προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα αν ο παράγοντας Ssn6 αλληλεπιδρά με τον υποκινητή *FRE2*, χρησιμοποιήσαμε ένα παράγωγο του Ssn6, που φέρει αμινοτελικά έναν επίτοπο HA, το οποίο εκφράσαμε σε κύτταρα *ssn6Δ* (και όχι αγρίου τύπου) για την αποφυγή ανταγωνισμού από την ενδογενή πρωτεΐνη. Όπως έδειξε η ανάλυση ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (ChIP) στην οποία υποβλήθηκαν κύτταρα αναπτυγμένα σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (εικόνα 2.11B), ο HA-Ssn6 στρατολογήθηκε στον υποκινητή *FRE2*, όπως και στον *FRE1* που εξετάστηκε παράλληλα, ενώ εντοπίστηκε μονάχα οριακά πάνω σε μια κωδική αλληλουχία του γονιδίου *ACT1* (αλληλουχία ελέγχου). Η απαλοιφή του γονιδίου *AFT1* σχεδόν εξαφάνισε τη στρατολόγηση στον υποκινητή *FRE2*, ενώ αντίθετα δεν την επηρέασε σημαντικά στον *FRE1*. Η απαλοιφή του *NHP6A/B* είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της στρατολόγησης στον *FRE2* ενώ δεν επηρέασε σημαντικά αυτή στον *FRE1* (εικόνα 2.11Γ). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι ο Ssn6 αλληλεπιδρά με τον υποκινητή *FRE2* και ότι η στρατολόγησή του εξαρτάται ποσοτικά από την παρουσία των πρωτεϊνών Aft1 και Nhr6. Το συμπέρασμα αυτό ισχυροποιείται από το ότι, σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου, στις οποίες ο Aft1 ως επί το πλείστον βρίσκεται εκτός του πυρήνα, δεν παρατηρήθηκε στρατολόγηση του HA-Ssn6 στον υποκινητή *FRE2* (εικόνα 2.11Δ), γεγονός σύμφωνο με την εξάρτησή της από την παρουσία του Aft1³. Από την άλλη, ο Ssn6 είναι παρών και στον υποκινητή *FRE1*,

³ Σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου, διαπιστώσαμε στρατολόγηση του HA-Aft1 στον υποκινητή *FRE2* (όπως και στον *FRE1*) (εικόνα 2.13). Αυτό από πρώτη άποψη δημιουργεί αντίφαση δεδομένης της ανυπαρξίας στρατολόγησης του HA-Ssn6 στον υποκινητή αυτό στις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο, εξηγείται ίσως από το γεγονός ότι ο HA-Aft1



Εικόνα 2.13

Αλληλεπίδραση του HA-Aft1 με τους υποκινητές *FRE1* και *FRE2*. Κύτταρα *aft1Δ*, μετασχηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Aft1 και αναπτυγμένα σε SCFe (έγινε προσθήκη FeCl_3 , σε τελική συγκέντρωση 200 μM , 30min πριν τη συλλογή των κυττάρων) ή SCBPS, υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-HA και στη συνέχεια το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *FRE1* και *FRE2* και την κωδική περιοχή *ACT1*.

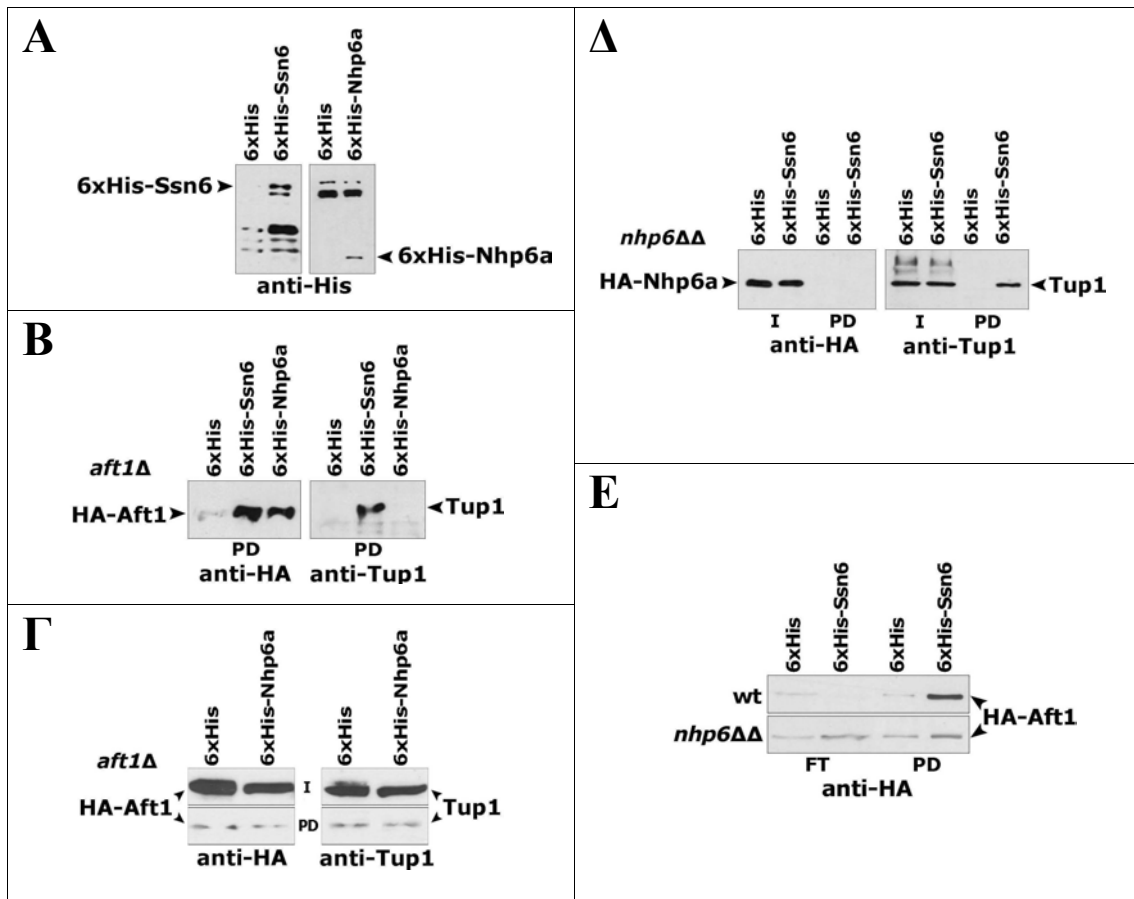


Εικόνα 2.14

Έκφραση του HA-Aft1 από την πλασμιδιακή κατασκευή *pYX142-AFT1*. Ανάλυση Northern ολικού RNA στελεχών αγρίου τύπου και *aft1Δ* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο έκφρασης του *AFT1* *pYX142-AFT1* και στελέχους αγρίου τύπου μετασχηματισμένου με τον φορέα *pYX142*, που αναπτύχθηκαν σε SCBPS, με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *AFT1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). Ανιχνεύτηκαν το γενωμικό (*gAFT1*) και το πλασμιδιακό (*pAFT1*) γονίδιο *AFT1*.

ανεξάρτητα όμως από τους Aft1 και Nhr6. Σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου, η στρατολόγηση του Ssn6 σε αυτόν βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε αντιστοιχία με τη χαμηλή έκφραση του γονιδίου στις συνθήκες αυτές (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 1.10B).

είναι υπερεκφρασμένος μέσα στο κύτταρο, συγκριτικά με τον ενδογενή Aft1 (εικόνα 2.14), περιορίζοντας τη σιδηρορύθμιση σε ένα στέλεχος *aft1Δ* και σχεδόν καταργώντας την σε ένα αγρίου τύπου (εικόνα 2.2Γ). Πάντως, δε μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο, παρά την παρουσία του σιδήρου, ένα μικρό ποσοστό του ενδογενούς Aft1 να παραμένει στον πυρήνα απενεργοποιημένο και ανίκανο να στρατολογήσει τον Ssn6.



Εικόνα 2.15

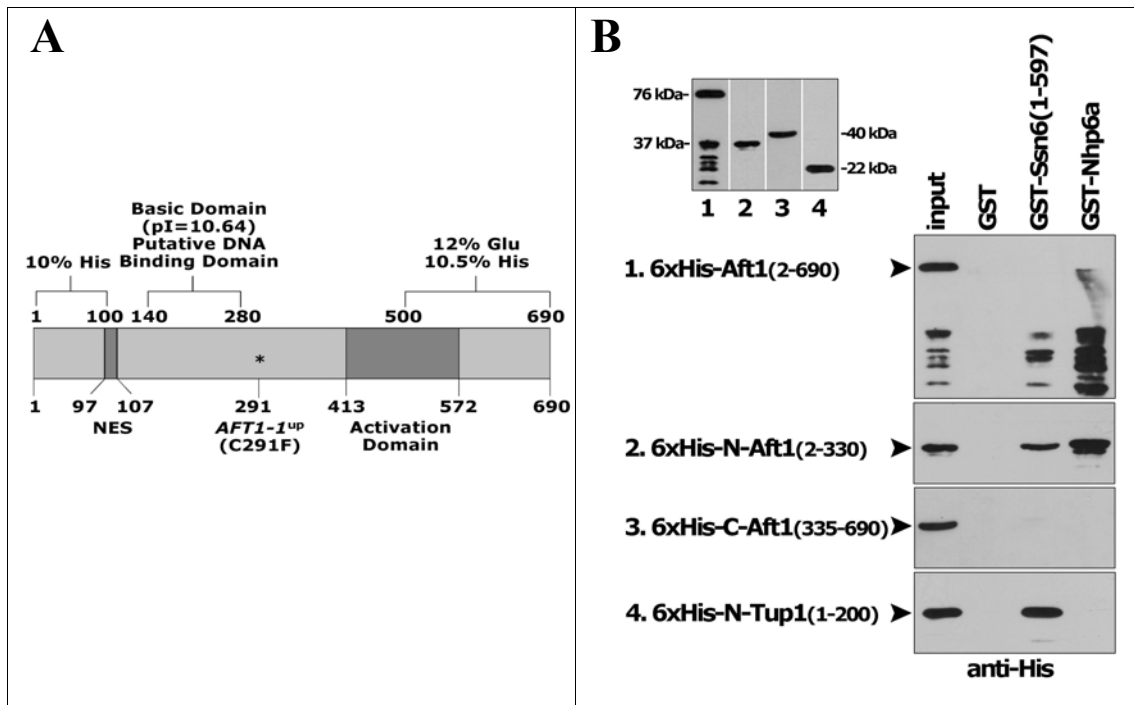
Αλληλεπίδραση των Ssn6 και Nhp6a με τον Aft1 *in vivo*. (A) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα *aft1Δ* που αναπτύχθηκαν σε SCBPS και στα οποία συνεκφράστηκαν οι 6xHis ή 6xHis-Ssn6 ή 6xHis-Nhp6a και HA-Aft1, επώαστηκαν με σφαιρίδια Ni-NTA. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια (PD) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και οι 6xHis-Ssn6 και 6xHis-Nhp6a ανοσοανιχνεύτηκαν με το αντίσωμα anti-His ενώ (B) η HA-Aft1 και η ενδογενής Tup1 με τα anti-HA (αριστερά) και anti-Tup1 (δεξιά), αντίστοιχα. (C) Εκχυλίσματα από κύτταρα *aft1Δ*, που αναπτύχθηκαν σε SC και στα οποία συνεκφράστηκαν οι 6xHis ή 6xHis-Nhp6a και HA-Aft1, επώαστηκαν με σφαιρίδια Ni-NTA. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια (PD) καθώς και εκείνες που αρχικά επώαστηκαν με αυτά (I) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και οι HA-Aft1, Tup1 ανοσοανιχνεύτηκαν με anti-HA (αριστερά) και anti-Tup1 (δεξιά), αντίστοιχα. (D) Εκχυλίσματα από κύτταρα *nhp6ΔΔ* που αναπτύχθηκαν σε SCBPS και στα οποία συνεκφράστηκαν οι 6xHis ή 6xHis-Ssn6 και HA-Nhp6a, επώαστηκαν με σφαιρίδια Ni-NTA. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια (PD) καθώς και εκείνες που αρχικά επώαστηκαν με αυτά (I) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και οι HA-Nhp6a, Tup1 ανοσοανιχνεύτηκαν με anti-HA (αριστερά) και anti-Tup1 (δεξιά), αντίστοιχα. (E) Εκχυλίσματα από κύτταρα αγρίου τύπου και *nhp6ΔΔ* που αναπτύχθηκαν σε SCBPS και στα οποία συνεκφράστηκαν 6xHis ή 6xHis-Ssn6 και HA-Aft1, επώαστηκαν με σφαιρίδια Ni-NTA. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν (PD) καθώς και εκείνες που δε δεσμεύτηκαν (FT) στα σφαιρίδια αναλύθηκαν με SDS-PAGE και η HA-Aft1 ανοσοανιχνεύτηκε με anti-HA.

2.3.9 Οι Ssn6 και Nhr6 αλληλεπιδρούν με τον Aft1 άλλα όχι μεταξύ τους *in vivo*

Μια προκαταρκτική διερεύνηση της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ των Aft1 και Ssn6 που έγινε *in vivo*, με το σύστημα των δύο υβριδίων, έδωσε αρχικά θετική ένδειξη. Παρόμοια διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ των Aft1 και Nhr6 δεν κατέστη δυνατό να πραγματοποιηθεί καθώς τα υπερεκφρασμένα υβριδιακά παράγωγα του Nhr6a που χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία φέρουν ετερόλογη περιοχή ενεργοποίησης (activation domain) ή περιοχή δέσμησης στο DNA (DNA-binding domain), αποδείχθηκαν τοξικά για τα κύτταρα (βλ. κεφάλαιο 1, πίνακας 1.2).

Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήσαμε πειράματα συγκατακρήμνισης *in vivo* σε κύτταρα *aft1Δ* στα οποία συνεκφράστηκαν ο Aft1, σημασμένος αμινοτελικά με έναν επίτοπο HA, μαζί με τους Ssn6 ή Nhr6a, σημασμένους αμινοτελικά με 6xHis, με σκοπό την επιβεβαίωση της αλληλεξάρτησης των τριών παραγόντων πάνω στον υποκινητή *FRE2*. Αυτά τα πειράματα έγιναν σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου έτσι ώστε να διασφαλιστεί η συνύπαρξη του Aft1 με τους Ssn6 και Nhr6 μέσα στον πυρήνα του κυττάρου. Οι 6xHis-Ssn6 και 6xHis-Nhr6a, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.15A, προσδέθηκαν αποτελεσματικά στα σφαιρίδια Ni-NTA. Ο HA-Aft1 συγκατακρημνίστηκε τόσο με τον 6xHis-Ssn6 όσο και με τον 6xHis-Nhr6a (εικόνα 2.15B, αριστερά), φανερώνοντας την ύπαρξη αλληλεπίδρασης με καθένα από τους δύο παράγοντες. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε αντίστοιχο πείραμα που έγινε σε συνθήκες επάρκειας σιδήρου δε διαπιστώσαμε αλληλεπίδραση μεταξύ των HA-Aft1 και 6xHis-Nhr6a (εικόνα 2.15Γ, αριστερά). Ο ενδογενής παράγοντας Tup1, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας του πειράματος, επίσης συγκατακρημνίστηκε με τον 6xHis-Ssn6 όπως αναμενόταν (εικόνα 2.15B, δεξιά), αλλά όχι με τον 6xHis-Nhr6a, σε συνθήκες είτε έλλειψης (εικόνα 2.15B, δεξιά) είτε επάρκειας (εικόνα 2.15Γ, δεξιά) σιδήρου.

Εφόσον ο Aft1 βρέθηκε να αλληλεπιδρά *in vivo* με καθέναν από τους παράγοντες Ssn6 και Nhr6a, στη συνέχεια εξετάσαμε αν οι τελευταίοι αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους. Το σχετικό πείραμα συγκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *nhr6ΔΔ* στα οποία συνεκφράστηκαν οι HA-Nhr6a και 6xHis-Ssn6. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.15Δ, δεν υπήρξε συγκατακρήμνιση του πρώτου με το δεύτερο, ενώ υπήρξε του Tup1 με το δεύτερο, γεγονός που δείχνει ότι ο Nhr6a δεν αλληλεπίδρασε με τον Ssn6 στις συγκεκριμένες συνθήκες. Το παραπάνω πείραμα έγινε σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου καθώς οι Ssn6 και Nhr6a ενδεχομένως χρειάζονται την ύπαρξη του Aft1 ώστε να αλληλεπιδράσουν. Ωστόσο,

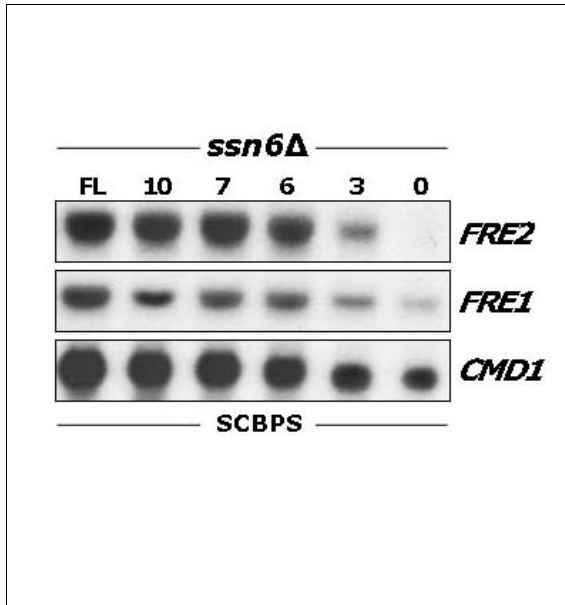


Εικόνα 2.16

Αλληλεπίδραση του Aft1 με τους Ssn6 και Nhrp6a *in vitro*. (A) Διαγραμματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του Aft1. (B) Δεσμευμένα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης πεπτιδία GST ή GST-Ssn6(1-597) ή GST-Nhrp6a επώαστηκαν με καθαρισμένα, συγχωνευμένα με 6xHis, παράγωγα του Aft1 ή με 6xHis-N-Tup1 (θετικός μάρτυρας) και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με χρήση του αντισώματος anti-His. Η στήλη input περιέχει 20% του συνολικού ποσού του κάθε συγχωνευμένου με 6xHis πεπτιδίου. Οι πολλαπλές ζώνες στο B-1 αντιστοιχούν σε προϊόντα αποικοδόμησης του Aft1. Στο ένθεμα πάνω αριστερά, φαίνεται το ηλεκτροφόρημα των συγχωνευμένων με 6xHis πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία συμμετείχε ο ενδογενής Aft1 του οποίου η ποσότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη των δύο άλλων υπερεκφρασμένων παραγόντων. Το αντίστροφο πείραμα συγκατακρήμνισης, με χρήση των HA-Ssn6 και 6xHis-Nhrp6a, που έγινε στις ίδιες συνθήκες, δεν έδωσε κάποια πληροφορία λόγω της υψηλής κατακράτησης του HA-Ssn6 στα σφαιρίδια Ni-NTA.

Τα παραπάνω δεδομένα αποκάλυψαν ότι ο Aft1 αλληλεπιδρά με τον Ssn6 και τον Nhrp6a *in vivo*, γεγονός σύμφωνο με την αλληλεξάρτησή του με καθένα από αυτούς τους παράγοντες πάνω στον υποκινητή *FRE2*. Επίσης έδειξαν ότι οι Ssn6 και Nhrp6a ενδεχομένως δεν αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους *in vivo* αν και συνδέονται μέσω του Aft1. Είναι πολύ πιθανό το σύμπλοκο των τριών παραγόντων να σχηματίζεται πάνω στο DNA. Κάτι τέτοιο φάνηκε από πειράματα συγκατακρήμνισης *in vivo* του HA-Aft1 με τον 6xHis-Ssn6 που έγιναν σε κύτταρα αγρίου τύπου και



Εικόνα 2.17

Ικανότητα διαφόρων ελλειμματικών πεπτιδίων Ssn6 να ενεργοποιούν τη μεταγραφή των *FRE1* και *FRE2 in vivo*. Ανάλυση Northern ολικού RNA του στελέχους *ssn6Δ* στο οποίο ο παράγοντας Ssn6 εκφράζεται ολόκληρος (FL) ή ελλειμματικός, περιλαμβάνοντας 10, 7, 6 ή 3 αμινοτελικές επαναλήψεις TPR μόνο, ή καθόλου (0), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE1*, *FRE2* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). Οι διάφορες πλασμδιακές κατασκευές περιγράφονται στα Y&M.

nhr6ΔΔ. Αυτά έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των Aft1 και Ssn6 εξαφανίζεται όταν απουσιάζει ο Nhr6 (εικόνα 2.15E).

2.3.10 Οι Ssn6 και Nhr6 αλληλεπιδρούν άμεσα με το αμινοτελικό μισό του Aft1 *in vitro*

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στη διερεύνηση του κατά πόσο οι αλληλεπιδράσεις *in vivo* που περιγράφηκαν παραπάνω, αντανακλούν φυσική επαφή μεταξύ των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε αν οι καθαρές πρωτεΐνες GST-N-Ssn6 και GST-Nhr6, που παράχθηκαν σε βακτήρια, μπορούν να αλληλεπιδράσουν *in vitro* χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία άλλων πρωτεϊνών της ζύμης, με τις επίσης καθαρές βακτηριακής προέλευσης 6xHis-Aft1, 6xHis-N-Aft1 και 6xHis-C-Aft1 (εικόνα 2.16A). Ολόκληρη η πρωτεΐνη Ssn6 δεν κατέστη δυνατό να παραχθεί σε βακτήρια. Ωστόσο, το αμινοτελικό παράγωγο της που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα αυτό (περιέχει και τις 10 διαδοχικές επαναλήψεις TPR του μορίου), αποδείχτηκε ικανό, όταν εκφράστηκε σε ένα στέλεχος *ssn6Δ*, να επαναφέρει την επαγόμενη μεταγραφή του *FRE2* σε επίπεδα αγρίου τύπου (εικόνα 2.17).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.16B, οι πρωτεΐνες GST-N-Ssn6 και GST-Nhr6, αλλά όχι η GST, αλληλεπιδράσαν με τις 6xHis-Aft1 (B-1) και 6xHis-N-Aft1 (B-2), αλλά όχι με την 6xHis-C-Aft1 (B-3), υποδηλώνοντας την ύπαρξη άμεσης επαφής μεταξύ των παραγόντων Aft1 (συγκεκριμένα του αμινοτελικού μισού του)

και Ssn6 (της αμινοτελικής περιοχής TPR) ή Nhr6a. Το γεγονός ότι ο Nhr6a αλληλεπιδρά άμεσα με την περιοχή δέσμευσης στο DNA του Aft1 ενισχύει ακόμα περισσότερο τον ισχυρισμό μας περί υποβοηθούμενης από τον πρώτο πρόσδεσης του δευτέρου στον υποκινητή *FRE2*. Τέλος, η πρωτεΐνη GST-N-Ssn6 αλληλεπίδρασε με την 6xHis-N-Tup1, όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά όχι με τη GST-Nhr6a (B-4), σε συμφωνία με ό,τι παρατηρήθηκε *in vivo*.

Τα δεδομένα μας, στο σύνολό τους, δείχνουν ότι σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (επαγωγικές):

(α) Η πρόσδεση του Aft1 στον υποκινητή *FRE2* εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την άμεση επαφή του με τον Nhr6a, χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα σημαντικού ρόλου στη διαδικασία της ενδεχόμενης κάμψης (bending) του DNA που επάγεται από τον Nhr6.

(β) Ο Ssn6 στρατολογείται στον υποκινητή μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής του με τον Aft1.

(γ) Καθένας από τους Nhr6 και Ssn6 είναι απαραίτητος για τη δημιουργία μιας ειδικής χρωματινικής οργάνωσης στον ενεργοποιημένο υποκινητή.

Με βάση αυτές τις ενδείξεις, προτείνουμε ένα μοντέλο συντονισμένης δράσης των Nhr6 και Ssn6 πάνω στον υποκινητή *FRE2*, απαραίτητης για την επαγόμενη από τον Aft1 μεταγραφή (βλ. συζήτηση).

2.3.11 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια συσσωρεύονται όλο και περισσότερα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τους ειδικούς ρόλους των γενικών παραγόντων Nhr6 και Ssn6 πάνω σε διάφορους ρυθμιζόμενους υποκινητές στη ζύμη. Αποκαλύπτονται έτσι νέες λειτουργίες και μοριακές αλληλεπιδράσεις στις οποίες οι παράγοντες αυτοί συμμετέχουν. Το γονίδιο *FRE2* επάγεται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου από το σιδηρορυθμιζόμενο και προσδεδεμένο στο DNA μεταγραφικό ενεργοποιητή Aft1. Η κυτταρική συγκέντρωση σιδήρου ρυθμίζει τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό του Aft1, εξασφαλίζοντας την παρουσία του στον πυρήνα όταν χρειάζεται. Ανακαλύψαμε ότι οι γενικοί μεταγραφικοί συρρυθμιστές Nhr6 και Ssn6 είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία του εκεί, δρώντας μαζί του πάνω στην περιοχή UAS_{Aft1} του απλά ρυθμιζόμενου υποκινητή *FRE2*.

2.3.11.1 Ο Nhr6 δρα στην περιοχή UAS του υποκινητή *FRE2* και ρυθμίζει, κατά κύριο λόγο, την πρόσδεση του Aft1 σε αυτή

Ο παράγοντας Nhr6 ρυθμίζει τη μεταγραφή ενός αριθμού εξαρτώμενων από την RNA πολυμεράση II γονιδίων. Γενετικά πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί χμιαρικοί υποκινητές, έδειξαν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις δρά στους εγγύς υποκινητές (core promoters) των γονιδίων αυτών [122]. Παράλληλα, με βιοχημικά πειράματα που έγιναν *in vitro*, βρέθηκε ότι διευκολύνει στο σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου με τους παράγοντες TBP και TFIIA, πάνω στο κουτί TATA, το οποίο έχει αυξημένη συγγένεια προς τον TFIIIB [122]. Πρόσφατη γενετική ανάλυση έδειξε, ακόμα, ότι προάγει την πρόσδεση του TBP στον υποκινητή *HO*, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην έναρξη της μεταγραφής [177].

Εμείς δείξαμε ότι το *FRE2* αποτελεί άλλο ένα εξαρτώμενο από την RNA πολυμεράση II γονίδιο, του οποίου η μεταγραφική ενεργοποίηση ρυθμίζεται από τον Nhr6. Ο παράγοντας αυτός χρειάζεται κυρίως στην περιοχή UAS του υποκινητή *FRE2*, παρά στην περιοχή TATA, αφού η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ*, στο οποίο η περιοχή TATA του υποκινητή *FRE2* αντικαταστάθηκε από την αντίστοιχη περιοχή του ανεξάρτητου από τον Nhr6 υποκινητή *HIS3*, μειώθηκε κατά 80% στο στέλεχος *nhr6ΔΔ*. Ο Nhr6 φαίνεται λοιπόν να παρεμβαίνει στη λειτουργία του προσδεδεμένου στο DNA μεταγραφικού ενεργοποιητή του *FRE2*, Aft1. Είναι χαρακτηριστικό ότι η διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα LexA-Aft1 ενεργοποίηση του γονιδίου *LexAop-HIS3-LacZ* μειώθηκε μόνο κατά 50% στο ίδιο στέλεχος, πράγμα που σημαίνει ότι, στο πλαίσιο του υποκινητή *FRE2*, ο Nhr6 κατά κύριο λόγο επηρεάζει τη λειτουργία δέσμευσης στο DNA του Aft1. Αυτό επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι η στρατολόγηση του Aft1 σε αυτόν εξαρτάται ποσοτικά από την παρουσία του Nhr6. Επιπλέον, δείχτηκε ότι ο Nhr6 συνδέεται με τον Aft1 *in vivo* και ότι αλληλεπιδρά άμεσα με το αμινοτελικό μισό του, το οποίο περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης στο DNA, *in vitro*. Το συμπέρασμα από τα προηγούμενα είναι ότι ο Nhr6 διευκολύνει την πρόσδεση του Aft1 στην θέση-στόχο του πάνω στον υποκινητή *FRE2*, *in vivo*. Σύμφωνα με αυτό είναι το γεγονός ότι σε συνθήκες επαγωγής, όπου ο Aft1 εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, παρατηρήθηκε εξαρτώμενη από την παρουσία του Nhr6 νουκλεοσωμική αναδιοργάνωση πάνω στην περιοχή *UAS_{Aft1}* του υποκινητή *FRE2*, η οποία προφανώς είχε ως σκοπό τη βελτίωση της προσβασιμότητας της περιοχής αυτής. Από την άλλη, εκτός από τη λειτουργία δέσμευσης στο DNA, ο Nhr6 ενδεχομένως επηρεάζει και

την ενεργοποιητική λειτουργία του Aft1, καθώς παρατηρήθηκε μικρή μείωση της διαμεσολαβούμενης από τον LexA-Aft1 ενεργοποίησης στο στέλεχος *nhr6ΔΔ* (εικόνα 2.7B). Οι συνέπειες της παρουσίας του Nhr6 θα μπορούσαν να οφείλονται σε διάφορες ενεργότητες διαμόρφωσης της χρωματινικής δομής (chromatin structure-modulating activities) που είναι γνωστό ότι συσχετίζονται γενετικά ή/και φυσικά με τον παράγοντα αυτόν [178, 177, 11, 33, 151]. Άλλωστε, η σημαντικά μειωμένη μεταγραφή του *FRE2* που παρατηρήθηκε στο στέλεχος *gcn5Δ* (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 1.11), φανερώνει πιθανό ρόλο του συμπλόκου SAGA πάνω στον υποκινητή του γονιδίου.

Παλαιότερη εργασία στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα πεπτίδια Nhr6 που ήταν ελαττωματικά ως προς τις σχετικές με τις RNA πολυμεράσες II ή III λειτουργίες τους αλλά όχι ως προς τη λειτουργία πρόσδεσης και κάμψης του DNA, έδειξε πως ο Nhr6 είναι ένας παράγοντας που λειτουργεί όχι μόνο αρχιτεκτονικά αλλά και αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες σε διάφορους υποκινητές [79]. Για παράδειγμα, στον υποκινητή *GALI*, ο Nhr6 είναι απαραίτητος για τη λειτουργία της περιοχής UAS [122] ενώ έχειδειχθεί ότι η περιοχή ενεργοποίησης του Gal4, μεταγραφικού ενεργοποιητή του γονιδίου *GALI*, αλληλεπιδρά άμεσα με τον Nhr6b [89]. Το πώς αυτή η αλληλεπίδραση βοηθάει στη λειτουργία του Gal4 παραμένει άγνωστο. Από την άλλη, ο ρόλος των παραγόντων HMGB1 και HMGB2 των θηλαστικών στην ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής *in vivo*, έχει συσχετιστεί με την ιδιότητά τους να αυξάνουν την ικανότητα δέσμευσης στο DNA πολλών ειδικών μεταγραφικών παραγόντων, αλληλεπιδρώντας άμεσα με αυτούς, που έχειδειχθεί *in vitro* [152, 1]. Σε αυτή τη βάση, έχει προταθεί ένας ρόλος σαπερόνης για τις μη ειδικές (nonsequence specific) HMGB πρωτεΐνες στη διευκόλυνση και σταθεροποίηση της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, που επιτρέπει τη στρατολόγηση πρόσθετων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα αποτελέσματά μας παρέχουν βιοχημικές ενδείξεις *in vivo* ότι η HMGB πρωτεΐνη της ζύμης Nhr6 έχει παρόμοιο τρόπο δράσης, διευκολύνοντας την πρόσδεση του μεταγραφικού ενεργοποιητή Aft1 πάνω στον υποκινητή *FRE2*.

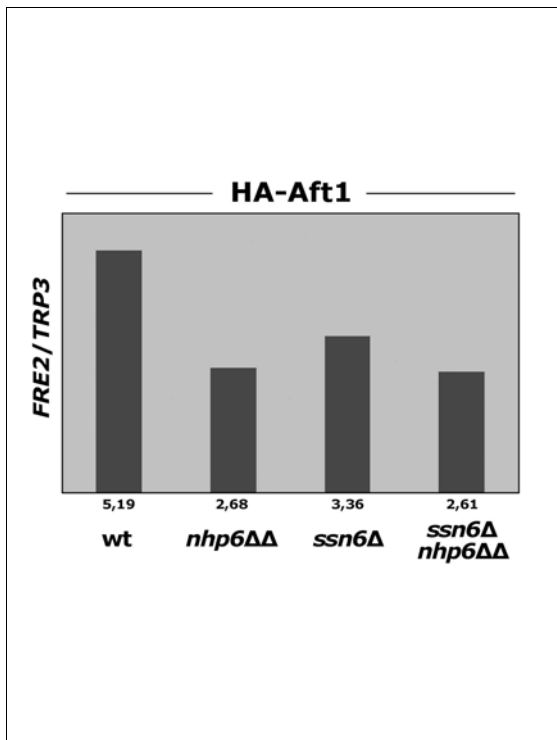
2.3.11.2 Ο Ssn6 στρατολογείται στον υποκινητή *FRE2* σε συνθήκες επαγωγής και προάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση

Αποκαλύψαμε έναν κρίσιμο συνενεργοποιητικό ρόλο του παράγοντα Ssn6 στη διαμεσολαβούμενη από τον Aft1 επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου *FRE2*. Από

τον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ* και *LexAop-HIS3-LacZ* στο στέλεχος *ssn6Δ*, διαπιστώθηκε ότι ο Ssn6 δρά στην περιοχή UAS του υποκινητή *FRE2*, επηρεάζοντας δραματικά την ενεργοποιητική λειτουργία του Aft1. Επιπλέον, είναι απαραίτητος, όπως και ο Nhr6, για την αναδιοργάνωση της χρωματίνης που γίνεται σε συνθήκες επαγωγής στον υποκινητή αυτόν. Εφόσον, όπως δείξαμε, ο Ssn6 είναι παρών στον υποκινητή *FRE2*, πιθανώς διευκολύνει τη στρατολόγηση ενεργοτήτων νουκλεοσωμικής τροποποίησης ή/και χρωματινικής αναδιοργάνωσης.

Το σύμπλοκο συγκαταστολής Ssn6-Tup1 έχειδειχθεί ότι επιδρά θετικά στη μεταγραφή του γονιδίου *CIT2* το οποίο κωδικοποιεί μια συνθάση του κιτρικού οξέος και επάγεται μεταγραφικά από τον προσδεδεμένο στο DNA ενεργοποιητή Rtg3 σε συνθήκες μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Προτάθηκε μάλιστα ότι ειδικά μεταβολικά σήματα ενδεχομένως το μετατρέπουν από μεταγραφικό συγκαταστολέα σε συνενεργοποιητή πάνω σε ορισμένους υποκινητές [19]. Το *GALI* καθώς και μια ομάδα από γονίδια που επάγονται από το οσμωτικό στρες και ρυθμίζονται από τον παράγοντα Sco1, έχουν επίσης προσδιοριστεί ως στόχοι θετικής δράσης του Ssn6-Tup1 [120, 132]. Το σύμπλοκο παραμένει συνεχώς προσδεδεμένο στους υποκινητές τους τόσο σε συνθήκες καταστολής όσο και επαγωγής. Ενώ όμως στις πρώτες έχει καθαρά κατασταλτική δράση, στις δεύτερες διευκολύνει παράλληλα τη στρατολόγηση των συνενεργοποιητικών συμπλόκων SAGA ή/και SWI/SNF που αναιρούν την επαγόμενη από το ίδιο καταστολή.

Στην παρούσα εργασία δείχθηκε ότι ο Ssn6 στρατολογείται μόνο σε συνθήκες επαγωγής στον υποκινητή *FRE2* και ότι η στρατολόγηση αυτή εξαρτάται ποσοτικά από την παρουσία του Aft1. Επιπλέον, η μεταγραφική ανάλυση του *FRE2* στο στέλεχος *ssn6Δ* δε φανέρωσε την ύπαρξη κατασταλτικής επίδρασης του Ssn6 σε συνθήκες επάρκειας σιδήρου. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 προσδέεται στον υποκινητή *FRE2* σε συνθήκες επαγωγής και εκεί έχει έναν καθαρά συνενεργοποιητικό ρόλο. Θεωρούμε ότι η επίδραση του Tup1 είναι παρόμοια με αυτή του Ssn6 καθώς παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση της επαγόμενης μεταγραφής του *FRE2* σε κύτταρα *tup1Δ* (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 1.10A). Η ενεργοποιητική λειτουργία του Ssn6-Tup1 βρίσκεται σε συμφωνία με τη μείωση στο ρυθμό αναγωγικής πρόσληψης σιδήρου στα στελέχη *ssn6Δ* ή *tup1Δ*, που έχει αναφερθεί από τους Lesuisse et al [90]. Ωστόσο, η αναγωγική πρόσληψη σιδήρου στη ζύμη δεν



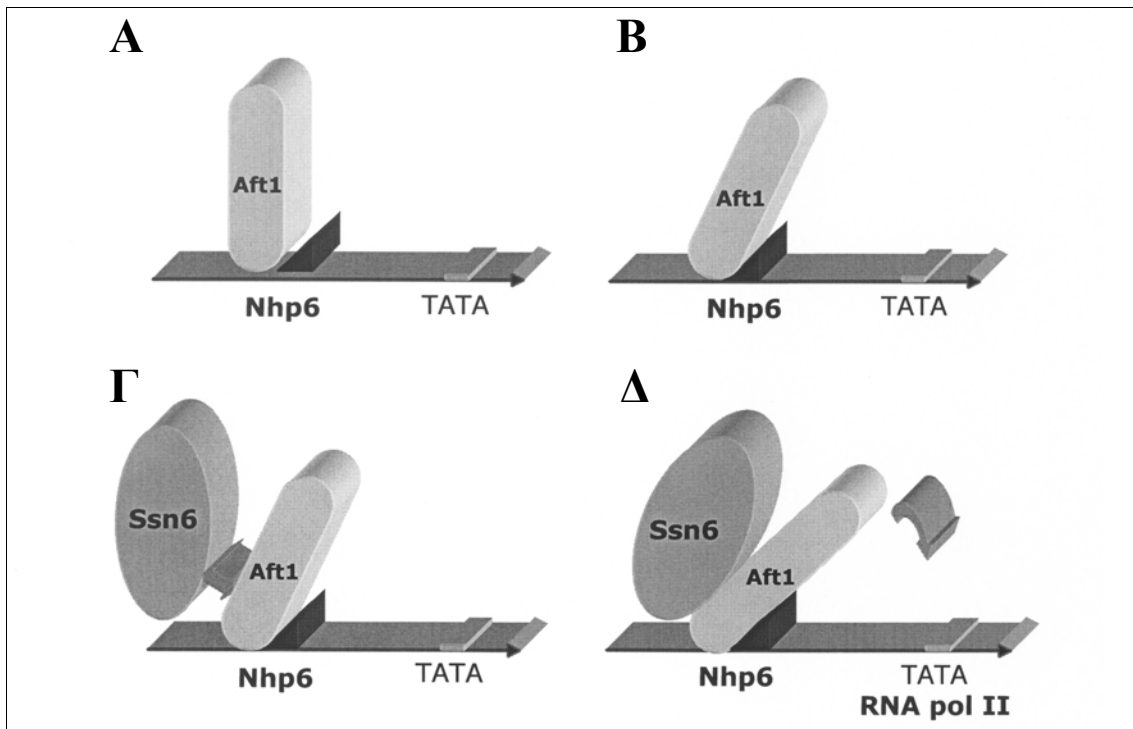
Εικόνα 2.18

Αλληλεπίδραση του HA-Aft1 με τον υποκινητή *FRE2* απουσία *Nhr6a* ή/και *Ssn6*. Κύτταρα αγρίου τύπου, *nhr6ΔΔ*, *ssn6Δ* και *ssn6Δ nhr6ΔΔ*, μετασχηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Aft1 και αναπτυγμένα σε SCBPS, υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-HA. Στη συνέχεια το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *FRE2* και *TRP3* και οι ζώνες DNA ποσοτικοποιήθηκαν στον PhosphorImager με χρήση του κατάλληλου λογισμικού (ImageQuant). Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input του *FRE2* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους του *TRP3*.

οφείλεται σε ένα γονίδιο αλλά στη συνολική δράση εξαρτώμενων από τον Aft1 γονιδίων αναγωγασών, οξειδασών και περμεασών.

2.3.11.3 Ο σχηματισμός ενός τριμερούς συμπλόκου Aft1-Nhr6-DNA πάνω στον υποκινητή *FRE2* επιτρέπει την κρίσιμη για την ενεργοποίηση στρατολόγηση του *Ssn6*

Δείξαμε ότι η στρατολόγηση του παράγοντα *Ssn6* στο πλαίσιο του υποκινητή *FRE2* προϋποθέτει την παρουσία του παράγοντα *Nhr6*. Με ανάλογο τρόπο, ο *Nhr6* θα μπορούσε να εμπλέκεται στην πρόσδεση του συμπλόκου *Ssn6-Tup1* σε διάφορους γενετικούς τόπους. Η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των *Nhr6b* και *Tup1* [89] υποστηρίζει την υπόθεση αυτή. Ωστόσο, εμείς δεν ανιχνεύσαμε αλληλεπίδραση μεταξύ των *Nhr6a* και *Tup1* τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ούτε και μεταξύ των *Ssn6* και *Nhr6* *in vivo*. Συνεπώς, ο *Ssn6* φαίνεται να στρατολογείται στον υποκινητή *FRE2* μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής του με ένα τριμερές σύμπλοκο Aft1-Nhr6-DNA. Πράγματι, η στρατολόγησή του εξαρτάται από την παρουσία τόσο του Aft1 όσο και του *Nhr6* ενώ η συγκατακρήμισή του *in vivo* με τον Aft1 εξαρτάται από την παρουσία του *Nhr6*. Με τη στρατολόγησή του, ο *Ssn6* ενδεχομένως σταθεροποιεί περισσότερο την πρόσδεση του Aft1 στο DNA καθώς βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά άμε-



Εικόνα 2.19

Μοντέλο που απεικονίζει πώς οι παράγοντες Nhp6 και Ssn6, διακριτά και συνεργατικά, προάγουν την επαγόμενη από τον Aft1 μεταγραφή στον υποκινητή *FRE2*. (Α) Κατά την επαγωγή, σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, ο Aft1 αλληλεπιδρά με τον χρωματινικό παράγοντα Nhp6 και το DNA. (Β) Τοπικές δομικές τροποποιήσεις έχουν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της πρόσδεσης του Aft1 στην περιοχή UAS. (Γ) Ευνοείται, έτσι, η αλληλεπίδραση του Ssn6 με τον Aft1. (Δ) Η παρουσία του Ssn6 στον υποκινητή σταθεροποιεί περισσότερο την πρόσδεση του Aft1 στο DNA και εξασφαλίζει τη φυσιολογική πρόσβαση στα στοιχεία του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού με αποτέλεσμα την πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση.

σα *in vitro* με το αμινοτελικό μισό του Aft1 (που περιέχει την περιοχή δέσμευσης στο DNA) και όχι με το καρβοξυτελικό (που περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης). Σε συμφωνία με αυτό, η στρατολόγηση του Aft1 στον υποκινητή *FRE2* βρέθηκε ελαφρά μειωμένη στο στέλεχος *ssn6Δ* (εικόνα 2.18).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, προτείνουμε ένα απλό μοντέλο που περιγράφει την ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν στο σχηματισμό ενός τετραμερούς συμπλέγματος Ssn6-Aft1-Nhp6-DNA πάνω στον υποκινητή *FRE2*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παρατηρούμενη ολική μεταγραφική ενεργότητα σε αυτόν (εικόνα 2.19). Όταν απουσιάζει είτε ο Ssn6 είτε ο Nhp6, η ενεργότητα είναι σοβαρά μειωμένη ενώ όταν απουσιάζουν και οι δύο σχεδόν εξαφανίζεται (εικόνα

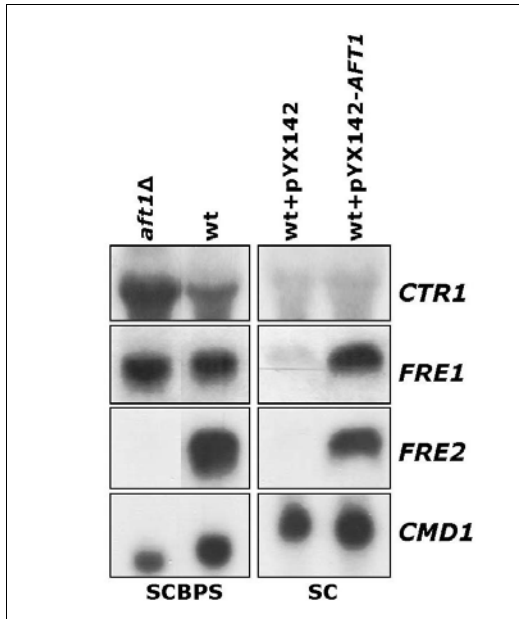
2.6A), αποκαλύπτοντας την ύπαρξη λειτουργικής συνεργατικότητας μεταξύ των Ssn6 και Nhr6 πάνω στον υποκινητή *FRE2*.

Από την άλλη, ο υποκινητής *FRE1* παρέχει ένα “περιβάλλον” όπου οι παράγοντες Ssn6 και Nhr6 δρουν ανεξάρτητα. Αν και τόσο ο ένας όσο και ο άλλος επηρεάζουν την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου, καθένας τους, όπως και ο Aft1, στρατολογείται ανεξάρτητα στον υποκινητή του. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η μεταγραφή του εξαρτάται και από άλλους προσδεδεμένους στο DNA ενεργοποιητές εκτός του Aft1. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεταγραφική ανάλυση και άλλων σιδηρορυθμιζόμενων γονιδίων, που παρουσιάστηκε παραπάνω, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που καθορίζονται από το γενικό πλαίσιο ενός υποκινητή είναι αυτές που με τη σειρά τους καθορίζουν που, πότε και πώς οι γενικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές θα ασκήσουν τη λειτουργία τους.

2.4 Ο Aft1 εμπλέκεται στην εξαρτώμενη από το χαλκορυθμιζόμενο ενεργοποιητή Mac1 μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου *CTR1*

2.4.1 Η μεταγραφή του *CTR1* αυξάνεται όταν απουσιάζει ο Aft1

Το γονίδιο *CTR1*, που κωδικοποιεί το βασικό μεταφορέα χαλκού της πλασματικής μεμβράνης του σακχαρομύκητα, φαίνεται να έχει απόλυτη μεταγραφική εξάρτηση από το χαλκορυθμιζόμενο, προσδεδεμένο στο DNA, ενεργοποιητή Mac1, όπως διαπιστώθηκε από την ανυπαρξία μεταγραφής του ελλείψει του παράγοντα αυτού (εικόνα 2.2B, στήλη 9). Από την άλλη, τα επιπέδα της επαγόμενης μεταγραφής του βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος *aft1Δ*, σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου (εικόνα 2.20 στήλες 1-2, εικόνα 2.2B στήλες 1-2). Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει πως η παρουσία ενός “σιδηροπαράγοντα”, του Aft1, περιορίζει την επαγωγή της μεταγραφής ενός “χαλκογονιδίου”, του *CTR1*. Με δεδομένο ότι δεν υπάρχει αλληλουχία FeRE στον υποκινητή *CTR1*, η πρόσδεση του Aft1 σε αυτόν δε φαίνεται πιθανή. Εξάλλου, αυτό διαφαίνεται έμμεσα και από το γεγονός ότι η υπερέκφραση του παράγοντα αυτού, σε κύτταρα αγρίου τύπου που αναπτύχθηκαν σε μη επαγωγικές συνθήκες, αν και επηρέασε θεαματικά τη μεταγραφή των *FRE1* και *FRE2* (κάτι λίγο-πολύ αναμενόμενο δεδομένης της πρόσδεσής του στους δύο υποκινητές), δεν είχε καμία επίδραση σε αυτή του *CTR1* (εικόνα 2.20, στήλες 3-4). Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, προχωρήσαμε στη διερεύνηση του ενδεχομένου η επίδραση του Aft1 στο *CTR1* να ασκείται μέσω του μοναδικού



Εικόνα 2.20

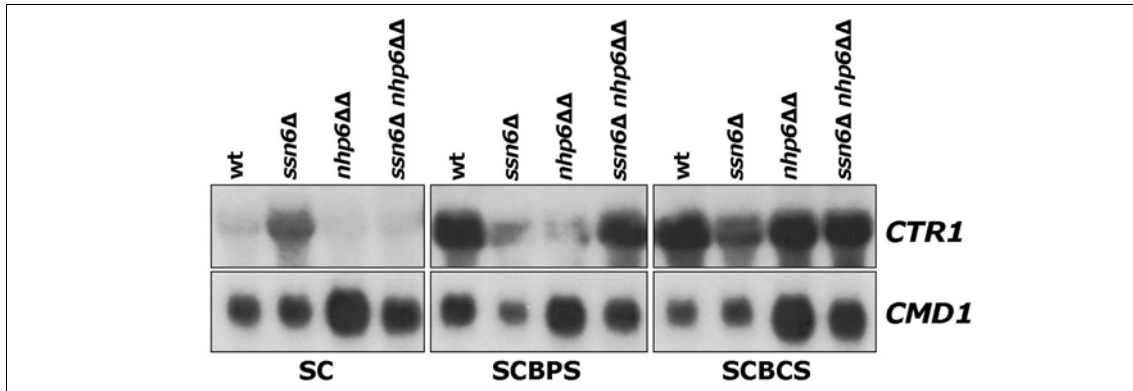
Επίδραση του *AFT1* στη μεταγραφή του *CTR1*. Ανάλυση Northern ολικού RNA από στελέχη αγρίου τύπου και *aft1Δ* αναπτυγμένα σε SCBPS και από στέλεχος αγρίου τύπου μετασηματισμένου με pYX142-*AFT1* (πλασμίδιο έκφρασης του *AFT1*) ή pYX142 και αναπτυγμένου σε SC, με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *CTR1*, *FRE1*, *FRE2*, και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης).

παράγοντα που είναι γνωστό ότι προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου, του *Mac1*.

Επίσης, εφόσον το *CTR1* προστέθηκε στην ομάδα των γονιδίων που επηρεάζονται από τον *Aft1*, ελέγξαμε τη μεταγραφή του στα στελέχη *ssn6Δ*, *nhr6ΔΔ* και *ssn6Δ nhr6ΔΔ*, σε σχέση με την αντίστοιχη αγρίου τύπου, όπως κάναμε νωρίτερα και για τα *FRE2* και *FRE1*. Το μεταγραφικό του προφίλ ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοιο με αυτό του *FRE1*, με χαρακτηριστική πάντως διαφορά την σαφή αποκαταστολή της βασικής μεταγραφής του στο στέλεχος *ssn6Δ* (εικόνα 2.21).

2.4.2 Ο *Aft1* στρατολογείται στον υποκινητή *CTR1* με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία του *Mac1*

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν ο παράγοντας *Aft1* αλληλεπιδρά με τον υποκινητή *CTR1*, ελέγξαμε τη στρατολόγηση του HA-*Aft1* σε αυτόν με ανάλυση ChIP που έγινε σε κύτταρα *aft1Δ* που αναπτύχθηκαν σε επαγωγικές ή μη επαγωγικές συνθήκες. Ο HA-*Aft1* ήταν παρών στον υποκινητή στις επαγωγικές συνθήκες ενώ μόλις ανιχνεύτηκε στις μη επαγωγικές (εικόνα 2.22A). Ωστόσο, σε κύτταρα *aft1Δ mac1Δ*, στις αντίστοιχες συνθήκες, η στρατολόγηση στον υποκινητή *CTR1* εξαφανίστηκε, ενώ αντίθετα αυτή στον υποκινητή *FRE1*, ο οποίος εξετάστηκε παράλληλα, αυξήθηκε (εικόνα 2.22B). Διαπιστώθηκε, ακόμα, ότι η απουσία του *Nhr6* δεν επηρέασε τη στρατολόγηση του *Aft1-9Myc* στον υποκινητή *CTR1*, όπως στον *FRE1* και αντίθετα με ό,τι συνέβη στον *FRE2* (εικόνα 2.22Γ). Συμπεραίνουμε,



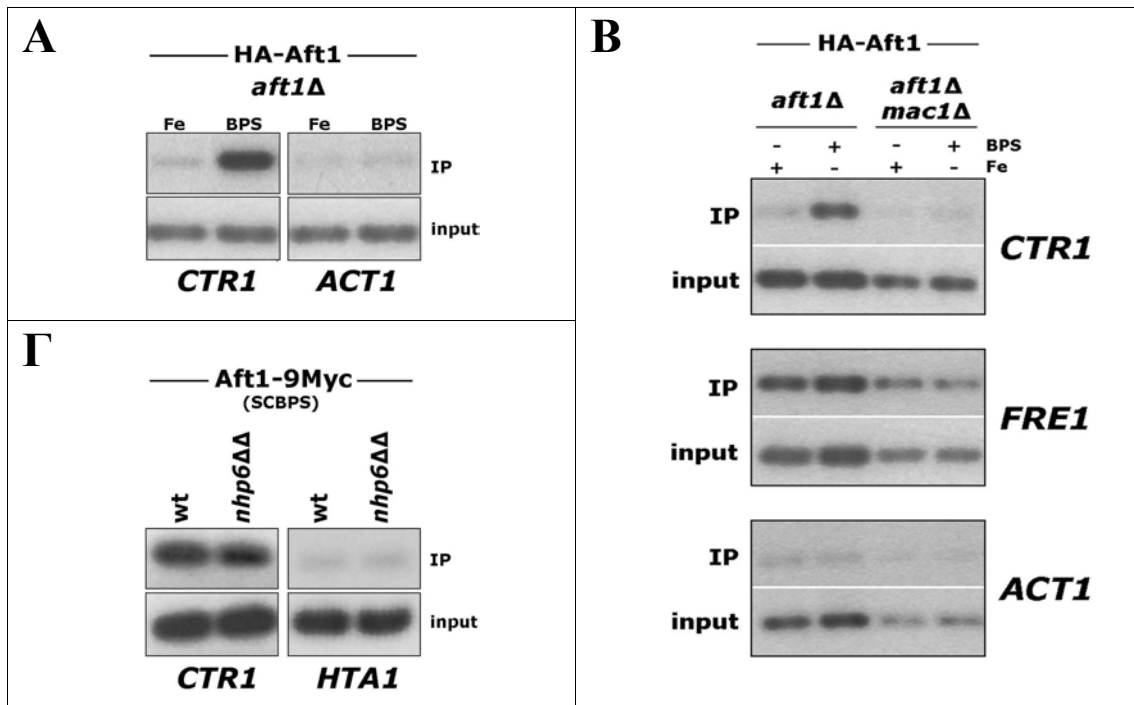
Εικόνα 2.21

Επίδραση των *SSN6* και *NHP6A/B* στη μεταγραφή του *CTR1*. Αντίστοιχη με αυτή της εικόνας 2.5 ανάλυση δειγμάτων RNA, με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *CTR1* και *CMD1*.

λοιπόν, ότι ο Aft1 αλληλεπιδρά με τον υποκινητή *CTR1* με τρόπο απόλυτα εξαρτώμενο από την παρουσία του Mac1 ενώ δεν επηρεάζεται καθόλου από τον Nhr6.

2.4.3 Ο Ssn6 στρατολογείται στον υποκινητή *CTR1* ανεξάρτητα από την παρουσία των Aft1 και Nhr6

Δεδομένης της χαρακτηριστικής επίδρασης του παράγοντα Ssn6 στην έκφραση του *CTR1*, εξετάσαμε αν αυτός στρατολογείται στον υποκινητή του γονιδίου καθώς και το ενδεχόμενο να εξαρτάται η (πιθανή) στρατολόγησή του από τον Aft1. Όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση ChIP που έγινε σε κύτταρα *ssn6Δ* που αναπτύχθηκαν σε επαγωγικές συνθήκες, ο HA-Ssn6 στρατολογήθηκε στον υποκινητή *CTR1*, όπως ακριβώς είχε συμβεί και στους υποκινητές *FRE2* και *FRE1*. Η απαλοιφή του γονιδίου *AFT1* δεν επηρέασε σημαντικά τη στρατολόγησή αυτή, όπως στον *FRE1* και αντίθετα με ό,τι συνέβη στον *FRE2* (εικόνα 2.23A). Το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα είχε και η απαλοιφή του *NHP6A/B*. Μάλιστα η τελευταία προκάλεσε ακόμα και αύξηση της στρατολόγησής σε κάποιους υποκινητές-θετικούς μάρτυρες (όπως οι *SUC2* και *HSP26*), στους οποίους είναι γνωστό ότι προσδένεται ο παράγοντας αυτός (εικόνα 2.23B). Σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου, διαπιστώθηκε οριακή στρατολόγησή του Ssn6 στον υποκινητή *CTR1* (αντίστοιχη με αυτή στον *FRE1*) (εικόνα 2.23Γ). Με βάση αυτή την παρατήρηση, θα μπορούσαμε ίσως να αποδώσουμε την παρατηρηθείσα στις ίδιες συνθήκες ανυπαρξία μεταγραφής του



Εικόνα 2.22

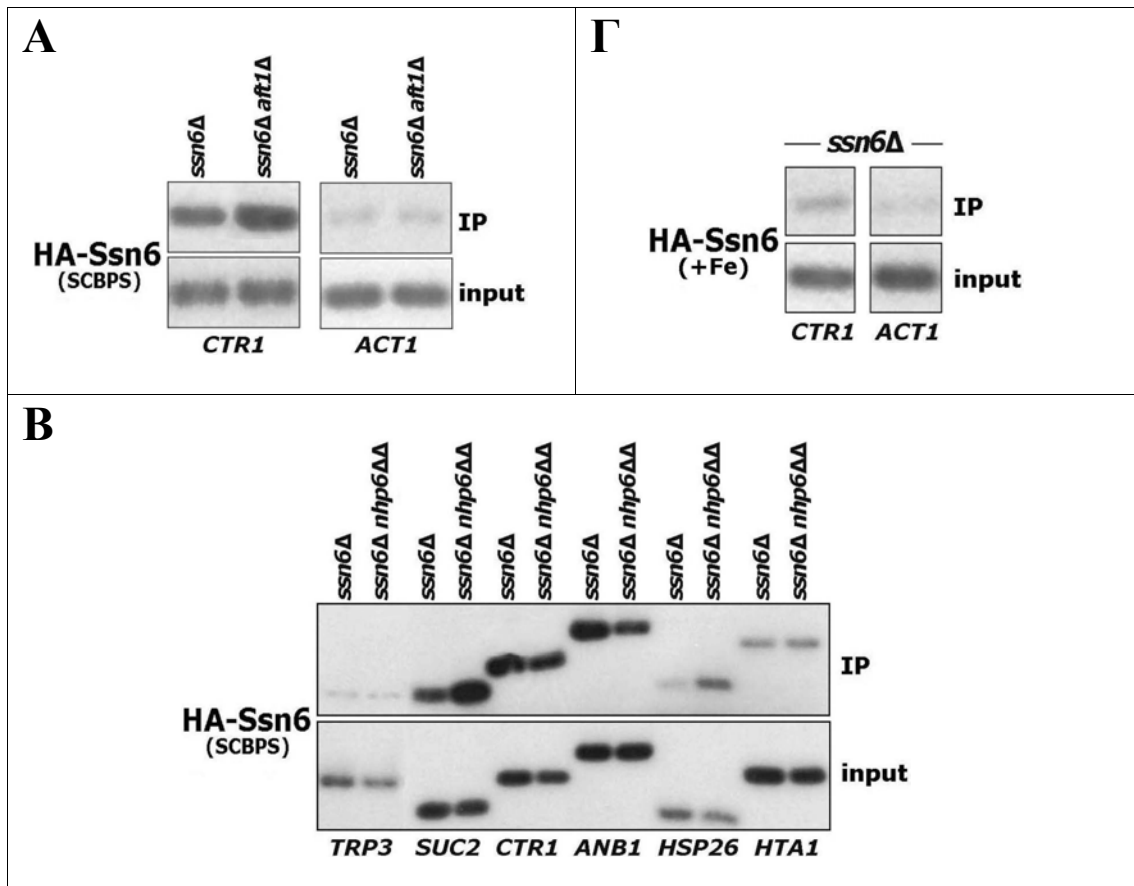
Αλληλεπίδραση του Aft1 με τον υποκινητή *CTR1*. (Α) Κύτταρα *aft1Δ* μετασηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Aft1 και αναπτυγμένα σε SCFe (έγινε προσθήκη FeCl_3 , σε τελική συγκέντρωση 200 μM , 30min πριν τη συλλογή των κυττάρων) ή SCBPS, υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-HA και στη συνέχεια το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή *CTR1* και την κωδική περιοχή *ACT1*. (Β) Κύτταρα *aft1Δ* και *aft1Δ mac1Δ* μετασηματίστηκαν, αναπτύχθηκαν και αναλύθηκαν όπως προηγουμένως με χρήση anti-HA και ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *CTR1* και *FRE1* και την κωδική περιοχή *ACT1*. (Γ) Κύτταρα αγρίου τύπου και *nhr6ΔΔ*, με χρωμοσωμική ένθεση του γονιδίου *AFT1-9Myc*, αναπτύχθηκαν σε SCBPS και αναλύθηκαν όπως προηγουμένως με χρήση anti-Myc και ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *CTR1* και *HTA1*.

CTR1 (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 1.10B) στην κατασταλτική επίδραση που έχει ο Ssn6 στη βασική μεταγραφή του γονιδίου.

2.4.4 Συζήτηση

Βρήκαμε ότι ο παράγοντας Aft1 συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου *CTR1* μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποκινητή του. Δύο στοιχεία συνηγορούν στον παραπάνω ισχυρισμό:

(α) Σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου και χαλκού, στις οποίες τόσο ο Aft1 όσο και ο (μοναδικός ενεργοποιητής του *CTR1*) Mac1 είναι ενεργοί, η απουσία του πρώτου είχε ως αποτέλεσμα παραπάνω μεταγραφική ενεργοποίηση του *CTR1*.



Εικόνα 2.23

Αλληλεπίδραση του Ssn6 με τον υποκινητή *CTR1*. (Α) Κύτταρα *ssn6Δ*^{*} και *ssn6Δ*^{*} *aft1Δ*, μετασηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Ssn6 και αναπτυγμένα σε SCBPS, υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-HA και στη συνέχεια το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή *CTR1* και την κωδική περιοχή *ACT1*. (Β) Κύτταρα *ssn6Δ* και *ssn6Δ nhr6ΔΔ* μετασηματίστηκαν, αναπτύχθηκαν και αναλύθηκαν όπως προηγουμένως με χρήση anti-HA και ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *ANB1*, *CTR1*, *HSP26*, *HTA1*, *SUC2* και *TRP3*. (Γ) Κύτταρα *ssn6Δ*^{*}, μετασηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης του HA-Ssn6 και αναπτυγμένα σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου (σε SC στο οποίο προστέθηκε FeCl₃, σε τελική συγκέντρωση 200μM, 30min πριν από τη συλλογή τους), αναλύθηκαν όπως προηγουμένως με χρήση anti-HA και ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή *CTR1* και την κωδική περιοχή *ACT1*.

(β) Στις ίδιες συνθήκες, ο Aft1 (συγκεκριμένα, τόσο ο υπερεκφρασμένος HA-Aft1 όσο και ο ενδογενής Aft1-9Myc) εντοπίστηκε πάνω στον υποκινητή του γονιδίου και μάλιστα με τρόπο απόλυτα εξαρτώμενο από την παρουσία του Mac1.

Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι και το αποτέλεσμα μιας προκαταρκτικής ανάλυσης σε σύστημα δύο υβριδίων, που έδειξε πιθανή αλληλεπίδραση του Aft1 με τον Mac1 (βλ. κεφάλαιο 1, πίνακας 1.2). Συνεπώς, με βάση όλα αυτά τα δεδομένα,

αποκαλύφθηκε ένας νέος ρόλος του Aft1, κατασταλτικός, ο οποίος ασκείται πάνω στον υποκινητή *CTRI* μέσω της έμμεσης στρατολόγησης και όχι της άμεσης πρόσδεσης του παράγοντα. Είναι γνωστή η ύπαρξη αλληλεξάρτησης μεταξύ του μεταβολισμού του σιδήρου και αυτού του χαλκού στη ζύμη, η οποία συμβάλλει στην κυτταρική ομοιοστασία των δύο μετάλλων. Μέρος αυτού του μηχανισμού ίσως αποτελεί και η άμεση συνεργασία μεταξύ των δύο βασικών μεταλλοεξαρτώμενων μεταγραφικών ρυθμιστών, του σιδηροεξαρτώμενου Aft1 και του χαλκοεξαρτώμενου Mac1, με σκοπό, στην περίπτωση του *CTRI* (και στις συγκεκριμένες συνθήκες), τον περιορισμό της ανεξέλεγκτης έκφρασης του βασικού γονιδίου που ευθύνεται για την είσοδο του χαλκού στο κύτταρο. Εξάλλου, δύο άλλα γονίδια του μεταβολισμού του χαλκού, το *ATX1* που κωδικοποιεί μια χαλκοσαπερόνη και το *CCC2* που κωδικοποιεί ένα ενδομεμβρανικό κανάλι μεταφοράς του μετάλλου, είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται από το σίδηρο μέσω του Aft1 (χωρίς, ωστόσο, να ρυθμίζονται παράλληλα και από το χαλκό όπως συμβαίνει με το *CTRI*) [138, 172].

Παράλληλα, διαπιστώσαμε τη μη ύπαρξη αλληλεξάρτησης μεταξύ των Ssn6, Nhr6 και Aft1 πάνω στον υποκινητή *CTRI*, όπως συνέβη και στον *FRE1*. Η διαπίστωση στηρίχτηκε στο γεγονός ότι ο Ssn6 στρατολογήθηκε σε αυτόν ανεξάρτητα από τους Aft1 και Nhr6, όπως και στο ότι η στρατολόγηση του Aft1 ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία του Nhr6. Σε συμφωνία λοιπόν με προηγούμενα ευρήματά μας, η δράση των παραγόντων αυτών και στον υποκινητή *CTRI* φαίνεται να καθορίζεται από ειδικές για το συγκεκριμένο “περιβάλλον” πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η εμπλοκή του Mac1 σε αυτές, ως του μοναδικού προσδεδεμένου στο συγκεκριμένο υποκινητή παράγοντα, αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω διερεύνησης.

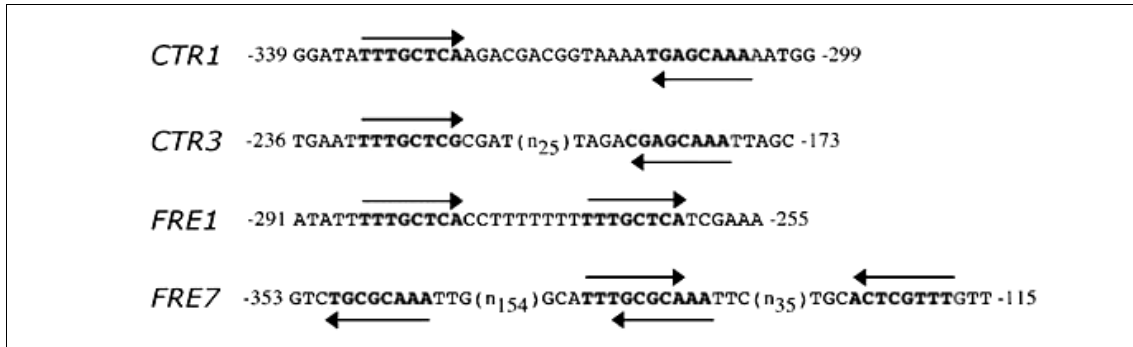
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ο χαλκορυθμιζόμενος μεταγραφικός ενεργοποιητής Mac1

3.1	Εισαγωγικά.....	80
3.2	Ο ρόλος της δεύτερης πλούσιας σε κυστεΐνες περιοχής του Mac1, REPII, στη λειτουργία του παράγοντα.....	83
3.2.1	Η περιοχή REPII ρυθμίζει την ικανότητα πρόσδεσης του Mac1 στο DNA.....	85
3.2.2	Συζήτηση.....	87
3.3	Η παρουσία του Mac1 έχει αρνητική επίδραση στη μεταγραφή του <i>FRE2</i>	89
3.3.1	Ο Mac1 δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποκινητή <i>FRE2 in vitro</i>	90
3.3.2	Ελλείπει του Mac1, η μεταγραφή του <i>FRE2</i> ενεργοποιείται με χαλκοεξαρτώμενο τρόπο από το σιδηρορυθμιζόμενο ενεργοποιητή Aft1.....	93

3.1 Εισαγωγικά

Στο σακχαρομύκητα, η κυτταρική συγκέντρωση του χαλκού ρυθμίζεται τόσο στο επίπεδο της πρόσληψης όσο και της αποθήκευσης του μετάλλου. Στη διαδικασία της αποθήκευσης βασικό ρόλο έχουν οι μεταλλοθειονίνες οι οποίες είναι μικρές πρωτεΐνες που δεσμεύουν χαλκό και άλλα τοξικά μέταλλα και που η σύνθεσή τους επάγεται μεταγραφικά από το χαλκοεξαρτώμενο μεταγραφικό ενεργοποιητή Ace1 [102]. Στη διαδικασία της πρόσληψης συμμετέχουν οι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης Fre1, Fre2 (αναγωγάσες μεταλλικών ιόντων) και Ctr1, Ctr3 (εξειδικευμένοι μεταφορείς χαλκού) για τις οποίες συζητήσαμε στην εισαγωγή. Τα γονίδια *CTR1*, *CTR3* και *FRE1*, όπως και το *FRE7* (ομόλογο με το *FRE1*) που κωδικοποιεί μια ενδοκυτταρική μεμβρανική αναγωγή μη γνωστής χρησιμότητας, επάγονται μεταγραφικά σε συνθήκες έλλειψης χαλκού και καταστέλλονται σε συνθήκες επάρκειας του μετάλλου. Διαμεσολαβητής αυτής της ρύθμισης είναι ο μεταγραφικός ενεργοποιητής Mac1 (**M**etal-**b**inding **a**ctivator) ο οποίος προσδένεται στο στοιχείο 5'-TTTGC(T/G)C(A/G)-3' (CuRE = **Cu-Responsive Element**) του οποίου δύο τουλάχιστον επαναλήψεις βρίσκονται πάνω στους υποκινητές τους [64, 171, 84, 109] (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1

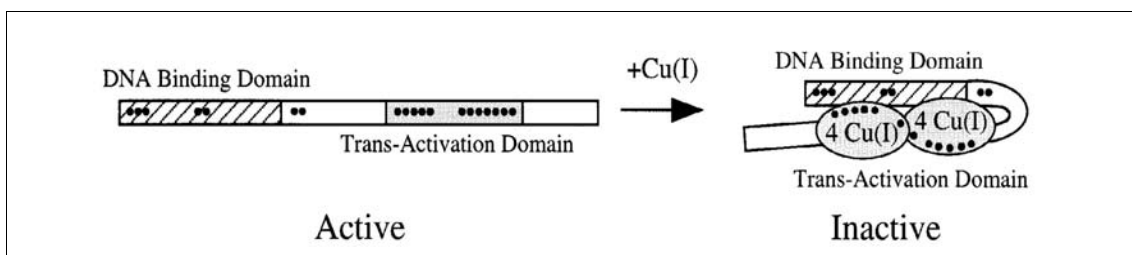
Τα στοιχεία CuRE τεσσάρων υποκινητών που ρυθμίζονται από τον παράγοντα Mac1 [109].

	1	40
Amt1	MVINGVKYACDSIKSHKAAQCEHNRPLKILKPR	GRPP
Ace1	MVINGVKYACETCIRGHRAAQCTHTDGPLQMI RRK	GRPS
Crf1	MVIEGIKYACERCIRGHRVSSCTHTQQLIRIKPK	GRPA
Haa1	MVLINGIKYACERCIRGHRVTTCNHTDQPLMMIKPK	GRPS
Cuf1	MVVINNVKMAEMKCI RGHRSSTCKHNDRELFPI RPK	GRPI
Mac1	MIIFNGNKYACASCIRGHRSSSTCRSHRMLIKVTR	GRPS
Grisea	MPILINGQKMACGPCI RGHIRSTKENHYNERVMVVRKP	GRPL

Εικόνα 3.2

Συντηρημένα αμινοτελικά μοτίβα διαφόρων χαλκοσχετιζόμενων μεταγραφικών παραγόντων που προέρχονται από μύκητες. Ο Amt1 προέρχεται από τον *Candida glabrata*, οι Ace1, Haa1 και Mac1 από τον *Saccharomyces cerevisiae*, ο Crf1 από τον *Yarrowia lipolytica*, ο Cuf1 από τον *Schizosaccharomyces pombe* και ο Grisea από τον *Podospora anserina* [154].

Ο Mac1 εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων είτε αυτά έχουν έλλειψη είτε επάρκεια χαλκού [62]. Περιέχει, μάλιστα, δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μια στο αμινοτελικό και μια στο καρβοξυτελικό μισό του [142]. Αποτελείται από 417 αμινοξέα και περιλαμβάνει πολλές λειτουργικές περιοχές. Το μικρότερο τμήμα της πρωτεΐνης που διατηρεί ικανότητα δέσμευσης στο DNA περιορίζεται στα πρώτα 159 αμινοξέα [61] και περιέχει (στα πρώτα 40 αμινοξέα) ένα μοτίβο δέσμευσης ψευδάργυρου και χαλκού (Cys-X₂-Cys-X₈-CysX-Cys) και ένα μοτίβο (R/K)GRP το οποίο έχει βρεθεί σε άλλες πρωτεΐνες να διαμεσολαβεί για την αλληλεπίδρασή τους με πλούσιες σε A/T αλληλουχίες, στο μικρό αυλάκι του DNA [58]. Τα μοτίβα αυτά απαντώνται επίσης στους ενεργοποιητές μεταλλοθειονινών Ace1 του σακχαρομύκητα και Amt1 της *Candida glabrata* [13] καθώς και σε άλλες

**Εικόνα 3.3**

Μοντέλο χαλκοεπαγόμενης ενδομοριακής αλληλεπίδρασης στον παράγοντα Mac1. Σημειώνονται οι περιοχές δέσμευσης στο DNA και ενεργοποίησης του μορίου ενώ οι τελείες αντιπροσωπεύουν κατάλοιπα κυστεΐνης [62].

πρωτεΐνες που προέρχονται από μύκητες (εικόνα 3.2). Η μελέτη της δομής του συμπλόκου Mac1-DNA πάνω στον υποκινητή *CTR1* έδειξε ότι ο Mac1 αλληλεπιδρά μέσω του μοτίβου RGRP με την αλληλουχία TTT στο μικρό αυλάκι του DNA και μέσω άλλου τομέα (που πιθανώς περιλαμβάνει το μοτίβο δέσμευσης ψευδαργύρου) με την αλληλουχία GCTCA στο μεγάλο αυλάκι [58]. Σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη που παράχθηκε *in vitro*, η πρόσδεση του Mac1 στο DNA βρέθηκε να γίνεται ανεξάρτητα από την παρουσία χαλκού [171]. Ωστόσο, σε πειράματα αποτύπωσης (footprinting) που έγιναν *in vivo* παρατηρήθηκε εξαφάνιση της πρόσδεσης σε συγκεντρώσεις του μετάλλου μεγαλύτερες από 10nM [84]. Παρατηρήθηκε επιπλέον, με χρήση ολικού εκχυλίσματος πεινασμένων για χαλκό κυττάρων ζύμης στα οποία ο Mac1 ήταν υπερεκφρασμένος, ότι η πρόσδεσή του στο DNA απαιτούσε ως προϋπόθεση αφενός την κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων χαλκού μέσα στο κύτταρο (η περίσσεια χαλκού αλλά και η απουσία Cu^+ την εμπόδισαν) και αφετέρου, ανεξάρτητα από το προηγούμενο γεγονός, τη φωσφορυλίωση της περιοχής ενεργοποίησής του [53].

Η περιοχή του Mac1 μεταξύ των αμινοξέων 252 και 341, που περιλαμβάνει δύο επαναλήψεις του πλούσιου σε κυστεΐνες μοτίβου Cys-X-Cys-X₄-Cys-X-Cys-X₂-Cys-X₂-His, τις REPI (αμινοξέα 264-279) και REPII (αμινοξέα 322-337), έχει ενεργοποιητική λειτουργία και πιθανώς δεσμεύει 8 ιόντα χαλκού [62]. Με δεδομένο ότι η ενεργότητα του Mac1 ρυθμίζεται από το χαλκό, η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της περιοχής δέσμευσης στο DNA και της περιοχής ενεργοποίησης του μορίου (που διαπιστώθηκε σε σύστημα δύο υβριδίων), έδειξε ότι η πρόσδεση του

χαλκού σε αυτές επάγει μια αλλοστερική αλληλεπίδραση που παρεμποδίζει και τις δύο λειτουργίες [62] (εικόνα 3.3).

Ο Mac1 αποδομείται γρήγορα σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού (> 10μΜ, τέτοιες ώστε να επάγεται η έκφραση μεταλλοθειονινών) με άγνωστο μηχανισμό στον οποίο εμπλέκεται η περιοχή REPI του μορίου [184]. Συμμετέχει έτσι στη διαδικασία προστασίας του κυττάρου από τα πλεονάζοντα τοξικά επίπεδα του μετάλλου. Επιπλέον, ελέγχει τη μετα-μεταφραστική αποδόμηση του μεταφορέα χαλκού Ctr1, η οποία έχει βρεθεί ότι γίνεται στην πλασματική μεμβράνη σε αντίστοιχα υψηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου [119]. Ένα πλούσιο σε κυστεΐνες, καρβοξυτελικά τοποθετημένο, μοτίβο του Ctr1 (παρόμοιο με αυτό που απαντάται επαναληπτικά στον Mac1), το οποίο βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, πιθανώς αλληλεπιδρά με την υπεύθυνη για την αποικοδόμηση πρωτεάση. Ο Mac1 ενδεχομένως επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου που την κωδικοποιεί ή κινητοποιεί μια προϋπάρχουσα πρωτεάση ή, τέλος, δρα ο ίδιος ως τέτοια, μετακινούμενος με κάποιο τρόπο από τον πυρήνα προς στο κυτταρόπλασμα (ίσως μέσω αποφωσφορυλίωσης) [176].

Τέλος, σε σύστημα δύο υβριδίων, διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση του Mac1 με τον εαυτό του, για την οποία υπεύθυνη είναι μια έλικα στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου (αμινοξέα 388-406) [142]. Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης Mac1-DNA *in vitro*, αποκάλυψε ότι ο ομοδιμερισμός διευκολύνει την πρόσδεση του παράγοντα σε δύο στοιχεία CuRE πάνω στους αποκρινόμενους υποκινητές [63]. Μάλιστα, σημειακές μεταλλαγές μέσα στην έλικα δημιούργησαν πεπτίδια που δεν ήταν ικανά να ομοδιμεριστούν, να σχηματίσουν τριμερή σύμπλοκα με το DNA *in vitro* ή να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή *in vivo* [63, 142]. Συνεπώς, ο ομοδιμερισμός είναι απαραίτητος για την πρόσδεση του Mac1 σε δύο στοιχεία CuRE πάνω στον υποκινητή, η οποία, με τη σειρά της, είναι αναγκαία για μεταγραφική ενεργοποίηση.

3.2 Ο ρόλος της δεύτερης πλούσιας σε κυστεΐνες περιοχής του Mac1, REPII, στη λειτουργία του παράγοντα

Όπως έδειξε η λειτουργική ανάλυση της περιοχής ενεργοποίησης του Mac1 που έγινε από τις ομάδες Winge και Thiele [46, 68, 184] και συνοψίζεται στον πίνακα 3.1, οι περιοχές REPI και REPII του παράγοντα είναι λειτουργικά διακριτές. Η πρώτη διαμεσολαβεί για τη χαλκοεξαρτώμενη ρύθμιση της ενεργότητάς του ενώ σχετίζεται και με τη διαδικασία αποδόμησής του σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού. Η δεύτερη,

ιδιότητες πεπτίδια	ενεργοποιητική ικανότητα	ενεργότητα <i>in vivo</i>	χαλκοεπαγόμενη αποδόμηση
Gal4DBD-Mac1(42-417) με 1 ή 2 μεταλλαγές στις 5Cys+1His της REPI	ναι μη χαλκορυθμιζόμενη		
Gal4DBD-Mac1(42-417) με 1 ή 2 μεταλλαγές στις 5Cys+1His της REPII	ναι χαλκορυθμιζόμενη		
Gal4DBD-Mac1(240-311) (περιέχει τη REPI)	πολύ μικρή μη χαλκορυθμιζόμενη		
Gal4DBD-Mac1(240-350) (περιέχει τις REPI+REPII)	ναι μη χαλκορυθμιζόμενη		
Gal4DBD-Mac1(290-350) (περιέχει τη REPII)	ναι μη χαλκορυθμιζόμενη		
Mac1(1-417) με 1 μεταλλαγή στις 5Cys+1His της REPI		ναι μη χαλκορυθμιζόμενη	
Mac1(1-417) με μεταλλαγμένη την His της REPII		ναι χαλκορυθμιζόμενη	
Mac1(1-417) με μεταλλαγμένες και τις 5Cys+1His της REPI		ναι μη χαλκορυθμιζόμενη	βραδύτερη
Mac1(1-417) με μεταλλαγμένες και τις 5Cys+1His της REPII		όχι	φυσιολογική

Πίνακας 3.1

Σύνοψη λειτουργικής ανάλυσης της περιοχής ενεργοποίησης του παράγοντα Mac1 που πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Winge και Thiele (). Οι περιοχές REPI(264-279) και REPII(322-337) της πρωτεΐνης, οι οποίες φέρουν τις μεταλλαγές, περιλαμβάνουν το μοτίβο 5'-Cys-X-Cys-X₄-Cys-X-Cys-X₂-Cys-X₂-His-3'.

παρόλο που δεν επηρεάζει τη χαλκοεξαρθώμενη ενεργοποιητική ικανότητα ή τη διαδικασία αποικοδόμησής του, επιδρά αρνητικά στη λειτουργία του *in vivo*. Υπάρχει συνεπώς μια ασάφεια σε σχέση με το ρόλο της περιοχής REPII. Με σκοπό τη διερεύνηση αυτού του ρόλου και την αποκάλυψη των απαραίτητων περιοχών για ένα χαλκορυθμιζόμενο και λειτουργικό μόριο Mac1, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας από την Αλεξάνδρα Βουτσινά ανάλυση λειτουργίας μιας σειράς ελλειμματικών παραγώγων του. Αυτή συνοψίζεται στον πίνακα 3.2 και έδειξε ότι η ενεργοποιητική ικανότητα στα διάφορα πεπτίδια δε συμβαδίζει πάντα με τη λειτουργικότητα *in vivo*.

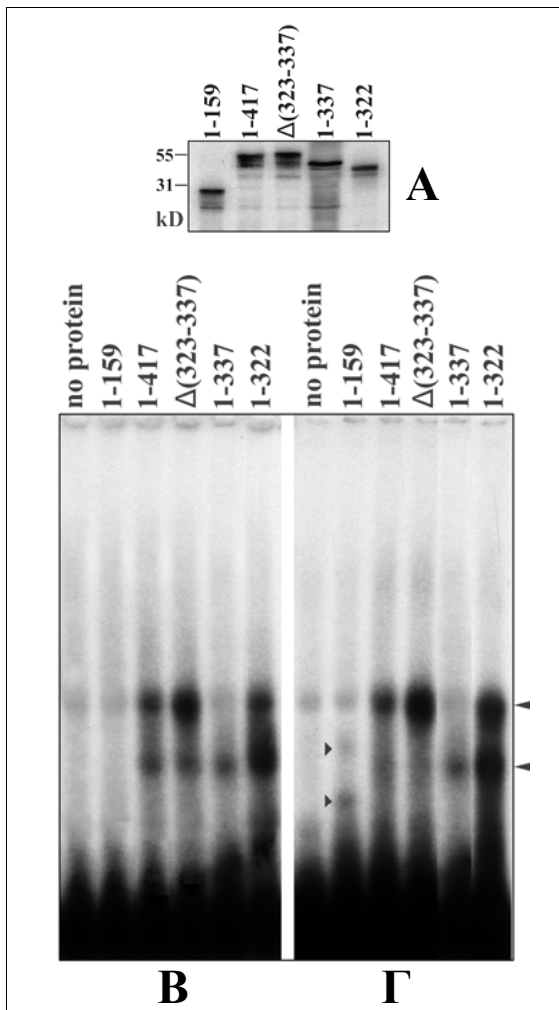
Mac1: 1	DBD	REPI	REPII	D	417	χαλκορυθμιζόμενη ικανότητα ενεργοποίησης	ικανότητα ομοδιμερισμού	λειτουργικότητα <i>in vivo</i>
1-159	_____					-	ΟΧΙ	-
1-322	_____	_____				-	ΟΧΙ	++
1-337	_____	_____	_____			+	ΟΧΙ	-
Δ(323-337)			_____	_____		+	ΝΑΙ	+
281-417				_____	_____	++	ΝΑΙ	-
1-417	_____	_____	_____	_____	_____	+	ΝΑΙ	++

Πίνακας 3.2

Λειτουργική ανάλυση ελλειμματικών πεπτιδίων Mac1. Σύνοψη της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε από την Αλεξάνδρα Βουτσινά σχετικά με την ικανότητα που έχουν τα παραπάνω πεπτίδια, εκφραζόμενα από κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς στα κατάλληλα στελέχη, (α) να επάγουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση ενός χιμαιρικού γονιδίου αναφοράς (β) να διμερίζονται σε σύστημα δύο υβριδίων και (γ) να ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου *CTR1*, απουσία χαλκού, *in vivo*.

3.2.1 Η περιοχή REPII ρυθμίζει την ικανότητα πρόσδεσης του Mac1 στο DNA

Για να ερμηνεύσουμε τα παραπάνω ευρήματα, ελέγξαμε την ικανότητα δέσμευσης στο DNA κάθε πεπτιδίου ξεχωριστά, *in vitro*. Είναι γνωστό ότι η πρόσδεση του Mac1 σε δύο στοιχεία CuRE πάνω στους ρυθμιζόμενους από αυτόν υποκινητές είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση *in vivo* [171, 84]. Η ανικανότητα ενός παραγώγου του από το οποίο απουσιάζει η περιοχή διμερισμού να δημιουργεί τριμερή σύμπλοκα (Mac1)₂-DNA *in vitro* και να αποκαθιστά την αναπνευστική δυσλειτουργία του στελέχους *mac1Δ in vivo*, οδήγησε στην υπόθεση ότι η πρόσδεση του παράγοντα σε δύο στοιχεία CuRE διευκολύνεται από τον ομοδιμερισμό του [63]. Εξετάσαμε λοιπόν την ικανότητα αντίστοιχων ποσών Mac1 και παραγώγων του (εικόνα 3.4A), που συντέθηκαν *in vitro*, για πρόσδεση πάνω σε ένα τμήμα DNA που περιείχε και τα δύο λειτουργικά στοιχεία CuRE του υποκινητή *CTR1* (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 1.2). Λαμβάνοντας υπόψη αντίστοιχα πειράματα του εργαστηρίου Kosman, θεωρήσαμε την ύπαρξη μιας μετατοπισμένης ζώνης DNA ως δείγμα πρόσδεσης στο ένα από τα δύο στοιχεία και αυτή μιας δεύτερης, ακόμα μικρότερης κινητικότητας, ως δείγμα πρόσδεσης και στα δύο [61, 63]. Το πεπτίδιο Mac1(1-417) (ολόκληρος ο παράγοντας) προσδέθηκε τόσο στο ένα όσο και στα δύο στοιχεία (εικόνα 3.4B, στήλη 3) ενώ όταν διπλασιάσαμε την ποσότητά του παρατηρήσαμε αποκλειστική πρόσδεση



Εικόνα 3.4

Έλεγχος πρόσδεσης ελλειμματικών παραγώγων του Mac1 στον υποκινητή *CTR1 in vitro*. (A) Αυτοραδιογράφημα παραγώγων του Mac1 που συντέθηκαν σε εκχύλισμα σπερματοκυττάρων σιταριού παρουσία ραδιενεργού μεθειονίνης και αναλύθηκαν με SDS-PAGE. Σε κάθε στήλη φορτώθηκε 0.5μl πρωτεΐνης.

(B) Αυτοραδιογράφημα κινητικά μετατοπισμένων ζωνών DNA που προέκυψαν από τη μίξη του ραδιοσημασμένου τμήματος -338/-300 του υποκινητή *CTR1* με καθένα από τα πεπτίδια Mac1. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 0,5μl πρωτεΐνης και 0,5μl εκχυλίσματος.

(Γ) Ομοίως, αλλά για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 1μl πρωτεΐνης συνολικά. Οι στήλες “no protein” αντιστοιχούν σε αντιδράσεις με 1μl εκχυλίσματος μόνο. Σημειώνονται με μεγάλα βέλη οι ζώνες που αντιστοιχούν στα σύμπλοκα Mac1-DNA (διπλό) και (Mac1)₂-DNA (τριπλό) και με μικρά οι αντίστοιχες για το μικρότερο παράγωγο Mac1(1-159).

του και στα δύο στοιχεία (εικόνα 3.4C, στήλη 3). Το πεπτίδιο Mac1(1-159), που περιλαμβάνει μόνο την περιοχή δέσμευσης στο DNA, προσδέθηκε τόσο στο ένα όσο και στα δύο στοιχεία (εικόνα 3.4C, στήλη 2) και το Mac1(1-337), από το οποίο απουσιάζει η περιοχή διμερισμού, στο ένα στοιχείο μόνο (εικόνα 3.4B-C, στήλη 5), σε συμφωνία με παλαιότερες παρατηρήσεις [61, 142]. Το Mac1Δ(323-337), από το οποίο απουσιάζει η περιοχή REPII, παρουσίασε πρότυπο πρόσδεσης παρόμοιο με αυτό του ολόκληρου παράγοντα με τη διαφορά ότι η πρόσδεσή του και στα δύο στοιχεία ήταν σημαντικά αυξημένη (εικόνα 3.4B/C στήλη 4). Τέλος, το Mac1(1-322), που δε διαθέτει τις περιοχές REPII και διμερισμού, προσδέθηκε τόσο στο ένα στοιχείο, αποτελεσματικότερα από κάθε άλλο πεπτίδιο που ελέγχθηκε, όσο και στα δύο (εικόνα 3.4B, στήλη 6) ενώ, όταν διπλασιάσαμε την ποσότητά του, παρατηρήσαμε αύξηση της πρόσδεσής του και στα δύο στοιχεία (εικόνα 3.4C, στήλη 6). Από τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι φανερό ότι τα πεπτίδια Mac1(1-322) και Mac1Δ(323-337) προσδέθηκαν στο DNA αποτελεσματικότερα επειδή δε διέθεταν

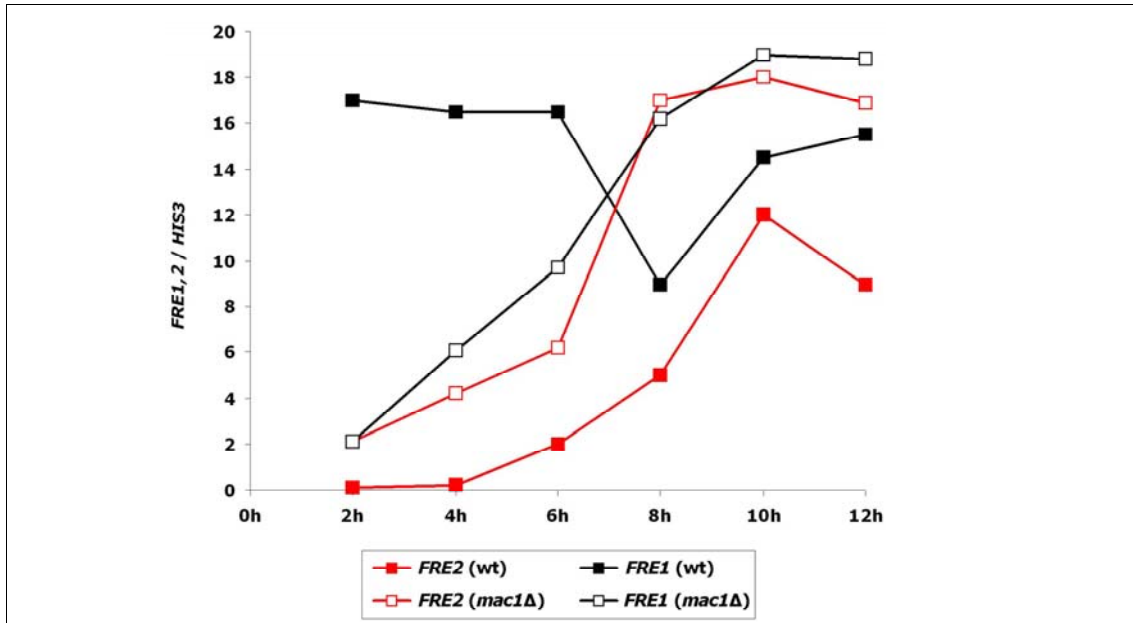
την περιοχή REPII. Το πρώτο, μάλιστα, προσδέθηκε στα δύο στοιχεία CuRE με ποσότητες τέτοιες που του επέτρεψαν, χωρίς να έχει την ενεργοποιητική ικανότητα του ολόκληρου παράγοντα, να παρουσιάσει συγκρίσιμη λειτουργικότητα με αυτόν *in vivo* (πίνακας 3.2). Επιπλέον, η πρόσδεσή του δεν προαπαίτησε τον ομοδιμερισμό του. Αυτό επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι το πεπτίδιο δεν αλληλεπίδρασε με τον εαυτό του σε σύστημα δύο υβριδίων (πίνακας 3.2) και άρα δε χρησιμοποίησε, κατά την πρόσδεσή του στο DNA, κάποια εναλλακτική περιοχή διμερισμού.

3.2.2 Συζήτηση

Η διερεύνηση της προσδετικής ικανότητας των διαφόρων πεπτιδίων Mac1 που περιγράφηκε παραπάνω, σε συνδυασμό με τη λειτουργική ανάλυσή τους (πίνακας 3.2), έριξαν φως στον μέχρι τώρα αδιευκρίνιστο ρόλο της περιοχής REPII του παράγοντα. Η περιοχή αυτή μπορεί μόνη της να ενεργοποιήσει ισχυρότατα την ετερόλογη μεταγραφή. Ευρισκόμενη όμως μέσα στο δομικό πλαίσιο του Mac1, δε συνεισφέρει ιδιαίτερα στο ενεργοποιητικό δυναμικό του αλλά αντίθετα ρυθμίζει την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA. Συγκεκριμένα, η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας του παράγοντα να προσδένεται σε δύο στοιχεία CuRE πάνω στον υποκινητή *CTRI*, γεγονός που αποτελεί προϋπόθεση για τη λειτουργικότητά του *in vivo*. Το πεπτίδιο Mac1(1-322), αν και δεν ομοδιμερίζεται (αφού δε διαθέτει περιοχή D), παρουσίασε αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (μη διαθέτοντας ούτε REPII). Αυτή του επέτρεψε να καταλάβει ανεξάρτητα και με αυξημένες ποσότητες και τα δύο στοιχεία CuRE του υποκινητή *CTRI* και, σε συνδυασμό ίσως με τη βελτιωμένη προσβασιμότητα των δύο ενεργοποιητικών περιοχών REPI, του προσέδωσε λειτουργικότητα *in vivo* συγκρίσιμη με αυτή του ομοδιμερούς αγρίου τύπου. Το πεπτίδιο Mac1Δ(323-337) παρουσίασε μεν αυξημένη πρόσδεση ως ομοδιμερές και στα δύο στοιχεία (αφού δε διαθέτει περιοχή REPII), αλλά ήταν λιγότερο ενεργό *in vivo* από το αντίστοιχο αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην έλλειψη της όποιας ενεργοποιητικής συνεισφοράς των περιοχών REPII ή/και στην πιθανή παρεμβολή των περιοχών D στη λειτουργία των REPI. Τέλος, το πεπτίδιο Mac1(1-337) δεν είχε αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (αφού διαθέτει περιοχή REPII) που θα του επέτρεπε, παρά το ότι δε μπορεί να ομοδιμεριστεί (μη διαθέτοντας περιοχή D), να καταλάβει και τα δύο στοιχεία CuRE. Συνεπώς μοιραία δεν ήταν λειτουργικό *in vivo*.

Ο αρνητικός ρόλος της περιοχής REPII στην προσδετική ικανότητα του Mac1 ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η ύπαρξή της αυξάνει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης μέσα στο μόριο, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η πρόσδεσή του στο DNA. Στον Mac1 είναι γνωστή η ύπαρξη χαλκορυθμιζόμενης αλληλεπίδρασης μεταξύ της αμινοτελικής περιοχής δέσμευσης στο DNA και της καρβοξυτελικής περιοχής ενεργοποίησης, η οποία γίνεται μέσω κυστεϊνών [62]. Τα πεπτίδια λοιπόν που δε διαθέτουν την πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή REPII έχουν μειωμένη πιθανότητα να αλληλεπιδράσουν ενδομοριακά και συνεπώς αυξημένη δυνατότητα να προσδεθούν στο DNA. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ενεργοποιητικής ικανότητάς τους σε σύστημα ενός υβριδίου (πίνακας 3.2) εξηγούνται με βάση τα παραπάνω, αν ληφθεί υπόψη ότι στο συγκεκριμένο σύστημα τα πεπτίδια διέθεταν την ίδια, ανεξάρτητη από το χαλκό, προσδετική ικανότητα (αφού έφεραν αμινοτελικά τη Gal4DBD) ενώ ακόμα είχαν τη Mac1DBD ελεύθερη και αποκλειστικά διαθέσιμη για ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Στο Gal4DBD-Mac1(1-322), λοιπόν, η περιοχή REPII πιθανώς αναλώθηκε αποκλειστικά σε αλληλεπίδραση με την ελεύθερη Mac1DBD, με αποτέλεσμα αυτό να είναι ανενεργό. Στα Gal4DBD-Mac1(1-337), Gal4DBD-Mac1Δ(323-337) και Gal4DBD-Mac1(1-417), η ύπαρξη πρόσθετων περιοχών μετά τη REPII ενδεχομένως προκάλεσε σχετική “ακαμψία” των μορίων και συνεπώς περιορισμό των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα αυτά να παρουσιάσουν ενεργοποιητική ικανότητα. Το ότι μάλιστα αυτή η ικανότητα ήταν παρόμοια και στα τρία επιβεβαιώνει την ελάχιστη συνεισφορά της περιοχής REPII σε αυτή. Από την άλλη, το Gal4DBD-Mac1(281-417), από το οποίο απουσιάζει η Mac1DBD και η περιοχή REPII, αποκάλυψε το πλήρες ενεργοποιητικό δυναμικό της περιοχής REPII.

Στο σύνολό τους τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η περιοχή REPII επιδρά αρνητικά στην πρόσδεση του Mac1 στο DNA. Η εξουδετέρωση της επίδρασής της έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη προσδετική ικανότητα του παράγοντα, η οποία καθιστά τον ομοδιμερισμό του μη αναγκαίο. Επομένως, στο μόριο αγρίου τύπου ο τελευταίος είναι απαραίτητος επειδή λειτουργεί αντισταθμιστικά στην αρνητική επίδραση της REPII στην πρόσδεση στο DNA. Οι επιδράσεις της REPII δείχνουν ότι, *in vivo*, η λειτουργία του Mac1 θα μπορούσε να τροποποιηθεί από δομικές διαμορφώσεις που επηρεάζουν τις ιδιότητες πρόσδεσής του στο DNA. Διαμορφώσεις που προσομοιάζουν με την έλλειψη των περιοχών REPII ή REPII+D θα μπορούσαν να προκληθούν από αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Το γεγονός ότι (α) τα



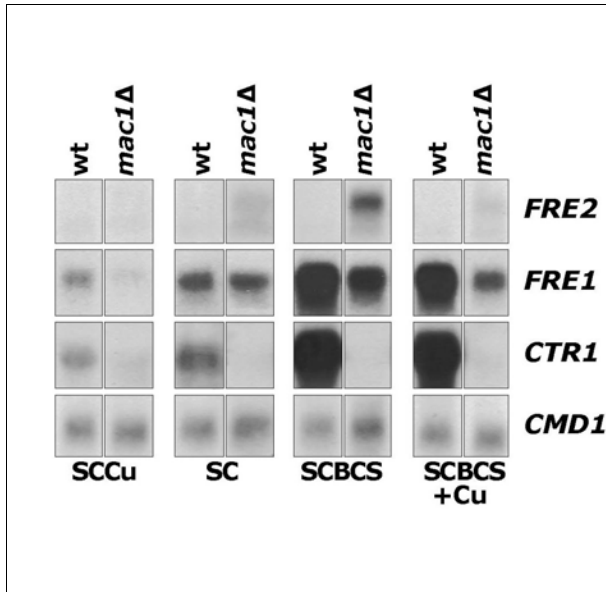
Εικόνα 3.5

Χρονικά πρότυπα της επαγόμενης μεταγραφής των γονιδίων *FRE1* και *FRE2* στα στελέχη αγρίου τύπου και *mac1Δ*. Βασίζονται σε δεδομένα της Έλενας Γεωργάτσου η οποία ανέχνευσε ανά 2h και για συνολικό διάστημα 12h και στη συνέχεια ποσοτικοποίησε τη συσσώρευση mRNA των γονιδίων *FRE1*, *FRE2* και *HIS3* σε αναπτυγμένα απουσία σιδήρου κύτταρα αγρίου τύπου και *mac1Δ*. Στο διάγραμμα, οι λόγοι της συσσώρευσης mRNA των *FRE1* και *FRE2* προς την αντίστοιχη του μη σιδηροεξαρτώμενου ποσοτικού δείκτη *HIS3* στα δύο στελέχη εκφράζονται ως συνάρτηση του χρόνου.

ελλειμματικά πεπτίδια Mac1 που δε διαθέτουν τις περιοχές REPII ή REPII+D είναι λειτουργικά και χαλκορυθμιζόμενα *in vivo*, (β) η χαλκορυθμιζόμενη ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών N και C του παράγοντα σχετίζεται κυρίως με την περιοχή REPI και (γ) η περιοχή REPII+D μόνη της παρουσιάζει ισχυρή ενεργοποιητική ικανότητα, δείχνει ότι η τελευταία ίσως εμπλέκεται σε ανεξάρτητες μοριακές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες ή μέταλλα στο πλαίσιο νέων άγνωστων λειτουργιών του Mac1.

3.3 Η παρουσία του Mac1 έχει αρνητική επίδραση στη μεταγραφή του *FRE2*

Η Έλενα Γεωργάτσου έδειξε στο εργαστήριό μας ότι τα προϊόντα των γονιδίων *FRE1* και *FRE2* ανάγουν και χαλκό (εκτός από σίδηρο), γεγονός που διευκολύνει την κυτταρική πρόσληψή του, καθώς και ότι σε συνθήκες έλλειψης χαλκού επάγεται αποκλειστικά ενεργότητα αναγωγής Fre1. Έδειξε ακόμα ότι η διαφοροποίηση των



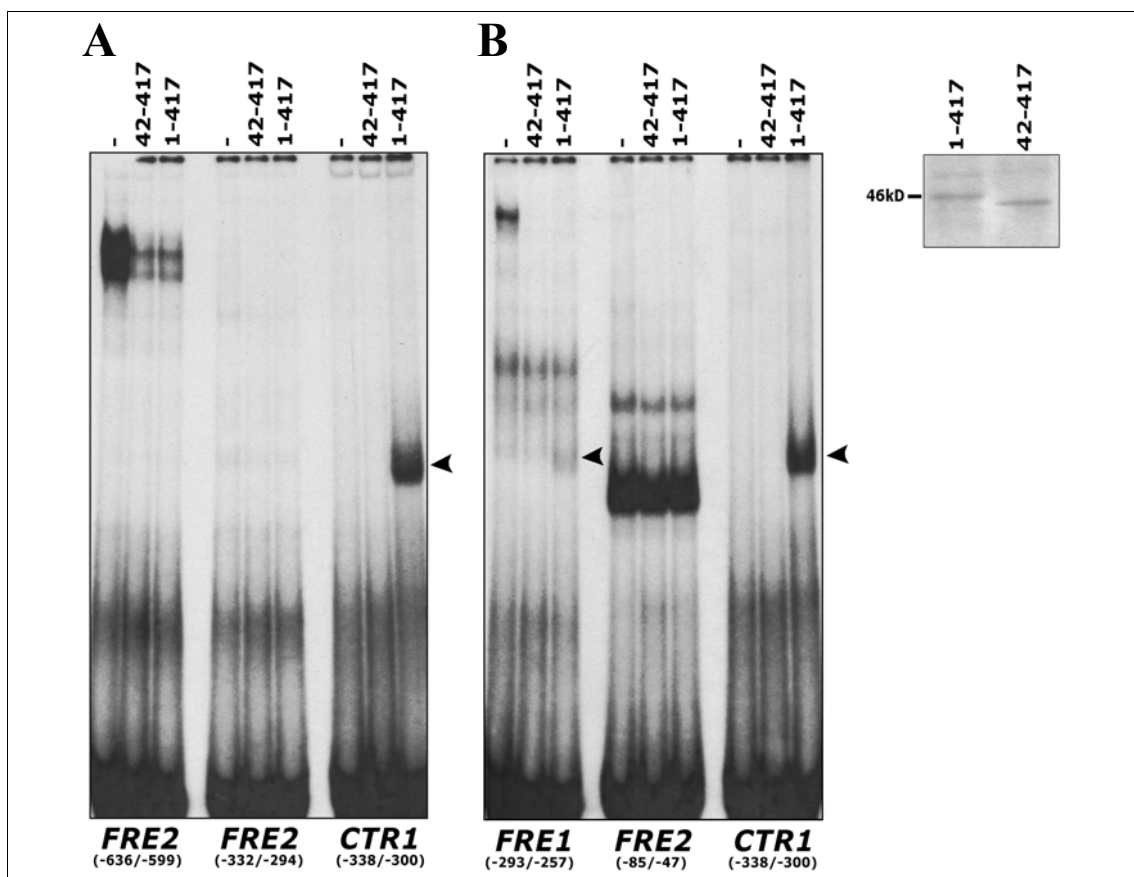
Εικόνα 3.6

Έλεγχος της μεταγραφής του *FRE2* στο στέλεχος *mac1Δ*. Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνυόμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επάρκεια (SC) ή περίσσεια (SCCu) ή έλλειψη χαλκού (SCBCS) ή σε μέσο με έλλειψη χαλκού στο οποίο το μέταλλο προστέθηκε (σε συγκέντρωση 200μM) 30min πριν τη συλλογή των κυττάρων (SCBCS+Cu), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE2*, *FRE1*, *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης).

αναγωγασών Fre1 και Fre2 ως προς την απόκριση στην έλλειψη χαλκού οφείλεται στη διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση των αντίστοιχων γονιδίων, βασικό στοιχείο της οποίας αποτελεί ο παράγοντας Mac1. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα χρονικά μεταγραφικά πρότυπα των *FRE1* και *FRE2* σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου και χαλκού (όπου οι παράγοντες Aft1 και Mac1 είναι ταυτόχρονα ενεργοί), τα οποία είναι διαφορετικά σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου, σχεδόν συμπίπτουν στο στέλεχος *mac1Δ* (εικόνα 3.5). Ενώ λοιπόν ο Mac1 έχει άμεση θετική επίδραση στη μεταγραφή του *FRE1*, φαίνεται ότι επηρεάζει και αυτή του *FRE2* με αντίθετο όμως αποτέλεσμα. Το γεγονός αυτό διαπιστώθηκε και από τον ταυτόχρονο έλεγχο των μεταγραφικών επιπέδων του *FRE2* και των (θετικά επηρεαζόμενων από τον Mac1) *FRE1* και *CTR1*, στα στελέχη αγρίου τύπου και *mac1Δ*, σε διάφορες συνθήκες διαθεσιμότητας χαλκού. Είναι χαρακτηριστικό ότι στο στέλεχος *mac1Δ* ανιχνεύτηκε βασική αλλά και επαγόμενη από την έλλειψη χαλκού μεταγραφή του *FRE2*, η οποία εξαφανίστηκε με την προσθήκη χαλκού (εκ των υστέρων στην περίπτωση των συνθηκών επαγωγής) (εικόνα 3.6). Ελλείπει του Mac1, λοιπόν, βρήκαμε ότι υπάρχει χαλκορυθμιζόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής του *FRE2*.

3.3.1 Ο Mac1 δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποκινητή *FRE2* *in vitro*

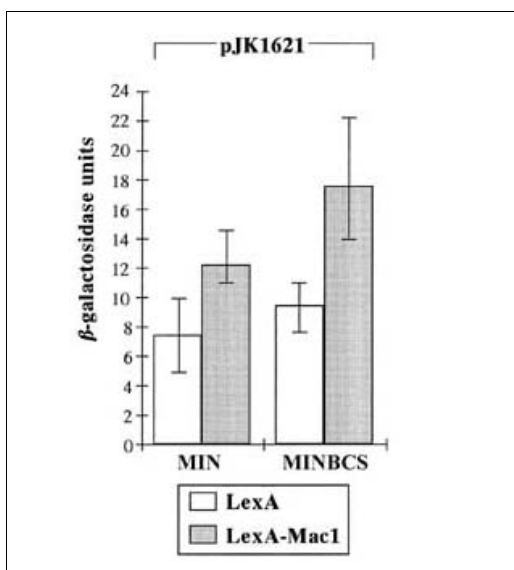
Το ερώτημα που τέθηκε στη συνέχεια ήταν με ποιό τρόπο διαμεσολαβείται η αρνητική δράση του Mac1 στη μεταγραφή του *FRE2*. Στον *S. pombe*, ο χαλκοεξαρτώμενος παράγοντας Cuf1 ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων που



Εικόνα 3.7

Έλεγχος πρόσδεσης του Mac1 στον υποκινητή *FRE2*, *in vitro*. (A) και (B) Αυτοραδιογραφήματα κινητικά μετατοπισμένων ζωνών DNA που προέκυψαν από τη μίξη των ραδιοσημασμένων τμημάτων -636/-599 ή 332/-294 ή -85/-47 του υποκινητή *FRE2* ή -293/-257 του *FRE1* (θετικός μάρτυρας) ή -338/-300 του *CTR1* (θετικός μάρτυρας) με εκχυλίσιμα σπερματοκυττάρων σιταριού στο οποίο εκφράστηκε ο παράγοντας Mac1 ολόκληρος (1-417) ή χωρίς την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (42-417). Οι στήλες (-) περιέχουν μόνο τα αντίστοιχα ραδιοσημασμένα τμήματα DNA. Οι ειδικές μετατοπισμένες ζώνες DNA σημειώνονται με βέλος. Πάνω δεξιά φαίνεται το αυτοραδιογράφημα των δύο πεπτιδίων Mac1 που συντέθηκαν στο εκχύλισμα σπερματοκυττάρων σιταριού παρουσία μεθειονίνης ^{35}S και αναλύθηκαν με SDS-PAGE.

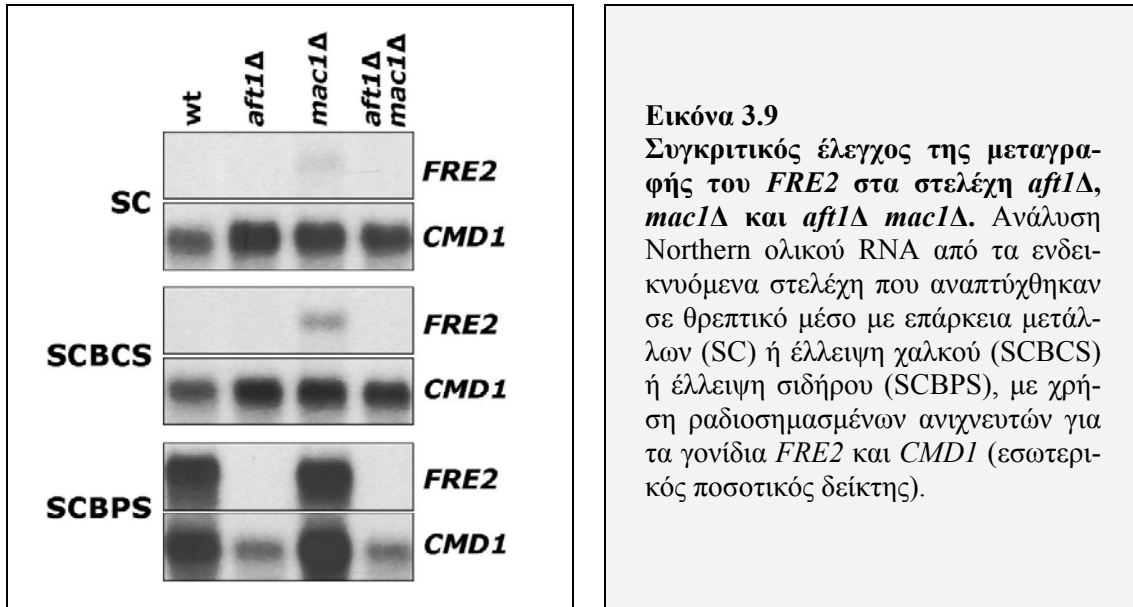
εμπλέκονται στην εξειδικευμένη μεταφορά χαλκού, επάγοντάς τη σε συνθήκες έλλειψης του μετάλλου. Παράλληλα, όμως, στις ίδιες συνθήκες, καταστέλλει άμεσα τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά του μηχανισμού μεταφοράς σιδήρου, προσδεδεμένος στην επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 5'-TTTGTC-3' που βρίσκεται στους υποκινητές τους [83]. Η μέχρι ενός σημείου δομική και λειτουργική ομοιότητά του Cuf1 με τον Mac1 [83] αλλά και η ομοιότητα της αλληλουχίας TTTGTC με το στοιχείο CuRE, έθεσαν το ζήτημα της ύπαρξης παρόμοιου

**Εικόνα 3.8****Διερεύνηση ενδεχόμενης κατασταλτικής επίδρασης του Mac1 στη μεταγραφή.**

Ενεργότητα β -γαλακτοσιδάσης σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου το οποίο μετασχηματίστηκε ταυτόχρονα με πλασμίδιο που φέρει το χμιαρικό γονίδιο αναφοράς $4xLexAop-CYC1_{2xUAS+TATA-LacZ}$ (pJK1621) και με πλασμίδιο έκφρασης LexA-Aft1 ή LexA και αναπτύχθηκε σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο με επάρκεια (MIN) ή έλλειψη χαλκού (MINBCS).

(εξαρτώμενου από τον Mac1) μηχανισμού μεταγραφικής καταστολής των γονιδίων της ομοιόστασης σιδήρου στον *S. cerevisiae*. Άλλωστε, η μεταγραφή του γονιδίου *FET3*, το οποίο κωδικοποιεί το βασικό μεταφορέα σιδήρου της πλασματικής μεμβράνης του *S. cerevisiae* και περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενα στοιχεία TTTGTC στον υποκινητή του, βρέθηκε επίσης σημαντικά αυξημένη στο στέλεχος *mac1Δ* [83]. Στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του *FRE2* (και όχι στις αντίστοιχες των θετικά επηρεαζόμενων από τον Mac1 *FRE1* και *CTR1*) εντοπίσαμε μια αναστραμμένη αλληλουχία TTTGTC μεταξύ των θέσεων -316 και -311 και μια δεύτερη, αρκετά μακρύτερα, μεταξύ των -621 και -616 (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 1.2). Προκειμένου να ελέγξουμε τη δυνατότητα πρόσδεσης του Mac1 πάνω σε καθεμιά από αυτές, χρησιμοποιήσαμε, σε πειράματα μετατόπισης της κινητικότητας του DNA, πρωτεΐνη που συντέθηκε *in vitro* και αντίστοιχα τα τμήματα του υποκινητή -636/-599 και -332/-294. Στις συγκεκριμένες συνθήκες, δεν παρατηρήσαμε πρόσδεση (εικόνα 3.7A), μη επιβεβαιώνοντας την αρχική μας υπόθεση. Το ενδεχόμενο ο παράγοντας να χρειάζεται *in vivo* και τα δύο στοιχεία TTTGTC για να προσδεθεί αποτελεσματικά, δε θεωρούμε ότι εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με ένα μόνο τέτοιο στοιχείο σε συνθήκες *in vitro*, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των στοιχείων CuRE (εικόνα 3.4).

Εξετάσαμε ακόμα, με παρόμοια πειραματική διαδικασία, τη δυνατότητα πρόσδεσης του Mac1 στο τμήμα -85/-47 του υποκινητή *FRE2*, η οποία περιλαμβάνει δύο διαδοχικά ατελή υποπήφια στοιχεία CuRE, ένα μεταξύ των θέσεων -82 και -75



Εικόνα 3.9

Συγκριτικός έλεγχος της μεταγραφής του *FRE2* στα στελέχη *aft1Δ*, *mac1Δ* και *aft1Δ mac1Δ*. Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνυόμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επάρκεια μετάλλων (SC) ή έλλειψη χαλκού (SCBCS) ή έλλειψη σιδήρου (SCBPS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *FRE2* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης).

και άλλο ένα αναστραμμένο μεταξύ των θέσεων -59 και -52 (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 1.2). Δεδομένου ότι το υποτιθέμενο κουτί TATA του υποκινητή ξεκινά από τη θέση -87, ενδεχόμενη πρόσδεση του Mac1 θα είχε πιθανώς ως αποτέλεσμα τη στερεοχημική παρεμπόδιση του σχηματισμού του μεταγραφικού συμπλόκου πάνω στον υποκινητή και επομένως την ανάσχεση της μεταγραφής του γονιδίου. Ούτε η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε καθώς το αποτέλεσμα του πειράματος πρόσδεσης ήταν και πάλι αρνητικό (εικόνα 3.7B).

Από τα προηγούμενα λοιπόν διαφαίνεται ότι δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση του Mac1 με τον υποκινητή *FRE2*, *in vitro*. Το ενδεχόμενο της ενεργητικής καταστολής ή της παθητικής μηχανιστικής παρεμπόδισης της μεταγραφής του *FRE2* δε φαίνεται να αποτελεί την απάντηση στο, σχετικό με την αρνητική δράση του παράγοντα, αρχικό ερώτημα. Μάλιστα, ο μη κατασταλτικός χαρακτήρας του Mac1 διαπιστώθηκε και από το γεγονός ότι η υβριδική πρωτεΐνη LexA-Mac1 είχε μάλλον ενεργοποιητική παρά κατασταλτική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς *LexAop-CYCI_{UAS+TATA}-LacZ* (εικόνα 3.8).

3.3.2 Ελλείψει του Mac1, η μεταγραφή του *FRE2* ενεργοποιείται με χαλκοεξαρτώμενο τρόπο από το σιδηρορυθμιζόμενο ενεργοποιητή Aft1

Με δεδομένο ότι η απουσία του Mac1 δεν προκαλεί αποκαταστολή της μεταγραφής του *FRE2* (όπως αντίστοιχα προκαλεί η απουσία του παράγοντα Cuf1 στα γονίδια της ομοιόστασης σιδήρου στον *S. pombe*), είναι λογικό να αποδώσουμε την

παρατηρούμενη αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου στο στέλεχος *mac1Δ*, στο μοναδικό ενεργοποιητή του, τον Aft1. Πράγματι, αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε από το γεγονός της ανυπαρξίας μεταγραφής του *FRE2* στο στέλεχος *aft1Δ mac1Δ* σε όλες τις συνθήκες διαθεσιμότητας μετάλλων (εικόνα 3.9). Το ότι αυτή η διαμεσολαβούμενη από τον Aft1 μεταγραφική ενεργοποίηση ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα του χαλκού δεν είναι παράξενο, καθότι είναι γνωστό ότι από την τελευταία εξαρτάται άμεσα ο κυτταρικός μηχανισμός μεταφοράς του σιδήρου (βλ. εισαγωγή). Επομένως, η χαμηλή διαθεσιμότητα χαλκού (που επιτείνεται μάλιστα από την απουσία του Mac1) προκαλεί μείωση των κυτταρικών αποθεμάτων σιδήρου και καθιστά τον Aft1 ενεργό. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ο γενωμικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης στο στέλεχος *mac1Δ* έδειξε αύξηση της έκφρασης των εξαρτώμενων από τον Aft1 γονιδίων της ομοιόστασης σιδήρου [28]. Μέσα στην ομάδα των επαγόμενων γονιδίων βρέθηκε και το γονίδιο *AFT1*, γεγονός που δείχνει ότι ο Mac1 ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα τη μεταγραφή του. Στην ενότητα 2.4 συζητήσαμε την εμπλοκή του Aft1 στη χαλκοεξαρτώμενη μεταγραφική ρύθμιση και προτείναμε ότι αυτή πιθανώς οφείλεται σε αλληλεπίδρασή του με τον Mac1. Στην παρούσα αντίστροφη περίπτωση, η εμπλοκή του Mac1 στη σιδηροεξαρτώμενη μεταγραφική ρύθμιση θα μπορούσε, ανεξάρτητα από τη διαπιστωμένη επίδραση του παράγοντα στη μεταγραφή του γονιδίου *AFT1*, να οφείλεται επίσης σε παρόμοιο μηχανισμό αλληλεπίδρασης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

➤ Υλικά.....	96
➤ Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης.....	97
➤ Στελέχη σακχαρομύκητα.....	97
➤ Βακτηριακά στελέχη.....	99
➤ Πλασμιδιακές κατασκευές.....	99
✓ Πλασμιδιακοί φορείς.....	99
✓ Έκφραση ενδογενών γονιδίων του σακχαρομύκητα.....	99
✓ Πρωτεϊνική έκφραση στο σακχαρομύκητα.....	100
✓ Πρωτεϊνική έκφραση σε βακτήρια.....	102
✓ Γονίδια αναφοράς.....	103
➤ Τεχνικές για νουκλεϊνικά οξέα.....	104
✓ Παρασκευή πλασμιδιακού DNA από βακτήρια.....	104
✓ Διαδικασίες τροποποίησης του DNA.....	104
✓ Ηλεκτροφορητική ανάλυση και απομόνωση του DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	105
✓ Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	105
✓ Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κλώνων (ανάλυση Grunstein).....	105
✓ Ραδιοσήμανση του DNA.....	105
✓ Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA.....	106
✓ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	106
✓ Ανάλυση DNA κατά Southern και RNA κατά Northern.....	106
✓ Ανάλυση προστασίας από RNάση A (RNase A protection assay).....	107
✓ Χαρτογράφηση του σημείου έναρξης της μεταγραφής (Primer extension analysis).....	108
➤ Τεχνικές για πρωτεΐνες.....	108
✓ Ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και ανοσοανίχνευση ακινητοποιημένων σε μεμβράνη πρωτεϊνών (Western blot analysis).....	108
✓ Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια.....	109

✓ Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων <i>in vitro</i>	110
✓ Ενζυμική αντίδραση ακετυλίωσης πρωτεϊνών.....	110
✓ Ανάλυση μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA λόγω σύνδεσής του με πρωτεΐνη (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA).....	110
➤ Ειδικές τεχνικές για το σακχαρομύκητα.....	111
✓ Απομόνωση γενωμικού DNA και ολικού RNA.....	111
✓ Μετασχηματισμός κυττάρων.....	111
✓ Ανάκτηση πλασμιδίου από το σακχαρομύκητα στην <i>E. coli</i>	111
✓ Προσδιορισμός ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης και ανάλυση δύο υβριδίων σε μετασχηματισμένα κύτταρα.....	112
✓ Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (whole cell extracts).....	112
✓ Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων <i>in vivo</i>	112
✓ Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation assay - ChIP).....	113
✓ Ανάλυση χρωματινικής δομής <i>in vivo</i>	115

Υλικά

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν:

- Χημικά των εταιρειών Sigma, Merck και Amersham
- Θρεπτικά μέσα της Difco
- Ένζυμα περιοριστικά, τροποποίησης, θερμοπολυμερισμού κ.λπ. των Minotech, New England Biolabs, Promega, Boehringer, Sigma, Merck, USB και Stratagene
- Αντισώματα (anti-HA, anti-His, anti-Myc, δευτερογενές anti-rabbit) των Santa Cruz και Jackson (το anti-Tup1 ήταν προσφορά του Μ. Παπαμίχου)
- Ραδιενεργά νουκλεοτίδια (α - ^{32}P dATP, α - ^{32}P dCTP, γ - ^{32}P dATP, α - ^{32}P UTP, α - ^{35}S dATP), ^{35}S -μεθειονίνη και ^3H -ακετυλοσυνένζυμο των Amersham και ICN
- Τα QiaQuick και Concert Gel Extraction Kits, T7 Sequenase DNA Sequencing Kit (USB), Transcription & Translation Coupled Wheat Germ Extract System (Promega), IMPACT T7 One-Step Protein Purification System (New England Biolabs) και ECL Western Blotting Detection Kit (Pierce)

- Μεμβράνες της Schleicher & Schuell, νάυλον για τη μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων και νιτροκυτταρίνης για τη μεταφορά πρωτεϊνών και βακτηριακών αποικιών
- Φιλμ αυτοραδιογραφίας Kodak και Fuji
- Σφαιρίδια Protein A Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia), Glutathione Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia), Ni-NTA Agarose (Qiagen)
- Ολιγονουκλεοτίδια από το Εργαστήριο Μικροχημείας του Ι.Τ.Ε. και από την MWG Biotech (Germany)
- Τα προγράμματα ποσοτικοποίησης ζωνών αυτοραδιογραφημάτων ImageQuant (για χρήση του PhosphorImager) και Scion Image
- Οι βάσεις δεδομένων SGD (*Saccharomyces* Genome Database) και PubMed

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης

Η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών έγινε σε θρεπτικό μέσο LB ενώ τα στελέχη ζύμης αναπτύχθηκαν σε μέσο SC (κυρίως), MIN ή YPD, όπως έχει περιγραφεί [7, 139]. Το συνθετικό πλήρες μέσο (SC) περιέχει 0.67% yeast nitrogen base (που περιλαμβάνει 1.23μM FeCl₃ και 0.25μM CuSO₄), τα 20 αμινοξέα, ουρακίλη, αδενίνη και 2% γλυκόζη. Για τη δημιουργία συνθηκών επαγωγής της μεταλλοεξαρτώμενης μεταγραφής, προστέθηκαν σε αυτό, σε τελική συγκέντρωση 100μM, ο χηλικός δεσμευτής του δισθενούς σιδήρου και χαλκού BPS (bathophenanthroline disulfonic acid-Na₂ salt) ή ο αντίστοιχος του μονοσθενούς χαλκού BCS (bathocuproine disulfonic acid-Na₂ salt). Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες αναπτύχθηκαν μέχρι OD₅₅₀ = 0.6-1.0,

- σε SC (συνθήκες επάρκειας μετάλλων) ή
- σε SC στο οποίο προστέθηκε BPS 7h πριν τη συλλογή των κυττάρων (συνθήκες έλλειψης σιδήρου) ή
- σε SC στο οποίο προστέθηκε BCS 3h πριν τη συλλογή των κυττάρων (συνθήκες έλλειψης χαλκού).

Στελέχη σακχαρομύκητα

- Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη αγρίου τύπου:
RH1168 (παράγωγο του S288C) (*MATa ura3-52 leu2-1*),

FT5 (*MATα ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2::PET56*) και

FY1679 (*MATα ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 his3-Δ200*)

- Τα μεταλλάγματα *yap1Δ** (*leu2 ura3*) [45], *gcn5Δ* (*leu2 ura3*) (Γ. Θηραίος) και *aft1Δ* (*leu2*) (Ε. Γεωργιάτσου) προήλθαν από το στέλεχος RH1168
- Τα μεταλλάγματα *ssn6Δ* (*cyc8-Δ9::HIS3*) και *tup1Δ* (*tup1Δ::HIS3*) προήλθαν από το στέλεχος FT5 [155]
- Το μετάλλαγμα *swi6Δ* (*leu2 ura3 trp1*) (Τ. Γεωργακόπουλος) προήλθε από το στέλεχος FY1679
- Το “υπό όρους” μετάλλαγμα *esal* (*leu2 ura3 his3 trp1 tetO₂ESAI::KanMX4*) (Susana Rodriguez) προήλθε από το στέλεχος FY1679
- Απαλοιφές των γονιδίων *NHP6A* ή/και *NHP6B* έγιναν στα στελέχη RH1168 (*nhr6aΔ*), RH1168 ή FT5 (*nhr6aΔ nhr6bΔ = nhr6ΔΔ*) και *ssn6Δ* (*ssn6Δ nhr6ΔΔ*), με ομόλογο ανασυνδυασμό, χρησιμοποιώντας δύο πλασμιδιακές κατασκευές (στο φορέα pBluescript) που περιείχαν η πρώτη το γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη (*KanMX4*) μεταξύ των θέσεων *BstEII* και *NdeI* του *NHP6A* (εκτομή από +9 έως +414) και η δεύτερη το γονίδιο *URA3* μεταξύ των θέσεων *SphI* και *MscI* του *NHP6B* (εκτομή από -154 έως +167). Στη δεύτερη περίπτωση, η αυξοτροφία για ουρακίλη ανακτήθηκε σε τριβλία με 5-FOA [7]. Οι απαλοιφές επιβεβαιώθηκαν φαινοτυπικά και γενωμικά με PCR
- Τα στελέχη FT5(*AFT1-9Myc*) και *nhr6ΔΔ*(*AFT1-9Myc*) δημιουργήθηκαν με διαδοχική καρβοξυτελική σήμανση του γενωμικού γονιδίου *AFT1* με μια ακολουθία που κωδικοποιεί 9 επίτοπους Myc και το γονίδιο *TRP1* του *Kluyveromyces lactis* ως δείκτη επιλογής, με τη μέθοδο των Knop et al. [73]
- Απαλοιφή του γονιδίου *SSN6* έγινε στα στελέχη RH1168 (*ssn6Δ**) και *aft1Δ* (*aft1Δ ssn6Δ**), με ομόλογο ανασυνδυασμό, χρησιμοποιώντας μια πλασμιδιακή κατασκευή (στο φορέα pBluescript) που περιείχε το γονίδιο *KanMX4* μεταξύ δύο θέσεων *PstI* εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου *SSN6* (εκτομή από +301 έως +2589) και επιβεβαιώθηκε φαινοτυπικά και γενωμικά με PCR
- Απαλοιφή του γονιδίου *MAC1* έγινε στα στελέχη RH1168 (*mac1Δ*) και *aft1Δ* (*aft1Δ mac1Δ*), με ομόλογο ανασυνδυασμό, χρησιμοποιώντας μια πλασμιδιακή κατασκευή (στο φορέα pBluescript) που περιείχε το γονίδιο *KanMX4* μεταξύ δύο θέσεων *SthI* εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου *MAC1* (εκτομή από +122 έως +602) και επιβεβαιώθηκε φαινοτυπικά και γενωμικά με PCR
- Στα πειράματα δύο υβριδίων χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη:

PJ69-4α (*MATα trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ UASGAL2-ADE2 LYS2::UASGAL1-HIS3 met2::UASGAL7-LacZ*) και
 L9FT5 (*MATα his3Δ::LexAopHIS3 leu2::PET56 ura3-52 trp1-Δ63*)

Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Escherichia coli* DH5α και XL1-blue για την ανάπτυξη πλασμιδίων και ER2566 για την έκφραση πρωτεϊνών.

Πλασμιδιακές κατασκευές

Πλασμιδιακοί φορείς

Οι βασικοί πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- για την κλωνοποίηση γονιδίων του σακχαρομύκητα και τη δημιουργία γονιδίων αναφοράς, οι YCp50 (CEN, Amp, *URA3*), YEp13 (2μ, Amp, *LEU2*) και pRS315 (CEN, Amp, *LEU2*)
- για την έκφραση πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα, οι YCp91 (CEN, Amp, *TRP1*) [155], pYX142 (Novagen - CEN, Amp, *LEU2*), pVTU260 (Euroscarf - 2μ, Amp, *URA3*) pGBT9 (Clontech - 2μ, Amp, *TRP1*) και pACT2 (Clontech - 2μ, Amp, *LEU2*)
- για την έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια, οι pTYB1 (NEB), pET22b και pET26b (Novagen), pGEX2T (Pharmacia) και pRSET-C (Invitrogen)
- και οι pBluescript (Stratagene) και pUC18 (NEB) για διάφορες υποκλωνοποιήσεις και τη δημιουργία κασσετών απαλοιφής γονιδίων

Έκφραση ενδογενών γονιδίων του σακχαρομύκητα

YCp50-YAP1: το ενδογενές γονίδιο *YAP1* κλωνοποιήθηκε στο φορέα YCp50 (Ε. Γεωργιάτσου)

YEp13 γενωμική βιβλιοθήκη σακχαρομύκητα: περιλαμβάνει ενθέματα 5-10kb κλωνοποιημένα στη θέση *Bam*HI του φορέα YEp13 (Kim Nasmyth)

YEp13-MAK3, pRS315-MAK3: το τμήμα *Pvu*II-*Eco*RV (1349bp) ενός κλώνου της βιβλιοθήκης YEp13, το οποίο περιλαμβάνει το γονίδιο *MAK3* (-473/+878), υποκλωνοποιήθηκε στη θέση (*Bam*HI τυφλή) του φορέα YEp13 και στη *Sma*I του pRS315

YEp13-NHP6A, pRS315-NHP6A: το τμήμα -480/+547 του γονιδίου *NHP6A* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *Bam*HI και κλωνοποιήθηκε στην αντίστοιχη θέση των φορέων YEp13 και pRS315

[εκκινητές: 5'-CGGGATCCTTAAACTTCACTGAGCAC-3'

5'-CGGGATCCGTTGACTGAAAAGAGCTG-5']

YEp13-SMK1, pRS315-SMK1: το τμήμα *Eco*RV-*Hpa*I (1714bp) ενός κλώνου της βιβλιοθήκης YEp13, το οποίο περιλαμβάνει το γονιδίο *SMK1* (-138/+1272), υποκλωνοποιήθηκε στη θέση (*Bam*HI τυφλή) του φορέα YEp13 και στη *Sma*I του pRS315

pRS315-AFT1: το τμήμα -759/+216 του γονιδίου *AFT1* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε στη θέση *Sma*I του φορέα pRS315

[εκκινητές: 5'-AGTACACAGGGCAAGGTCAT-3'

5'-ATCCTGATCTTAGCACCGAT-5']

Πρωτεϊνική έκφραση στο σακχαρομύκητα

pAS-AFT1 (έκφραση LexA-Aft1, Θ. Τάρτας): το τμήμα +3/+2070 του γονιδίου *AFT1* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *Sma*I και *Kpn*I και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα YCp91

[εκκινητές: 5'-TCCCCCGGGGAAGGCTTCAATCCGGCTG -3'

5'-GGGGTACCATCTTCTGGCTTCACATACT-3']

pAS-N-AFT1 (έκφραση LexA-N-Aft1, Θ. Τάρτας): το τμήμα +3/+1149 του γονιδίου *AFT1* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *Sma*I και *Kpn*I και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα YCp91

[εκκινητές: 5'-TCCCCCGGGGAAGGCTTCAATCCGGCTG-3'

5'-GGGGTACCGGTCTTACGCAGCCTTGA-3']

pAS-MAC1 (έκφραση LexA-Mac1, Θ. Τάρτας)

pAS-N-MAC1 (έκφραση LexA-N-Mac1, Θ. Τάρτας)

pAS-SSN6 (έκφραση LexA-Ssn6, Δ. Τζαμαρίας)

pAS-N-SSN6(10T) (έκφραση LexA-N-Ssn6^{10TPRs}, Δ. Τζαμαρίας)

pAS-N-SSN6(7T) (έκφραση LexA-N-Ssn6^{7TPRs}, Δ. Τζαμαρίας)

pAS-TUP1 (έκφραση LexA-Tup1, Δ. Τζαμαρίας)

pAS-GCN5 (έκφραση LexA-Gcn5, Γ. Θηραίος)

pGBT9-NHP6A (έκφραση Gal4DBD-Nhp6a): το τμήμα +1/+279 του *NHP6A* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε στη θέση *Sma*I του φορέα pGBT9

[εκκινητές: 5'-CCCCCCCCATATGGTCAACCCCAAGAGAA-5'

5'-AGCCAAAGTGGCGTTATAAT-5']

pGBT9-ESAI (έκφραση Gal4DBD-Esa1, Τ. Γεωργακόπουλος)

pACT2-AFTI (έκφραση Gal4AD-Aft1, Α. Βουτσινά)

pACT2-N-AFTI (έκφραση Gal4AD-Aft1 Α. Βουτσινά)

pACT2-C-AFTI (έκφραση Gal4AD-Aft1): το τμήμα +1001/+2070 του *AFTI* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε στη θέση (*Bam*HI τυφλή) του φορέα pACT2

[εκκινητές: 5'-TCCCCCGGGCCATGCTTACCCTCTGTA-3'

5'-GGGGTACCATCTTCTGGCTTCACATACT-3']

pACT2-MAC1 (έκφραση Gal4AD-Mac1, Α. Βουτσινά)

pACT2-N-SSN6(10T) (έκφραση Gal4AD-N-Ssn6^{10TPRs}): το τμήμα *Sma*I-*Pvu*II της κατασκευής pAS-SSN6 κλωνοποιήθηκε στη θέση *Sma*I του φορέα pACT2

pACT2-SWI6 (έκφραση Gal4AD-Aft1, Τ. Γεωργακόπουλος): κλώνος βιβλιοθήκης, στο φορέα pACT2, που περιλαμβάνει τμήμα του γονιδίου *SWI6* (περίπου +650/+1150 από 2412bp συνολικά)

pACT2-NHP6A (έκφραση Gal4AD-Aft1): το τμήμα +1/+279 του *NHP6A* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε στη θέση *Sma*I του φορέα pACT2

pN-SSN6(7T)-VP16 (έκφραση Ssn6^{7TPRs}-VP16, Δ. Τζαμαρίας)

pTUP1-VP16 (έκφραση Tup1-VP16, Δ. Τζαμαρίας)

pYX142-AFTI (έκφραση HA-Aft1): το τμήμα *Eco*RI-*Sac*I της κατασκευής pAS-*AFTI* κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pYX142

pYX142-N-AFTI(2-280) (έκφραση HA-N-Aft1(2-280)): από την κατασκευή pYX142-*AFTI* απομακρύνθηκε το τμήμα *Msc*I-*Sac*I και στη συνέχεια η θέση *Sac*I τυφλοποιήθηκε και το πλασμίδιο επανασυνδέθηκε

pYX142-N-AFTI(2-330) (έκφραση HA-N-Aft12-330)): από την κατασκευή pYX142-*AFTI* απομακρύνθηκε το τμήμα *Nsi*I-*Sac*I και στη συνέχεια οι δύο θέσεις τυφλοποιήθηκαν και το πλασμίδιο επανασυνδέθηκε

pYX142-SSN6 (έκφραση HA-Ssn6): το τμήμα *Eco*RI-*Sac*I της κατασκευής pAS-SSN6 κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pYX142

pYX142-N-SSN6(10T) (έκφραση HA-Ssn6^{10TPRs}): το τμήμα *Eco*RI-*Pvu*II της κατασκευής pAS-SSN6 κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *Eco*RI-*Eco*RV του φορέα pYX142

pYX142-N-SSN6(7T) (έκφραση HA-Ssn6^{7TPRs}): το τμήμα *EcoRI*-(*MluI* τυφλή) της κατασκευής pAS-SSN6 κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *EcoRI-EcoRV* του φορέα pYX142

pYX142-N-SSN6(6T) (έκφραση HA-Ssn6^{6TPRs}): το τμήμα *EcoRI*-(*KpnI* τυφλή) της κατασκευής pAS-SSN6 κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *EcoRI-EcoRV* του φορέα pYX142

pYX142-N-SSN6(3T) (έκφραση HA-Ssn6^{3TPRs}): το τμήμα *EcoRI*-(*BstXI* τυφλή) της κατασκευής pAS-SSN6 κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *EcoRI-EcoRV* του φορέα pYX142

pYX142-NHP6A (έκφραση HA-Nhr6a): από την κατασκευή pYX142-SSN6 απομακρύνθηκε το τμήμα *SmaI-NheI* και στις θέσεις *SmaI*-(*NheI* τυφλή) κλωνοποιήθηκε το τμήμα +1/+547 του γονιδίου *NHP6A* (προϊόν PCR)

[εκκινητές: 5'-CCCCCCCCATATGGTCAACCCAAGAGAA-5'
5'-CGGGATCCGTTGACTGAAAAGAGCTG-5']

pYX142-GCN5 (έκφραση HA-Gcn5, Γ. Θηραίος)

pVTU-SSN6 (έκφραση 6xHis-Ssn6): το τμήμα *SmaI-NcoI* της κατασκευής pYX142-SSN6 κλωνοποιήθηκε στις θέσεις (*NheI* blunt)-*NcoI* του φορέα pVTU260

pVTU-NHP6A (έκφραση 6xHis-Ssn6): το τμήμα +1/+547 του γονιδίου *NHP6A* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις (*NheI* blunt)-*BamHI* του φορέα pVTU260

Πρωτεϊνική έκφραση σε βακτήρια

pTYB1-NHP6A (έκφραση Nhr6a-intein-CBD): το τμήμα +1/+279 του γονιδίου *NHP6A* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *NdeI* και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *NdeI*-(*SapI* τυφλή) του φορέα pTYB1

pTYB1-NHP6B (έκφραση Nhr6b-intein-CBD): το τμήμα +1/+297 του γονιδίου *NHP6B* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *NdeI* και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *NdeI*-(*SapI* τυφλή) του φορέα pTYB1

[εκκινητές: 5'-CCCCCCCCATATGGCCGCAACTAAAGAA-3'
5'-AGCACGTGTAGCATTGTACA-3']

pET26b-ESAI (έκφραση Esa1-6xHis): το τμήμα +1/+1335 του γονιδίου *ESAI* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *NdeI* και *XhoI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pET26b

[εκκινητές: 5'-CCCCCCCCATATGTC~~CC~~ATGACGGAAAA-3']

5'-CCCCCTCGAGCCAGGCAAAGCGTAA-3']

pET22b-*ESAI-GFP* (έκφραση *Esa1-GFP-6xHis*): το τμήμα +1/+1335 του γονιδίου *ESAI* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε αρχικά στη θέση *SmaI* του φορέα pGFP-N1 (Clontech) και στη συνέχεια το τμήμα *Asp718I-XbaI* (*ESAI-GFP*) του πλασμιδίου που προέκυψε τυφλοποιήθηκε και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις (*NdeI* τυφλή)-(*XhoI* τυφλή) του φορέα pET22b

pET22b-*GCN5* (έκφραση *Gcn5-6xHis*, Γ. Θηραίος)

pGEX2T-N-*SSN6(10T)* (έκφραση *GST-N-Ssn6^{10TPRs}*): το τμήμα *SmaI-PvuII* της κατασκευής pYX142-*SSN6* κλωνοποιήθηκε στη θέση *SmaI* του φορέα pGEX2T

pGEX2T-*NHP6A* (έκφραση *GST-Nhp6a*): το τμήμα +1/+547 του γονιδίου *NHP6A* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε στη θέση *SmaI* του φορέα pGEX2T

pRSET-*AFT1* (έκφραση *6xHis-Aft1*): το τμήμα +3/+2070 του γονιδίου *AFT1* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε στη θέση *PvuII* του φορέα pRSET-C

pRSET-N-*AFT1(2-330)* (έκφραση *6xHis-N-Aft1*): από την προηγούμενη κατασκευή απομακρύνθηκε το τμήμα *NsiI-NcoI* και οι δύο θέσεις τυφλοποιήθηκαν και επανασυνδέθηκαν

pRSET-C-*AFT1(335-690)* (έκφραση *6xHis-C-Aft1*): το τμήμα +1001/+2070 του γονιδίου *AFT1* (προϊόν PCR) κλωνοποιήθηκε στη θέση *PvuII* του φορέα pRSET-C

[εκκινητές: 5'-TCCCCCGGGCCATGCTTACCCTCTGTA-3'

5'-GGGGTACCATCTTCTGGCTTCACATACT-3']

pRSET-N-*TUPI* (έκφραση *6xHis-N-Tup1(1-200)*, Μ. Παπαμίχος)

Γονίδια αναφοράς

FRE2*_(-930/-1)-*LacZ: το τμήμα -930/-1 του γονιδίου *FRE2* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* και κλωνοποιήθηκε στην αντίστοιχη θέση του φορέα YCr50Z (Ε. Γεωργιάτσου)

[εκκινητές: 5'-CGGGATCCTTAGCGTGGTATTTCTGG-3'

5'-CGGGATCCATTATATTCGTTGGGTTTC-3']

FRE2*_(-333/-1)-*LacZ: το τμήμα -333/-1 του γονιδίου *FRE2* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* και κλωνοποιήθηκε στην αντίστοιχη θέση του φορέα YCr50Z

[εκκινητές: 5'-CGGGATCCGGTAATGGTTGCATTGAC-3'

5'-CGGGATCCATTATATTCGTTGGGTTTC-3']

FRE2*_(-655/-419)-*HIS3*_{TR}-*LacZ: το τμήμα -655/-419 του γονιδίου *FRE2* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *Bam*HI και *Eco*RI και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα VS11 (39)

[εκκινητές: 5'-GCGGATCCATCATAATGTCTCTCAGCC-3'
5'-GGAATTCGACCTGGGTGCAATTACG-3']

LexAop-HIS3*_{TR}-*LacZ (Γ. Θηραίος)

4xLexAop-GAL1*_{TATA}-*LacZ (pJK103) [7]

4xLexAop-CYCI*_{2xUAS+TATA}-*LacZ (pJK1621) [156]

FRE2*_(-816/-1)-*HIS3: το τμήμα +1/+631 του γονιδίου *HIS3* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *Bam*HI και *Kpn*I και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα YIp55 και στη συνέχεια το τμήμα -816/+3 του γονιδίου *FRE2* (προϊόν PCR), αφού υδρολύθηκε με *Bam*HI, κλωνοποιήθηκε στην αντίστοιχη θέση του πλασμιδίου που προέκυψε από την προηγούμενη διαδικασία

[εκκινητές *HIS3*: 5'-CGGGATCCAATGACAGAGCAGAAACC-3'
5'-CATCGTTGGTACCATTGGGC-3']

εκκινητές *FRE2*: 5'-CGGGATCCTGAGTGTTTTTGATAGGGGA-3'
5'-CGGGATCCTATATTCGTTGGGTTTCATAAG-3']

Τεχνικές για νουκλεϊνικά οξέα

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA από βακτήρια

Για παρασκευή σε μικρή κλίμακα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λύσης με βρασμό [139]. Η παρασκευή σε μεσαία ή μεγάλη κλίμακα έγινε είτε με συνδυασμό αλκαλικής λύσης και κατακρήμνισης του DNA με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG 8000) [139] είτε, όταν χρειάστηκε να απομονωθεί DNA πολύ υψηλής καθαρότητας, με χρήση ειδικών στηλών καθαρισμού νουκλεϊνικών οξέων της Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Διαδικασίες τροποποίησης του DNA

Περιέλαβαν (α) τον τεμαχισμό μορίων με υδρόλυση τους από ενδονουκλεάσες περιορισμού, (β) τη δημιουργία τυφλών άκρων σε μόρια που είχαν (5' ή 3') προεξέχοντα άκρα, με χρήση του κομματιού Klenow της DNA πολυμεράσης I, (γ) την αποφωσφορυλίωση μορίων με υδρόλυση των 5' ελεύθερων φωσφορικών ομάδων τους από την αλκαλική φωσφατάση και (δ) τη συνένωση μορίων με χρήση της T4

DNA λιγάσης. Οι παραπάνω διαδικασίες εφαρμόστηκαν όπως έχει περιγραφτεί [139] και σε συμφωνία με τις οδηγίες των εταιρειών κατασκευής των αντίστοιχων ενζύμων.

Ηλεκτροφορητική ανάλυση και απομόνωση του DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό του μεγέθους μορίων DNA, αλλά και για μια εκτίμηση της ποσότητάς τους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης [139]. Η απομόνωση ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων τμημάτων DNA έγινε είτε με ειδικά συστήματα εξαγωγής DNA από πήκτωμα (QiaQuick ή Concert Gel Extraction Kits) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών είτε με χρήση ειδικού πηκτώματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης όπως έχει περιγραφτεί [139].

Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και ο μετασηματισμός τους έγιναν με τη συμβατική χημική μέθοδο των χλωριούχου ασβεστίου και χλωριούχου ρουβιδίου ή με τη μέθοδο εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου (electroporation) [7].

Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κλώνων (ανάλυση Grunstein)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λύσης *in situ* μετασηματισμένων βακτηριακών αποικιών πάνω σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης, τα οποία στη συνέχεια υβριδοποιήθηκαν με ειδικούς ραδιοσημασμένους ανιχνευτές γονιδίων (κωδικά τμήματα που προέκυψαν με PCR), με τη μέθοδο Church. Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν όπως έχει περιγραφτεί [139].

Ραδιοσήμανση του DNA

Δίκλιωνα μόρια DNA ραδιοσημάνθηκαν είτε (α) με τη μέθοδο μετάφρασης εγκοπής (nick translation) που βασίζεται στη δημιουργία τυχαίων εγκοπών στο DNA και στην επιδιόρθωσή τους από τη DNA πολυμεράση I, παρουσία ραδιενεργών νουκλεοτιδίων είτε (β) με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών (random priming) που βασίζεται στην παροδική αποδιάταξη του DNA και στη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων από το κομμάτι Klenow της DNA πολυμεράσης I, παρουσία τυχαίων εξαμερών εκκινητών και ραδιενεργών νουκλεοτιδίων. Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (μονόκλιωνα ή δίκλιωνα) ραδιοσημάνθηκαν με χρήση της T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν όπως έχει περιγραφτεί [139].

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA

Εφαρμόστηκε, η ενζυμική μέθοδος του Sanger [139] που βασίζεται στο συνδυασμό ραδιενεργής επιμήκυνσης μιας αλυσίδας DNA από το ένζυμο sequenase και τερματισμού της με την ενσωμάτωση τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων. Η διαδικασία έγινε με χρήση των υλικών του T7 Sequenase DNA Sequencing Kit της USB, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Χρησιμοποιήθηκε καθαρό DNA κλωνοποιημένο στους φορείς pBluescript, pUC18 ή YEp13 ή μη κλωνοποιημένο προϊόν PCR ως μήτρα, κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές και α -[³⁵S]dATP για τη σήμανση των μορίων. Επίσης, αλληλουχίσεις ακολουθιών DNA παραγγέλθηκαν στα Εργαστήρια Μικροχημείας - Ι.Τ.Ε. και Γενωμικής Έρευνας - Ι.Μ.Β.Β.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μια τυπική αντίδραση PCR περιείχε σε όγκο 25 μ l διαλύματος θερμοπολυμερισμού (καθοριζόμενου από τον κατασκευαστή του ενζύμου): 25ng πλασμιδιακού ή 250ng γενωμικού DNA, 0.2mM από κάθε dNTP, 200ng ενός ζεύγους εκκινητών, 0.5 μ l Taq (Minotech) ή Vent (NEB) και 1.5-2mM MgCl₂. Οι παράμετροι στα προγράμματα θερμοπολυμερισμού καθορίστηκαν ανάλογα με το T_m των εκκινητών και το μέγεθος των προϊόντων. Ένα τυπικό πρόγραμμα είχε ως εξής:

- 4min στους 94°C (αποδιάταξη),
- 30sec στους 94°C, 30sec στους 45-65°C, 1-2min στους 72°C (25-30 κύκλοι) (επιμήκυνση)
- 5min στους 72°C (τελική επιμήκυνση)

Ανάλυση DNA κατά Southern και RNA κατά Northern

Τα διάφορα δείγματα DNA ή RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης (στην περίπτωση του RNA τα τελευταία είχαν πυκνότητα 1.5% και περιείχαν φορμαλδεΰδη) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε νάυλον μεμβράνες όπου στερεώθηκαν ομοιοπολικά με έκθεση στο UV για 4min. Τελικά υβριδοποιήθηκαν με ειδικούς ραδιοσημασμένους ανιχνευτές γονιδίων (κωδικά τμήματα που προέκυψαν με PCR), με τη μέθοδο Church. Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν όπως έχει περιγραφεί [139].

Ανάλυση προστασίας από RNάση A (RNase A protection assay)

Πρόκειται για μια υψηλής ευαισθησίας τεχνική ανίχνευσης mRNA. Βασίζεται στην υβριδοποίηση ολικού RNA με έναν αντιπαράλληλο RNA ανιχνευτή (antisense RNA probe) που είναι συμπληρωματικός με το προς ανίχνευση mRNA (δηλαδή προέρχεται από τη μεταγραφή του κλώνου 3'-5' του DNA και όχι του 5'-3' από όπου μεταγράφεται το mRNA). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των mRNAs των γονιδίων *FRE1*, *FRE2* και *HIS3* σε διάφορα στελέχη ζύμης. Για τη δημιουργία αντιπαράλληλων RNA ανιχνευτών των γονιδίων αυτών, χρησιμοποιήθηκαν τρία ανασυνδυασμένα πλασμίδια pBluescript: το πρώτο είχε κλωνοποιημένο στη θέση *EcoRV* το γενωμικό τμήμα *PvuII-SacI* (-680/+1893) του *FRE1*, το δεύτερο στην ίδια θέση το γενωμικό τμήμα *MluI-AflIII* (-2041/+2340) του *FRE2* και το τρίτο στη θέση *HindIII* το κωδικό τμήμα +305/+591 του *HIS3*. Τα τρία πλασμίδια έγιναν γραμμικά με πέψη στις θέσεις *SpeI* (+1893) του *FRE1*, *BsaHI* (+1682) του *FRE2* και *MseI* (+312) του *HIS3* αντίστοιχα και αποτέλεσαν τις μήτρες για τη μεταγραφή των τριών ανιχνευτών από την T3 (ή την T7 στην περίπτωση του *HIS3*) RNA πολυμεράση. Οι αντιδράσεις μεταγραφής, που έγιναν σε όγκο 20μl και περιλάμβαναν 0.5μl RNasin, 0.5mM “κρύα” ATP, CTP και GTP, 10μM “κρύο” UTP, 5X διάλυμα μεταγραφής, 0.5μg γραμμικό πλασμίδιο, 3μl α-[³²P]UTP και 10u T3 ή T7 RNA πολυμεράση, αρχικά επώαστηκαν για 1h στους 37°C και, μετά την προσθήκη 1μl (10u) DNάσης, για άλλα 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε αύξηση του όγκου στα 200μl, καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 250μl ισοπροπανόλη μετά από προσθήκη 46μl 10M οξικού αμμωνίου (2.3M τελική συγκέντρωση) και 1μg tRNA και τελικά επαναδιάλυση σε 20μl διαλύματος υβριδοποίησης (75% φορμαμίδιο, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA). Στη συνέχεια, αφού υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα των ανιχνευτών, ποσότητα από καθέναν αντίστοιχη με 10⁵ cpm υβριδοποιήθηκε με 25μg ολικού RNA στους 45°C, όλη τη νύχτα, σε 20μl διαλύματος υβριδοποίησης. Το επόμενο πρωί, το μίγμα αραιώθηκε σε 300μl διαλύματος 0.3 NaCl, 5mM EDTA και επώαστηκε με RNάση A (30μg/ml) στους 20°C για 30min και διαδοχικά με πρωτεΐνάση K (300μg/ml σε 0.1% SDS) στους 37°C για 20min. Ακολούθησαν διαδοχικά: καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη, αποδιάταξη με βρασμό για 5min, ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σε πήκτωμα ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης (19:1) 6% (που περιείχε 8.3M ουρία) και αυτοραδιογραφία.

Χαρτογράφηση του σημείου έναρξης της μεταγραφής (Primer extension analysis)

Έγινε προσδιορισμός του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου *FRE2* με ανάλυση επέκτασης της ειδικής για το γονίδιο αλληλουχίας-εκκινητή 5'-**CAAAATAGCGCTCAAGATGGACGTCCAATG**-3' (+33/+4). Η παραπάνω αλληλουχία σημάνθηκε στο 5' άκρο με γ - ^{32}P dATP και 1ng αυτής (5×10^5 cpm) αναμίχθηκε με 40μg RNA σε συνολικό όγκο 30μl διαλύματος υβριδοποίησης (150mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA). Το μίγμα βράστηκε για 2.5min (αποδιάταξη) και στη συνέχεια ψύχθηκε αργά, κατακρημνίστηκε με αιθανόλη, επαναδιαλύθηκε σε 20μl νερό και χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής μαζί με 4μl διάλυμα ανάστροφης μεταγραφής 5X (καθορίζεται από τον κατασκευαστή του ενζύμου), 1μl dNTPs (10mM), 1μl RNasin, 0.5μl ανάστροφη μεταγραφάση (MLV-RT) και νερό μέχρι τα 40μl. Η αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 1h και τερματίστηκε με την προσθήκη 1μl EDTA 0.5M. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για ακόμα 1/2h με 0.5μl RNase A (10μg/μl), καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και τελικά επαναδιάλυση σε 4μl νερό (+6μl formamide loading buffer). Το μέγεθος του ραδιοσημασμένου DNA που συντέθηκε προσδιορίστηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παράλληλα με αντιδράσεις νουκλεοτιδικού προσδιορισμού γνωστής αλληλουχίας.

Τεχνικές για πρωτεΐνες

Ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και ανοσοανίχνευση ακινητοποιημένων σε μεμβράνη πρωτεϊνών (Western blot analysis)

Οι διάφορες υπό μελέτη πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν, ανάλογα με τα μεγέθη τους, σε αποδιατακτικά πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδης 8-15%, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ανοσοεντοπισμός τους με χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων (πρωτογενών και δευτερογενών) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιρειών. Για την τελική πρωτεϊνική ανίχνευση εφαρμόστηκε η μέθοδος ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που στηρίζεται στη δράση της συζευγμένης με τα δευτερογενή αντισώματα υπεροξειδάσης HRP. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν όπως έχουν περιγραφεί [7, 139].

Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

Γονίδια που κωδικοποιούν υπό μελέτη πρωτεΐνες κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς με τους οποίους στη συνέχεια μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E. coli* ER2566. Ακολούθησε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με προσθήκη IPTG στις βακτηριακές καλλιέργειες (0.3mM τελική συγκέντρωση) και επώαση στις κατάλληλες συνθήκες (συνήθως στους 30°C για 3h).

Για την παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, τα κύτταρα επαγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 50ml φυγοκεντρήθηκαν για 5min, επαναδιαλύθηκαν σε 250μl διαλύματος λύσης (10% γλυκερόλη, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0,05% Triton, 1mM PMSF, 5mg/ml leupeptin), ηχοβολήθηκαν 4 φορές από 15sec (με παρεμβολές στον πάγο) και φυγοκεντρήθηκαν εν ψυχρώ για 30sec. Το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20°C.

Για την απομόνωση και καθαρισμό βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών, ακολουθήθηκαν διάφορες μέθοδοι ανάλογα με τη μορφή με την οποία οι πρωτεΐνες αυτές εκφράστηκαν.

- Πρωτεΐνες με καρβοξυτελική διαδοχική συγχώνευση ιντεΐνης και CBD (chitin binding domain) (φορέας έκφρασης pTYB) απομονώθηκαν σε στήλη χιτίνης με χρήση του συστήματος IMPACT (N.E.B.), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Πρωτεΐνες με αμινοτελική συγχώνευση GST (Glutathione S-Transferase) (φορέας έκφρασης pGEX) απομονώθηκαν με χρήση Glutathione Sepharose 4B (Amersham) ως εξής: Τα κύτταρα επαγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 500ml επαναδιαλύθηκαν σε 10ml διαλύματος λύσης (100mM NaCl, 20% γλυκερόλη, 20mM HEPES pH 7.9, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0.5% BSA, 1% Triton, 1mM PMSF και 5mg/ml leupeptin), ηχοβολήθηκαν 3 φορές από 20sec (με παρεμβολές στον πάγο) και φυγοκεντρήθηκαν εν ψυχρώ για 15min. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν εξισορροπημένα σφαιρίδια Glutathione Sepharose (30μl/100ml αρχικής καλλιέργειας) και ακολούθησε επώαση στους 4°C για 1h (με περιστροφική ανάδευση). Τα σφαιρίδια πλύθηκαν 5 φορές με τουλάχιστον ίσο όγκο του παραπάνω διαλύματος (χωρίς BSA) και φυλάχθηκαν στους 4°C.
- Πρωτεΐνες με αμινοτελική συγχώνευση 6xHis (φορείς έκφρασης pRSET, pET) απομονώθηκαν με χρήση Ni-NTA Agarose (Qiagen) ως εξής: Τα κύτταρα επαγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 100ml επαναδιαλύθηκαν σε 2ml διαλύματος A (50mM HEPES pH 7.9, 500mM NaCl, 0.1% NP40, 5mM

ιμιδαζόλιο, 0.25% BSA, αναστολείς πρωτεασών), ηχοβολήθηκαν 3 φορές από 20sec (με παρεμβολές στον πάγο) και φυγοκεντρήθηκαν εν ψυχρώ για 15min. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 100μl εξισορροπημένα σφαιρίδια Ni-NTA Agarose και ακολούθησε επώαση στους 4°C για 1h (με περιστροφική ανάδευση). Τα σφαιρίδια πλύθηκαν 2 φορές από 20min σε 15ml διάλυμα B (όπως το A, αλλά με 50mM ιμιδαζόλιο και χωρίς BSA) και ακολούθησε έκλουση σε 300μl διαλύματος αλληλεπίδρασης (βλ. παρακάτω) στο οποίο προστέθηκε ιμιδαζόλιο (250mM), στους 4°C για 2h (με περιστροφική ανάδευση).

Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vitro*

Ο έλεγχος αλληλεπίδρασης μεταξύ βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών συγχωνευμένων με GST και αντίστοιχων συγχωνευμένων με 6xHis έγινε ως εξής: 2μg συγχωνευμένης με 6xHis πρωτεΐνης αναμίχθηκαν με ένα μικρό ποσό σφαιριδίων Glutathione Sepharose στα οποία ήταν δεσμευμένη αντίστοιχη ποσότητα GST υβριδίου, σε συνολικό όγκο 200μl διαλύματος αλληλεπίδρασης (75mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8, 0.01% NP40, 0.25% BSA, αναστολείς πρωτεασών). Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 8-12h (με περιστροφική ανάδευση), πλύσιμο των σφαιριδίων στο ίδιο διάλυμα (χωρίς BSA) και ανάλυση των πρωτεϊνών που κατακρατήθηκαν σε αυτά με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση.

Ενζυμική αντίδραση ακετυλίωσης πρωτεϊνών

Σε αυτή, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα καθαρή πρωτεΐνη που εκφράστηκε και απομονώθηκε σε βακτήρια (Nhr6a, Nhr6b) και ως ένζυμο βακτηριακό εκχύλισμα στο οποίο υπερεκφράστηκε μια ακετυλοτρανσφεράση (Esa1 ή Gcn5). Έγινε σε συνολικό όγκο 20μl και περιλάμβανε 1μl εκχύλισμα-ένζυμο, 4μl διάλυμα ακετυλίωσης 5X (250mM Tris-HCl pH 8, 50% γλυκερόλη, 5mM DTT, 0.5mM EDTA), 2-10μg καθαρή πρωτεΐνη-υπόστρωμα και 1μl τριτιωμένο ακετυλοσυνένζυμο A. Επώαστηκε στους 30°C για 30min και αναλύθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης το οποίο στη συνέχεια υποβλήθηκε στη διαδικασία στερέωσης (ή βαφής με coomassie), ενίσχυσης σήματος, ξήρανσης και τελικά αυτοραδιογραφίας.

Ανάλυση μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA λόγω σύνδεσής του με πρωτεΐνη (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA)

Στα πειράματα ελέγχου της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές ραδιοσημασμένα δίκλιωνα 40μερή ή 25μερή νουκλεοτίδια (αντιπροσωπευτικά περιοχών των υποκινητών *FRE1*, *FRE2* και *CTR1*) και πεπτιδία Mac1 ή Aft1 που συντέθηκαν *in vitro* σε εκχύλισμα σπερματοκυττάρων σιταριού με το σύστημα συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης (TNT Coupled Wheat Germ Extract System, Promega) σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή. Ως μήτρες για τη σύνθεση των διαφόρων πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια pBluescript στα οποία ήταν κλωνοποιημένα κωδικά τμήματα των γονιδίων *MAC1* ή *AFT1* (pBluescript-*MAC1*(1-417) (Ε. Γεωργιάτσου), pBluescript- *MAC1*(1-159, 1-322, 1-337, Δ(323-337), 42-417) (Α. Βουτσινά) και pBluescript-*AFT1*). Στις αντιδράσεις σύνδεσης DNA-πρωτεΐνης, 5fmol ραδιοσημασμένου ανιχνευτή αναμίχθηκαν με 1μl εκχυλίσματος, σε συνολικό όγκο 15μl διαλύματος που περιλάμβανε 12% γλυκερόλη, 12mM HEPES-NaOH pH 7.9, 60mM KCl, 5mM MgCl₂, 4mM Tris-HCl pH 8, 0.6mM EDTA, 0.6mM DTT και 0.5μg herring sperm DNA. Τα μίγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20min, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης 1.5% (120V, 4°C) (ή σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 6%) και αναλύθηκαν με αυτοραδιογραφία.

Ειδικές τεχνικές για το σακχαρομύκητα

Απομόνωση γενωμικού DNA και ολικού RNA

Γενωμικό DNA σακχαρομύκητα απομονώθηκε με χρήση γυάλινων σφαιριδίων, όπως έχει περιγραφτεί [7], από καλλιέργειες 10ml αναπτυγμένες σε YPD. Ολικό RNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης [7] από καλλιέργειες 30ml αναπτυγμένες σε SC στις κατάλληλες κατά περίπτωση συνθήκες.

Μετασηματισμός κυττάρων

Η παρασκευή και ο μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων σακχαρομύκητα έγινε με τη μέθοδο του οξικού λιθίου (TRAF0).

Ανάκτηση πλασμιδίου από το σακχαρομύκητα στην *E. coli*

Κύτταρα μετασηματισμένα με το προς ανάκτηση πλασμίδιο (καλλιέργεια 5ml σε YPD) πλύθηκαν σε νερό και επαναδιαλύθηκαν σε 200μl διαλύματος 100mM NaCl,

10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0.1% SDS. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε αυτά 200μl γυάλινα σφαιρίδια και 200μl φαινόλη-χλωροφόρμιο και αναδεύτηκαν ισχυρά (vortex) για 3min. Τελικά, φυγοκεντρήθηκαν για 20min στις 14000rpm και 5-10μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli*.

Προσδιορισμός ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης και ανάλυση δύο υβριδίων σε μετασχηματισμένα κύτταρα

Καλλιέργειες 5ml μετασχηματισμένων με τα κατάλληλα πλασμίδια στελεχών αναπτύχθηκαν αρχικά σε SC μέχρι $OD_{550}=1.5$. Στη συνέχεια αραιώθηκαν 5-15 φορές (ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης) και αναπτύχθηκαν για ακόμη 7h στο ίδιο μέσο, στο οποίο κατά περίπτωση προστέθηκε ή όχι ο χηλικός δεσμευτής του σιδήρου BPS (επαγωγικές/μη επαγωγικές συνθήκες). Τελικά, έγινε συλλογή των κυττάρων και μέτρηση σε αυτά της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης όπως έχει περιγραφεί [7].

Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (whole cell extracts)

Για την ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα, παρασκευάστηκαν τυπικά κυτταρικά εκχυλίσματα ως εξής: Τα κύτταρα καλλιέργειας 50ml, αναπτυγμένα σε OD_{550} μέχρι 1, αφού πλύθηκαν διαδοχικά σε μισό όγκο νερού και 1.5ml διαλύματος εκχύλισης (10% γλυκερόλη, 400mM $(NH_4)_2SO_4$, 10mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 7mM β-merc, 1mM PMSF, 5mg/ml leupeptin), επαναδιαλύθηκαν σε 200μl του τελευταίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε αυτά 200μl γυάλινα σφαιρίδια και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) 8 φορές από 30sec με παρεμβολές ίσου χρόνου στον πάγο. Το υπερκείμενο κρατήθηκε, στα σφαιρίδια προστέθηκαν άλλα 150μl διαλύματος εκχύλισης και ακολούθησε νέα ισχυρή ανάδευση. Το δεύτερο υπερκείμενο προστέθηκε στο πρώτο και το συνολικό (περίπου 350μl) φυγοκεντρήθηκε εν ψυχρώ για 15min για την απομάκρυνση του ιζήματος και φυλάχθηκε στους $-70^\circ C$.

Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vivo*

Η πιθανή αλληλεπίδραση ανάμεσα σε μια πρωτεΐνη με καρβοξυτελική συγχώνευση 6xHis και μια δεύτερη συντηγμένη με τον επίτοπο HA, εξετάστηκε σε κύτταρα σακχαρομύκητα ως εξής: Από καλλιέργεια 150-300ml ($OD_{550}=0.8$) στην οποία εκφράζονταν πλασμιδικά οι δύο υποψήφιες για αλληλεπίδραση πρωτεΐνες και η

οποία αναπτύχθηκε σε SC κάτω από συνθήκες παρουσίας ή έλλειψης μετάλλων (ανάλογα με την περίπτωση), παρασκευάστηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Ο τρόπος παρασκευής ήταν αντίστοιχος με αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω και η εκχύλιση έγινε σε 50mM HEPES-KOH pH 7.5, 5mM MgAc, 75mM NaAc, 0.1% NP-40, 0.5mg/ml BSA, 5mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF και 5mg/ml leupeptin ενώ ο τελικός όγκος του εκχυλίσματος ήταν 800μl. Στη συνέχεια, αυτό επώαστηκε με 30μl σφαιρίδια Ni-NTA Agarose στους 4°C για 1h με κυκλική ανάδευση κι έπειτα τα σφαιρίδια πλύθηκαν 4 φορές από 10min στο ίδιο διάλυμα χωρίς BSA. Τελικά, οι πρωτεΐνες που κατακρατήθηκαν σε αυτά αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοανιχνεύθηκαν.

Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin ImmunoPrecipitation assay - ChIP)

Για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και DNA σε χρωματινικό περιβάλλον εφαρμόστηκε η μέθοδος της ομοιοπολικής διασύνδεσης και ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης *in vivo*, σύμφωνα με τους Kuo και Allis [82]. Στη μέθοδο έγιναν συγκεκριμένες τροποποιήσεις οι οποίες αναφέρονται παρακάτω.

Τα κύτταρα καλλιέργειας 50ml ($OD_{550} < 1$) επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση, παρουσία 1% φορμαλδεΐδης, για 20min (στερέωση) και στη συνέχεια, αφού προστέθηκε γλυκίνη σε συγκέντρωση 125mM, για επιπλέον 5min (τερματισμός της στερέωσης). Μετά, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 3min και πλύθηκαν 3 φορές σε 20ml TBS (20mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl) και 1 φορά σε 1ml διαλύματος λύσης (50mM HEPES-KOH pH 7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton, 0.1% Na-deoxycholate). Τελικά επαναδιαλύθηκαν σε 400μl διαλύματος λύσης στο οποίο προστέθηκαν 500μl γυάλινα σφαιρίδια και αναστολείς πρωτεασών (1mM PMSF, 5mg/ml leupeptin). Ακολούθηκε ισχυρή ανάδευση (vortex) εν ψυχρώ για 1/2h, φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 1min, συλλογή των υπερκειμένων λυμένων κυττάρων και ηχοβόλησή τους 5 φορές από 10sec (με παρεμβολές των 30sec στον πάγο) με αποτέλεσμα τη θραύση του DNA τους σε τμήματα των 500bp κατά μέσο όρο. Το τελικό υπερκείμενο (περίπου 500μl), που προέκυψε από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις των 5min και 20min εν ψυχρώ, περιλάμβανε την καθαρή ολική χρωματίνη και φυλάχθηκε στους -70°C. Από το ολικό χρωματινικό εκχύλισμα, ποσότητα 30μl χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης και ίδια

ποσότητα ως ποσοτικός και ποιοτικός δείκτης της μη ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης.

Παρασκευή ανοσοκατακρημνισμένου DNA (IP): Τα 30μl ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος αραιώθηκαν σε συνολικό όγκο 200μl διαλύματος λύσης (που περιείχε αναστολείς πρωτεασών) και επώαστηκαν με την κατάλληλη ποσότητα αντισώματος (5μl anti-HA ή anti-Myc) στους 4°C όλη τη νύχτα με περιστροφική ανάδευση. Το επόμενο πρωί, προστέθηκαν στο δείγμα 20μg salmon sperm DNA και 30μl εξισορροπημένων σφαιριδίων Protein A Sepharose και έγινε επώασή του εν ψυχρώ για 2h με περιστροφική ανάδευση. Τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 1min και πλύθηκαν, σε θερμοκρασία δωματίου για 10min με περιστροφική ανάδευση, διαδοχικά σε 1.5ml των εξής διαλυμάτων: (α) λύσης, (β) λύσης με 500mM NaCl, (γ) 10mM Tris-HCl pH 8, 250mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 1mM EDTA και (δ) TE. Τελικά, επαναδιαλύθηκαν σε 100μl TE, επώαστηκαν με 20μg RNάση A στους 37°C για 20min και ακολούθησε έκλυση της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης από αυτά με 2 διαδοχικές πλύσεις τους για 15min σε 250μl διαλύματος έκλυσης (1% SDS, 1mM NaHCO₃). Στη συνέχεια, το συνολικό υπερκείμενο (500μl) επώαστηκε στους 65°C για 5h έτσι ώστε να σπάσουν οι ομοιοπολικοί δεσμοί που είχαν δημιουργηθεί. Έπειτα, ακολούθησε επώαση της χρωματίνης με πρωτεΐνωση K στους 50°C για 30min, καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη παρουσία 20μg γλυκογόνου και τελικά επαναδιάλυση σε 100μl TE.

Παρασκευή ολικού κυτταρικού DNA (input): Τα 30μl ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος αραιώθηκαν στα 100μl με TE και έγινε επεξεργασία τους αντίστοιχη με αυτή που περιγράφεται παραπάνω. Τελικά, το δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 1000μl TE.

Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το ολικό κυτταρικό (input) DNA (3μl/100μl και 3μl/1000μl αντίστοιχα) αναλύθηκαν με PCR σε αντιδράσεις των 25μl που περιείχαν 200ng ενός ζεύγους ειδικών εκκινητών, 0.2mM από καθένα dNTP, 0.25μl α-[³²P]dATP και 1.25U πολυμεράσης Taq. Οι παράμετροι θερμοπολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: [4min στους 94°C], [30sec στους 94°C, 30sec στους 52°C, 55sec στους 72°C] (27 κύκλοι) και [5min στους 72°C]. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης 1.7%, αυτοραδιογραφήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση του κατάλληλου λογισμικού. Στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικά για ρυθμιστικές ή κωδικές γονιδιακές

αλληλουχίες οι βασικότερες από τις οποίες ήταν οι: *FRE2* (-596/-297), *FRE1* (-353/-1), *CTR1* (-380/-73), *HTA1* (-655/-373), *TRP3* (-146/+143) και *ACT1* (+415/+724).

Ανάλυση χρωματινικής δομής *in vivo*

Η χρωματινική δομή του υποκινητή *FRE2* αναλύθηκε με διαδοχική χρήση των μεθόδων κατεργασίας διαπερατών σφαιροπλαστών με μικροκοκκική νουκλεάση (MNase) [161] και έμμεσης σήμανσης άκρου (indirect end labeling). Τα κύτταρα καλλιέργειας 100ml (OD₅₅₀=0.8) συλλέχθηκαν, πλύθηκαν σε μισό όγκο νερού, επαναδιαλύθηκαν σε 500μl διαλύματος 10mM Tris-HCl pH 7.5, 20mM EDTA, 0.7M β-merc και επώαστηκαν στους 30°C για 15min. Στη συνέχεια, επανασυλλέχθηκαν και αφού πλύθηκαν σε 1ml 1M σορβιτόλης, επαναδιαλύθηκαν σε 300μl διαλύματος ζυμολύσεως (1M σορβιτόλη, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM β-merc, 20g/ml ζυμολύση) και επώαστηκαν στους 30°C για 5min (δημιουργία σφαιροπλαστών). Οι σφαιροπλάστες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5min και αφού πλύθηκαν σε 1ml 1M σορβιτόλης, επαναδιαλύθηκαν σε 600μl διαλύματος νυστατίνης (1M σορβιτόλη, 20mM Tris-HCl pH 8, 50mM NaCl, 1.5mM CaCl₂, 50μg/ml νυστατίνη) και χωρίστηκαν σε τρία μέρη των 200μl. Σε διάστημα 5min από την επαναδιάλυση στο διάλυμα νυστατίνης, προστέθηκε σε καθένα από τα τρία μέρη η κατάλληλη ποσότητα μικροκοκκικής νουκλεάσης (π.χ. 1, 2 και 4 units αντίστοιχα) και έγινε επώαση στους 37°C για 15min. Ακολούθησε διακοπή της ενζυμικής δράσης με προσθήκη 20μl διαλύματος τερματισμού, προσθήκη 5μl πρωτεΐνης K (20μg/μl), επώαση στους 37°C για 30min, καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και τελικά επαναδιάλυση σε 20μl νερό. Στη συνέχεια, έγινε ολονύκτια πέψη (σε συνολικό όγκο αντίδρασης 30μl) των 20μl του κάθε DNA που προέκυψε από την προηγούμενη διαδικασία με το ένζυμο *XhoI*, το οποίο οριοθετεί (στη θέση +901) το άκρο του προς ανάλυση τμήματος του *FRE2*. Ακολούθησε, το επόμενο πρωί, προσθήκη 10μg RNάσης A στα δείγματα, ηλεκτροφορητική ανάλυσή τους σε πηκτώμα αγαρόζης 1%, μεταφορά Southern και υβριδοποίηση με ειδικό ραδιενεργό ανιχνευτή του *FRE2* (+441/+864).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Agresti, A. and M.E. Bianchi, *HMGB proteins and gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(2): p. 170-8.
2. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(10): p. 940-59.
3. Allain, F.H., et al., *Solution structure of the HMG protein NHP6A and its interaction with DNA reveals the structural determinants for non-sequence-specific binding*. Embo J, 1999. **18**(9): p. 2563-79.
4. Andrews, N.C., M.D. Fleming, and H. Gunshin, *Iron transport across biologic membranes*. Nutr Rev, 1999. **57**(4): p. 114-23.
5. Askwith, C., et al., *The FET3 gene of S. cerevisiae encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake*. Cell, 1994. **76**(2): p. 403-10.
6. Askwith, C. and J. Kaplan, *Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(4): p. 135-8.
7. Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. 1987-2003: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
8. Babcock, M., et al., *Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1709-12.
9. Beers, J., D.M. Glerum, and A. Tzagoloff, *Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33191-6.
10. Blaiseau, P.L., E. Lesuisse, and J.M. Camadro, *Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 34221-6.
11. Brewster, N.K., G.C. Johnston, and R.A. Singer, *A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3491-502.
12. Briat, J.F., et al., *Regulation of plant ferritin synthesis: how and why*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(1-2): p. 155-66.
13. Brown, K.R., et al., *Structures of the cuprous-thiolate clusters of the Mac1 and Ace1 transcriptional activators*. Biochemistry, 2002. **41**(20): p. 6469-76.
14. Bustin, M., *Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5237-46.
15. Bustin, M., L. Trieschmann, and Y.V. Postnikov, *The HMG-14/-17 chromosomal protein family: architectural elements that enhance transcription from chromatin*

- templates*. Semin Cell Biol, 1995. **6**(4): p. 247-55.
16. Casas, C., et al., *The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1997. **13**(7): p. 621-37.
 17. Chen, O.S., S. Hemenway, and J. Kaplan, *Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12321-6.
 18. Chen, O.S. and J. Kaplan, *CCCI suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7626-32.
 19. Conlan, R.S., et al., *The Tup1-Cyc8 protein complex can shift from a transcriptional co-repressor to a transcriptional co-activator*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 205-10.
 20. Costigan, C., D. Kolodrubetz, and M. Snyder, *NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast SLT2 mitogen-activated protein kinase pathway*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2391-403.
 21. Creaven, M., et al., *Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat*. Biochemistry, 1999. **38**(27): p. 8826-30.
 22. Dancis, A., et al., *The Saccharomyces cerevisiae copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25660-7.
 23. Dancis, A., et al., *Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2294-301.
 24. Dancis, A., et al., *Ferric reductase of Saccharomyces cerevisiae: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 3869-73.
 25. Dancis, A., et al., *Molecular characterization of a copper transport protein in S. cerevisiae: an unexpected role for copper in iron transport*. Cell, 1994. **76**(2): p. 393-402.
 26. Davis-Kaplan, S.R., et al., *Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13641-5.
 27. De Freitas, J., et al., *Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies*. Biometals, 2003. **16**(1): p. 185-97.
 28. De Freitas, J.M., et al., *Exploratory and confirmatory gene expression profiling of mac1Delta*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4450-8.

29. De Rome, L. and G.M. Gadd, *Measurement of copper uptake in Saccharomyces cerevisiae using a Cu²⁺-selective electrode*. FEMS Microbiol. Lett., 1987(43): p. 283-287.
30. Dix, D., et al., *Characterization of the FET4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 11770-7.
31. Dix, D.R., et al., *The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26092-9.
32. Eide, D.J., et al., *The vacuolar H(+)-ATPase of Saccharomyces cerevisiae is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism*. Mol Gen Genet, 1993. **241**(3-4): p. 447-56.
33. Formosa, T., et al., *Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN*. Embo J, 2001. **20**(13): p. 3506-17.
34. Foury, F. and O. Cazzalini, *Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria*. FEBS Lett, 1997. **411**(2-3): p. 373-7.
35. Foury, F. and T. Roganti, *Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24475-83.
36. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
37. Fry, C.J. and C.L. Peterson, *Transcription. Unlocking the gates to gene expression*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1847-8.
38. Garland, S.A., et al., *Saccharomyces cerevisiae ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly*. J Mol Biol, 1999. **294**(4): p. 897-907.
39. Georgakopoulos, T. and G. Thireos, *Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription*. Embo J, 1992. **11**(11): p. 4145-52.
40. Georgatsou, E. and D. Alexandraki, *Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(5): p. 3065-73.
41. Georgatsou, E. and D. Alexandraki, *Regulated expression of the Saccharomyces cerevisiae Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes*. Yeast, 1999. **15**(7): p. 573-84.
42. Georgatsou, E., et al., *The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13786-92.

43. Glerum, D.M., A. Shtanko, and A. Tzagoloff, *Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14504-9.
44. Glerum, D.M., A. Shtanko, and A. Tzagoloff, *SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20531-5.
45. Gounalaki, N. and G. Thireos, *Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response*. Embo J, 1994. **13**(17): p. 4036-41.
46. Graden, J.A. and D.R. Winge, *Copper-mediated repression of the activation domain in the yeast Mac1p transcription factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5550-5.
47. Gross, C., et al., *Identification of the copper regulon in Saccharomyces cerevisiae by DNA microarrays*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32310-6.
48. Harshman, K.D., W.S. Moye-Rowley, and C.S. Parker, *Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4*. Cell, 1988. **53**(2): p. 321-30.
49. Hassett, R., et al., *The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, 2000. **351 Pt 2**: p. 477-84.
50. Hassett, R. and D.J. Kosman, *Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1995. **270**(1): p. 128-34.
51. Hassett, R.F., A.M. Romeo, and D.J. Kosman, *Regulation of high affinity iron uptake in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Role of dioxygen and Fe*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7628-36.
52. Heaton, D.N., et al., *The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex*. Biochemistry, 2001. **40**(3): p. 743-51.
53. Heredia, J., M. Crooks, and Z. Zhu, *Phosphorylation and Cu⁺ coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8793-7.
54. Herrera, J.E., et al., *Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3466-73.
55. Himelblau, E. and R.M. Amasino, *Delivering copper within plant cells*. Curr Opin Plant Biol, 2000. **3**(3): p. 205-10.
56. Hiser, L., et al., *Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase*. J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 619-

- 23.
57. Hughes, T.R., et al., *Functional discovery via a compendium of expression profiles*. Cell, 2000. **102**(1): p. 109-26.
58. Jamison McDaniels, C.P., et al., *The yeast transcription factor Mac1 binds to DNA in a modular fashion*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26962-7.
59. Jensen, L.T. and V.C. Culotta, *Role of Saccharomyces cerevisiae ISA1 and ISA2 in iron homeostasis*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(11): p. 3918-27.
60. Jensen, L.T. and V.C. Culotta, *Regulation of Saccharomyces cerevisiae FET4 by oxygen and iron*. J Mol Biol, 2002. **318**(2): p. 251-60.
61. Jensen, L.T., et al., *Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23805-11.
62. Jensen, L.T. and D.R. Winge, *Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from Saccharomyces cerevisiae*. Embo J, 1998. **17**(18): p. 5400-8.
63. Joshi, A., M. Serpe, and D.J. Kosman, *Evidence for (Mac1p)₂.DNA ternary complex formation in Mac1p-dependent transactivation at the CTR1 promoter*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 218-26.
64. Jungmann, J., et al., *MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast*. Embo J, 1993. **12**(13): p. 5051-6.
65. Kampfenkel, K., et al., *Molecular characterization of a putative Arabidopsis thaliana copper transporter and its yeast homologue*. J Biol Chem, 1995. **270**(47): p. 28479-86.
66. Karthikeyan, G., L.K. Lewis, and M.A. Resnick, *The mitochondrial protein frataxin prevents nuclear damage*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(11): p. 1351-62.
67. Kaut, A., et al., *Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15955-61.
68. Keller, G., et al., *Functional independence of the two cysteine-rich activation domains in the yeast Mac1 transcription factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29193-9.
69. Kim, R., et al., *J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17524-32.
70. Kispal, G., et al., *The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins*. Embo J, 1999. **18**(14): p. 3981-9.

71. Knight, S.A., et al., *A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene*. *Genes Dev*, 1996. **10**(15): p. 1917-29.
72. Knight, S.A., et al., *Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(29): p. 18389-93.
73. Knop, M., et al., *Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines*. *Yeast*, 1999. **15**(10B): p. 963-72.
74. Kolodrubetz, D. and A. Burgum, *Duplicated NHP6 genes of Saccharomyces cerevisiae encode proteins homologous to bovine high mobility group protein 1*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(6): p. 3234-9.
75. Kolodrubetz, D., M. Kruppa, and A. Burgum, *Gene dosage affects the expression of the duplicated NHP6 genes of Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 2001. **272**(1-2): p. 93-101.
76. Kosman, D.J., *Molecular mechanisms of iron uptake in fungi*. *Mol Microbiol*, 2003. **47**(5): p. 1185-97.
77. Kouzarides, T., *Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?* *Embo J*, 2000. **19**(6): p. 1176-9.
78. Kruger, W. and I. Herskowitz, *A negative regulator of HO transcription, SIN1 (SPT2), is a nonspecific DNA-binding protein related to HMG1*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(8): p. 4135-46.
79. Kruppa, M. and D. Kolodrubetz, *Mutations in the yeast Nhp6 protein can differentially affect its in vivo functions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **280**(5): p. 1292-9.
80. Kruppa, M., et al., *Nhp6, an HMG1 protein, functions in SNR6 transcription by RNA polymerase III in S. cerevisiae*. *Mol Cell*, 2001. **7**(2): p. 309-18.
81. Kuge, S. and N. Jones, *YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides*. *Embo J*, 1994. **13**(3): p. 655-64.
82. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment*. *Methods*, 1999. **19**(3): p. 425-33.
83. Labbe, S., et al., *A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(51): p. 36252-60.
84. Labbe, S., Z. Zhu, and D.J. Thiele, *Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(25): p. 15951-8.

85. Lamb, J.R., S. Tugendreich, and P. Hieter, *Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?* Trends Biochem Sci, 1995. **20**(7): p. 257-9.
86. Lange, H., et al., *A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1050-5.
87. Lange, H., G. Kispal, and R. Lill, *Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria.* J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18989-96.
88. Lange, H., et al., *An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins.* EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 715-20.
89. Laser, H., et al., *A new screen for protein interactions reveals that the Saccharomyces cerevisiae high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the GAL1 promoter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13732-7.
90. Lesuisse, E., et al., *Siderophore uptake and use by the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Microbiology, 2001. **147**(Pt 2): p. 289-98.
91. Lesuisse, E., et al., *Role of YHM1, encoding a mitochondrial carrier protein, in iron distribution of yeast.* Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 599-607.
92. Lesuisse, E., et al., *Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1).* Hum Mol Genet, 2003. **12**(8): p. 879-89.
93. Li, J., et al., *Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis.* J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1503-9.
94. Li, L., et al., *CCCI is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast.* J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29515-9.
95. Li, L. and J. Kaplan, *Characterization of yeast methyl sterol oxidase (ERG25) and identification of a human homologue.* J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16927-33.
96. Li, L. and J. Kaplan, *Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters.* J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28485-93.
97. Li, L. and J. Kaplan, *Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity.* J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22181-7.
98. Lill, R. and G. Kispal, *Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria.* Trends Biochem Sci, 2000. **25**(8): p. 352-6.
99. Lin, S.J., et al., *A role for the Saccharomyces cerevisiae ATX1 gene in copper trafficking and iron transport.* J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9215-20.
100. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo.* Free Radic Biol Med, 1994. **16**(1): p. 29-33.

101. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Superoxide and iron: partners in crime*. IUBMB Life, 1999. **48**(2): p. 157-61.
102. Liu, X.D. and D.J. Thiele, *Yeast metallothionein gene expression in response to metals and oxidative stress*. Methods, 1997. **11**(3): p. 289-99.
103. Liu, X.F., et al., *Negative control of heavy metal uptake by the Saccharomyces cerevisiae BSD2 gene*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 11763-9.
104. Lode, A., et al., *Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p*. FEBS Lett, 2000. **485**(1): p. 19-24.
105. Lopez, S., et al., *High-mobility-group proteins NHP6A and NHP6B participate in activation of the RNA polymerase III SNR6 gene*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(9): p. 3096-104.
106. Lutz, T., et al., *The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria*. J Mol Biol, 2001. **307**(3): p. 815-25.
107. Martin, M.P., V.L. Gerlach, and D.A. Brow, *A novel upstream RNA polymerase III promoter element becomes essential when the chromatin structure of the yeast U6 RNA gene is altered*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(19): p. 6429-39.
108. Martinez, E., *Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription*. Plant Mol Biol, 2002. **50**(6): p. 925-47.
109. Martins, L.J., et al., *Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23716-21.
110. McLoughlin, D.M., et al., *The neuronal adaptor protein X11alpha interacts with the copper chaperone for SOD1 and regulates SOD1 activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9303-7.
111. Melcher, K., *A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors*. Anal Biochem, 2000. **277**(1): p. 109-20.
112. Meneghini, R., *Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(5): p. 783-92.
113. Moreira, J.M. and S. Holmberg, *Chromatin-mediated transcriptional regulation by the yeast architectural factors NHP6A and NHP6B*. Embo J, 2000. **19**(24): p. 6804-13.
114. Muhlenhoff, U., et al., *Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p*. Embo J, 2003. **22**(18): p. 4815-25.
115. Muhlenhoff, U., et al., *The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(17): p. 2025-36.

116. Muhlenhoff, U., et al., *A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40612-20.
117. Munshi, N., et al., *Coordination of a transcriptional switch by HMG1(Y) acetylation*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1133-6.
118. Munshi, N., et al., *Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome*. Mol Cell, 1998. **2**(4): p. 457-67.
119. Ooi, C.E., et al., *Copper-dependent degradation of the Saccharomyces cerevisiae plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis*. Embo J, 1996. **15**(14): p. 3515-23.
120. Papamichos-Chronakis, M., et al., *Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1297-305.
121. Park, S., et al., *Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31340-51.
122. Paull, T.T., M. Carey, and R.C. Johnson, *Yeast HMG proteins NHP6A/B potentiate promoter-specific transcriptional activation in vivo and assembly of preinitiation complexes in vitro*. Genes Dev, 1996. **10**(21): p. 2769-81.
123. Paull, T.T. and R.C. Johnson, *DNA looping by Saccharomyces cerevisiae high mobility group proteins NHP6A/B. Consequences for nucleoprotein complex assembly and chromatin condensation*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8744-54.
124. Pelzer, W., et al., *Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins*. FEBS Lett, 2000. **476**(3): p. 134-9.
125. Pena, M.M., J. Lee, and D.J. Thiele, *A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution*. J Nutr, 1999. **129**(7): p. 1251-60.
126. Pena, M.M., S. Puig, and D.J. Thiele, *Characterization of the Saccharomyces cerevisiae high affinity copper transporter Ctr3*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33244-51.
127. Philpott, C.C., et al., *The response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae: expression of siderophore-based systems of iron uptake*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 698-702.
128. Philpott, C.C., et al., *Cell-cycle arrest and inhibition of G1 cyclin translation by iron in AFT1-1(up) yeast*. Embo J, 1998. **17**(17): p. 5026-36.
129. Pollard, K.J. and C.L. Peterson, *Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6212-22.
130. Portnoy, M.E., X.F. Liu, and V.C. Culotta, *Saccharomyces cerevisiae expresses*

- three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 7893-902.
131. Portnoy, M.E., et al., *Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Genet Genomics, 2001. **265**(5): p. 873-82.
 132. Proft, M. and K. Struhl, *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. **9**(6): p. 1307-17.
 133. Protchenko, O., et al., *Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 49244-50.
 134. Pufahl, R.A., et al., *Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1.* Science, 1997. **278**(5339): p. 853-6.
 135. Reece, R.J. and A. Platt, *Signaling activation and repression of RNA polymerase II transcription in yeast.* Bioessays, 1997. **19**(11): p. 1001-10.
 136. Rodriguez-Manzaneque, M.T., et al., *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): p. 1109-21.
 137. Rutherford, J.C., et al., *A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14322-7.
 138. Rutherford, J.C., S. Jaron, and D.R. Winge, *Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements.* J Biol Chem, 2003.
 139. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 140. Schilke, B., et al., *Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10206-11.
 141. Schultz, J., L. Marshall-Carlson, and M. Carlson, *The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(9): p. 4744-56.
 142. Serpe, M., A. Joshi, and D.J. Kosman, *Structure-function analysis of the protein-binding domains of Mac1p, a copper-dependent transcriptional activator of copper uptake in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29211-9.
 143. Shakoury-Elizeh, M., et al., *Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1233-43.
 144. Sidorova, J. and L. Breeden, *The MSN1 and NHP6A genes suppress SWI6 defects*

- in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1999. **151**(1): p. 45-55.
145. Sipos, K., et al., *Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 26944-9.
146. Smith, R.L. and A.D. Johnson, *Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(7): p. 325-30.
147. Stearman, R., et al., *A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1552-7.
148. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(2): p. 435-59.
149. Strain, J., et al., *Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in Saccharomyces cerevisiae. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31138-44.
150. Szczycka, M.S., et al., *Saccharomyces cerevisiae mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription*. Yeast, 1997. **13**(15): p. 1423-35.
151. Szerlong, H., A. Saha, and B.R. Cairns, *The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin remodeling*. Embo J, 2003. **22**(12): p. 3175-87.
152. Thomas, J.O. and A.A. Travers, *HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(3): p. 167-74.
153. Thompson, P.R., et al., *Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(4): p. 308-15.
154. Turner, R.B., et al., *Solution structure of a zinc domain conserved in yeast copper-regulated transcription factors*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(7): p. 551-5.
155. Tzamarias, D. and K. Struhl, *Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex*. Nature, 1994. **369**(6483): p. 758-61.
156. Tzamarias, D. and K. Struhl, *Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters*. Genes Dev, 1995. **9**(7): p. 821-31.
157. Ueta, R., A. Fukunaka, and Y. Yamaguchi-Iwai, *Pselp mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50120-7.
158. Urbanowski, J.L. and R.C. Piper, *The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38061-70.

159. Valentine, J.S. and E.B. Gralla, *Delivering copper inside yeast and human cells*. Science, 1997. **278**(5339): p. 817-8.
160. Valentine, J.S., et al., *The dark side of dioxygen biochemistry*. Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(2): p. 253-62.
161. Venditti, S. and G. Camilloni, *In vivo analysis of chromatin following nystatin-mediated import of active enzymes into Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet, 1994. **242**(1): p. 100-4.
162. Voisine, C., et al., *Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1483-8.
163. Voisine, C., et al., *Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3677-84.
164. Waters, B.M. and D.J. Eide, *Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33749-57.
165. Weissman, J.D., et al., *HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11601-6.
166. Wemmie, J.A., et al., *Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance*. J Biol Chem, 1994. **269**(20): p. 14690-7.
167. Wilson, R.B. and D.M. Roof, *Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 352-7.
168. Wong, B., et al., *Binding to cisplatin-modified DNA by the Saccharomyces cerevisiae HMGB protein Nhp6A*. Biochemistry, 2002. **41**(17): p. 5404-14.
169. Wu, A.L. and W.S. Moye-Rowley, *GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5832-9.
170. Yamaguchi-Iwai, Y., A. Dancis, and R.D. Klausner, *AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in Saccharomyces cerevisiae*. Embo J, 1995. **14**(6): p. 1231-9.
171. Yamaguchi-Iwai, Y., et al., *Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17711-8.
172. Yamaguchi-Iwai, Y., et al., *Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast*. Embo J, 1996. **15**(13): p. 3377-84.
173. Yamaguchi-Iwai, Y., et al., *Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2002. **277**(21):

- p. 18914-8.
174. Yan, Y., et al., *The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(11): p. 862-9.
 175. Yen, Y.M., B. Wong, and R.C. Johnson, *Determinants of DNA binding and bending by the Saccharomyces cerevisiae high mobility group protein NHP6A that are important for its biological activities. Role of the unique N terminus and putative intercalating methionine*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4424-35.
 176. Yonkovich, J., et al., *Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 23981-4.
 177. Yu, Y., et al., *Regulation of TATA-binding protein binding by the SAGA complex and the Nhp6 high-mobility group protein*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1910-21.
 178. Yu, Y., P. Eriksson, and D.J. Stillman, *Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2350-7.
 179. Yuan, D.S., A. Dancis, and R.D. Klausner, *Restriction of copper export in Saccharomyces cerevisiae to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25787-93.
 180. Yuan, D.S., et al., *The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2632-6.
 181. Yun, C.W., et al., *The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10218-23.
 182. Yun, C.W., et al., *Desferrioxamine-mediated iron uptake in Saccharomyces cerevisiae. Evidence for two pathways of iron uptake*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10709-15.
 183. Zhang, L. and L. Guarente, *Evidence that TUP1/SSN6 has a positive effect on the activity of the yeast activator HAPI*. Genetics, 1994. **136**(3): p. 813-7.
 184. Zhu, Z., et al., *Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1277-80.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for *FRE2* transcriptional activation

George S Fragiadakis^{1,2}, Dimitris Tzamaris^{1,3} and Despina Alexandraki^{1,2,*}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH, University of Crete, Vassilika Vouton, Heraklion, Crete, Greece, ²Department of Biology, University of Crete, Greece and ³School of Science and Technology, Hellenic Open University, Greece

We found Nhp6a/b yeast HMG-box chromatin-associated architectural factors and Ssn6 (Cyc8) corepressor to be crucial transcriptional coactivators of *FRE2* gene. *FRE2* encoding a plasma membrane ferric reductase is induced by the iron-responsive, DNA-binding, transcriptional activator Aft1. We have shown that Nhp6 interacts directly with the Aft1 N-half, including the DNA-binding region, to facilitate Aft1 binding at *FRE2* UAS. Ssn6 also interacts directly with the Aft1 N-half and is recruited on *FRE2* promoter only in the presence of both Aft1 and Nhp6. This Nhp6/Ssn6 role in Aft1-mediated transcription is *FRE2* promoter context specific, and both regulators are required for activation-dependent chromatin remodeling. Our results provide the first *in vivo* biochemical evidence for nonsequence-specific HMG-box protein-facilitated recruitment of a yeast gene-specific transactivator to its DNA target site and for Nhp6-mediated Ssn6 promoter recruitment. Ssn6 has an explicitly coactivating role on *FRE2* promoter only upon induction. Therefore, transcriptional activation in response to iron availability involves multiple protein interactions between the Aft1 iron-responsive DNA-binding factor and global regulators such as Nhp6 and Ssn6.

The EMBO Journal (2004) 23, 333–342. doi:10.1038/sj.emboj.7600043; Published online 22 January 2004

Subject Categories: chromatin & transcription; signal transduction

Keywords: Aft1; iron regulation; Nhp6; Ssn6; transcriptional activation

Introduction

Gene expression involves dynamic and highly regulated processes of interactions between protein and DNA components of the chromatin. Transcription of most eucaryotic genes involves several DNA-binding activators that recognize distinct sequences on a single promoter. Pathway-specific transactivators, responding to diverse cellular signals, cooperate with global activators or repressors to exert their specific function.

*Corresponding author. Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH, University of Crete, Vassilika Vouton, PO Box 1527, Heraklion, Crete GR-71110, Greece. Tel.: +30 281 039 1161; Fax: +30 281 039 1101; E-mail: alexandr@imbb.forth.gr

Received: 22 August 2003; accepted: 25 November 2003; Published online: 22 January 2004

Iron uptake and homeostasis is a complex process and, in *Saccharomyces cerevisiae*, involves many proteins, including iron reductases (Fre1–6), oxidases (Fet3, Fet5), permeases (Ftr1, Fth1, Fet4), siderophore transporters (Arn1–4) and cell wall mannoproteins (Fit1–3) (Kosman, 2003). Transcription of the corresponding genes is regulated by the availability of iron, being induced under low-iron conditions. Iron-dependent regulation is mediated by Aft1 (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995) and/or the recently identified Aft2 (Blaiseau *et al*, 2001; Rutherford *et al*, 2003) DNA-binding transcription factors. Aft1 binds to the FeRE consensus sequence PyPuCACCCPu, present on various promoters, in an iron-dependent manner (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1996). It contains a basic putative DNA-binding domain within residues 140–280 of its N-terminal region and a strong transactivation domain within residues 413–572 of its glutamine-rich C-terminus (Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002). Aft1 responds to the iron concentration of the cell, remaining in the cytoplasm when iron is replete (Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002). Its subcellular localization is regulated by an N-terminal nuclear export signal sequence. The mechanism by which Aft1 senses iron is still unexplored and may involve direct iron binding to the protein. A putative iron binding CysXCys motif, located in the middle of the molecule, affects Aft1 transactivation potential since a Cys291Phe substitution causes constitutive transcriptional activation (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995). Two histidine-rich domains, located N- and C-terminally, respectively, may bind iron leading to an intramolecular interaction, as was shown for other metal-related activators (Jensen and Winge, 1998).

FRE1 (Dancis *et al*, 1992) and *FRE2* (Georgatsou and Alexandraki, 1994) are the most extensively studied iron reductase genes. *FRE2* transcription solely depends on Aft1 whereas *FRE1* is also induced by Aft2 (Rutherford *et al*, 2003) and, in the absence of extracellular copper, by the copper-regulated DNA-binding transcriptional activator Mac1 (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1997). The highly inducible and simply regulated *FRE2* gene is a suitable model for transcriptional regulation studies. Interestingly, in a genetic screen seeking positive regulators of *FRE2* expression, we identified *NHP6A* gene encoding the Nhp6a architectural protein. On the other hand, a previous report suggested that Nhp6b protein physically interacts with Tup1 (Laser *et al*, 2000) while Ssn6 and Tup1 transcriptional corepressors were shown to affect reductive iron uptake in yeast (Lesuisse *et al*, 2001). On this basis, we have examined the functional interplay of these general cofactors in *FRE2* transcription in relation to Aft1 function.

Nhp6a and its counterpart Nhp6b (both termed Nhp6) are small, abundant, chromatin-associated, non-histone yeast proteins. They belong to the HMG-box family of high-mobility-group proteins, being structurally and functionally homologous to the ubiquitous mammalian HMGB1/2 proteins (Kolodrubetz and Burgum, 1990). HMGB1/2 appear to act

as architectural facilitators to overcome the rigidity barrier of DNA in the assembly of nucleoprotein complexes, in a variety of DNA-related processes such as transcription, replication, recombination and repair (Bustin, 1999; Thomas and Travers, 2001). Nhp6 consists of a single HMG box that functions as a sequence-independent DNA-binding domain and a short basic N-terminal tail essential for high-affinity DNA binding (Yen *et al*, 1998). It preferentially binds distorted (e.g. microcircular or cisplatinated) DNA structures and induces a large bend to linear DNA *in vitro* (Paull and Johnson, 1995; Yen *et al*, 1998; Wong *et al*, 2002).

Either *nhp6aΔ* or *nhp6bΔ* mutant exhibits no observable phenotype, reflecting a functional redundancy of the two proteins (Costigan *et al*, 1994). Notably, Nhp6b, less abundant than Nhp6a, is increased in *nhp6aΔ* cells to compensate for the absence of its counterpart (Kolodrubetz *et al*, 2001). On the other hand, *nhp6ΔΔ* double mutant exhibits several phenotypes, including slow growth at 30°C, cessation of growth at 38°C in the absence of osmotic support (1 M sorbitol) along with cellular and cytoskeletal morphology defects (Costigan *et al*, 1994). This phenotypic variety is consistent with the affected transcription of several RNA polymerase II-transcribed genes in the *nhp6ΔΔ* strain (Paull *et al*, 1996; Sidorova and Breeden, 1999; Moreira and Holmberg, 2000; Yu *et al*, 2000, 2003) and the Nhp6-stimulated TFIIC-dependent transcription of *SNR6* gene by RNA polymerase III (Kruppa *et al*, 2001; Lopez *et al*, 2001; Martin *et al*, 2001). Furthermore, accumulating evidence shows that Nhp6 is directly involved in the modulation of chromatin state (Moreira and Holmberg, 2000; Brewster *et al*, 2001; Formosa *et al*, 2001; Lopez *et al*, 2001; Szerlong *et al*, 2003).

Ssn6 is a major transcriptional coregulator in yeast. It was identified as the corepressor required, in a complex with Tup1, for the transcriptional inhibition of various genes involved in diverse physiological pathways. This complex is recruited to different promoters via interactions with specific DNA-binding regulatory proteins and inhibits transcription, with the Tup1 subunit being the repressor, by affecting both chromatin structure and the basic transcription machinery (Smith and Johnson, 2000). Experiments using artificial reporter genes have shown that Ssn6–Tup1 can also act as a transcriptional coactivator, with this function predominantly mediated by Ssn6 (Conlan *et al*, 1999). Genetic and biochemical analyses have revealed a number of natural genes as targets of Ssn6–Tup1 positive action (Zhang and Guarente, 1994; Conlan *et al*, 1999; Papamichos-Chronakis *et al*, 2002; Proft and Struhl, 2002).

In this work, we show that induced *FRE2* transcription relies on the collaborative function of the two general transcriptional coregulators, Nhp6 and Ssn6, necessary for Aft1 function. We demonstrate a distinct relation of Nhp6 and Ssn6 with Aft1 on *FRE2* promoter, providing new roles for both coregulators and showing that specific protein interactions modulate Aft1 functionality in response to iron availability.

Results

***SSN6* and *NHP6A/B* are necessary for induced *FRE2* transcription**

We isolated *NHP6A* gene as a high-copy suppressor of a genomic mutation that abolishes *FRE2*, but not *FRE1*, transcriptional induction (genetic screen in Materials and

methods). Preliminary transcriptional analysis of a *FRE2-LacZ* reporter gene in *NHP6A*, *SSN6* and *TUP1* mutants revealed a strong positive effect of each of the three genes on induced transcription, with the effect of *TUP1* being less prominent (data not shown). On this basis, we examined the accumulation of *FRE2* mRNA, as well as of *FRE1* for comparison, in *ssn6Δ*, *nhp6ΔΔ* and *ssn6Δ nhp6ΔΔ* mutants, compared to a wild-type strain, under basal and inducing conditions. We used an *nhp6ΔΔ* double mutation since disruption of both *NHP6* genes is required to obtain observable phenotypes (Costigan *et al*, 1994). Transcriptional activation of *FRE2* in the absence of iron was completely eliminated in all mutant strains (Figure 1A), revealing a dramatic effect of the *SSN6* and *NHP6A/B* deletions on induced *FRE2* transcription. Basal mRNA levels (in iron-replete medium) were hardly detected in wild-type and mutant strains, and therefore we could not draw any safe conclusion concerning the effect of the above deletions on *FRE2* basal transcription. Under copper-depleted conditions, *FRE2* transcription was at basal levels in all strains examined, in agreement with previously reported results (Georgatsou *et al*, 1997). This was an important control since the Fe(II) chelator used in our experiments also chelates Cu(II) (see Materials and methods).

The results for *FRE1* transcription revealed a more complex regulation (Figure 1B) consistent with the known action of multiple DNA-binding transactivators on *FRE1* promoter. Basal transcription of *FRE1* in the *ssn6Δ* strain was at wild-type levels while transcriptional induction was significantly lower, more prominently in the absence of copper, indicating that the *SSN6* deletion affected induced *FRE1* transcription. In *nhp6ΔΔ* cells, basal transcription was drastically reduced and transcriptional induction was also reduced (more prominently in the absence of copper), but to a lesser extent, suggesting that the *NHP6A/B* deletion affected predominantly noninduced *FRE1* transcription. The *ssn6Δ nhp6ΔΔ* triple mutation produced results similar to those of *ssn6Δ* and *nhp6ΔΔ* alone, under inducing conditions, whereas it revealed an epistatic effect of *nhp6ΔΔ* on *ssn6Δ* in *FRE1* basal transcription.

Our data so far revealed a new regulatory role of *SSN6* and *NHP6A/B* in metal-regulated transcription. Since these genes were essential for induced *FRE2* transcription, the question that arose next was whether this role directly associated with the action of Aft1 transactivator. Unlike *FRE1* whose expression is not solely affected by Aft1, *FRE2* expression, under iron-depletion conditions, is completely eliminated by *AFT1* deletion (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995; our observations).

***SSN6* and *NHP6A/B* promote Aft1-mediated transcription**

In order to test whether *SSN6* and *NHP6A/B* are involved in Aft1-mediated *FRE2* transcription, we examined transcriptional induction in wild-type and mutant cells grown in iron-depleted medium, using a *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ* reporter gene. This gene comprises a region from *FRE2* promoter that contains the Aft1 binding consensus element and a TATA region from *HIS3* promoter known to be unaffected by *NHP6A/B* (Paull *et al*, 1996) and *SSN6* (data not shown), inserted upstream of the *LacZ* gene. As shown in Figure 2A, β-galactosidase activity was drastically and similarly reduced in both *ssn6Δ* and *nhp6ΔΔ*, compared to wild-type strain,

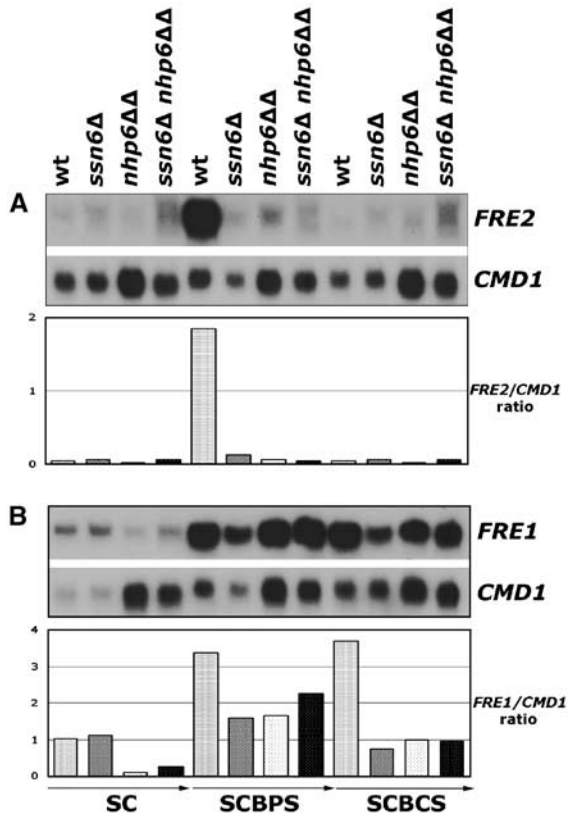


Figure 1 Effect of *SSN6* and *NHP6A/B* on metal-regulated transcription. (A) Northern analysis of total RNA extracted from the indicated strains grown in metal-replete (SC), iron-depleted (SCBPS) or copper-depleted (SCBCS) medium using radiolabeled *FRE2* and *CMD1* (internal control) probes. (B) The same blot using *FRE1* and *CMD1* probes. Bands were quantified using the PhosphorImager and ImageQuant software, and bars represent the indicated intensity ratios (normalized mRNA levels).

indicating a considerable effect of *SSN6* and *NHP6A/B* on Aft1-mediated transcription. Interestingly, it was further reduced in the triply deleted *ssn6Δ nhp6ΔΔ* strain, implying a cooperative role for these genes. Furthermore, concomitant overexpression of *AFT1*, although increasing β -galactosidase activity in wild-type strain, did not rescue the activity of mutant strains (Figure 2A), confirming that the observed effect on transcription was mediated through Aft1 transactivator. We further investigated the effect of *SSN6* and *NHP6A/B* on the transactivation function of Aft1 by artificially tethering a LexA-Aft1 protein on another reporter gene containing a LexA binding site upstream of *HIS3-LacZ*. β -galactosidase activity was decreased by 85% in *ssn6Δ*, compared to wild-type cells, indicating that *SSN6* is mainly responsible for full transactivation by LexA-Aft1 (Figure 2B). On the other hand, nearly half of the wild-type activity was retained in *nhp6ΔΔ* strain, suggesting that the effect of *NHP6A/B* is exerted partly on the transactivation potential and mainly on the DNA-binding function of Aft1. These observations indicate that *SSN6* and *NHP6A/B* promote the Aft1 activation potential from *FRE2* promoter in a distinct manner.

***SSN6* and *NHP6A/B* deletion effects are promoter context specific**

In order to examine whether the effects of *SSN6* and *NHP6A/B* are common to all Aft1-responsive genes, we analyzed the

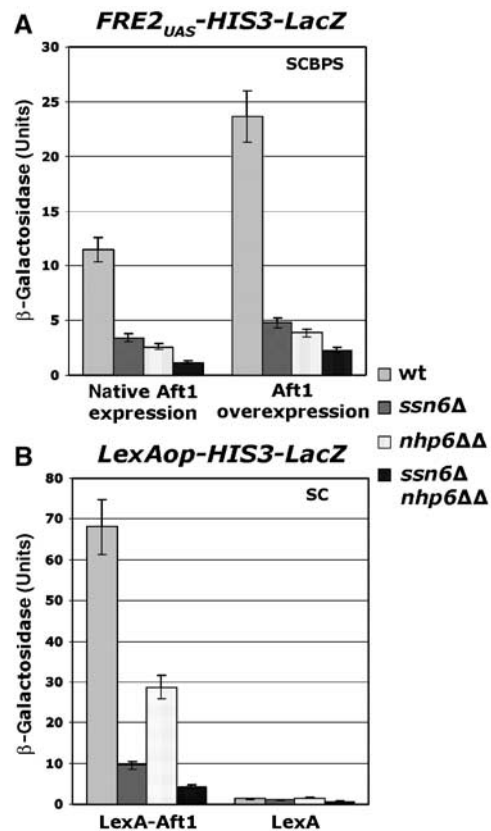


Figure 2 Effect of *SSN6* and *NHP6A/B* on Aft1-mediated transcription. (A) β -Galactosidase activity units obtained from the indicated strains cotransformed with *FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ* and pYX142 or pYX142-*AFT1* (*AFT1* overexpression) grown in SCBPS. (B) β -Galactosidase activity units obtained from the indicated strains cotransformed with *LexAop-HIS3-LacZ* and LexA-Aft1 or LexA expression plasmid grown in SC medium. (The activity in SCBPS exceeds measurable levels.) Values in (A) and (B) represent the average obtained from three independent transformants.

RNA accumulation patterns of four additional iron-regulated genes. These were selected according to the iron regulation literature (Rutherford *et al*, 2003): *ARN2* (*TAF1*) as the only other gene, in addition to *FRE2*, that is considerably, and probably solely, upregulated by Aft1, *FRE3* as the most homologous to *FRE2* and the most prominently regulated by Aft1 of all *FRE* genes, and *FIT2* as well as *FET3* as highly induced by Aft1 and less by Aft2. Of these genes, only the expression of *ARN2* was drastically reduced in either *ssn6Δ* or *nhp6ΔΔ* background and practically abolished in the double mutant, reproducing the results obtained for the expression of *FRE2* gene (Figure 3). *ARN2*, like *FRE2*, is probably regulated only by Aft1 using one FeRE element. *FRE2* contains an additional but less functional FeRE element (GS Fragiadakis, data not shown). *FET3*, *FIT2* and possibly *FRE3* promoters are regulated by both Aft1 and Aft2 and, moreover, contain multiple FeRE elements. These findings imply that *SSN6* and *NHP6A/B* deletion effects are promoter context specific.

***SSN6* and *NHP6A/B* are required for the activation-dependent chromatin remodeling of *FRE2* promoter**

To investigate whether specific chromatin organization is involved in the transcriptional activation of *FRE2* gene and

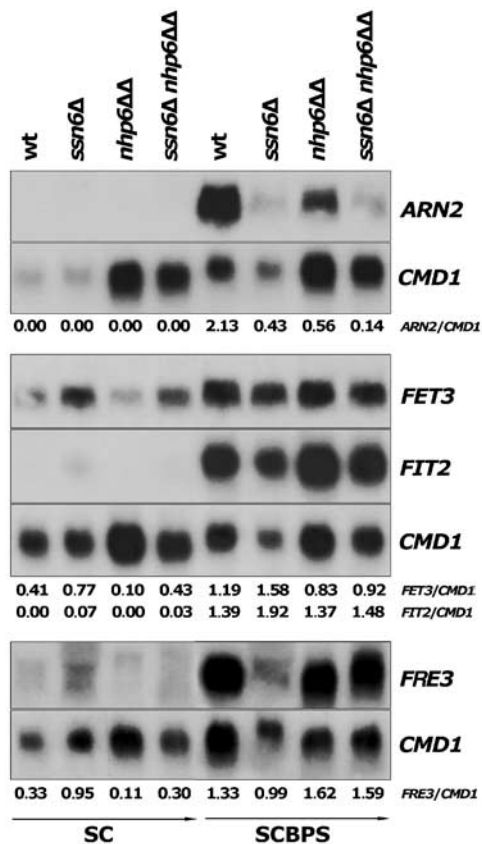


Figure 3 Effect of *SSN6* and *NHP6A/B* on Aft1-regulated genes. Same blots and analysis for SC and SCBPS RNA samples as described for Figure 1, using *ARN2*, *FET3*, *FIT2*, *FRE3* and *CMD1* probes.

affected by *SSN6* and *NHP6A/B* deletions, we first subjected wild-type cells grown under iron-replete or iron-depleted conditions to micrococcal nuclease digestion followed by indirect end-labeling analysis (Figure 4, lanes 2 and 3). Two different DNA band patterns were obtained, corresponding to the repressed or activated state indicating an activation-dependent chromatin change on *FRE2* promoter. More specifically, nucleosomes were positioned on repressed *FRE2* promoter. A region including the UAS_{Aft1} was protected in the repressed state while it became nuclease hypersensitive in the activated state, suggesting that remodeling of a UAS_{Aft1} -occluding nucleosome (nuc-2, upstream of TATA) took place upon induction. The band patterns obtained from similarly analyzed *nhp6ΔΔ* or *ssn6Δ* cells under induction conditions (Figure 4, lanes 4 and 5) resembled that of repressed wild-type cells, indicating that the absence of Nhp6 or Ssn6 resulted in defective activation-dependent chromatin remodeling of *FRE2* promoter. This is in accordance with the severe decrease in induced *FRE2* transcription observed in *nhp6ΔΔ* and *ssn6Δ* strains. Therefore, chromatin remodeling of *FRE2* promoter takes place under induction conditions and strictly depends on the presence of Nhp6 and Ssn6 proteins.

Aft1 recruitment on *FRE2* promoter requires the presence of Nhp6

To further understand the activation process on *FRE2* promoter, we tested its occupancy by the Aft1 and Nhp6 factors *in vivo*, performing chromatin immunoprecipitation (ChIP)

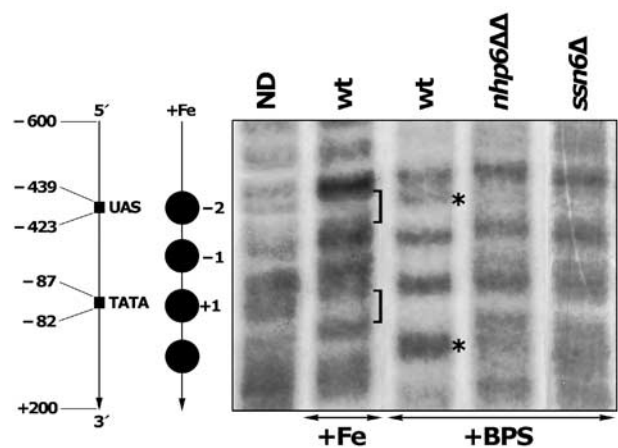


Figure 4 Low-resolution chromatin analysis of the *FRE2* promoter. Wild-type cells under repression (+Fe, SC supplemented with 200 μ M $FeCl_3$ 30 min prior to cell collection) and wild type, *nhp6ΔΔ* and *ssn6Δ* under induction (+BPS) conditions were subjected to MNase digestion followed by indirect end-labeling. On the left, nucleosomes seen as protected areas on the repressed *FRE2* promoter are depicted as circles. The adjacent map indicates the relative positions of the UAS_{Aft1} and the presumptive TATA box. Brackets indicate the corresponding protected regions and asterisks indicate induction-specific MNase sensitivity sites. Lane ND contains a naked genomic DNA digest.

assays in cells grown under conditions of iron depletion. As shown in Figure 5A, the occupancy of *FRE2* promoter by the endogenous Aft1 protein, tagged with 9 Myc epitopes, depended quantitatively on the presence of Nhp6. In contrast, Aft1-9Myc recruitment on *FRE1* promoter (analyzed in parallel) was similar in wild-type and *nhp6ΔΔ* cells. Similar results were obtained using an HA-tagged Aft1 (data not shown). Given that Aft1 bound to both promoters, this finding indicated that Nhp6 intervenes in Aft1 binding on *FRE2* and not on *FRE1*, acting in a promoter context-dependent manner. Indeed, we found Nhp6a present on both *FRE1* and *FRE2* promoters, as well as on several other promoters and coding regions, at similarly high levels (data not shown). Nhp6, as a nonsequence-specific DNA-binding protein whose interaction with chromatin is more stable and permanent than that of other transiently binding regulatory factors (Bustin, 1999), was expected to crosslink efficiently in many chromosomal positions. Our experiments demonstrated that, specifically in the *FRE2* promoter context, Nhp6 facilitated quantitative Aft1 DNA binding.

Ssn6 is recruited on *FRE2* promoter and this recruitment is dependent upon the presence of both Aft1 and Nhp6

To address whether Ssn6 protein physically associates with *FRE2* promoter, we used an HA-tagged Ssn6 derivative expressed in *ssn6Δ* to avoid interference by endogenous Ssn6. As assayed by ChIP performed in cells grown in iron depletion (Figure 5B), HA-Ssn6 was specifically recruited on *FRE2* and *FRE1* promoter (analyzed in parallel), whereas it occupied at background levels an *ACT1* coding sequence. *AFT1* gene deletion almost eliminated HA-Ssn6 recruitment on *FRE2* while, in contrast, did not significantly affect recruitment on *FRE1* promoter. Deletion of *NHP6A/B* genes considerably reduced HA-Ssn6 recruitment on *FRE2* promoter while recruitment on *FRE1* was not significantly affected (Figure 5C). We conclude that Ssn6 associates with *FRE2*

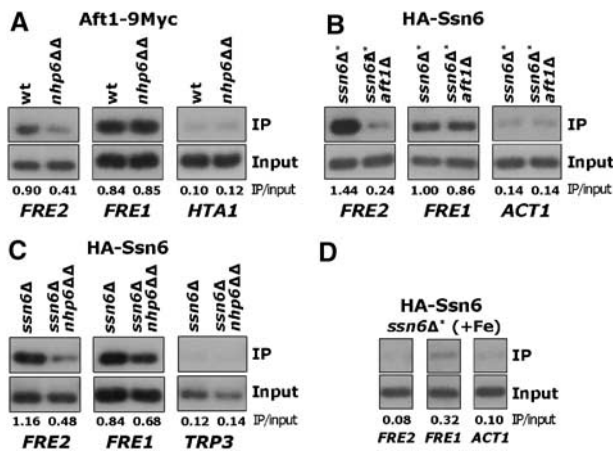


Figure 5 Association of Aft1 and Ssn6 with *FRE1* and *FRE2* promoters. (A) Wild-type and *nhp6ΔΔ* cells, carrying chromosomal *AFT1-9Myc*, grown in SCBPS, were subjected to ChIP with anti-Myc, followed by PCR analysis of the immunoprecipitated (IP) and input DNA using primers specific for *FRE1*, *FRE2* and *HTA1* promoters. (B) *ssn6Δ** and *ssn6Δ* aft1Δ* cells, transformed with an HA-Ssn6 expressing plasmid, were grown and analyzed as above using anti-HA and primers specific for *FRE1* and *FRE2* promoters and *ACT1* coding region. (C) *ssn6Δ* and *ssn6Δ nhp6ΔΔ* cells were transformed, grown and analyzed as above using anti-HA and primers specific for *FRE1*, *FRE2* and *TRP3* promoters. (D) *ssn6Δ** cells transformed with an HA-Ssn6 expressing plasmid and grown under high-iron conditions (SC supplemented with 200 μM FeCl₃ 30 min prior to cell collection) were analyzed as above using anti-HA and primers specific for *FRE1* and *FRE2* promoters and *ACT1* coding region. Bands in (A–D) were quantified using the PhosphorImager and ImageQuant software, and numbers express the indicated ratios. The specific recruitment of HA-Ssn6 on *FRE1* and *FRE2* promoters in *ssn6Δ* cells of two different genetic backgrounds was comparable.

promoter and its recruitment is quantitatively dependent on the presence of Aft1 and Nhp6. In fact, under high-iron conditions, when Aft1 is cytoplasmic, we observed no recruitment of Ssn6 on *FRE2* promoter (Figure 5D), consistent with its dependency on the presence of Aft1. On the other hand, Ssn6 is also present at *FRE1* promoter, but independently of Aft1 and Nhp6. Under high-iron conditions, recruitment of Ssn6 on *FRE1* promoter was observed at low levels (Figure 3D), consistent with the Aft1-independent low *FRE1* expression in these conditions (data not shown, but similar to SC conditions shown in Figure 1).

Ssn6 and Nhp6a associate with Aft1 in vivo but not with one another

A preliminary indication for an Aft1–Ssn6 interaction *in vivo* was obtained by two-hybrid analysis (data not shown). A similar analysis of potential Aft1–Nhp6 interaction was not feasible because hybrids of Nhp6a with an activation or DNA-binding domain, expressed from strong promoters on multi-copy plasmids, probably caused a dramatic decrease in growth rate, being toxic for cells. On this basis, we performed copurification assays *in vivo* in *aft1Δ* cells expressing HA-Aft1 and 6xHis-Ssn6 or 6xHis-Nhp6a proteins in order to verify the interdependence of Aft1 with Ssn6 and Nhp6 on *FRE2* promoter. These assays were carried out under iron-depletion conditions to ensure quantitative Aft1 colocalization with Ssn6 and Nhp6 in the nucleus. The 6xHis-tagged proteins bound on Ni-NTA beads are shown in Figure 6A. HA-Aft1

specifically copurified with 6xHis-Ssn6 as well as with 6xHis-Nhp6a (Figure 6B, left), indicating an association with each of the two proteins. Interestingly, in a copurification assay carried out under iron-replete conditions, we did not observe Aft1–Nhp6a association (data not shown). The endogenous Tup1, used as a positive control of the assay, also copurified with 6xHis-Ssn6 as expected (Figure 6B, right), but did not copurify with 6xHis-Nhp6a under either iron-depletion (Figure 6B, right) or iron-replete conditions (data not shown).

Since Aft1 was found to associate with each of Ssn6 and Nhp6a, we next examined whether Ssn6 and Nhp6a associate with one another as well. The *in vivo* copurification assay was performed in *nhp6ΔΔ* cells expressing HA-Nhp6a and 6xHis-Ssn6 proteins. As shown in Figure 6C, HA-Nhp6a did not copurify with 6xHis-Ssn6 (left panel) while Tup1 did (right panel), indicating that Nhp6a did not associate with Ssn6 under the conditions employed. We used iron-depletion conditions as Ssn6 and Nhp6a may require the presence of Aft1 in order to interact. However, in this experiment Aft1 was expressed from the native *AFT1* gene at levels significantly lower than those of the other two proteins. The ‘reverse’ copurification experiment, under the same conditions, using HA-Ssn6 and 6xHis-Nhp6a proteins was not informative due to high nonspecific retention of HA-Ssn6 on the Ni-NTA agarose beads (data not shown).

The above data revealed that Aft1 associates with Ssn6 and Nhp6a *in vivo*, consistent with its interdependence with each of these proteins on *FRE2* promoter. They also showed that Ssn6 and Nhp6a may not interact directly *in vivo*, although they are linked through Aft1. Furthermore, this protein complex is most likely formed on DNA, since interaction between Aft1 and Ssn6 was abolished in cells lacking Nhp6 as shown by *in vivo* copurification of HA-Aft1 with the 6xHis-Ssn6 in wild-type and *nhp6ΔΔ* cells (Figure 6D).

Ssn6 and Nhp6a interact directly with the N-terminal half of Aft1 in vitro

We subsequently examined whether the *in vivo* detected associations reflected physical contacts between the involved proteins. For this, we tested whether bacterially produced GST-fused N-Ssn6, or GST-fused Nhp6a, could associate *in vitro*, in the absence of additional yeast proteins, with bacterially produced 6xHis-tagged Aft1 and the N-half or C-half Aft1 derivatives (Figure 7A). The entire Ssn6 protein could not be produced in bacteria. However, the N-Ssn6 derivative tested in this assay, containing the entire TPR domain of Ssn6 (10 tandem repeats) known to be involved in distinct protein–protein interactions (Tzamarias and Struhl, 1995), could restore *FRE2* gene induction to wild-type levels, when introduced in an *ssn6Δ* strain (data not shown).

As shown in Figure 7B, GST-N-Ssn6 as well as GST-Nhp6a, but not GST alone, interacted with 6xHis-Aft1 (7B-1), 6xHis-N-Aft1 (7B-2), but not with 6xHis-C-Aft1 (7B-3), indicating a direct contact between residues of the N-half of Aft1 and the TPR domain of Ssn6 or some portion of the Nhp6a protein. The fact that Nhp6a interacted directly with the DNA-binding region of Aft1 further supported our finding, described above, for Nhp6-facilitated Aft1 binding on *FRE2* promoter. Finally, GST-N-Ssn6 interacted with 6xHis-N-Tup1 as expected, while GST-Nhp6a did not (7B-4), in accordance with what we observed *in vivo*.

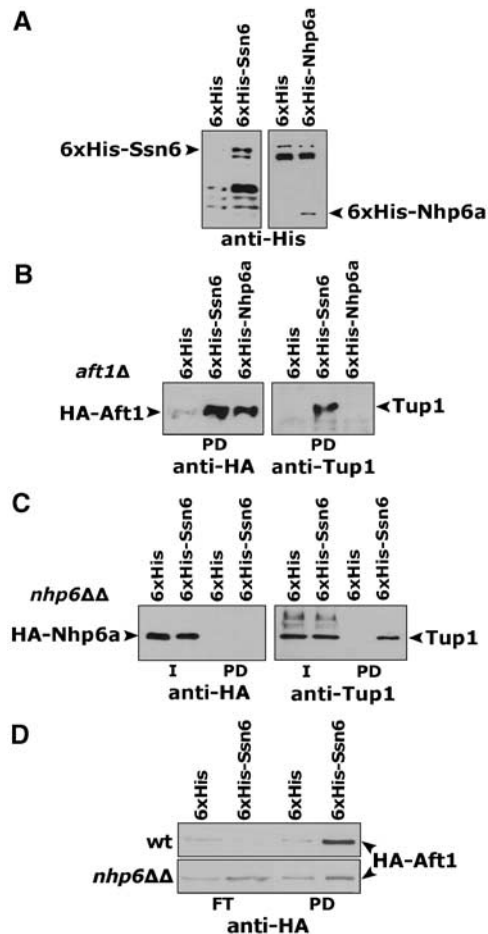


Figure 6 Association of Ssn6 and Nhp6a with Aft1 *in vivo*. (A) Protein extracts from *aft1Δ* cells grown in SCBPS and expressing 6xHis or 6xHis-Ssn6 or 6xHis-Nhp6a along with HA-Aft1 were incubated with Ni-NTA beads. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-His to detect 6xHis-Ssn6 and 6xHis-Nhp6a. (B) Pulled-down (PD) HA-Aft1 was detected by anti-HA (left) and pulled-down endogenous Tup1 by anti-Tup1 (right). (C) Extracts from *nhp6ΔΔ* cells grown in SCBPS and expressing 6xHis or 6xHis-Ssn6 along with HA-Nhp6a were incubated with Ni-NTA beads. Pulled-down (PD) and input (I) proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-HA to detect HA-Nhp6a (left) and anti-Tup1 to detect endogenous Tup1 (right). (D) Extracts from wild-type and *nhp6ΔΔ* cells grown in SCBPS and expressing 6xHis or 6xHis-Ssn6 along with HA-Aft1 were incubated with Ni-NTA beads. Pulled-down (PD) and flow-through (FT) proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-HA to detect HA-Aft1.

Taken together, our data indicate the following in iron starvation: (a) Aft1 binding on *FRE2* promoter largely depends on its direct interaction with Nhp6a. The possibility of DNA bending playing a major role cannot be excluded. (b) Ssn6 is recruited on *FRE2* promoter via direct interaction with Aft1. (c) Each of Nhp6 and Ssn6 is required for activation-specific chromatin organization. Based on these indications, we propose a model of concerted action of Nhp6 and Ssn6 proteins on *FRE2* promoter, required for Aft1-induced transcription (see Discussion).

Discussion

Accumulating data concerning the specific roles of Nhp6 and Ssn6 commonly used factors on various regulated promoters

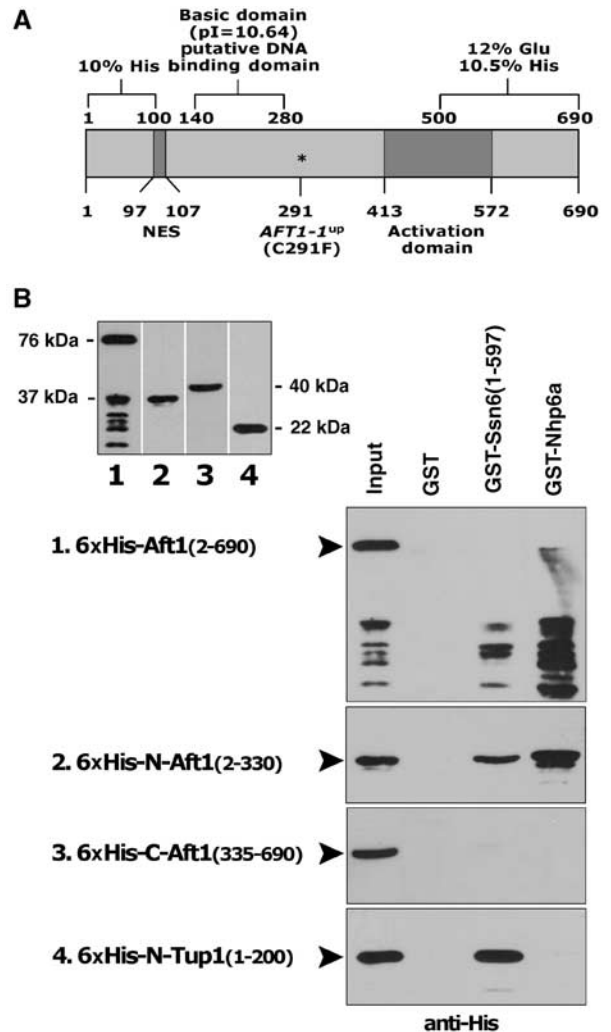


Figure 7 Interaction of Aft1 with Ssn6 and Nhp6a *in vitro*. (A) Diagrammatic representation of the Aft1 protein sequence. (B) GST or GST-Ssn6(1-597) or GST-Nhp6a bound on glutathione agarose beads were incubated with purified 6xHis-tagged Aft1 derivatives or N-Tup1 (positive control) and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-His antibody. The input lane contains 20% of the total amount of each 6xHis-tagged protein incubated with the beads. Multiple bands observed in B-1 correspond to Aft1 degradation products. Top left inset: electrophoretic pattern of the 6xHis-tagged proteins (input amounts).

in yeast reveal new functions and molecular interplays. *FRE2* gene is induced upon iron limitation by the iron-responsive, DNA-binding, transcriptional activator Aft1. Although cellular iron concentration regulates the subcellular localization of Aft1, we found that Nhp6 and Ssn6 global coregulators are necessary to potentiate its activation function acting together at UAS_{Aft1} on the simply regulated *FRE2* promoter.

Nhp6 acts at *FRE2* UAS regulating predominantly Aft1 DNA binding

Nhp6 regulates the transcription of a number of RNA polymerase II-transcribed genes. *In vivo* experiments with chimeric promoter constructions have suggested that Nhp6 acts, in most cases, at the core promoters of RNA polymerase II-transcribed genes, whereas *in vitro* binding experiments have demonstrated that it promotes the formation of a complex

with TBP and TFIIA, at the TATA box, with enhanced affinity for TFIIB (Paull *et al*, 1996). Recent genetic analysis has shown that Nhp6 stimulates TBP binding to *HO* promoter, leading to initiation of transcription (Yu *et al*, 2003). Here, we show that *FRE2* is another RNA polymerase II-transcribed gene whose activated transcription depends on Nhp6 protein. Nhp6 is predominantly required at *FRE2* UAS rather than at the core promoter since transcriptional activation of a *FRE2*_{UAS}-*HIS3-LacZ* gene, in which the *FRE2* core promoter has been replaced by the Nhp6-independent respective region from *HIS3*, was reduced by 80% in *nhp6ΔΔ* strain. Thus, Nhp6 seems to intervene in the function of *FRE2* gene's DNA-binding transactivator, Aft1. Interestingly, LexA-Aft1-mediated activation of a *LexAop-HIS3-LacZ* gene was reduced by only 50% in the same strain, revealing that, in the *FRE2* promoter context, Nhp6 predominantly affects the DNA-binding function of Aft1. This was confirmed by showing that recruitment of Aft1 on *FRE2* promoter is quantitatively dependent upon the presence of Nhp6. We further demonstrated *in vivo* association of Nhp6 with Aft1 and *in vitro* direct interaction of Nhp6 with the N-half of Aft1 correlated with its DNA-binding domain. Therefore, we reason that, *in vivo*, Nhp6 enhances the binding of Aft1 to its cognate DNA site at *FRE2* promoter. Consistent with this, under induction conditions, when Aft1 is nuclear, we observed nucleosomal remodeling at the region of UAS_{Aft1}, possibly to improve its accessibility, and this was dependent on the presence of Nhp6. In addition to its effect on Aft1 DNA binding, Nhp6 may also affect directly Aft1 activation function since we observed a residual Nhp6 effect on LexA-Aft1-mediated activation (Figure 2B). These effects could be mediated by chromatin structure-modulating activities known to associate genetically and/or physically with Nhp6 (Yu *et al*, 2000, 2003; Brewster *et al*, 2001; Formosa *et al*, 2001; Szerlong *et al*, 2003). A possible role of SAGA on *FRE2* promoter was implied by the significant transcriptional reduction of *FRE2* mRNA accumulation in a *gcn5Δ* strain (unpublished observations).

An indication that Nhp6 mediates its biological functions by interacting with different proteins at various promoters was previously reported using engineered mutations affecting its RNA polymerase II- or III-related functions but not its DNA-binding and -bending properties (Kruppa and Kolodrubetz, 2001). It is also known that Nhp6 is required for *GAL1* UAS activity (Paull *et al*, 1996), and a direct interaction between the activation domain of Gal4 transactivator and Nhp6b has been demonstrated (Laser *et al*, 2000). However, how this interaction assists Gal4 in its function remains unknown. On the other hand, the mammalian HMGB1/2 proteins enhance the *in vitro* DNA-binding ability of several sequence-specific transcription factors by directly interacting with them *in vitro* and this has been correlated with their role in activation or repression of transcription *in vivo* (Thomas and Travers, 2001; Agresti and Bianchi, 2003). Therefore, a chaperone role has been proposed for nonsequence-specific HMGB proteins in facilitation and stabilization of transcription factor binding, allowing additional proteins or protein complexes to be recruited. Our results provide *in vivo* biochemical evidence for a similar mode of action of the yeast Nhp6 HMGB protein in facilitating the binding of Aft1 transactivator to its target site on *FRE2* promoter.

***Ssn6* corepressor is recruited under inducing conditions on *FRE2* promoter and mediates transcriptional activation**

Our data point to a crucial coactivating role of Ssn6 in Aft1-mediated *FRE2* transcriptional activation. Ssn6 exerts its action at *FRE2* UAS by dramatically affecting Aft1 transactivation function, as revealed by the *FRE2*_{UAS}-*HIS3-LacZ* and *LexAop-HIS3-LacZ* transcriptional activation in an *ssn6Δ* strain. Moreover, similarly to Nhp6, Ssn6 is required for the observed chromatin remodeling of the activated *FRE2* promoter. Since we showed that Ssn6 is recruited on *FRE2* promoter, we assume that Ssn6 may recruit nucleosome modifying and/or chromatin remodeling activities in this particular promoter context. A positive role for the Ssn6-Tup1 complex in transcription has been reported for *CIT2* gene encoding a citrate synthase, regulated by Rtg3, a bHLH/L-Zip DNA-binding transcriptional activator, upon mitochondrial dysfunction (Conlan *et al*, 1999). The authors proposed that specific metabolic signals may convert the Ssn6-Tup1 transcriptional corepressor to a coactivator on certain promoters. *GAL1* and a set of Sko1-regulated osmotic stress-inducible genes have also been identified as targets of Ssn6-Tup1 positive action (Papamichos-Chronakis *et al*, 2002; Proft and Struhl, 2002). The corepressor complex is continuously tethered on these promoters under both repressing and inducing conditions. Upon induction, instead of being released, it facilitates recruitment of SAGA and/or SWI/SNF coactivators that alleviate Ssn6-Tup1-mediated repression. We showed that on *FRE2* promoter Ssn6 is recruited only under inducing conditions, and this depends quantitatively on the presence of Aft1. Moreover, *ssn6Δ* analysis did not reveal any repressive role of Ssn6 under iron-replete conditions. Therefore, we reason that the Ssn6-Tup1 complex is tethered at *FRE2* promoter upon induction and that, therefore, it has an explicitly coactivating role. We assume a Tup1 effect similar to that of Ssn6 since we noticed considerable reduction of induced *FRE2* transcription in *tup1Δ* cells (unpublished observations). The activation function of Ssn6-Tup1 is in agreement with the previously reported decrease in the rate of iron reductive uptake (ferric citrate) in *ssn6Δ* or *tup1Δ* strains (Lesuisse *et al*, 2001). However, the iron reductive uptake results reflect the overall effect of *FRE1* and *FRE2* reductase genes as well as of Aft1-dependent oxidase and permease genes.

Formation of an Aft1-Nhp6-DNA ternary complex on *FRE2* promoter allows Ssn6 recruitment, a crucial step for activation

We showed that Ssn6 recruitment, in the particular *FRE2* promoter context, is induced by Nhp6. By analogy, Nhp6 could be involved in tethering Ssn6-Tup1 to various loci. A previously reported Nhp6b-Tup1 interaction (Laser *et al*, 2000) is in support of this notion. However, we were not able to detect interaction between Nhp6a and Tup1 in both our *in vivo* and *in vitro* experiments nor association between Ssn6 and Nhp6 proteins. Therefore, Ssn6 appears to be recruited on *FRE2* promoter via direct interaction with an Aft1-Nhp6-DNA ternary complex. In fact, its recruitment depends on the presence of both Aft1 and Nhp6, while its *in vivo* copurification with Aft1 depends on the presence of Nhp6. Upon recruitment, Ssn6 may further stabilize Aft1 DNA binding, since we found *in vitro* direct interaction

of Ssn6 with the N-half of Aft1 (DNA-binding domain) rather than the C-half (transactivation domain) of Aft1. Consistent with this, Aft1 recruitment on *FRE2* promoter was found to be slightly reduced in an *ssn6Δ* strain (unpublished observations).

Based on the above results taken together, we propose a simple model illustrating the sequence of events leading to the formation of an Ssn6–Aft1–Nhp6–DNA quaternary complex on *FRE2* promoter, responsible for the observed full transcriptional activity (Figure 8). In the absence of either Ssn6 or Nhp6, activity is severely reduced, while in the absence of both it is almost abolished (Figure 2A), revealing an Ssn6–Nhp6 functional cooperativity on *FRE2* promoter.

On the other hand, *FRE1* promoter provides a context where Nhp6 and Ssn6 act independently. Although both factors affect *FRE1* gene expression, each of Ssn6 and Nhp6, as well as Aft1, are independently recruited on *FRE1* promoter. This may be due to the fact that *FRE1* transcription depends on different DNA-binding activators besides Aft1. Considering also our presented RNA analysis of other iron-regulated genes, we reason that promoter context-determined protein interactions decide where, when and how global regulators will exert their function.

Materials and methods

Yeast strains and media

ssn6Δ (*cyc8-Δ9::HIS3*) is an FT5 (*MATa ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2::PET56*) derivative (Tzamarias and Struhl, 1994). *nhp6aΔ* *nhp6bΔ* (*nhp6ΔΔ*) and *ssn6Δ* *nhp6ΔΔ* were generated by replacement of the *BstEII-NdeI* fragment of *NHP6A* with *KanMX4* and of the *SphI-MscI* fragment of *NHP6B* with the *URA3* gene and recovery of uracil auxotrophy on 5-FOA-containing plates (Ausubel *et al*, 1987–2003). FT5(*AFT1-9Myc*) and *nhp6ΔΔ*(*AFT1-9Myc*) strains were generated by C-terminal tagging the genomic *AFT1* (Knop *et al*, 1999). *aft1Δ* is S288C derived (Georgatsou *et al*, 1997). The S288C-derived *ssn6Δ** was generated by replacing the *PstI* fragment of *SSN6* by *KanMX4*.

Synthetic complete (SC) medium (0.67% yeast nitrogen base, 20 amino acids, uracil, adenine, 2% glucose, 1.23 μM FeCl₃ and

0.25 μM CuSO₄; Difco) was supplemented with 100 μM bathophenanthroline disulfonic acid-Na₂ salt (BPS) as Fe(II) and Cu(II) chelator (in effect chelator of reduced iron) or with 100 μM bathocuproine disulfonic acid-Na₂ salt (BCS) as Cu(I) chelator.

Plasmids

FRE2_{UAS}-HIS3-LacZ contains *FRE2* promoter (–655 to –419), upstream of the *HIS3* T_R element of the VS11, *URA3*-marked, low-copy plasmid (Georgakopoulos and Thireos, 1992). *LexAop-HIS3-LacZ* contains a single LexA operator upstream of the *HIS3* T_R. LexA-Aft1 plasmid contains the *AFT1* coding sequence between the *SmaI* and *KpnI* sites of YCp91 (Tzamarias and Struhl, 1994). HA-Aft1 plasmid contains an *EcoRI-NcoI*/blunt fragment from LexA-Aft1 plasmid between the *EcoRI* and *SacI*/blunt sites of pYX142 (Novagen). HA-Ssn6 plasmid contains an *EcoRI-SacI* fragment from LexA-Ssn6 plasmid (Tzamarias and Struhl, 1995) between the *EcoRI* and *SacI* sites of pYX142. HA-Nhp6a plasmid was constructed by replacing the *SmaI-NheI* fragment of HA-Ssn6 plasmid with the *NHP6A* coding sequence cloned bluntly between *SmaI* and *NheI*/blunt sites. 6xHis-Ssn6 plasmid contains a *SmaI-NcoI* fragment from HA-Ssn6 plasmid between the *NheI*/blunt and *NcoI* sites of pVTU260 (EUROSCARF). 6xHis-Nhp6a plasmid contains a *BamHI* fragment of *NHP6A* inserted between the *NheI*/blunt and *BamHI* sites of pVTU260. Fusion proteins are functional as judged by phenotypic complementation of the corresponding mutants, and protein levels are not significantly affected in mutant strains as confirmed by Western blot analysis. GST-N-Ssn6(1–597) plasmid contains a *SmaI-PvuII* fragment from HA-Ssn6 plasmid into the *SmaI* site of pGEX-T2 (Pharmacia). GST-Nhp6a plasmid contains the *NHP6A* coding sequence into the *SmaI* site of pGEX-T2. *AFT1* coding sequence was cloned into the *PvuII* site of pRSET-C (Invitrogen) to yield the 6xHis-Aft1(2–690) plasmid. 6xHis-N-Aft1(2–330) plasmid was generated by removal of the *NsiI-NcoI* fragment from 6xHis-Aft1(2–690). 6xHis-C-Aft1(335–690) plasmid contains a PCR-synthesized *AFT1* fragment (+1001 to +2070) into the *PvuII* site of pRSET-C. 6xHis-N-Tup1(1–200) plasmid derived from pRSET-A.

Oligonucleotide primers were purchased from the Microchemistry Lab at FORTH and MWG-Biotech. All PCR primer sequences are available on request. The polymerases used for PCR were Vent (New England Biolabs) or *Taq* (MINOTECH Biotechnology).

Genetic screen

In a *leu2-1 ura3-52* S288C-derived strain, *HIS3* gene was replaced with a *FRE2-HIS3* hybrid containing the *FRE2* regulatory region (–816 to –1) fused to the *HIS3* coding region, leading to iron-dependent histidine auxotrophy. In this selection scheme, we sought mutants affecting putative regulators of *FRE2* but not *FRE1* transcription. A *FRE2*-affecting *trans* semidominant mutation that caused very poor growth on low-iron plates lacking histidine, was isolated. We did not identify the mutated gene (it was not an *AFT1* allele), but instead sought suppressors of this mutation. A YEpl3-based high-copy yeast genomic library (Kim Nasmyth), containing inserts of 5–10 kb, was introduced in the mutant strain, and transformants, initially selected for leucine prototrophy, were screened for growth on plates containing iron-depleted (100 μM BPS) minimal medium lacking histidine, in the presence of 1 mM of 3-aminotriazole, a competitive inhibitor of His3 protein, to repress basal *HIS3* expression. Five plasmids carried inserts from chromosome XVI, with *NHP6A* gene being responsible for suppression. *NHP6A* did not complement the chromosomal mutation since the *NHP6A* allele from the mutant strain could also suppress the *FRE2* mutant phenotype.

RNA analysis

Total RNA was extracted by the acid phenol method (Ausubel *et al*, 1987–2003) from cultures grown to an OD₅₅₀ of 0.6–1.0 in SC medium or initially in SC and then in SCBPS for 7 h or SCBPS for 3 h.

β-Galactosidase and one-hybrid assays

In all, 5 ml of yeast cultures were grown in SC to an OD₅₅₀ of 1.5, diluted and regrown for 7 h in SC or SCBPS, and β-galactosidase activity was measured (Ausubel *et al*, 1987–2003).

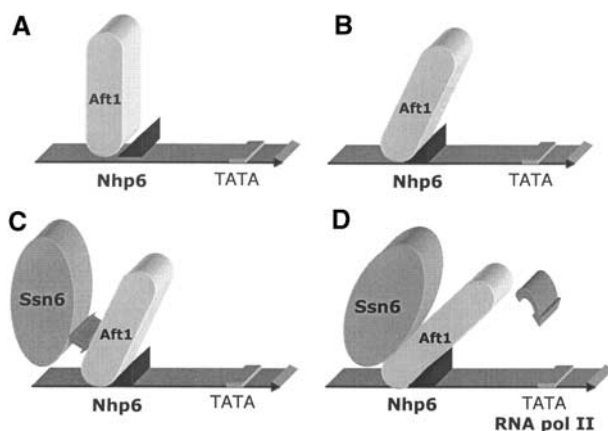


Figure 8 Model depicting how Nhp6a and Ssn6 distinctly and cooperatively potentiate Aft1-mediated transcription on *FRE2* promoter. (A) Upon induction under iron depletion, Nhp6 is in proximity with chromatin and Aft1 interacts with DNA and Nhp6. (B) Structural alterations are induced, resulting in enhanced Aft1 binding to UAS. (C) Ssn6 interaction with Aft1 is favored. (D) The presence of Ssn6 on the promoter further stabilizes Aft1 DNA binding and ensures access to the RNA polymerase II transcription machinery components, resulting in full transcriptional activation.

In vivo nucleosome-remodeling assay

Chromatin analysis of *FRE2* promoter was performed by micrococcal nuclease (MNase) digestion using nystatin-permeabilized spheroplasts (Venditti and Camilloni, 1994) followed by indirect end-labeling. Secondary digestion was with *Xho*I at position +901, and a ³²P-labeled fragment from position +441 to +864 was used as a probe.

Chromatin immunoprecipitation assays

In all, 50 ml of yeast cultures grown to an OD₅₅₀ of 0.6–1.0 initially in SC and then in SCBPS for 7 h were used for ChIP assays (Kuo and Allis, 1999) with polyclonal anti-HA and anti-Myc antibodies (Santa Cruz). Immunoprecipitated (3/100 μl) and total input DNA (3/1000 μl) were analyzed by PCR (4 min at 94°C; 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 55 s at 72°C (27 cycles); 5 min at 72°C). PCR products electrophoresed on 1.7% agarose gels were quantified using the PhosphorImager and ImageQuant software (Molecular Dynamics). The pairs of primers used were specific for promoter or ORF regions: *FRE2*(–596/–297), *FRE1*(–353/–1), *HTA1*(–665/–373), *TRP3*(–146/+143) and *ACT1*(+415/+724).

6xHis pull-down assays in yeast cells

Cells cotransformed with plasmids expressing 6xHis- and HA-tagged proteins were grown to an OD₅₅₀ of 0.8, initially in SC and then in SCBPS for 7 h. Proteins were extracted from lysed cells in 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 75 mM potassium acetate, 0.1% NP-40, 0.5 mg/ml BSA, 5 mM imidazole, 10% glycerol and protease inhibitors. The supernatant was incubated with Ni-NTA beads for 1 h at 4°C. Beads were washed in the same buffer without BSA. Retained proteins were eluted in gel

loading buffer and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting (Ausubel *et al*, 1987–2003) using polyclonal anti-His, anti-HA (Santa Cruz) and anti-Tup1 antibodies. Secondary antibodies were visualized by an ECL Western blotting detection kit (Pierce).

In vitro interaction assays

GST-tagged proteins were expressed in *E. coli* ER2566 (Tzamarias and Struhl, 1995). 6xHis-tagged proteins expressed in ER2566, purified by Ni-NTA chromatography (Qiagen), were eluted in 75 mM KCl, 20 mM Tris, pH 8.00, 0.01% NP-40, 0.25% BSA, 250 mM imidazole and protease inhibitors and incubated with glutathione agarose bead-bound GST or GST hybrid protein for 8–12 h, at 4°C, in 200 μl of the above buffer without imidazole. Beads were washed in the same buffer without BSA and retained proteins were eluted in gel loading buffer and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using a polyclonal anti-His antibody (Santa Cruz).

Acknowledgements

We thank A Voutsina, E Georgatsou, Y Papanikolaou, I Topalidou, G Thireos and I Talianidis for helpful discussions, M Papamichos-Chronakis for the 6xHis-N-Tup1 plasmid, Tup1 antibody and advice, N Gounalaki for the *nhp6ΔΔ*, *ssn6Δ* *nhp6ΔΔ* FT5-derived strains, G Thireos for *LexAop-HIS3-LacZ* plasmid, A Tartas for constructing the LexA-Aft1 plasmid and I Kagiampakis for computational assistance. This work was supported by the Greek Ministry of Development-GSRT (IMBB funding and PENED grant).

References

- Agresti A, Bianchi ME (2003) HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 170–178
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987–2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience
- Blaiseau PL, Lesuisse E, Camadro JM (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* **276**: 34221–34226
- Brewster NK, Johnston GC, Singer RA (2001) A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription. *Mol Cell Biol* **21**: 3491–3502
- Bustin M (1999) Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* **19**: 5237–5246
- Conlan RS, Gounalaki N, Hatzis P, Tzamarias D (1999) The Tup1–Cyc8 protein complex can shift from a transcriptional co-repressor to a transcriptional co-activator. *J Biol Chem* **274**: 205–210
- Costigan C, Kolodrubetz D, Snyder M (1994) NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast SLT2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **14**: 2391–2403
- Dancis A, Roman DG, Anderson GJ, Hinnebusch AG, Klausner RD (1992) Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3869–3873
- Formosa T, Eriksson P, Wittmeyer J, Ginn J, Yu Y, Stillman DJ (2001) Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN. *EMBO J* **20**: 3506–3517
- Georgakopoulos T, Thireos G (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J* **11**: 4145–4152
- Georgatsou E, Alexandraki D (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**: 3065–3073
- Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS, Alexandraki D (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem* **272**: 13786–13792
- Jensen LT, Winge DR (1998) Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**: 5400–5408
- Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963–972
- Kolodrubetz D, Burgum A (1990) Duplicated NHP6 genes of *Saccharomyces cerevisiae* encode proteins homologous to bovine high mobility group protein 1. *J Biol Chem* **265**: 3234–3239
- Kolodrubetz D, Kruppa M, Burgum A (2001) Gene dosage affects the expression of the duplicated NHP6 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **272**: 93–101
- Kosman DJ (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* **47**: 1185–1197
- Kruppa M, Kolodrubetz D (2001) Mutations in the yeast Nhp6 protein can differentially affect its *in vivo* functions. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1292–1299
- Kruppa M, Moir RD, Kolodrubetz D, Willis IM (2001) Nhp6, an HMG1 protein, functions in SNR6 transcription by RNA polymerase III in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **7**: 309–318
- Kuo MH, Allis CD (1999) *In vivo* cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* **19**: 425–433
- Laser H, Bongards C, Schuller J, Heck S, Johnsson N, Lehming N (2000) A new screen for protein interactions reveals that the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the GAL1 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13732–13737
- Lesuisse E, Blaiseau PL, Dancis A, Camadro JM (2001) Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**: 289–298
- Lopez S, Livingstone-Zatchej M, Jourdain S, Thoma F, Sentenac A, Marsolier MC (2001) High-mobility-group proteins NHP6A and NHP6B participate in activation of the RNA polymerase III SNR6 gene. *Mol Cell Biol* **21**: 3096–3104
- Martin MP, Gerlach VL, Brow DA (2001) A novel upstream RNA polymerase III promoter element becomes essential when the chromatin structure of the yeast U6 RNA gene is altered. *Mol Cell Biol* **21**: 6429–6439
- Moreira JM, Holmberg S (2000) Chromatin-mediated transcriptional regulation by the yeast architectural factors NHP6A and NHP6B. *EMBO J* **19**: 6804–6813
- Papamichos-Chronakis M, Petrakis T, Ktistaki E, Topalidou I, Tzamarias D (2002) Cti6, a PHD domain protein, bridges the

- Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1. *Mol Cell* **9**: 1297–1305
- Paull TT, Carey M, Johnson RC (1996) Yeast HMG proteins NHP6A/B potentiate promoter-specific transcriptional activation *in vivo* and assembly of preinitiation complexes *in vitro*. *Genes Dev* **10**: 2769–2781
- Paull TT, Johnson RC (1995) DNA looping by *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins NHP6A/B. Consequences for nucleoprotein complex assembly and chromatin condensation. *J Biol Chem* **270**: 8744–8754
- Proft M, Struhl K (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307–1317
- Rutherford JC, Jaron S, Winge DR (2003) Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J Biol Chem*
- Sidorova J, Breeden L (1999) The MSN1 and NHP6A genes suppress SWI6 defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**: 45–55
- Smith RL, Johnson AD (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **25**: 325–330
- Szerlong H, Saha A, Cairns BR (2003) The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin remodeling. *EMBO J* **22**: 3175–3187
- Thomas JO, Travers AA (2001) HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **26**: 167–174
- Tzamarias D, Struhl K (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369**: 758–761
- Tzamarias D, 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
- Venditti S, Camilloni G (1994) *In vivo* analysis of chromatin following nystatin-mediated import of active enzymes into *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **242**: 100–104
- Wong B, Masse JE, Yen YM, Giannikopoulos P, Feigon J, Johnson RC, Giannikopoulos P (2002) Binding to cisplatin-modified DNA by the *Saccharomyces cerevisiae* HMGB protein Nhp6A. *Biochemistry* **41**: 5404–5414
- Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A, Klausner RD (1995) AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**: 1231–1239
- Yamaguchi-Iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, Klausner RD, Dancis A (1997) Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J Biol Chem* **272**: 17711–17718
- Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A, Klausner RD (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulation in yeast. *EMBO J* **15**: 3377–3384
- Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 18914–18918
- Yen YM, Wong B, Johnson RC (1998) Determinants of DNA binding and bending by the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group protein NHP6A that are important for its biological activities. Role of the unique N terminus and putative intercalating methionine. *J Biol Chem* **273**: 4424–4435
- Yu Y, Eriksson P, Bhoite LT, Stillman DJ (2003) Regulation of TATA-binding protein binding by the SAGA complex and the Nhp6 high-mobility group protein. *Mol Cell Biol* **23**: 1910–1921
- Yu Y, Eriksson P, Stillman DJ (2000) Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Mol Cell Biol* **20**: 2350–2357
- Zhang L, Guarente L (1994) Evidence that TUP1/SSN6 has a positive effect on the activity of the yeast activator HAP1. *Genetics* **136**: 813–817

The second cysteine-rich domain of Mac1p is a potent transactivator that modulates DNA binding efficiency and functionality of the protein

Alexandra Voutsina^a, George S. Fragiadakis^{a,b}, Alexandra Boutla^b, Despina Alexandraki^{a,b,*}

^aFoundation for Research and Technology-HELLAS, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, P.O. Box 1527, Heraklion 711 10, Crete, Greece

^bDepartment of Biology, University of Crete, P.O. Box 1527, Heraklion 711 10, Crete, Greece

Received 14 December 2000; revised 6 March 2001; accepted 7 March 2001

First published online 19 March 2001

Edited by Matti Saraste

Abstract Mac1p is a *Saccharomyces cerevisiae* DNA binding transcription factor that activates genes involved in copper uptake. A copper-induced N–C-terminal intramolecular interaction and copper-independent homodimerization affect its function. Here, we present a functional analysis of Mac1p deletion derivatives that attributes new roles to the second cysteine-rich (REPII) domain of the protein. This domain exhibits the copper-responsive potent transactivation function when assayed independently and, in the context of the entire protein, modulates the efficiency of Mac1p binding to DNA. The efficiency of binding to both copper-response promoter elements can determine the in vivo functionality of Mac1p independent of homodimerization. © 2001 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Mac1p; Transcriptional activation/repression; DNA binding; Yeast two-hybrid; Metalloregulation; Copper homeostasis

1. Introduction

Copper is an essential nutrient for all living organisms serving as catalytic co-factor of various enzymes required for respiration, oxidative damage response and iron uptake. Excess copper accumulated in the cell catalyzes the generation of reactive hydroxyl radicals causing damage to DNA, proteins and lipids. In *Saccharomyces cerevisiae*, copper homeostasis is maintained through both regulated cellular uptake and intracellular sequestration of copper ions [1,2]. Copper uptake is mediated by the plasma membrane high affinity permeases Ctr1p and Ctr3p and the Cu(II)/Fe(III) reductases Fre1p/Fre2p [3–6]. *CTR1*, *CTR3* and *FRE1* genes are transcriptionally upregulated under copper starvation conditions (below 1 nM) and downregulated in copper-replete cells [7–9]. The metal-sensitive transcription factor Mac1p (metal binding activator) binds to two CuRE (copper-response element, 5'-TTTG(T/G)C(A/G)-3') DNA sequences on the promoters of the responding genes and mediates activation [8–10].

Mac1p was found within the nucleus of both copper-defi-

cient and copper-loaded cells [11,12]. It contains different functional domains within its 417 amino acid residues [12]. Its DNA binding portion (residues 1–159) contains a zinc and copper binding motif (Cys-X₂-Cys-X₈-Cys-X-His) homologous to the metallothionein transactivators Ace1p (*S. cerevisiae*) and Amt1 (*Candida glabrata*) [13,14]. In vitro DNA binding of Mac1p was found copper-independent [9] but in vivo footprint was feasible only in copper-deficient cells, extinguished in 10 nM of copper ions [8]. Its C-terminal region (residues 252–341), that includes two cysteine-rich repeats (Cys-X-Cys-X₄-Cys-X-Cys-X₂-Cys-X₂-His), termed REPI (residues 264–279) and REPII (residues 322–337), respectively, exhibits the transactivation function and possibly binds eight copper ions [11]. The transcriptional activity of Mac1p is regulated by copper [6,15]. Two-hybrid interaction between the DNA binding and transactivation domains proposes that copper binding induces an allosteric interaction that inhibits both functions [11]. An unknown detoxification mechanism ensures elimination of the Cu(I) transport system, by rapid degradation of Mac1p at high copper ion concentrations (over 10 μM) [16]. Mac1p activation domain contains two functionally distinct regions. Mutations in the REPI motif resulted in constitutively active peptides, incapable of intramolecular interaction and more resistant to copper-dependent degradation [11,16]. Mutations in the REPII motif failed to activate *CTR3* transcription and did not rescue the respiratory deficiency of *mac1* [16]. However, they did not affect the copper-regulated transcriptional activity of Gal4pDBD-Mac1p fusion proteins on *GALI-UAS-driven lacZ* [15] and resulted in peptides degraded with similar to wild-type kinetics [16]. Therefore the function of REPII was not clear. Finally, a copper-independent two-hybrid Mac1p–Mac1p interaction was attributed to a predicted helix in the C-terminal residues 388–406 [12] and in vitro DNA shift assays proposed that Mac1p homodimerization facilitates binding to two CuRE elements of the responsive promoters [17]. In this paper, our functional analysis of Mac1p deletion derivatives investigates the role of the REPII-containing region and identifies indispensable regions for a copper-regulated in vivo functional Mac1p molecule.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and growth conditions

Construction of *mac1Δ* strain was previously described [6]. PJ69-4α (*MATα*) used for one- and two-hybrid experiments derived from PJ69-4A (*MATα trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ UASGAL2-ADE2 LYS2::UASGAL1-HIS3 met2::UASGAL7-lacZ*)

*Corresponding author. Fax: (30)-81-3911101.
E-mail: alexandr@imbb.forth.gr

Abbreviations: DBD, DNA binding domain; AD, DNA activation domain; REPI/REPII, repeat I/II; CuRE, copper-response element; BCS, bathocuproine disulfonate

[18,19] (gifts from D. Lockshon and J.-C. Jauniaux). FY105 (*ura3-52 his3Δ200 trp1-54*) was used for gene isolation.

Standard bacterial and yeast growth media and methods were used as previously described [20–22]. SC, synthetic complete medium, contains 0.67% yeast nitrogen base (Difco), all amino acids, uracil, adenine and 2% glucose. SC was supplemented with 100 μM bathocuproine disulfonic acid-Na₂ salt (BCS) as Cu(I) chelator [4]. For all assays described, cells were cultured in SC medium to OD₆₀₀ of 1.0, aliquots were resuspended to OD₆₀₀ of 0.1 into the desired medium and cultured for 6 h at 30°C.

2.2. Plasmid construction

MAC1 protein coding sequence and deletion derivatives were generated by PCR using Vent Polymerase (New England Biolabs) and synthetic oligonucleotides (Microchemistry Lab at FORTH, Greece, and MWG-Biotech AG, Germany). pGBT9 (Clontech), pACTII (Clontech) were used for one- and two-hybrid assays, pYX142 (Novagen) and pRS315 [23] for *mac1Δ* complementation and pBluescript II for *in vitro* transcription/translation. The levels of *TPI*-driven *MAC1* RNAs in pYX142 were 8–9-fold higher than those expressed from *MAC1* promoter (data not shown).

MAC1 genomic sequence [6] (including 939 bp upstream of the AUG, the coding region and 674 bp downstream of the stop codon) was subcloned into the *ApaI*–*HindIII* sites of pRS315. A *MAC1* PCR-generated fragment using 5'-GGATCTCGAGACAATAAGCTGC-3' and 5'-GGGGTACCTGAAGTGGTGGCATCGCTTA-3', containing the coding region and 100 bp upstream was subcloned into the *KpnI*–*XhoI* sites of pBluescript II KS. Primers 5'-ttccccgggATAA-TATTTAATGGGAACA-3' and 5'-ggggtaccTGAAGTGGTGGCA-TCGCTTA-3' generated *MAC1* coding fragment, subsequently subcloned bluntly into (a) *SalI* site of pGBT9 filled in with dNTPs by the Klenow fragment of DNA polymerase I, (b) *SmaI* site of pACTII and (c) *NcoI*–*HindIII* sites of pYX142 filled in with dNTPs.

Mac1p(1–337) was generated using primers 5'-cgggatccgtATGATAATTTAATGGGA-3' and 5'-cggaattcAGAGTGAGAAAAA-CATCC-3' and subcloned into (a) *BamHI* and *PstI* filled in sites of pGBT9 and (b) *BamHI*–*SmaI* sites of pYX142; the *BamHI*–(*NheI* blunt) fragment from this was subcloned into the *BamHI*–*SmaI* sites of pBluescript II KS.

Mac1p(1–322) was generated by *NdeI*–*XhoI* digestion of *MAC1* subcloned into pYX142, filling in and religation. From this construct, the *EcoRV*–*SacI* fragment was subcloned into the *NcoI* filled in and *SacI* sites of pACTII, the *EcoRV*–*SacI* (filled in) fragment was subcloned into the *SalI* filled in site of pGBT9 and the *EcoRI*–(*NheI* blunt) fragment into the *EcoRI*–*XbaI* sites of pBluescript II KS.

Mac1pΔ(323–337) was generated from ligation of two DNA fragments (*BamHI*–*NsiI* from Mac1p(1–337) and a PCR fragment from 5'-aaactgcagcACAAATATAATTCCATTTGAA-3' and 5'-ggggtaccTGAAGTGGTGGCATCGCTTA-3' primers), and subcloning into (a) *BamHI* and *PstI* filled in sites of pGBT9, (b) *BamHI* and *XhoI* filled in sites of pACTII and (c) *BamHI*–*SmaI* sites of pYX142; from this construct, a *BamHI*–(*KpnI* blunt) fragment was subcloned to *BamHI*–*SmaI* sites of pBluescript II KS.

Mac1p(281–417) was generated using 5'-tccccgggAGCGAAGAG-GAATGAATTC-3' and 5'-ggggtaccTGAAGTGGTGGCATCGCTTA-3' primers and subcloning into the *SalI* filled in site of pGBT9.

Mac1p(338–417) was synthesized using 5'-aaactgcagcACAAATA-TAATTCATTTGAA-3' and 5'-ggggtaccTGAAGTGGTGGCATCGCTTA-3' and subcloning into the *XmaI* filled in site of pGBT9. Mac1p(1–159) was generated from Mac1pΔ(338–417) as *BamHI*–*NaeI* fragment and subcloned into *BamHI* and *PstI* filled in sites of pGBT9 or into *BamHI*–*EcoRV* sites of pBluescript II KS.

2.3. RNA blot hybridization and DNA mobility shift assays

Samples of 50 μg total RNA [6] were electrophoresed on 1.5% agarose gels, transferred onto nylon membranes and used for hybridizations. Electrophoretic mobility shift assays were conducted using a radiolabelled double-stranded 40-mer oligonucleotide as probe, containing *CTR1* promoter sequences extending from –339 to –300 and including all sequence context needed for strong Mac1p binding [17]. Mac1p peptides were produced *in vitro* by the coupled TNT wheat germ extract system (Promega), using *MAC1* deletion derivatives as DNA templates, in the presence of [³⁵S]methionine. Visual detection and quantitation of the protein products were possible by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% polyacrylamide gels followed by autoradiography. DNA–protein binding reactions were car-

ried out in 15 μl of binding buffered solution (12% glycerol, 12 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.6 mM EDTA and 0.6 mM dithiothreitol [17]) containing 0.5 μg of herring sperm DNA, 5 fmol of ³²P-end-labelled probe and 1 μl of wheat germ extract. Mixtures were incubated for 20 min at room temperature and then electrophoresed on 1.5% agarose gels run at 120 V, at 4°C [24] and analyzed by autoradiography.

2.4. One- and two-hybrid assays and Western blot analysis

Mac1p hybrid derivatives were expressed from pGBT9 (Gal4pDBD-Mac1p) and pACTII (Gal4pAD) vectors. PJ69-4α transformed with the appropriate vectors was grown on SC selective medium. PJ69-4α strain has three distinct reporter genes, *ADE2*, *HIS3* and *lacZ*, each under the control of a different Gal4p-dependent UAS, *GAL2*, *GAL1* and *GAL7*, respectively [19]. One- and two-hybrid assays were performed by measuring β-galactosidase activity in liquid assays [20]. Protein levels of Gal4pDBD-Mac1p fusion derivatives were detected using a polyclonal antibody to Gal4p DNA binding domain (DBD). PJ69-4A transformed with Gal4pDBD-Mac1p derivatives was grown to OD₅₅₀ = 1. Whole cell extracts were prepared from 10 OD₅₅₀ units of cells by glass bead disruption [25]. Proteins were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose membranes and analyzed with anti-Gal4pDBD (Santa Cruz, cat # sc-577) (1:100 dilution) and goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:40 000 dilution).

3. Results

3.1. A *Mac1p* derivative lacking both the REPII cysteine-rich and dimerization domains is copper-responsive and functional *in vivo*

To investigate the role of the REPII region in Mac1p function *in vivo*, we examined the ability of Mac1p deletion derivatives to complement the respiratory deficiency of a *mac1Δ* strain [7]. Our analysis included Mac1p(1–337) lacking the dimerization domain, Mac1pΔ(323–337) lacking the REPII motif and Mac1p(1–322) lacking both the REPII and dimerization domains. Expression of all derivatives and full-length Mac1p(1–417) was driven from the constitutive *TPII* promoter of the centromeric plasmid pYX142. Mac1p expressed from *MAC1* promoter on the centromeric pRS315 was also examined. As shown in Fig. 1, Mac1pΔ(323–337) complemented the growth defect as well as full-length Mac1p, indicating that deletion of the REPII domain had no dramatic effects on the examined Mac1p function. Mac1p(1–337) did not complement the growth defect, in agreement to previous results, suggesting that dimerization of Mac1p was essential for that function [12]. However, complementation was also obtained by Mac1p(1–322) that contains neither the REPII

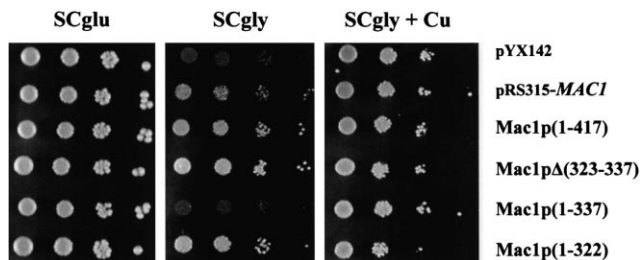


Fig. 1. Phenotypic complementation of *mac1Δ* strain by Mac1p deletion derivatives. *mac1Δ* cells were transformed with pYX142 expressing the indicated Mac1p derivatives, pYX142 vector and pRS315-*MAC1*. 10 μl of serially diluted cells from exponentially grown cultures in SC glucose medium were spotted (from left to right) on solid media SC glucose, SC glycerol (containing 3% glycerol instead of 2% glucose) or SC glycerol plus 100 μM of CuSO₄ and grown for 2, 5 and 5 days, respectively, at 30°C.

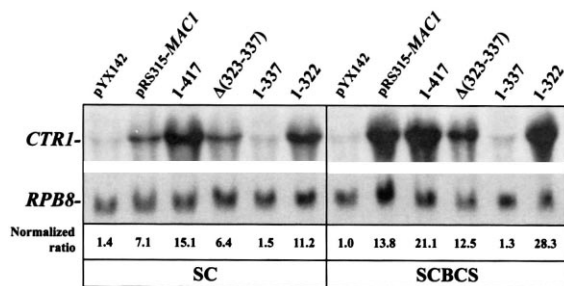


Fig. 2. *CTR1* mRNA accumulation regulated by *Mac1p* deletion derivatives. *mac1Δ* cells transformed with pYX142 expressing the indicated *Mac1p* derivatives, pYX142 vector and pRS315-*MAC1* were grown in copper-replete (SC) or copper-deplete (SCBCS) medium. Extracted RNA was subjected to Northern analysis using *CTR1* and *RPB8* (internal quantitative control) radiolabelled DNA probes. Normalized ratios of *CTR1*/*RPB8* mRNA levels were measured using the Scion Image program on various autoradiography exposures.

nor the dimerization domains, indicating that this derivative was functional. Growth defects were rescued under high copper ion conditions known to rescue the inability of *mac1Δ* to utilize glycerol as a sole carbon source.

To further investigate the copper responsiveness of *Mac1p*(1–322), we examined its ability to promote *CTR1* mRNA accumulation in *mac1Δ* cells grown in the presence or absence of copper. In the presence of 0.25 μM CuSO₄ (SC medium), full-length *Mac1p* expressed from its own promoter activated *CTR1* whereas the *TPI*-driven full-length *Mac1p* promoted even higher *CTR1* activation (Fig. 2). In the absence of copper (100 μM BCS) both *Mac1p*-expressing strains displayed even higher *CTR1* activation. In agreement

to the phenotypic complementation results, *Mac1pΔ*(323–337) activated *CTR1* in response to copper depletion, however, at lower (about 2.5-fold) levels than those induced by the full-length *Mac1p*. This could indicate a contribution of the REPII domain to the transactivation potential of *Mac1p*, not revealed by the phenotypic test. *Mac1p*(1–337) did not activate transcription at any condition. *Mac1p*(1–322) responded to copper depletion similarly to full-length *Mac1p*. Therefore, the N-terminal truncated derivative containing the DNA binding and REPI domains was sufficient for copper-modulated *in vivo* *Mac1p* function, although the other derivatives indicated that the dimerization domain was essential and the contribution of REPII could be significant for *CTR1* activation.

3.2. The REPII cysteine-rich region exhibits independent copper-regulated potent transactivation function

To investigate the contribution of the REPII domain in the transcriptional induction of *CTR1*, we examined the transactivation potential and copper responsiveness of the described and other derivatives in a one-hybrid system. All peptides were fused to the Gal4pDBD and examined for regulation of the *GAL7*-UAS-driven *lacZ* gene, in response to both copper repletion (100 μM CuSO₄) and copper starvation (100 μM BCS) conditions. As shown in Fig. 3A, a C-terminal derivative containing only the REPII and dimerization domains, *Mac1p*(281–417), exhibited high transactivation. This function was regulated by copper, indicative of an inhibitory effect from copper binding. Another C-terminal derivative containing only the dimerization domain, *Mac1p*(338–417), gave insignificant levels of activation, attributing the previous result to the remaining REPII-containing sequences. However, the

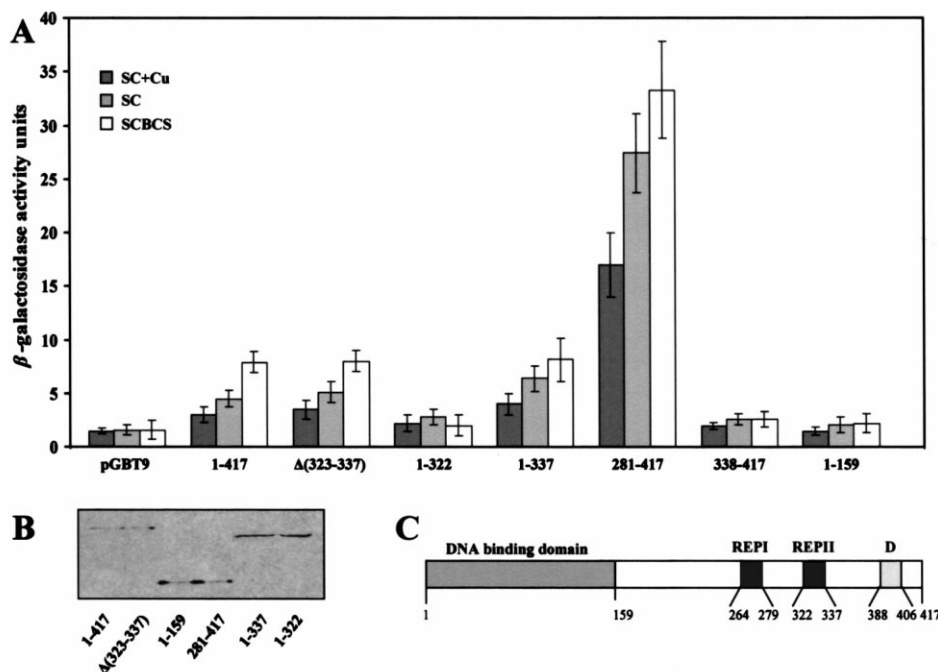


Fig. 3. Copper-modulated *Mac1p* transactivation function. A: Diagrammatic representation of β-galactosidase activity units obtained from a *met2::UASGAL7-lacZ* reporter gene, in PJ69-4α cells transformed with pGBT9 vector or the indicated *Mac1p* derivatives fused to the Gal4pDBD of pGBT9. Cells were cultured under three different conditions (SC supplemented with 100 μM of CuSO₄, SC and SC supplemented with 100 μM of BCS) as described in Section 2. Standard deviation of unit values from five independent experiments is indicated. B: Protein levels of Gal4pDBD-*Mac1p* derivatives analyzed by Western blotting using anti-Gal4pDBD as described in Section 2. C: Diagrammatic representation of *Mac1p* domains.

full-length Mac1p(1–417), the REPII deletant Mac1p Δ (323–337) and Mac1p(1–337) lacking the dimerization domain all exhibited comparable levels of copper-responsive transactivation. This result suggested that the activation function of the REPII domain was not significant in the context of these derivatives. Therefore, the REPII-containing region (most likely residues 322–337) has a potent activation function that is apparently reduced in the context of the entire protein. The copper-regulated *in vivo* functional Mac1p(1–322) exhibited very low levels of activation and this was not due to lower amounts of protein, since all fusion peptides were expressed at comparable amounts (Fig. 3B). It was rather indicative of low activation potential of the REPI domain in the context of this construct.

3.3. The REPII domain modulates DNA binding efficiency of Mac1p derivatives

Since the above presented transactivation potential of Mac1p derivatives did not correlate directly to their *in vivo* functionality, we further examined the DNA binding efficiency of each peptide. Previous reports have shown that binding to both CuRE elements present in all Mac1p-regulated promoters is needed for transcriptional activation [8,9]. The inability of a D-helix deletion derivative to form (Mac1p)₂–DNA ternary complex *in vitro* and complement *mac1* respiratory deficiency *in vivo* led to the hypothesis that homodimerization of Mac1p facilitates its binding to the two promoter elements [17].

We tested equal amounts of *in vitro*-synthesized Mac1p and derivatives (Fig. 4A) for binding on a DNA fragment containing both CuRE elements of the *CTRI* promoter. According to previous *in vitro* electrophoretic mobility shift assays [13,17], we considered the resolution of a shifted DNA band as binding to one element and the resolution of an additional band with lower mobility as binding to both elements. Mac1p showed binding to one and both consensus elements, indicated by two shifted bands (Fig. 4B) and increased amounts of input protein resulted in almost exclusive binding to both elements (Fig. 4C). The minimal DBD alone, Mac1p(1–159), showed binding to one and both elements and Mac1p(1–337), lacking dimerization domain, bound to one element only as previously observed. Under the same experimental conditions, the REPII deletant Mac1p Δ (323–337) showed significantly higher binding to both elements, compared to the full-length Mac1p, and Mac1p(1–322) bound to one element with much higher efficiency than any other tested peptide; increased amounts of input protein increased binding to both elements. This finding implied that, although Mac1p(1–322) is not as potent a transactivator as the full-length Mac1p, it binds to

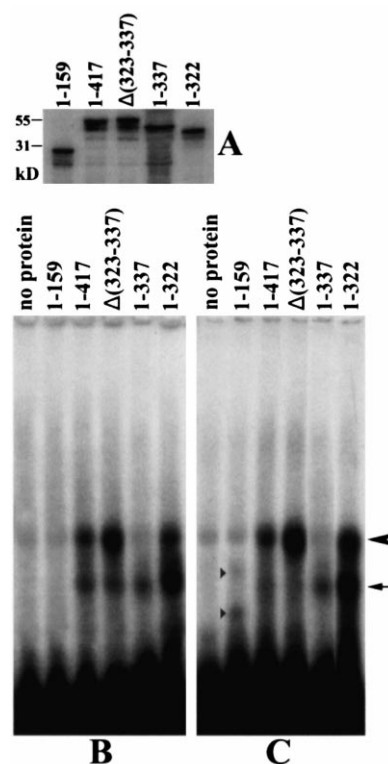


Fig. 4. *In vitro* binding of Mac1p deletion derivatives to *CTRI* promoter. A: Autoradiogram of Mac1p derivatives synthesized in wheat germ extract, in the presence of [³⁵S]methionine and analyzed by SDS-PAGE. 0.5 μ l of the indicated peptides were loaded in each lane. B: Autoradiogram of mobility band shift assays performed by mixing *in vitro*-synthesized Mac1p derivatives with 5 fmol of a ³²P-end-labelled *CTRI* promoter 40-mer DNA. 0.5 μ l of input proteins plus 0.5 μ l of wheat germ extract were added to each binding reaction. C: as in B but 1 μ l of input protein was added to each reaction. ‘No protein’ lanes contain 1 μ l wheat germ extract alone and *CTRI* probe. Migration sites for the Mac1p–DNA binary (arrow) and (Mac1p)₂–DNA ternary (arrowhead) complexes are indicated. Small arrowheads indicate the corresponding sites for the smallest Mac1p(1–159) derivative.

both CuRE elements on target promoters much more efficiently, namely in higher quantities, and therefore provides comparable functionality. It also implied that Mac1p(1–322) and Mac1p Δ (323–337) bind better because they lack the REPII domain.

These results also indicated that dimerization was not a prerequisite for DNA binding and functionality of Mac1p(1–322). Indeed, examination of protein interactions in a two-hybrid system showed that, while all derivatives con-

Table 1
Two-hybrid interactions between Mac1p deletion derivatives

	pACTII	1–417	1–322	Δ (323–337)	240–417	293–417
pGBT9	1.50	2.96	3.00	2.00	1.60	2.30
1–417	4.50	71.00	–	74.00	50.00	132.00
1–322	3.20	–	3.80	–	4.15	–
1–337	6.70	14.00	–	13.00	10.00	15.00
338–417	2.60	12.00	–	7.60	98.00	145.00
281–417	45.00	72.00	–	68.00	52.00	129.00

β -Galactosidase activity units obtained from a met2::UASGAL7-*lacZ* reporter gene, in PJ69-4 α cells co-transformed with the indicated Mac1p derivatives fused to the Gal4pDBD of pGBT9 and to the Gal4pAD of pACTII. Derivatives 240–417 and 293–417 are clones identified in a pACTII genomic DNA library. Cells were cultured in SC medium. Unit values from a representative out of five independent experiments are shown.

taining dimerization domain exhibited strong two-hybrid interactions, both derivatives lacking dimerization domain, Mac1p(1–322) and Mac1p(1–337), exhibited very low levels of β -galactosidase activity, indicating that they do not use alternative domains to homodimerize (Table 1).

4. Discussion

Mac1p is a multidomain protein and its function involves both inter- and intramolecular interactions. The presented data on functionality in vivo, transactivation potential and DNA binding efficiency of Mac1p truncated derivatives provide new insights on the role of the second cysteine-rich domain. We found that this domain, when assayed independently, was a potent transactivator responsive to copper. In the context of the entire protein, REPII domain mostly affected the efficiency of the protein to bind to both CuRE promoter elements, pertinent for Mac1p function; in the absence of REPII domain, DNA binding efficiency was increased. Mac1p(1–322), that lacks REPII and dimerization domains, was copper-responsive and fully functional in vivo due to its higher efficiency of binding to both CuRE elements and possibly better exposure of the REPI-containing activation domains, compared to the full-length Mac1p homodimer. Homodimerization was not detected between Mac1p(1–322) peptides and therefore did not play any role in their binding on promoters and their functionality. The in vivo functional REPII deletion Mac1p Δ (323–337) also exhibited more efficient in vitro binding to both CuRE elements compared to the full-length homodimer. The negative role of REPII in DNA binding could be exerted through potential cysteine–cysteine interactions between REPII and DBDs. As previously proposed, such interactions can occur primarily via REPI cysteines and copper ions [11]. We suggest that, in the absence of REPII domain, the probability of N–C-terminal intramolecular interactions is reduced and DNA is better stabilized in its DNA-bound conformation. In fact, our one-hybrid results are in agreement with this hypothesis. The Gal4pDBD fusion N-terminal derivatives contain Mac1pDBD in a non-DNA-bound conformation, possibly more available for intramolecular interactions. All N derivatives in which REPI was followed by additional ‘stabilizing’ sequences (REPII or REPII-D or D) exhibited *lacZ* transactivation; Mac1p(1–322), containing only the first cysteine-rich domain REPI, showed practically no activation, possibly because REPI was mostly involved in interactions with Mac1pDBD. On the other hand, the Gal4pDBD–REPII-D fusion, containing no Mac1pDBD, exhibited its full activation potential.

Previous studies investigating the effects of point mutations in REPII in one-hybrid context suggested a minor role for this domain in the activation function of Mac1p [15], similarly to our results with Gal4pDBD–Mac1p Δ (323–337). Other studies have shown that a Mac1p derivative bearing Cys–Ser substitutions in all Cys sequence positions of REPII was not functional in vivo when expressed from a low copy number plasmid [16]. Our Mac1p Δ (323–337) was functional but overexpressed and this could explain the apparent difference concerning the necessity of REPII on Mac1p function. Alternatively, Cys–Ser substitutions could have different effects on Mac1p DNA binding than REPII deletion.

Mac1p Δ (323–337), despite its better DNA binding potential, activated *CTR1* expression less than Mac1p. This could

possibly be due to interference of the more proximal dimerization domain with the REPI transactivation function.

The non-functional Mac1p(1–337) that lacks the dimerization but contains the REPII domain showed in vitro binding to one CuRE element only, indicating an essential positive role of dimerization when REPII is included in the protein context. In other studies, the need for dimerization could also be bypassed when the very strong activation domain of VP16 was fused to the DBD of Mac1p [13].

Overall, our results showed that REPII exerts a negative effect on Mac1p DNA binding. Neutralization of its effects results in increased DNA binding efficiency that overrides even the necessity for homodimerization. The REPII domain effects indicate that Mac1p function could be altered in vivo by structural modulations affecting its DNA binding properties. Modulations that resemble the deletion of REPII or REPII-D regions could be mediated by intermolecular interactions. The fact that (a) truncated peptides lacking the REPII or REPII-D domains are functional and regulated by copper in vivo, (b) the N–C intramolecular modulation by copper involves primarily REPI and (c) the REPII-D-containing region, when isolated, exhibits high transactivation function, indicate that this latter region may be involved in independent molecular interactions with other proteins or metals. We have preliminary two-hybrid results indicating such interactions between Mac1p and several proteins of known or unknown function. Analysis of their biological significance may reveal new aspects of Mac1p function¹.

Acknowledgements: We are grateful to Jean-Claude Jauniaux, Remy Poirey (at DKFZ/Heidelberg, Germany), Per Sunnerhagen and Anna Ramne (at University of Goeteborg) for generous gifts and valuable advice concerning two-hybrid technologies. We thank Yannis Papanikolaou, George Thireos, Elena Georgatsou, Dimitris Tzamaris and Atul Joshi for helpful discussions. We thank Maria Tzermia for technical assistance, Dimitris Kotsis for the pRS315-*MAC1* construct and Yannis Papanikolaou, Lila Kalogeraki and Giannis Kagiampakis for help with the figures. This work was supported by the Greek Ministry of Development (IMBB funding and PENED grant fellowships) and Biotechnology program of the European Commission EUROFAN 2 (BIO4-CT97-2294).

References

- [1] Winge, D.R., Jensen, L.T. and Srinivasan, C. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 216–221.
- [2] Radisky, D. and Kaplan, J. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4481–4484.
- [3] Dancis, A., Haile, D., Yuan, D.S. and Klausner, R.D. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 25660–25667.
- [4] Hassett, R. and Kosman, D.J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 128–134.
- [5] Knight, S.A., Labbe, S., Kwon, L.F., Kosman, D.J. and Thiele, D.J. (1996) *Genes Dev.* 10, 1917–1929.
- [6] Georgatsou, E., Mavrogiannis, L.A., Fragiadakis, G.S. and Alexandraki, D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 13786–13792.
- [7] Jungmann, J., Reins, H.A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D. and Jentsch, S. (1993) *EMBO J.* 12, 5051–5056.
- [8] Labbe, S., Zhu, Z. and Thiele, D.J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 15951–15958.
- [9] Yamaguchi-Iwai, Y., Serpe, M., Haile, D., Yang, W., Kosman, D.J., Klausner, R.D. and Dancis, A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 17711–17718.

¹ Note added in proof: Keller et al. [26] have also identified functional independence of the two cysteine-rich activation domains of Mac1p.

- [10] Jamison McDaniels, C.P., Jensen, L.T., Srinivasan, C., Winge, D.R. and Tullius, T.D. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 26962–26967.
- [11] Jensen, L.T. and Winge, D.R. (1998) *EMBO J.* 17, 5400–5408.
- [12] Serpe, M., Joshi, A. and Kosman, D.J. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29211–29219.
- [13] Jensen, L.T., Posewitz, M.C., Srinivasan, C. and Winge, D.R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 23805–23811.
- [14] Turner, R.B., Smith, D.L., Zawrotny, M.E., Summers, M.F., Posewitz, M.C. and Winge, D.R. (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5, 551–555.
- [15] Graden, J.A. and Winge, D.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5550–5555.
- [16] Zhu, Z., Labbe, S., Pena, M.M. and Thiele, D.J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 1277–1280.
- [17] Joshi, A., Serpe, M. and Kosman, D.J. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 218–226.
- [18] James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) *Genetics* 144, 1425–1436.
- [19] Uetz, P. et al. (2000) *Nature* 403, 623–627.
- [20] Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (2000) *Short Protocols in Molecular Biology*, Wiley-Interscience, New York.
- [21] Guthrie, C. and Fink, G.R. (1991) in: *Methods in Enzymology*, Vol. 194, Academic Press, New York.
- [22] Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [23] Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) *Genetics* 122, 19–27.
- [24] Liu, X.D., Liu, P.C., Santoro, N. and Thiele, D.J. (1997) *EMBO J.* 16, 6466–6477.
- [25] Burke, D., Dawson, D. and Stearns, T. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [26] Keller, G., Gross, C., Kelleher, M. and Winge, D.R. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29193–29199.

The Yeast Fre1p/Fre2p Cupric Reductases Facilitate Copper Uptake and Are Regulated by the Copper-modulated Mac1p Activator*

(Received for publication, July 18, 1996, and in revised form, February 11, 1997)

Elena Georgatsou‡, Lampros A. Mavrogiannis‡§, George S. Fragiadakis‡§, and Despina Alexandraki‡§¶

From the ‡Foundation for Research and Technology-Hellas, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, and §Department of Biology, University of Crete, Heraklion 711 10 Crete, Greece

Fre1p and Fre2p are ferric reductases which account for the total plasma membrane associated activity, a prerequisite for iron uptake, in *Saccharomyces cerevisiae*. The two genes are transcriptionally induced by iron depletion. In this communication, we provide evidence that Fre2p has also cupric reductase activity, as has been previously shown for Fre1p (Hassett, R., and Kosman, D.J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 128–134). Both Fre1p and Fre2p enzymes are functionally significant for copper uptake, as monitored by the accumulation of the copper-regulated *CUP1* and *CTR1* mRNAs in *fre1Δ*, *fre2Δ*, and *fre1Δfre2Δ* mutant strains. However, only Fre1p activity is induced by copper depletion, even in the presence of iron. This differential copper-dependent regulation of Fre1p and Fre2p is exerted at the transcriptional level of the two genes. We have shown that Mac1p, known to affect the basal levels of *FRE1* gene expression (Jungmann, J., Reins, H.-A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D., and Jentsch, S. (1993) *EMBO J.* 12, 5051–5056), accounts for both the copper-dependent induction of *FRE1* and down-regulation of *FRE2* gene. Finally, Mac1p transcriptional activation function is itself modulated by the availability of copper.

Iron and copper are elements that have many similar chemical properties. Both are transition metals with several oxidation states, have close atomic and ionic radii numbers, and have very similar electronegativity. They are relatively homogeneously distributed on the planet and have thus been integrated in many biochemical reactions during evolution. Both are essential for life in almost every species (bacteria, fungi, plants, mammals) (1, 2). Excess quantities of iron and copper exert similar amount-dependent cytotoxicity, both favoring the formation of hydroxyl radicals which are disastrous to the cell (3). Iron presents a particular problem for its uptake, since in the oxygen-containing atmosphere it is practically all in the form of insoluble ferric hydroxides. Organisms have therefore developed complex mechanisms of high fidelity and precision to achieve an appropriate homeostasis of these two metals.

In *Saccharomyces cerevisiae*, two proteins of the plasma cell membrane, Fre1p and Fre2p, reduce Fe(III) to Fe(II) in the proximal vicinity of the cell. The expression of both corresponding genes is regulated by the environmental iron concentration

by a negative feedback mechanism which takes place at the transcriptional level (4, 5). The coupled function of the cell surface Fet3p multicopper oxidase, which catalyzes the conversion of Fe(II) to Fe(III) extracellularly (6), and the recently reported Ftr1p permease (7) are also required for high affinity iron uptake. Thus, a link between iron and copper metabolism was first noted by the isolation of the *FET3* gene in a scheme aiming to clone the ferrous transporter (8). Fet3p requires copper to function, and therefore high affinity iron uptake requires copper (8, 9). Mutations either in the high affinity copper transporter gene *CTR1* or in the *CCC2* gene, encoding a member of the family of P-type ATPases proposed to transport cytosolic copper into the lumen of a secretory organelle, results in iron deficiency in the cell (9, 10). A similar mechanism has been postulated in mammals for the release of newly absorbed iron from intestine to blood involving the plasma glycoprotein ceruloplasmin, a copper-binding protein with ferrous oxidase activity (11, 12). Finally, the iron regulated transcription of the yeast genes *FRE1*, *FRE2*, *FET3*, *CCC2*, *FTR1*, and *FTH1* (*FTR1* homologue of unknown function) is affected by the Aft1p transcriptional activator which recognizes a specific consensus sequence on their promoters (13, 14). Moreover, expression of *FRE1* and *CTR1* mRNAs depends on the nuclear protein Mac1p, which is involved in iron and copper utilization (15).¹

We have previously shown that although Fre1p and Fre2p have seemingly redundant functions in *S. cerevisiae*, the two genes are up-regulated by the absence of extracellular iron in a kinetically different way, implying that they are subject to distinct regulation (5). Since there is evidence that copper reduction might be a component of copper uptake (16) and that Fre1p is also a copper-repressible cupric reductase (15–17), in this study we have investigated the participation of *FRE1* and *FRE2* gene products in copper metabolism. Our data clearly point to a role of both activities in copper uptake, although the two genes are differentially affected by the function of Mac1p under conditions of copper (and iron) depletion. Mac1p transactivating function is itself modulated by the availability of copper, being higher in its absence.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains, Media, and Growth Conditions—The yeast strains used in this study are all derivatives of the S288C strain. The wild type and *fre1Δ*, *fre2Δ*, and *fre1Δfre2Δ* strains have been previously described (5). For the *MAC1* gene disruption in the yeast genome, a 480-base pair *StyI* fragment (codons 41–201) was replaced by the 1.1-kilobase *HindIII* fragment of the *URA3* gene on a *MAC1* (–100 to 963)/pBluescript recombinant phagemid. The resulted insertion fragment was excised and used to transform the desired *ura3–52* strains (18). Uracil prototrophy was used for the selection of transformants. Transformants able to grow on glycerol only in the presence of 50 μM copper (15) were

* This work was supported by the Greek Ministry of Industry, Energy and Technology. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Foundation for Research and Technology-Hellas, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, P.O. Box 1527, Heraklion 711 10 Crete, Greece. Tel.: 30-81-391171. Fax: 30-81-3911101; E-mail: alexandraki@nefeli.imbb.forth.gr.

¹ E. Georgatsou, L. A. Mavrogiannis, G. S. Fragiadakis, and D. Alexandraki, unpublished observations.

further confirmed for the *MAC1* gene deletion by DNA blot hybridization. The yeast strain used for transcriptional induction and repression assays of the LexA-Mac1p fusion proteins to *lacZ* reporters was L9FT5, a derivative of FY105 (*MAT α* , *his3 Δ ::LexAopHIS3 leu2::PET56 ura3-52 trp1 Δ 63*).

The growth media used were SD (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base; Difco) or SD supplemented either with 100 μ M bathophenanthroline disulfonic acid- Na_2 salt (BPS) (Fe(II) and Cu(II) chelator) or with 100 μ M bathocuproine disulfonic acid- Na_2 salt (BCS) (Cu(I) chelator) (16, 19, 20). For all experiments described, cells were grown to saturation in SD medium, subsequently resuspended in the same medium, and grown for 8–10 generations (exponential phase). They were then shifted to the desired medium (SD, SDBCS, or SDBPS) at a concentration of $4\text{--}5 \times 10^6$ cells/ml. Aliquots were removed from each culture every 2 h and assayed for copper and iron reducing activities simultaneously.

Genes and Plasmids—The *FRE2/lacZ* and *FRE1/lacZ* fusion plasmids were constructed starting from the low copy number *URA3*-containing YCP50 vector carrying a 6.3-kilobase *Bam*HI-*Sal*I fragment containing the *Escherichia coli lacZ* gene (except for the 8 amino-terminal codons of β -galactosidase), the *lacY* gene, and a portion of the *lacA* gene. The $-977/+3$ and $-930/+3$ promoter fragments of *FRE1* and *FRE2* genes, respectively, produced by polymerase chain reaction were cloned in the *Bam*HI site of the described plasmid in fusion to the β -galactosidase open reading frame.

The *MAC1* gene was isolated from a YCP50 yeast genomic library by the use of a synthetic oligonucleotide probe. The sequence of the oligonucleotide is 5'-GCCCTCTGATGCACGATGCACACGCA-3'. For the construction of the LexA-Mac1p fusion proteins, the *MAC1* gene sequence from +4 to +1249 nucleotides was synthesized by polymerase chain reaction and subcloned into the *Sma*I-*Kpn*I sites of plasmid YCP91, a derivative of pRS314 (*TRP1*) containing the *ADH1* promoter and 5' untranslated region followed by an ATG codon and sequences encoding the SV40 nuclear localization signal, the HA1 epitope from influenza virus, and the LexA binding domain (21). The oligonucleotide sequences used for the polymerase chain reaction are 5'-TCCCCGGGATAATATTTAATGGGAACA-3' and 5'-GGGGTACCTGAAGTGGTG-GCATCGCTTA-3'. The reporter plasmids used for the transactivation and repressor assays were correspondingly pJK103, in which four *LexA* operators upstream of the *GAL1* TATA element control the *lacZ* gene transcription (21, 22), and pJK1621, in which four *LexA* operators, two upstream activation sequences, and TATA element of the *CYC1* gene control the *lacZ* gene transcription (23, 24).

The sequences of the antisense *CTR1*, *CUP1*, and *EF1 α* synthetic oligonucleotides used as probes in the RNA blot hybridization analyses are 5'-CCTGCAACTTGGAAATTCCTCAAGGATGTC-3', 5'-GTTACCG-CAGGGCATTGTGTCGTCGTC-3', and 5'-CCAGAATCGACATGACC-GATAACGAC-3', respectively.

End-labeling of these oligonucleotides with γ -[32 P]ATP was performed by DNA kinase (22). The described oligonucleotides were synthesized by the Institute of Molecular Biology and Biotechnology Microchemistry group (Heraklion, Crete, Greece).

RNA and DNA Blot Hybridization Analyses—Samples of total RNA and yeast DNA were prepared and blot-hybridized according to standard procedures (22).

Antisense RNA Probe Preparation—For the *FRE1* gene-specific probe, a *Pvu*II-*Sac*I genomic DNA fragment containing the coding region of the *FRE1* gene (-680 to $+2280$) was subcloned into the *Eco*RV site of the pBluescript II KS (+/-) phagemid (Stratagene). The recombinant plasmid was linearized by restriction at the *Spe*I site on the *FRE1* gene ($+1893$) and a 444-base (including polylinker sequences) single-stranded homogeneously radiolabeled antisense RNA probe was synthesized by the T3 RNA polymerase in the presence of α -[32 P]UTP (21). From the 444-base *FRE1* probe, a 298-base fragment was protected, which defined the 3' end of the RNA 135 bases downstream of the translation termination. A protected doublet was observed with this probe due to three consecutive thymidines preceding this point, which created an unstable RNase digestion-prone A/T-rich region.

For the *FRE2* gene-specific probe, an *Mlu*I-*Afl*II genomic DNA fragment containing the coding region of the *FRE2* gene (-2041 to $+2340$) was subcloned into the *Eco*RV site of the phagemid described for the *FRE1*-specific probe. The recombinant plasmid was linearized by restriction at the *Aha*II site on the *FRE2* gene ($+1682$) and a 712-base probe was produced by the same procedure as for the *FRE1*-specific probe. From the 712-base *FRE2* probe, 654 bases were protected, *i.e.* the size of the whole probe omitting the polylinker sequences (the *FRE2* mRNA 3' is downstream the *Afl*II site used for subcloning). A protected doublet was observed with this probe due to a region of seven consec-

utive thymidines preceding the *Afl*II site.

For the *HIS3* gene-specific probe, a *Hind*III genomic DNA fragment covering the coding region of the *HIS3* gene from $+305$ to $+591$ was subcloned into the *Hind*III site of the phagemid described for the *FRE1*-specific probe. The recombinant phagemid was linearized by restriction at the *Mse*I site ($+312$) and a 260-base probe was produced by transcription with the T7 RNA polymerase.

RNase A Protection Assays— 10^5 cpm of each antisense RNA probe were simultaneously hybridized with 25 μ g of total RNA in a 20- μ l reaction mixture containing 75% formamide, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, and 1 mM EDTA overnight. The mixture was diluted in 300 μ l of a solution containing 0.3 M NaCl and 5 mM EDTA and treated with RNase A (30 μ g/ml) at 20 $^\circ$ C for 30 min, followed by treatment with proteinase K (300 μ g/ml in 0.1% SDS) at 37 $^\circ$ C for 20 min. The mixture was phenol/chloroform extracted, ethanol precipitated, denatured at 92 $^\circ$ C for 5 min, and electrophoresed on a 40-cm, 6% polyacrylamide/bisacrylamide (19:1), 8.3 M urea-containing gel.

Reductase Assays—Ferric reduction activity was measured as described previously (5). Exactly the same conditions were used for the copper reduction assay, except that BCS and CuCl_2 was used instead of BPS and FeCl_3 . For the Cu(I) quantification, an extinction coefficient of 12.25 $\text{mm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ was used to measure the Cu(I)BCS complex at 482 nm (A_{482}). The extinction coefficient used for Fe(II)BPS at 520 nm (A_{520}) was 22.39 $\text{mm}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

β -Galactosidase Assays— β -Galactosidase activity assays (22) were performed following 7 h of growth in the desired medium.

RESULTS

Fre1p and Fre2p Both Are Cupric Reductases but Only Fre1p Is Induced by Copper Deprivation—It has been shown previously that *Fre1p* ferric reductase is also cupric reductase induced by copper depletion (16). In this report, we have examined *Fre2p* ferric reductase for cupric reducing activity assayed in a *fre1 Δ* strain (5). We have first used iron depletion culture conditions known to induce *Fre2p* (5) to obtain measurable amounts of the enzyme. For comparison, we have assayed three additional strains, wild type, *fre2 Δ* (*Fre1p* activity), and *fre1 Δ fre2 Δ* , in parallel according to the conditions described under "Experimental Procedures." The results presented in Table I show that *Fre2p* as well as *Fre1p* have cupric reductase activity.

Since we had previously observed that the two enzymes follow kinetically distinct induction by iron deprivation (5), we have assayed the same strains under conditions of copper depletion during 12 h of exponential growth. Our results (Table I) show that *Fre1p* was induced under copper depletion at similar levels as by iron depletion. In contrast, *Fre2p* was not detectably modulated by copper depletion. *Fre2p* activity was not induced even in the presence of the reducing agent sodium ascorbate (up to 500 μ M), excluding the possibility of inefficient retention of the Cu(II) found in the minimal medium by the Cu(I)-specific chelator BCS (data not shown). We have obtained the same results (activity observed only in the *fre2 Δ* strain) by using medium reconstituted from its ingredients with the omission of copper (data not shown).

Data in Table I show residual copper-reducing activity in the *fre1 Δ fre2 Δ* strain which was not affected by metal depletion and accounted for about 80% of the activity in noninduction conditions. We have not detected similar residual ferric reducing activity in this *fre1 Δ fre2 Δ* strain (5) (Table I).

Although *Fre2p* did not show induction within 12 h in copper-depleted *fre1 Δ* cultures, this was achieved later between 12 and 15 h in repeatedly diluted copper-depleting medium and remained relatively constant during the exponential growth of the cells (Fig. 1). We suggest that according to the proposed model of iron-copper connection (8, 9) prolonged depletion of copper intracellularly created also iron depletion, which in turn induced *Fre2p* activity.

Copper Reduction by *Fre1p* and *Fre2p* Cupric Reductases Facilitates Copper Uptake—While our results showed that both *Fre1p* and *Fre2p* are cupric reductases, they do not an-

TABLE I
Fre1p and Fre2p induction under copper and iron depletion

Assays of reductase activities were performed in aliquots of the indicated strain cultures at different time points of growth in minimal (SD), copper-depleted (SDBCS), and iron-depleted (SDBPS) media. The average unit values (multiplied by a factor of 10) from five identical experiments obtained at 4 and 10 h of growth (when peak activities of the two reductases were detected) are shown. Units are defined as Cu(I) or Fe(II) nmol/h/10⁶ cells.

Medium	Strain	Cupric reductase units		Ferric reductase units	
		4 h	10 h	4 h	10 h
SD	WT	5.3 ± 0.8	6.3 ± 2.0	4.5 ± 1.3	5.5 ± 2.7
	<i>fre1Δ</i>	5.0 ± 1.8	4.8 ± 0.4	1.2 ± 1.0	1.4 ± 0.9
	<i>fre2Δ</i>	4.2 ± 1.0	4.6 ± 0.5	6.1 ± 3.5	4.2 ± 1.9
	<i>fre1Δfre2Δ</i>	4.7 ± 2.0	3.6 ± 0.3	0.8 ± 1.4	1.4 ± 1.1
SDBCS	WT	38.5 ± 4.5	18.8 ± 1.8	102.5 ± 26.1	48.8 ± 7.1
	<i>fre1Δ</i>	4.2 ± 0.0	5.3 ± 1.3	1.9 ± 1.8	3.4 ± 1.8
	<i>fre2Δ</i>	35.5 ± 5.1	15.8 ± 1.8	104.6 ± 15.9	45.8 ± 4.8
	<i>fre1Δfre2Δ</i>	4.2 ± 0.4	4.7 ± 0.6	2.0 ± 1.7	3.2 ± 1.0
SDBPS	WT	40.2 ± 3.8	47.0 ± 2.0	120.7 ± 35.0	91.2 ± 31.8
	<i>fre1Δ</i>	4.4 ± 2.7	32.0 ± 1.1	1.4 ± 1.4	53.6 ± 17.0
	<i>fre2Δ</i>	31.8 ± 7.9	12.0 ± 4.1	103.7 ± 20.9	33.6 ± 18.2
	<i>fre1Δfre2Δ</i>	5.2 ± 0.7	3.8 ± 0.1	1.8 ± 1.6	1.8 ± 1.3

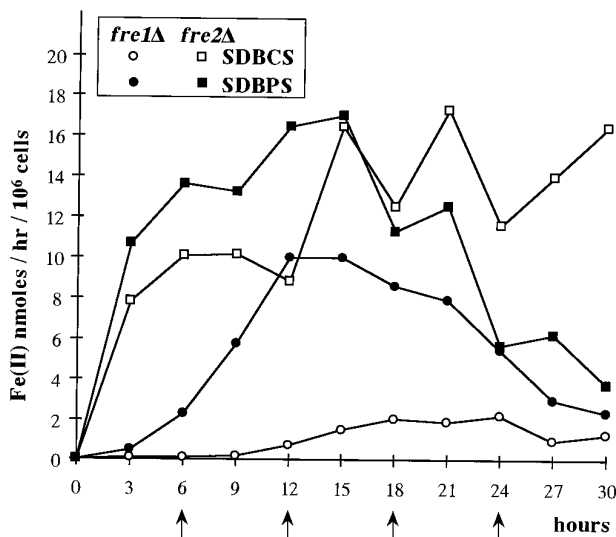


FIG. 1. Induction of Fre1p/Fre2p reductases during prolonged growth in copper- and iron-depleted media. Ferric reductase assays were performed in *fre1Δ* and *fre2Δ* strains during growth in SDBCS and SDBPS media. Ferric reductase activity was assayed in preference to cupric reductase activity to avoid the interference of the residual noninduced activity and to obtain higher values. The assay and growth conditions were as described under "Experimental Procedures," except that the cultures were diluted in fresh medium to a density of 4.5×10^6 cells/ml at 6-h intervals (arrows) to avoid saturation. The reductase assays for these particular time points were performed immediately prior to dilution. The results of one of two identical experiments are shown.

answer the question of whether copper reduction is necessary for copper uptake. Assuming that Fre1p and Fre2p are indeed important for copper uptake, this process should be impaired in a *fre1Δfre2Δ* strain. We have monitored copper entrance into the cell and its utilization by following the expression of two different copper responsive genes, *CUP1* and *CTR1*. The regulation of these genes by copper follows distinct pathways. *CUP1* transcript encoding a metallothionein is induced by the transcription factor Ace1p when copper concentration increases in the cell (25, 26), whereas *CTR1* transcript encoding the copper transporter is induced by copper depletion and is not affected by the Ace1p factor (27). As shown in Fig. 2A, high levels of *CTR1* mRNA were detected in *fre1Δfre2Δ* cells grown in minimal medium (SD), which indicated that the mutant cells had lower copper uptake capacity than the wild type cells. Nonetheless, addition of copper to a concentration of $0.5 \mu\text{M}$ completely repressed *CTR1* mRNA levels in both strains, indicat-

ing that the metal could enter also the *fre1Δfre2Δ* cells. No significant difference was detected in the accumulation of *CUP1* mRNA between the two strains, possibly because *CTR1* gene responded to lower levels of copper than *CUP1* gene (27).

When cultures grew under Fe(II) and Cu(II) retention conditions (SDBPS) when both reductases were induced, prominent differences in the accumulation of both *CTR1* and *CUP1* mRNAs were obtained between *fre1Δfre2Δ* and wild type strain. One hundredfold higher CuSO_4 concentration was necessary to diminish *CTR1* mRNA levels in the mutant cells. This observation demonstrated that the two reductases were clearly required for copper uptake under conditions of strong retention by chelators. As expected, when the two cultures grew under Cu(I) depletion conditions (SDBPCS), the difference between the two strains almost disappeared, since copper chelation was exerted after the step of reduction. The small remaining difference might reflect a higher Cu(I) concentration in the presence of reductases facilitating the Cu(I) transporter to compete with the chelator.

To evaluate the contribution of each of the reductases for copper uptake, we have similarly tested the singly disrupted strains *fre1Δ* and *fre2Δ* under conditions at which the double disruptant and wild type cells had shown the most prominent differences (SDBPS) (Fig. 2B). Comparison of the extent of *CTR1* mRNA repression in the four strains showed clearly that both reductases participated in copper uptake. The similarity of *CTR1* mRNA patterns between *fre2Δ* and wild type cells implied that Fre1p carried through the process almost as well as both reductases. However, a clear-cut difference between the *fre1Δ* and *fre1Δfre2Δ* strains (a 5-fold CuSO_4 concentration was required to repress *CTR1* mRNA in the doubly disrupted cells) was detected, attributing to the Fre2p minor participation in copper uptake. The detected *CUP1* mRNA accumulation could not distinguish in either case between the presence or absence of Fre2p, but clearly pointed to the important contribution of Fre1p.

The Availability of Copper Affects the Transcription of FRE1 and FRE2 Genes—The differential induction profiles of the two reductases in copper depleted cells led us to investigate the levels of *FRE1* and *FRE2* mRNAs under these conditions. Using an RNase A protection assay we were able to simultaneously detect and quantitatively compare *FRE1*, *FRE2*, and *HIS3* (as an internal control) mRNAs in total RNA of a wild type strain. Fig. 3A (left panels) shows that *FRE1* mRNA accumulated under copper depletion and *FRE2* mRNA was barely detectable (only at very long film exposures) at all time points, as described for the induction of the corresponding

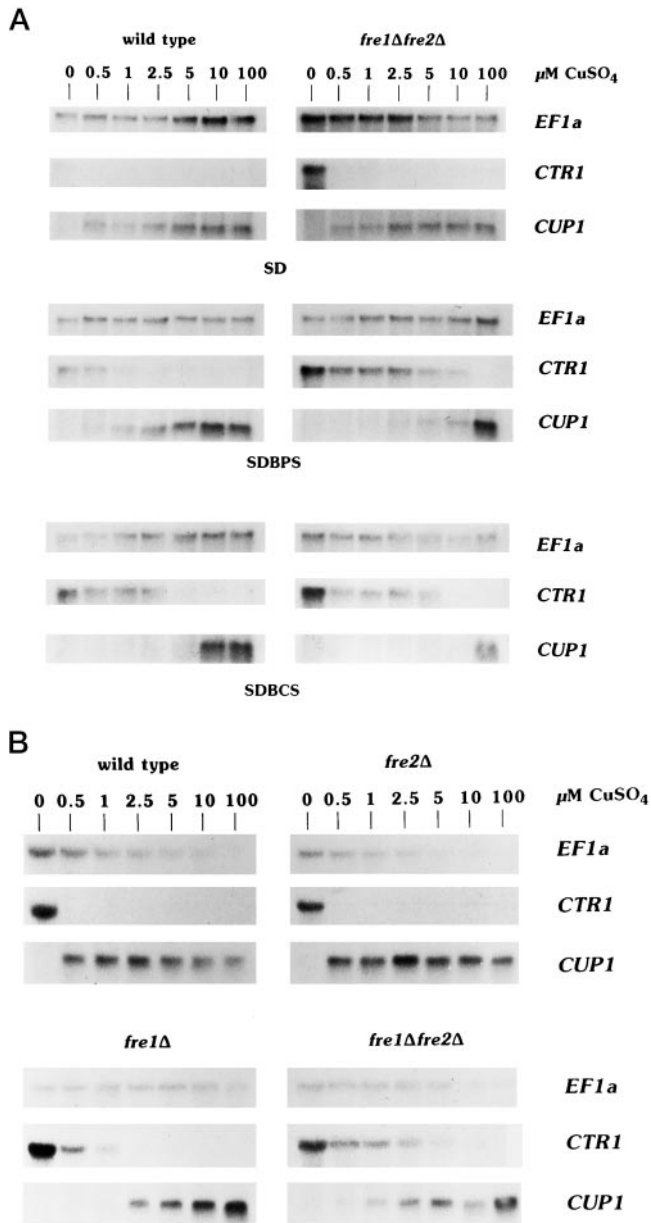


FIG. 2. Uptake and utilization of copper monitored by *CTR1* and *CUP1* mRNA accumulation. A, wild type and *fre1Δfre2Δ* cultures were first grown in SD, SDBPS, or SDBCS medium for 7 h. Aliquots were subsequently incubated in the presence of the indicated quantities of CuSO_4 (0.5–100 μM final concentration on top of the 0.25 μM contained in the SD medium) at 30 °C for 5 min. Fifteen μg of total RNA were prepared and analyzed by RNA blot hybridization using the radiolabeled *CTR1*, *CUP1*, and *EF1a* (*EF1a* on figure) oligonucleotide probes as described under “Experimental Procedures.” *EF1a* (translation elongation factor 1 subunit α) probe was used as an internal control of quantitatively unaffected specific RNA accumulation. B, the mRNA patterns of wild type, *fre1Δ*, *fre2Δ*, and *fre1Δfre2Δ* cells grown in SDBPS, incubated in the presence of the indicated amounts of CuSO_4 at 30 °C for 10 min, and treated as described in A.

enzymatic activities. In parallel experiments using iron-depleted cultures, *FRE1* and *FRE2* mRNAs accumulated both following the time-dependent induction observed for the corresponding reductase activities (5) (Table I).

Measurements of β -galactosidase activities driven by the *FRE1* or *FRE2* promoters in wild type cells grown under copper and iron depletion indicated clearly that the *FRE1* promoter was able to confer both copper- and iron-regulated expression of β -galactosidase, whereas the *FRE2* promoter conferred only iron-regulated expression (Fig. 4).

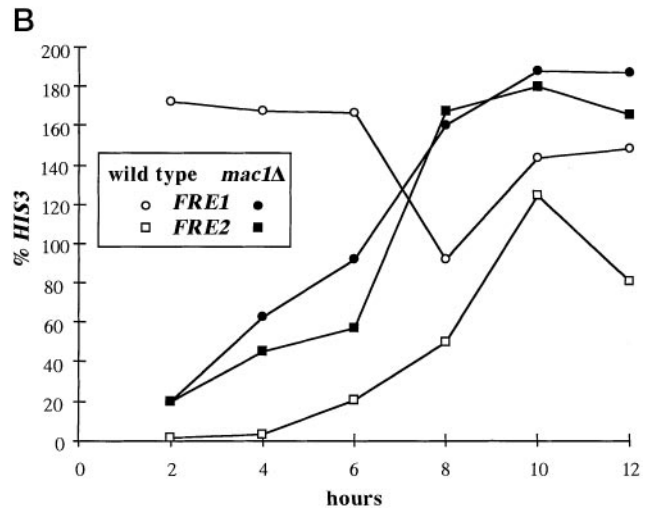
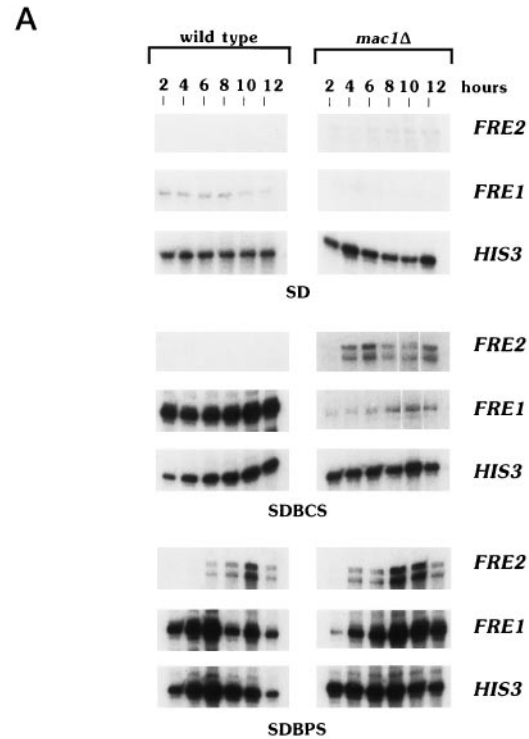


FIG. 3. Copper- and iron-dependent *FRE1* and *FRE2* mRNA accumulation in wild type and *mac1Δ* strains. A, total RNA prepared during growth of wild type and *mac1Δ* strains in minimal SD, SDBCS, or SDBPS medium was subjected to RNase A protection assay by the indicated (right) radiolabeled antisense RNA probes and analyzed by gel electrophoresis and autoradiography as described under “Experimental Procedures.” The *HIS3* antisense RNA probe was used as an internal control of quantitatively unaffected specific RNA accumulation. B, densitometric analysis of the lanes in SDBPS panels (wild type and *mac1Δ*) shown in A. The relative values of *FRE1* and *FRE2* mRNAs are expressed as the percentage of the *HIS3* mRNA value in each lane.

The Function of Mac1p Accounts for the Differential Copper-dependent Regulation of FRE1 and FRE2 Gene Expression—The only known nuclear protein implicated in both copper and iron metabolism, affecting basal expression of the *FRE1* gene is Mac1p (15). *mac1* mutant cells suffer from copper and, possibly, iron deficiency, since addition of copper or iron (partly) can complement their phenotypes (15). Mac1p contains a region homologous to the copper-dependent transcription factor Ace1p (15). We have followed the response of *FRE1* and *FRE2* genes to copper depletion in a *MAC1* gene-deleted strain during 12 h

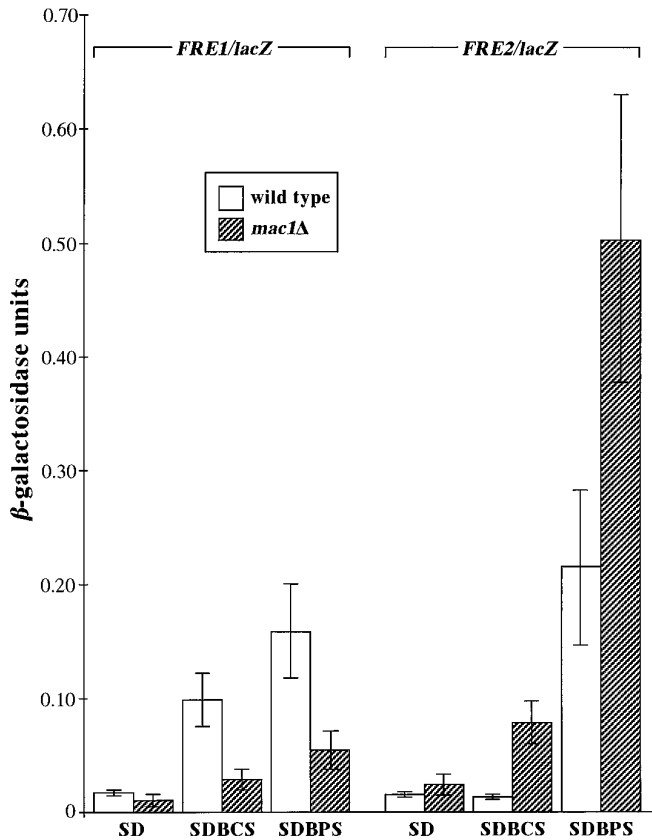


FIG. 4. *FRE1* and *FRE2* promoter-driven β -galactosidase activity in wild type and *mac1* Δ strain. β -Galactosidase activities measured from cultures of wild type (open bars) or *mac1* Δ (hatched bars) strains transformed with the chimeric plasmids *FRE1/lacZ* and *FRE2/lacZ* and grown for 7 h in minimal (SD), copper-depleted (SDBCS), and iron-depleted (SDBPS) media.

of growth. The results shown in Fig. 3A (right panels) revealed that *FRE2* mRNA was detectable in *mac1* Δ cells grown in minimal medium (SD) and substantially induced following copper depletion. In contrast, *FRE1* mRNA basal levels were significantly lower in the *mac1* Δ uninduced cells (SD medium) compared with the wild type levels and accumulated at very reduced levels in the copper-depleted cells. Following iron depletion of the *mac1* Δ strain, both *FRE1* and *FRE2* mRNAs were induced. However, by comparison to the induction patterns obtained in wild type cells, we found a temporal shift of the *FRE1* mRNA induction to later time points in the exponentially growing *mac1* Δ culture, in contrast to a temporal shift of the *FRE2* mRNA accumulation to earlier time points (Fig. 3, A and B).

β -Galactosidase activity levels produced by the *FRE1/lacZ* and *FRE2/lacZ* plasmids in a *mac1* Δ strain grown under copper or iron depletion conditions showed that the differential accumulation of *FRE1* and *FRE2* mRNAs resulted from the transcriptional response of the two genes (Fig. 4). Comparing these results to the RNA accumulation profiles, we should note that at 7 h of growth (when the assays were performed) the accumulation of β -galactosidase was less in the *mac1* Δ strain compared with the wild type strain when driven by the *FRE1* promoter and more when driven by the *FRE2* promoter. The results of reductase assays on copper- and iron-depleted *fre1* Δ *mac1* Δ and *fre2* Δ *mac1* Δ cultures were in agreement with the induction patterns of their transcripts (data not shown).

Therefore, under copper limitation, Mac1p function has a negative role on *FRE2* gene regulation, while it affects positively *FRE1* gene. In the absence of Mac1p (in *mac1* Δ strain)

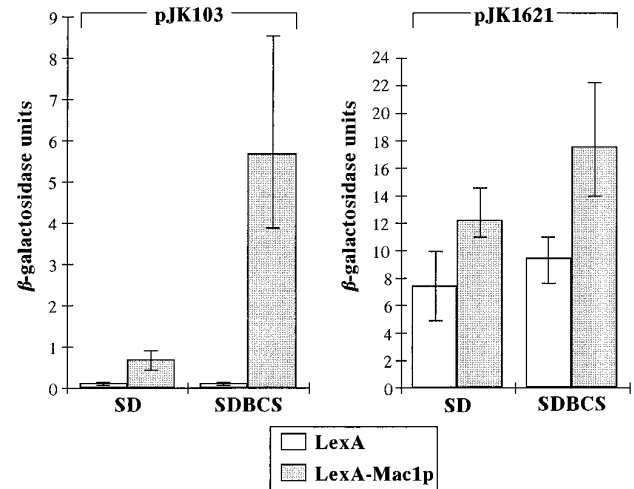


FIG. 5. Copper-modulated transcriptional regulation by LexA-Mac1p. β -Galactosidase activities obtained from pJK103 or pJK1621 *lacZ* reporters co-transformed with plasmids YCp91 (LexA) or YCp91-Mac1p (LexA-Mac1p fusion) as described under "Experimental Procedures". Measurements were performed in L9FT5 transformants grown for 7 h in minimal (SD) and copper-depleted (SDBCS) media.

under copper limitation, additional inducing factors might exist for both genes, since *FRE2* and *FRE1* mRNA levels are higher than those detected in the noninducing culture (minimal medium). Furthermore, as presented in the diagrams shown in Fig. 3B, Mac1p seems to be involved in the temporally differential expression of *FRE1/FRE2* genes under iron limitation. These observations are elaborated further under "Discussion."

Mac1p Transactivating Activity Is Modulated by Copper—The observed copper-dependent regulation of *FRE1/FRE2* genes affected by Mac1p function led us to investigate the copper dependence of Mac1p protein function. First we have tested the entire Mac1p coding sequence fused to the LexA binding domain for its ability to activate transcription of a β -galactosidase reporter following binding to the LexA operator (21, 22). As shown in Fig. 5, Mac1p protein was capable of transactivating the β -galactosidase reporter in cells grown in minimal medium. This activity was significantly increased when cells were depleted from copper, which suggests that the Mac1p protein was activated at these conditions. Mac1p mRNA levels were unaffected under copper-depleting conditions (data not shown). These results implicate a direct effect of copper on Mac1p modulating its transcriptional activation function. Testing of the LexA-Mac1p fusion for repression function on a *CYC1* promoter-driven *lacZ* transcription (23, 24) showed inducing rather than repressing effect on the constitutive expression of this reporter (Fig. 5), indicating that Mac1p probably does not have repressing activity. This result is relevant for the explanation given for its different role on the expression of the *FRE1/2* genes (see under "Discussion").

DISCUSSION

Iron and copper are metals whose biological importance and common properties have been emphasized frequently. The cellular mechanisms by which living organisms exploit them to fulfill their needs and simultaneously protect themselves are now being unravelled (12). The externally directed enzymes Fre1p and Fre2p are situated at the "beginning" of the pathway that links extracellular to intracellular iron communication, leading to nuclear events that alter gene expression, as well as at the "end" of such a pathway, being themselves regulated by iron to control its influx into the cell. Although a common iron-related transactivator, Aft1p, has been identified (13, 14),

the two reductase genes are differentially induced (Ref. 5 and this paper).

In this study we have examined the participation of the ferric reductases Fre1p and Fre2p in copper metabolism, and we have revealed elements of their metal-regulated expression. Previous reports have presented the ferrireductase plasma membrane activity (17) and Fre1p (16) as being repressed by copper. We have demonstrated that Fre2p is a cupric reductase, as is Fre1p, but only Fre1p is induced in copper starvation, accounting for 80–90% of the plasma membrane activity. The residual copper-specific reducing activity, which is not modulated by copper, probably corresponds to the Cu(II)-specific reductase, not repressible by iron, described by Hassett and Kosman (16). This reductase is possibly encoded by another *FRE*-homologous gene.²

We have further shown that the distinct response of the two cupric reductases to copper depletion is reflected from the differential transcriptional regulation of the two genes. While *FRE1* gene was transcriptionally up-regulated, *FRE2* gene did not seem to respond to copper depletion. Furthermore, we have shown that Mac1p nuclear protein contributed directly or indirectly to this differential response of the two reductase genes. *FRE1* gene basal and induced expression were highly dependent on its presence, in agreement with the notion that Mac1p is involved in the communication of the copper starvation signal to the *FRE1* gene. In contrast, *FRE2* gene basal and copper-induced expression were only observed in the absence of Mac1p. An explanation for this phenomenon, which needs to be proven, may lie in the following observations. *FRE1* promoter contains a pyrimidine-rich directly repeated sequence, previously shown to mediate iron-regulated transcription of a reporter gene (4), distinct from the Aft1p binding consensus, which could be responsible for the Mac1p effects, as discussed by Yamaguchi-Iwai *et al.* (14). Similar pyrimidine-rich repeated sequences are also found on the *FRE2* (5) and *CTR1* (9) promoters in different orientations. *CTR1* gene expression is also dependent on the presence of Mac1p (15).¹ Only on the *FRE2* promoter are these sequences situated next to the TATA box between positions –54 and –80. (The transcription start site of *FRE2* gene is at position –5 from the first coding AUG¹ and the potential TATA box is at position –89.) If these sequences were indeed affected by Mac1p, they might play different roles on the different promoters. While affecting positively the expression of *FRE1* and *CTR1* genes, Mac1p may result in steric hindrance of the formation of the transcriptional complex on the *FRE2* promoter (28). This hypothesis is also in agreement with our results indicating that Mac1p plays a major role in the temporally different induction of the two reductase genes by the use of the Fe/Cu chelator (BPS medium). We can conceive that upon metal deprivation Mac1p facilitates *FRE1* expression and inhibits *FRE2* expression. Accumulation of Aft1p and/or appearance of another epistatic *FRE2*-specific inducer results in the *FRE2* late induction.

This scheme is in agreement with our additional findings on the role of Mac1p. First, Mac1p was able to transactivate a reporter gene (*lacZ*) when artificially brought to its promoter (by the LexA binding domain). Second, Mac1p did not show any repression function on a constitutively expressed reporter gene (*CYC1(UAS)-lacZ*). Third, an important finding that directly related Mac1p function to the cupric reductases was the fact that its transactivation function was modulated by the availability of copper, being increased in its absence. The precise role of Mac1p will be revealed by the detailed study of its

functional domains as well as examination of the interacting elements of the transcriptional complexes in which it participates.

Our last finding concerns the role of the Fre1p/Fre2p cupric reductases on the uptake of copper. Asking the question whether copper reduction is necessary for its cellular uptake, the profit from such a reaction is not immediately obvious since Cu(II) ions, unlike Fe(III), are found in a soluble form in water-dominated environments. Evidence as to whether copper enters the cell as Cu(II) or Cu(I) was indirect. Several studies in plants have shown a concomitant increase in Fe(III) and Cu(II) reducing activities in response to depletion of these metals from the soil (29, 30). These observations could be explained either by introducing the notion of a general role of reductases in regulating the redox state of the plasma membrane which would affect channel gating and ion influx (17, 30) or a more specific role in copper uptake which would take into account environmental factors, *e.g.* the availability of Cu(II) ions which form very stable complexes with various environmental ligands. Hassett and Kosman (16) presented evidence for copper reductive assimilation in *S. cerevisiae*, since Pt inhibition (Fre1p inhibitor) of copper uptake was relieved when the reducing agent ascorbate was included in the uptake assay. Very recently, Knight *et al.* showed that *FRE1* gene is necessary for the Ctr1p and Ctr3p function in ⁶⁴Cu uptake (31).

We have obtained evidence for the importance of reduction for copper uptake by using the *CTR1* and *CUP1* mRNAs as reporters to monitor entrance and utilization of copper in the cell. We have demonstrated that Fre1p/Fre2p activities assure higher intracellular copper levels, as shown by the increased *CTR1* mRNA quantities in the *fre1Δfre2Δ* strain compared with wild type cells. This activity was not an absolute prerequisite for copper uptake, possibly due to the entrance of Cu(II) ions or to Cu(I) produced by the residual plasma membrane copper-reducing activity mentioned above. Our results provide evidence that mostly Fre1p but also Fre2p have a major contribution to the uptake of copper when we used a chelator capturing its oxidized form (BPS). This contribution might be very useful for the organism, since there are probably many chelators of Cu(II) in the ecosystem of *S. cerevisiae* (*e.g.* citrate in fruits). The involvement of the two ferric reductases in copper and iron metabolism appears distinct and specific, particularly since Fre1p and Fre2p do not respond to molybdenum, zinc, or manganese deprivation.¹ In reference to the iron-copper connection already discussed, it seems inevitable that ferric reductases have evolved to participate also in copper metabolism. Since iron cannot enter the cells in conditions of copper starvation, induction of the ferric reductases by iron depletion would not be of any use if copper entrance was not facilitated simultaneously. On the other hand, when copper is depleted, Fre1p is first induced, able to assume most part of copper import into the cells, and if, for some reason, copper continues to be rare, Fre2p comes to its aid, being induced much later indirectly because of iron deprivation. A clear contribution of Fre2p was seen both under prolonged copper starvation and in the *mac1Δ* strain. Our results show clearly that reduction of copper facilitates its entrance into the cells. We propose that Fre1p and Fre2p, although not indispensable for copper uptake, are actively and catalytically participating in that process, especially under natural conditions.

In conclusion, the Fre1p/Fre2p system, involving two genes distally related in primary structure (5) functioning in close collaboration for iron and copper handling but with clearly differentiated controlling mediators, is a very promising experimental model in revealing “fine tuning” mechanisms that have evolved in living organisms to assure profitable metal homeo-

² Internet data bases (<http://speedy.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast> and <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).

stasis. It is interesting to note that, as revealed by the completed sequence of the *S. cerevisiae* genome,² six additional open reading frames share similarities with the Fre1p and Fre2p sequences and possibly are involved in other specific membrane reductase activity functions.

Acknowledgments—We thank George Thireos and Dimitris Tzamaras for helpful suggestions; Apostolis Klinakis, Alexis Zafiropoulos, Thanassis Tartas, and Alexandra Boutla for help with plasmid and strain constructions; Georgia Houlaki for artistic assistance; and Lila Kalogeraki for photographic assistance.

REFERENCES

- Theil, E., and Raymond, N. K. (1994) in *Bioinorganic Chemistry* (Bertini, I., Gray, H. B., Cippard, S. I., and Valentine, J. S., eds.), University Science Books, Mill Valley, CA
- Crichton, R. R., and Charlotiaux-Wauters, M. (1987) *Eur. J. Biochem.* **164**, 485–506
- Halliwel, B., and Catteridge, M. C. (1990) *Methods Enzymol.* **186**, 1–85
- Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G., and Klausner, R. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3869–3873
- Georgatsou, E., and Alexandraki, D. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3065–3073
- De Silva, D. M., Askwith, C. C., Eide, D., and Kaplan, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1098–1101
- Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D., and Dancis, A. (1996) *Science* **271**, 1552–1557
- Askwith, C., Eide, D., Ho, A. V., Bernard, P. S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D. M., and Kaplan, J. (1994) *Cell* **76**, 403–410
- Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J., and Klausner, R. D. (1994) *Cell* **76**, 393–402
- Yan, D. S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., and Klausner, R. D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2632–2636
- Chang A., and G. R. Fink (1994) *Curr. Biol.* **4**, 532–533
- Kaplan, J., and O'Halloran, T. V. (1996) *Science* **271**, 1510–1512
- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., and Klausner, R. D. (1995) *EMBO J.* **14**, 1231–1239
- Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., and Klausner, R. D. (1996) *EMBO J.* **15**, 3377–3384
- Jungmann, J., Reins, H.-A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D., and Jentsch, S. (1993) *EMBO J.* **12**, 5051–5056
- Hassett, R., and Kosman, D. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 128–134
- Lesuisse E., and Labbe, P. (1992) *Plant Physiol.* **100**, 769–777
- Guthrie C., and Fink, G. (eds) (1991) *Methods in Enzymology* Vol. 194, Academic Press, New York
- Landers, J. W., and Zak, B. (1958) *Am. J. Clin. Pathol.* **29**, 590–592
- Eide, D., Davis-Kaplan, S., Jordan, I., Sipe, D., and Kaplan, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20774–20781
- Tzamaras, D., and Struhl, K. (1994) *Nature* **369**, 758–761
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (eds) (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene & Wiley, New York
- Tzamaras, D., and Struhl, K. (1995) *Genes Dev.* **9**, 821–831
- Keleher, C. A., Redd, M. J., Schultz, J., Carlson, M., and Johnson, A. D. (1992) *Cell* **68**, 709–19
- Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J., and Fogel, S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 337–341
- Szczyпка, M. S., and Thiele, D. J. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 421–429
- Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S., and Klausner, R. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25660–25667
- Brent, R., and Ptashne, M. (1984) *Nature* **312**, 612–615
- Welch, R. M., Norvell, W. A., Schaefer, S. C., Shaff, J. E., and Koschian, L. V. (1993) *Planta* **190**, 555–561
- Evans, K. M., Gatehouse, J. A., Lindsay, W. P., Shi, J., Tommey, A. M., and Robinson, N. J. (1992) *Plant Mol. Biol.* **20**, 1019–1028
- Knight, S. A. B., Labbé, S., Kwon, L. F., Kosman, D. J., and Thiele, D. J. (1996) *Genes Dev.* **10**, 1917–1929