

Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Θέμα μεταπτυχιακού τίτλου εξειδίκευσης

In vivo ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του χαλκορυθμιζόμενου μεταγραφικού παράγοντα Mac1p της ζύμης.



Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Δέσποινα Αλεξανδράκη

ΚΑΓΙΑΜΠΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Αφιερωμένο σε αυτούς που πρέπει, ξέρουν αυτοί.

Abstract

This study focuses mainly on the interaction between proteins Dog2p, Yol022cp, and Rad9p with the transcription factor Mac1p. In addition, the role of those interactions was investigated. We showed that Dog2p and Rad9p interact with Mac1p *in vivo* by coimmunoprecipitation assays. However, using these assays it was not clear whether the Yol022cp interacted with Mac1p, thus another approach is necessary to establish a potential interaction.

SDS-PAGE and monoclonal anti-phosphoserine antibody methods were used to investigate whether Dog2p affects the phosphorylation state of Mac1p, and probe the conditions of degradation Mac1p-9Myc. The latter protein did not appear to degrade in a high-copper environment, contrary to previous reports. We were unable to establish the dependence of the phosphorylation state of Mac1p on Dog2p, because the discretion of the two forms of Mac1p was very low in an SDS-PAGE.

The deletion of *Dog1p* and Dog2p did not significantly affect transcription of *CTR1* at high or low copper environments in YPD. In addition deletion of these genes did not affect intracellular concentrations of H₂O₂ and O₂⁻, as did deletion of *rad9*.

Subcellular localization of Dog2p was investigated by immunofluorescence and confocal microscopy. Dog2p was present throughout the cell, in agreement with previous record. Finally, subcloning of *DOG2* in the pYX142 vector, a construct necessary for Chromatin Immunoprecipitation (CHIP) experiments, was described.

Περίληψη

Η παρακάτω μελέτη επικεντρώνεται στις αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Dog2p, Yoi022cp, και Rad9p με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p. Επιπρόσθετα μελετήθηκε και ο ρόλος αυτών των αλληλεπιδράσεων. Δηκτικέ με την βοήθεια της *in vivo* συνανοσοκατακρήμνισης ότι οι Dog2p και Rad9p αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p. Αντίθετα δεν είναι βέβαιο αν η Yoi022cp αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό αυτό παράγοντα και χρειάζεται μια άλλη προσέγγιση του ερωτήματος αυτού.

Αντίσωμα εναντίον της φωσφοσερίνης και πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν η Dog2p επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλιώσεις του Mac1p και παράλληλα μελετήθηκε σε ποια συγκέντρωση χαλκού διασπάται ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1p. Από τα πειράματα έγινε φανερό ότι η Mac1p δεν διασπάται σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού σε αντίθεση με ότι αναφέρεται στην βιβλιογραφία. Επίσης δεν έγινε δυνατή η μελέτη της συσχέτισης της Dog2p με την φωσφορυλίωση της Mac1p, επειδή ο διαχωρισμός των δυο μορφών της Mac1p-9Myc δεν είναι τόσο καλός σε πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης.

Μηδενικές μεταλλαγές των γονιδίων *Dog1p* και *Dog2p* δεν επηρεάζουν σημαντικά τη μεταγραφή του *CTR1* τόσο σε υψηλές, όσο και σε χαμηλές συγκεντρώσεις χαλκού σε θρεπτικό YPD. Επιπρόσθετα τα μεταλλάγματα αυτά δεν φαίνεται να παρουσιάζουν καμία αλλαγή στην συγκέντρωση O_2^- και H_2O_2 μέσα στο κύτταρο σε αντίθεση με το μετάλλαγμα *rad9*.

Στη συνέχεια μελετήθηκε σε πιο κυτταρικό διαμέρισμα βρίσκεται η πρωτεΐνη Dog2p μέσω ανοσοβιολογίας φθορισμού και ομοεστιακής μικροσκοπίας. Το αποτέλεσμα του πειράματος είναι σε συμφωνία με την βιβλιογραφία. Τέλος περιγράφεται η κλωνοποίηση του γονιδίου *DOG2* στο πλασμιδιακό φορέα pYX142. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.

Περιεχόμενα

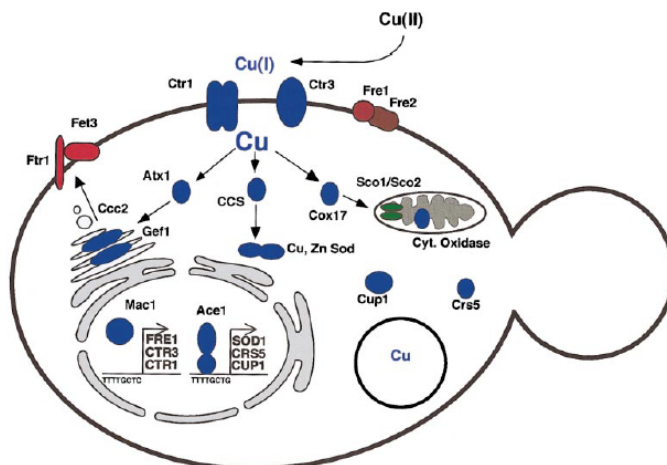
Abstract	3
Περίληψη	4
Περιεχόμενα	5
Εισαγωγή	6
Σύντομη περιγραφή του μονοπατιού εισόδου και διανομής του χαλκού σε κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Αρχικό πείραμα.....	7
Περιγραφή των γονιδίων <i>DOG1</i> και <i>DOG2</i> αλλά και των πρωτεϊνών που παράγονται από αυτά.....	8
Χαρακτηριστικά των Dog1p και Dog2p.....	10
Πρωτεϊνικές Αλληλεπιδράσεις	12
Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων <i>DOG1</i> και <i>DOG2</i>	14
Ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα	19
Microarrays.....	20
Φαινότυποι.....	29
Εντοπισμός των Dog1p και Dog2p.....	30
Ομολογίες με άλλες πρωτεΐνες του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Ομολογίες με πρωτεΐνες άλλων οργανισμών.....	32
Yol022cp.....	33
Υλικά και μέθοδοι	34
<i>In vivo</i> συνανοσοκατακρήμιση	34
Αποτελέσματα	37
Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών.....	37
<i>In vivo</i> συνανοσοκατακρήμιση της Dog2p χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.....	37
Έλεγχος αν η αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα Mac1p διατηρείται παρουσία και απουσία χαλκού.....	39
<i>In vivo</i> συνανοσοκατακρήμιση της Rad9p χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.....	40
<i>In vivo</i> συνανοσοκατακρήμιση της Yol022cp χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.....	41
Πειράματα σταθερότητας και μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων της Mac1p.....	42
Αναζήτηση φαινοτύπου.....	47
Παραρτημα: Κατασκευή στελεχών για τη δημιουργία του διπλού μεταλλάγματος <i>dog1 - dog2Δ :: KanMX4</i>	51
Αναζήτηση φαινοτύπου με γενετικό τρόπο	55
Confocal Microscopy.....	58
Κατασκευή πλασμιδίου pYX142 – <i>DOG2</i> για πειράματα ChIP.....	59
Συζήτηση	61
Βιβλιογραφία	66

Εισαγωγή

Σύντομη περιγραφή του μονοπατιού εισόδου και διανομής του χαλκού σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*

Πριν γίνει είσοδος των ιόντων χαλκού στο κύτταρο θα πρέπει τα ιόντα να αναχθούν από Cu(II) σε Cu(I). Το ρόλο αυτό φαίνεται να διαδραματίζουν πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και ονομάζονται Fe(III)/Cu(II) αναγωγάσες. Οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *FRE1* ως *FRE7*. Τα γονίδια από *FRE2* ως *FRE6* ρυθμίζονται από το σίδηρο μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Aft1, ενώ το γονίδιο *FRE7* ρυθμίζεται από τον χαλκο, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Mac1p. Το γονίδιο *FRE1* ρυθμίζεται και από τους δυο μεταγραφικούς παράγοντες. Μετά την αναγωγή τους σε Cu(I) πιστεύεται ότι τα ιόντα χαλκού εισέρχονται μέσα στο κύτταρο με τη βοήθεια συµμεταφορέων που έχουν μεγάλη συνάφεια με τα ιόντα χαλκού και οι οποίοι κωδικοποιούνται από τα γονίδια *CTR1* και *CTR3*. Το Km για την είσοδο ιόντων χαλκού από τις Ctr1p και Ctr3p είναι 1 - 4 µmol/L. Συγκεντρώσεις χαλκού μεγαλύτερες από το Km έχουν ως συνέπεια τη γρήγορη διάσπαση της Ctr1p στην πλασµατική µεµβράνη. Το γονίδιο *CTR3* σε πολλά εργαστηριακά στελέχη δεν είναι λειτουργικό λόγω ένθεσης του µεταθετού στοιχείου Ty.

Λόγω της ισχυρής οξειδοαναγωγικής δράσης του χαλκού, τα ιόντα μόλις εισέλθουν μέσα στο κυτταρόπλασμα δεσµεύονται από διάφορες πρωτεΐνες που ονοµάζονται χαλκοσαπερόνες για να µπορούν να διανεµηθούν στα επιµέρους διαµερίσµατα του κυττάρου. Ο τρόπος που γίνεται αυτό είναι άγνωστος. Μια τέτοια χαλκοσαπερόνη είναι και η Atx1p, οι οποία µεταφέρει ιόντα χαλκού στο εκκριτικό µονοπάτι. Η Atx1p δεσµεύει ένα ιόν χαλκού ανά πρωτεΐνη. Έχει προταθεί ότι η Atx1p παραδίδει το ιόν χαλκού στην πρωτεΐνη Ccc2p που βρίσκεται στο TGN (trans Golgi network). Στη συνέχεια τα ιόντα χαλκού µεταφέρονται µέσω της Ccc2p ATPάσης στην Fet3p (οξειδάσης), οι οποία σχετίζεται µε την είσοδο ιόντων σιδήρου µέσα στο κύτταρο. Μια άλλη χαλκοσαπερόνη είναι η Cox17p, η οποία µεταφέρει ιόντα χαλκού στα µιτοχόνδρια για να χρησιµοποιηθούν στην αναπνευστική αλυσίδα, ενώ η CCS (the Copper Chaperone for SOD1) παραδίδει απευθείας ιόντα χαλκού στην Cu, Zn SOD (SuperOxide Dismutase). (Pena et al 1999, Puig & Thiele 2002)



Εικόνα 1

Αρχικό πείραμα

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία δύο υβριδίων, έγινε σάρωση σε γενωμική βιβλιοθήκη γενώματος *Saccharomyces cerevisiae*, με σκοπό να βρεθεί ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το μεταγραφικό παράγοντα Mac1p. Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (unpublished data, Voutsina A).

Πίνακας 1

ORF (Open Reading Frame) / γονίδιο	Αριθμός των κλώνων που βρέθηκαν να έχουν το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης	Αριθμός των διαφορετικών κλώνων που βρέθηκαν στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης	Ο αριθμός του πρώτου νουκλεοτιδίου που έχει κλωνοποιηθεί στον κλώνο της βιβλιοθήκης βάσει του ολικού πλαισίου ανάγνωσης	Μέγεθος του προβλεπόμενου ORF	Χαρακτηριστικά / λειτουργίες
YMR021 / MAC1	16	5	722 814 868 876 892	1254	Μεταγραφικός ενεργοποιητής που δεσμεύει χαλκό.
YBL008 W / HIR1	9	1	1179	2523	Σχετίζεται με την ετεροχρωματίνη και την ρύθμιση της μεταγραφής των ιστονών ανάλογα με τον κυτταρικό κύκλο, πιθανός παράγοντας αναστολής ανάλογος με το Tur1P
YER047 C /	2	1	54	2694	Μέλος της οικογένειας των AAA ATPases, αλληλεπιδρά με τον

Περίληψη

SAP1					μεταγραφικό καταστολέα Sin1p σε πειράματα 2 υβριδίων.
YHR043 C / DOG2	1	1	242	741	Φωσφατάση της 2 δεοξυγλυκόζη – 6 – φωσφορική.
YOL022 C	3	1	384	1227	Πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας, χρειάζεται για την βιωσιμότητα.
YDR217 C / RAD9	3	2	1954 1972	3930	Πρωτεΐνη που σχετίζεται με σημεία έλεγχου του κυτταρικού κύκλου με σκοπό την επιδιόρθωση του DNA.
YOR196 C / LIP5	2	1	342	1245	Συνθάση του λιπώϊκού οξέος.
YGR100 W / MDR1	1	1	2162	2853	Πρωτεΐνη GTPase για την ενεργοποίηση Ypt6p και Sec4p.
YNR065 C	1	1	1872	3351	Πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας. Yeast Sortilin 1
YER106 W / MAM1	1	1	106	909	Πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας, πιθανή περιελιγμένη (coiled – coil) πρωτεΐνη που επάγεται κατά την σπορίωση. (Monopolar microtubule Attachment during Meiosis I)

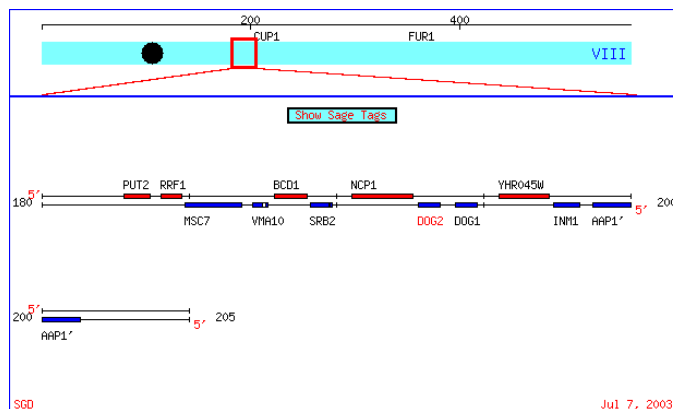
Η εργασία αυτή ασχολείται κυρίως με 2 γονίδια, το *DOG2* και το *YOL022c*, ενώ μικρή αναφορά γίνεται και στο γονίδιο *RAD9*.

Περιγραφή των γονιδίων *DOG1* και *DOG2* αλλά και των πρωτεϊνών που παράγονται από αυτά.

Τα γονίδια *DOG1* και *DOG2* δεν δίνουν κανένα φαινότυπο (φαινότυπος θεωρείται ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων), ούτε σε διπλό (*dog1Δ/dog2Δ*), αλλά ούτε σε μονά μεταλλάγματα (*dog1Δ*, *dog2Δ*) σε όλες τις φυσιολογικές συνθήκες που μέχρι στιγμής έχουν ελεγχθεί, παρόλο που η έκφραση τους επάγεται από συνθήκες stress. Τα γονίδια αυτά διατηρούνται και σε άλλους οργανισμούς όπως περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω.

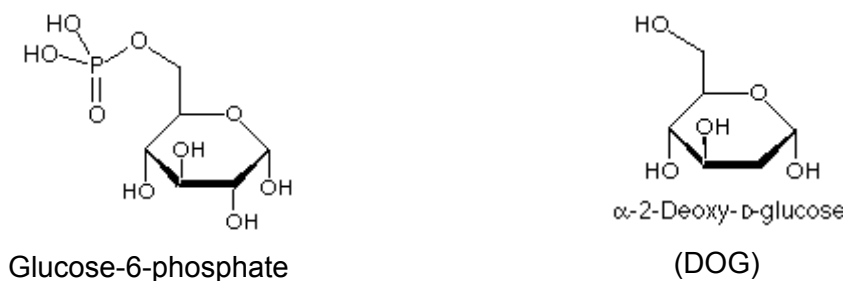
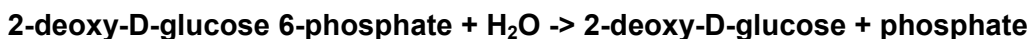
Τα γονίδια *DOG1* (YHR044C) και *DOG2* (YHR043C) βρίσκονται στο χρωμόσωμα 8 του *Saccharomyces cerevisiae* το ένα δίπλα στο άλλο, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.

Περίληψη



Εικόνα 2. Χρωμοσωμικός χάρτης

Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν 2 πρωτεΐνες που έχουν δράση φωσφατάσης (Phosphoric Monoester¹ Hydrolases²) της 2-δεοξυγλυκόζης 6-φωσφορικής. Συγκεκριμένα η αντίδραση που καταλύουν είναι:



Εικόνα 3

Τα γονίδια *DOG1* και *DOG2* πρωτοανακαλύφθηκαν διότι προσφέρουν αντίσταση στην ουσία 2-deoxyglucose (DOG), εμποδίζοντας την συσσώρευση της μέσα στο κύτταρο.

Η ουσία DOG είναι ένα ανάλογο γλυκόζης που δεν μεταβολίζεται, με αποτέλεσμα να αναστέλλει την ζύμωση και την αναπνοή (φωσφορυλιώνεται από την εξοκινάση). Το κύτταρο σταματά να αναπτύσσεται και τελικά οδηγείται σε λύση. Επίσης η ουσία αυτή ενσωματώνεται στα νουκλεοτίδια ουριδίνη και γουανοσίνη, ενώ σχηματίζει 2,2' dideoxy-

¹ Εστερικός δεσμός: $\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}'$, ή όπου άνθρακας να υπάρχει S ή P, ή $\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{R}'$

² Hydrolase: Υδρολυτικό κόψιμο δεσμών C-C, C-N, C-O, και άλλων δεσμών.

Περίληψη

α,α -trehalose και 2-deoxy- α,α -trehalose. (Η trehalose είναι ένας αποθηκευτικός δισακχαρίτης. Η Trehalose-phosphate σχηματίζεται από glucose 6-phosphate και UDP-glucose.) Τέλος ενσωματώνεται στο κυτταρικό τοίχωμα του *Saccharomyces cerevisiae* και συγκεκριμένα σε μαννάνες. (Mannans αποτελούνται από μόρια mannose ενωμένα με α 1,6 – γλυκοζητικούς δεσμούς και πλευρικές ομάδες ενωμένες με α -1,2 και α -1,3 γλυκοζητικούς δεσμούς).(Sanz et al 1994). Η ουσία DOG δεν είναι φυσικό προϊόν και δεν μεταβολίζεται από τα κύτταρα. (Tsujiimoto et al 2000)

Χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών Dog1p και Dog2p

Τα γονίδια *DOG1* και *DOG2* εμφανίζουν ταυτότητα 89,5%. Η ομολογία αυτή μεταφράζεται σε 91,5% ταυτότητα στην αμινοξική αλληλουχία. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα 94 πρώτα αμινοξέα η ομολογία είναι 79,8% ενώ από 95-247 η ομολογία είναι 99,3%.

Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των 2 ενζύμων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2

	Dog1p	Dog2p
Length	247 aa	247 aa
Molecular Weight	27208.98 m.w.	27274.37 m.w.
Isoelectric Point	5.19	5.48
Charge at pH 7	-5.98	-3.98
K_M 2-DOG-6P	17 mM	41 mM
V_{max} 2-DOG-6P	29 nmol/min	69 nmol/min
Optimum pH 2-DOG-6P	6	6
Optimum Temperature 2-DOG-6P	30°C	40°C
K_M Fructose -1P	Not determined	10 mM
V_{max} Fructose -1P	Not determined	26 nmol/min
K_M Fructose -5P	30 mM	Not determined
V_{max} Fructose -5P	40 nmol/min	Not determined

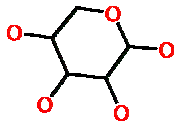
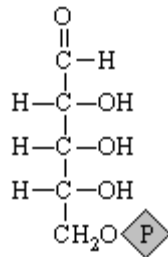
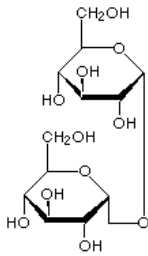
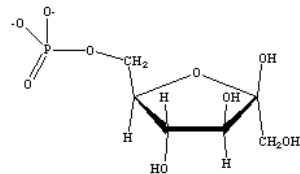
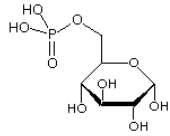
Για την αντίδραση της αποφοσφρυλίωσης των σακχάρων από τα ένζυμα Dog1p και Dog2p, χρειάζεται η προσθήκη 10 mM MgCl₂. Επίσης ο ανόργανος φώσφορος αναστέλλει τη δράση και των 2 ενζύμων. Αναστολή στην δράση των ενζύμων δεν παρατηρούμε από τα ζάχαρα DOG, γλυκόζη, φρουκτόζη και ριβόζη (συγκεντρώσεις 25-100 mM).

Περίληψη

Οι πρωτεΐνες Dog1p και Dog2p παρουσιάζουν ειδικότητα για συγκεκριμένα υποστρώματα σακχάρων, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα: (Randez-Gil et al 1995)

Πίνακας 3

Υπόστρωμα (40mM)	Σχετική ενεργότητα %	
	Dog1p	Dog2p
2-DOG-6P	100	100
Glucose-6P	20	30
Fructose 6-P	2	17
Fructose 1-P	12	106
Trehalose-6P	2	1
Ribose-5P	42	13
2-Deoxyribose-5P	21	1
Arabinose-5P	6	6



Περίληψη

	7	1
Ribulose-5P Glycerate-6P	1	1

Από όλα τα παραπάνω συνεπάγεται, ότι παρόλο που τα ένζυμα αυτά είναι τόσο όμοια σε αμινοξική αλληλουχία, παρουσιάζουν διαφορές στην λειτουργία τους και πρέπει να μελετηθούν ξεχωριστά για την εύρεση της πραγματικής βιοχημικής δράσης τους μέσα στο κύτταρο. Συμφωνα με την SGD (www.yeastgenome.org) το *DOG2* επάγεται από οξειδωτικό και οσμωτικό στρες και προσφέρει ανθεκτικότητα σε 2-deoxyglucose όταν υπερπαράγεται.

Πρωτεϊνικές Αλληλοεπιδράσεις

Σημαντική ένδειξη για την λειτουργία μιας πρωτεΐνης αποτελεί η γνώση των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά. Η πρωτεΐνη Dog1p αλληλεπιδρά με τις παρακάτω πρωτεΐνες όπως παρουσιάζεται στο yeast GRID: (Gavin et al 2002, Ho et al 2002)

Πίνακας 4

Όνομασία	Λειτουργία	Εντοπισμός	Φαινότυπος	Τεχνική	Συνθήκες - στέλεχος
Snp1 / YIL061C	Ομόλογη με την πρωτεΐνη U1snRNP 70K. Σχετίζεται με τον εντοπισμό του RNA και τη διαδικασία pre-mRNA splicing	Άγνωστος	Σε μερικά στελέχη η μηδενική μεταλλαγή είναι θνησιγόνα. Αυξημένος ρυθμός παραγωγής εκβλαστημάτων. Ευαισθησία στην θερμοκρασία, δυσλειτουργία στο pre-mRNA splicing	Affinity precipitation. Tandem Mass Spectrometry. (Shukla & Futrell 2000) Dog2p prey, Snp1 bait	Θρεπτικό μέσο XY (2% bactopeptone, 1% yeast extract, 0.01% adenine, 0.02% tryptophan) (επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με γαλακτόζη ή doxycyclin) – BY4742
YLR096W / KIN2	Παρουσιάζει λειτουργία πρωτεϊνικής κίνησης σερίνης θρεονίνης. Άγνωστος βιολογικός ρόλος.	Βρίσκεται στην κύτταρο-πλασματική μεριά της κυτταρικής μεμβράνης	Άγνωστος	Affinity precipitation. Tandem Mass Spectrometry. (Shukla & Futrell 2000) Dog2p prey, KIN2 bait	Θρεπτικό μέσο XY (2% bactopeptone, 1% yeast extract, 0.01% adenine, 0.02% tryptophan) (επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με γαλακτόζη ή doxycyclin) – BY4742
YDR267C	Άγνωστος	Άγνωστος	Θνησιγόνο	Affinity precipitation. Tandem Mass Spectrometry. (Shukla & Futrell 2000) Dog2p bait, YDR267C bait	Θρεπτικό μέσο XY (2% bactopeptone, 1% yeast extract, 0.01% adenine, 0.02% tryptophan) (επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με γαλακτόζη ή doxycyclin) – BY4742

Περίληψη

CDC12/ YHR107C	Σχετίζεται με το σωστό σχηματισμό του εκβλαστήματος και την κιτοκίνηση. Χρειάζεται για την μορφογένεση που επάγεται με φερορμόνες. Συμμετέχει στον έλεγχο της αύξησης του μεγέθους του εκβλαστήματος κατά τη διάρκεια της μίτωσης.	Ινίδια σεππίνης (Septin Filaments), Κυτταρόπλασμα	θνησιγόνο	Affinity precipitation. Tandem Mass Spectrometry. (Shukla & Futrell 2000) Dog2p prey, YDR267C bait	Θρεπτικό μέσο XY (2% bactopectone, 1% yeast extract, 0.01% adenine, 0.02% tryptophan) (επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με γαλακτόζη ή doxycyclin) – BY4742
-------------------	--	---	-----------	--	---

Η πρωτεΐνη Dog2p αλληλεπιδρά με τις παρακάτω πρωτεΐνες:

Πίνακας 5

Όνομασία	Λειτουργία	Εντοπισμός	Φαινότυπος	Τεχνική	Συνθήκες - στέλεχος
CDC12 / YHR107C	Σχετίζεται με το σωστό σχηματισμό του εκβλαστήματος και την κιτοκίνηση. Χρειάζεται για την μορφογένεση που επάγεται με φερορμόνες. Συμμετέχει στον έλεγχο της αύξησης του μεγέθους του εκβλαστήματος κατά τη διάρκεια της μίτωσης.	Ινίδια σεππίνης (Septin Filaments), Κυτταρόπλασμα	θνησιγόνο	Affinity precipitation. Tandem Mass Spectrometry. (Shukla & Futrell 2000) Dog2p prey, YDR267C bait	Θρεπτικό μέσο XY (2% bactopectone, 1% yeast extract, 0.01% adenine, 0.02% tryptophan) (επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με γαλακτόζη ή doxycyclin) – BY4742
APG17 / YLR423c	Χρειάζεται για την ενεργοποίηση της Agp1 κινάσης	Κυτταρόπλασμα. Πυρηνική μεμβράνη, Ενδοπλασματικό δίκτυο.	Η μηδενική μεταλλαγή δεν είναι θνησιγόνα αλλά παρουσιάζει προβλήματα στην αυτοφαγία. Επίσης παρουσιάζει μικρότερη ταχύτητα ανάπτυξης, όταν μεγαλώνει με αερόβια αναπνοή.	Two-hybrids screen. (Ito et al 2001)	

Δεδομένα που δεν βρίσκονται στο yeast GRID:

MAC1 / YMR021c	Σχετίζεται με την είσοδο ιόντων Cu ⁺ στο	Πυρήνας	Τα κύτταρα με	Two-hybrids screen. ³
-------------------	---	---------	---------------	----------------------------------

³ Unpublished data (Voutsina A.)

Περίληψη

κύτταρο. Μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει τα γονίδια *CTR1*, *FRE1* και *FRE7*

μηδενική μεταλλαγή παρουσιάζουν μικρότερη ταχύτητα πολλαπλασιασμού από τον άγριο τύπο. Τα κύτταρα δεν μεγαλώνουν σε μη ζυμούμενη πηγή άνθρακα.

Affinity precipitation⁴.

Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων *DOG1* και *DOG2*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η έκφραση των γονιδίων *DOG1* και *DOG2* φαίνεται να επάγεται σε συνθήκες stress σύμφωνα με το παρακάτω πίνακα:

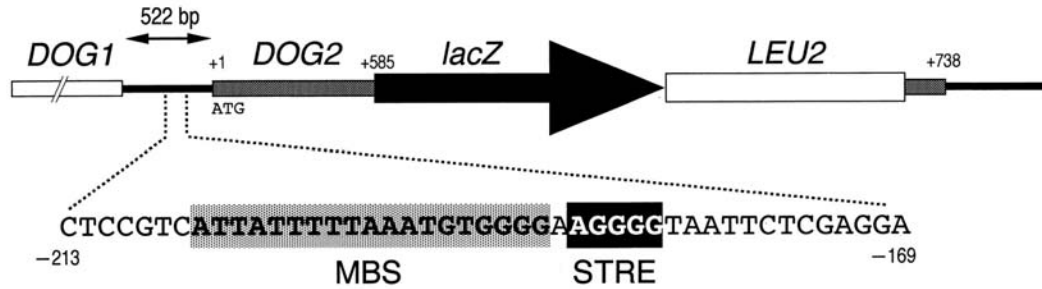
Πίνακας 6		
stress	<i>DOG1</i>	<i>DOG2</i>
2-DOG	+ (protein level)	Not determined
tert-Butyl hydroperoxide ⁵	Not determined	+ (<i>DOG2</i> -LacZ reporter)
Osmotic stress (NaCl, KCl, sorbitol)	Not determined	+ (<i>DOG2</i> -LacZ reporter)
Glucose starvation	Not determined	+ (<i>DOG2</i> -LacZ reporter)

Στον υποκινητή του γονιδίου *DOG2*, αλλά όχι στον υποκινητή του *DOG1*, υπάρχουν στοιχεία MBS (Mig1p – binding site, περιοχή πλούσια σε AT και GGGG) και STRE (stress response elements, αλληλουχία 5'- AGGGG -3').

⁴ Unpublished data (Kagiampakis, I)

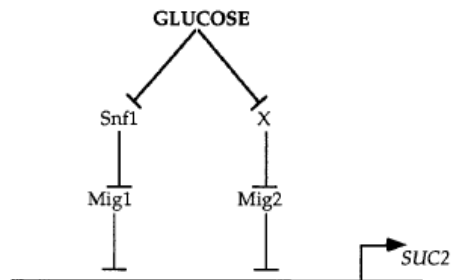
⁵ Το tert-Butyl hydroperoxide (t-BMP) χρησιμοποιείται ως παράγοντας stress, μια και προκαλεί την παραγωγή lipid hydroperoxide (LOOH) (οξειδωτικό stress). Οι υπεροξειδικές ρίζες (HOO) μπορούν να απομακρύνουν ένα άτομο H (bis-allylic hydrogen atom) από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (LH) και έτσι να σχηματιστεί μια lipid alkyl radical (L). Η L οξειδώνεται από το μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια lipid peroxide radical (LOO). Η LOO αντιδρά με την LH και δίνει lipid hydroperoxide (LOOH) και L. Το LOOH ενσωματώνεται στις μεμβράνες του κυττάρου. Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 27002-9

Περίληψη



Εικόνα 4

Η Mig1p είναι μια zing Finger πρωτεΐνη, που προσδένεται στο DNA και στρατολογεί το σύμπλοκο Ssn6 Tup1. Με τον τρόπο αυτό καταστέλλει την λειτουργία γονιδίων, όπως για παράδειγμα το γονίδιο *SUC2* που σχετίζεται με το καταβολισμό της σουκρόζης, όταν δεν υπάρχει γλυκόζη. Η λειτουργία της Mig1p ρυθμίζεται στο επίπεδο του πυρηνικού εντοπισμού της. Απουσία γλυκόζης, η πρωτεΐνη Mig1p βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ παρουσία αυτής βρίσκεται στον πυρήνα. Η κινάση Snf1p, που χρειάζεται για την έκφραση πολλών γονιδίων που καταστέλλονται από την παρουσία γλυκόζης, καταστέλλει την λειτουργία της Mig1p απουσία γλυκόζης, πιθανόν με το να την φωσφορυλιώνει. Η φωσφορυλιωμένη Mig1p μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, οπότε και σταματά η καταστολή των γονιδίων στόχων της. Ομόλογη με την πρωτεΐνη Mig1p είναι και η Mig2p, η οποία όμως δεν ελέγχεται από την κινάση Snf1 (Εικόνα 5)(Lutfiyya et al 1998).

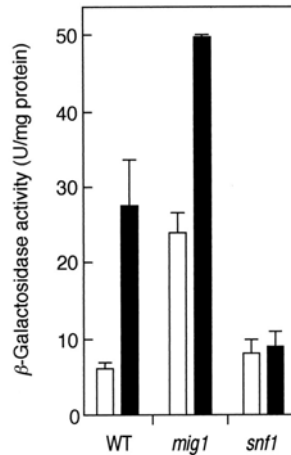


Εικόνα 5

Στην περίπτωση που έχουμε παρουσία γλυκόζης, η βασική έκφραση του γονιδίου *DOG2-LacZ* αυξάνεται σε μεταλλάγματα έλλειψης του γονιδίου *MIG1*. Η έκφραση όμως του γονιδίου αυξάνεται απουσία γλυκόζης, γεγονός που δηλώνει ότι συνεχίζει να είναι ρυθμιζόμενο από γλυκόζη. Το ίδιο συμβαίνει και με το διπλό μετάλλαγμα *mig1Δ/mig2Δ*. Αντίθετα στο στέλεχος όπου έχουμε μηδενική μεταλλαγή στο γονίδιο *SNF1* δεν

Περίληψη

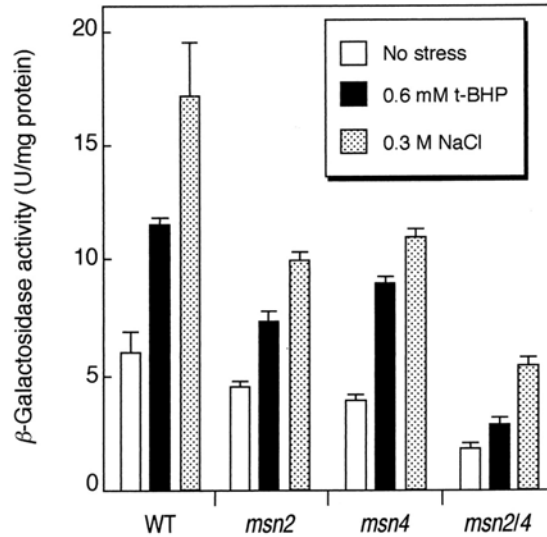
παρατηρείται καμία μεταβολή παρουσία γλυκόζης. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν, ότι το γονίδιο *DOG2-LacZ* καταστέλλεται από την παρουσία γλυκόζης, αλλά δεν υπάρχει συσχέτιση μονοπατιού Snf1-Mig1 με την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *DOG2* απουσία γλυκόζης. (Εικόνα 6) (Tsujiimoto et al 2000)



Εικόνα 6 (Με άσπρες στήλες συμβολίζονται οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται παρουσία γλυκόζης (YPD), ενώ με μαύρες στήλες οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται απουσία γλυκόζης (1% yeast extract, 2% peptone))

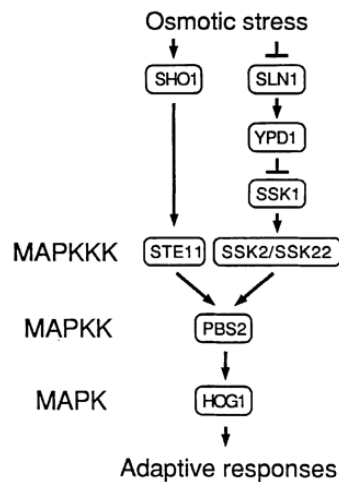
Οι πρωτεΐνες Msn2 και Msn4 είναι zing finger μεταγραφικοί παράγοντες που δεσμεύονται στην αλληλουχία STRE. Έχει δειχθεί ότι πολλά σήματα stress «καταλήγουν» στις συγκεκριμένες αλληλουχίες, μεταξύ των οποίων το οξειδωτικό και το οσμωτικό stress. Για την επαγωγή του οξειδωτικού stress χρησιμοποιείται η ουσία t-BHP, ενώ για την επαγωγή του οσμωτικού stress χρησιμοποιείται το NaCl. Σε στελέχη *msn4Δ msn2Δ* παρατηρείται πτώση της βασικής έκφρασης του γονιδίου *DOG2-LacZ*, το οποίο όμως συνεχίζει να επάγεται σε συνθήκες stress. Επομένως οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες πιθανόν να σχετίζονται με την ενεργοποίηση του γονιδίου *DOG2-LacZ* στα πλαίσια της βασικής του έκφρασης, ενώ δεν συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του σε συνθήκες stress. (Εικόνα 7) (Tsujiimoto et al 2000)

Περίληψη



Εικόνα 7

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος του καταρράκτη αντιδράσεων HOG-MAP kinase, ο οποίος σχετίζεται με την απόκριση σε συνθήκες οσμωτικού stress. Ο καταρράκτης αντιδράσεων φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

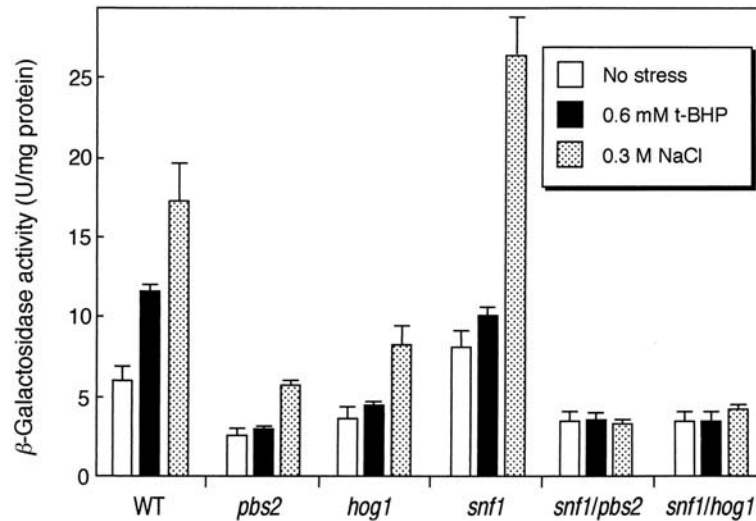


Εικόνα 8 (Στην κορυφή του μονοπατιού υπάρχουν 2 οσμωαισθητήρες, ένας εναλλακτικός (SHO1) και ένας που αποτελείται από 2 μέρη (SLN1, YPD1 και SSK1), ακολουθούν μια σειρά κινάσες. (Posas & Saito 1998)

Όταν πραγματοποιηθεί γονιδιακή αφαίρεση στα γονίδια *PBS2* και *HOG1*, παρατηρούμε ότι μειώνεται η βασική έκφραση του γονιδίου *DOG2-LacZ*, ενώ η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου παραμένει. Σε στελέχη όμως που αποτελούνται από τα δίπλα

Περίληψη

μεταλλάγματα *snf1Δ/pbs2Δ* και *snf1Δ/hog1Δ* δεν παρατηρείται καμία επαγωγή σε συνθήκες οξειδωτικού και οσμωτικού stress. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες *snf1*, *pbs2* και *hog1* θα πρέπει να συνεργάζονται για την επαγωγή του γονιδίου *DOG2-LacZ* κάτω από συνθήκες οξειδωτικού και οσμωτικού stress. (Εικόνα 9)



Εικόνα 9

Από τα παραπάνω πειράματα γίνεται φανερό ότι, τουλάχιστον η πρωτεΐνη Dog2p θα πρέπει να σχετίζεται με λειτουργίες αντιμετώπισης καταστάσεων stress. Μένει επομένως να διευκρινισθεί ο ρόλος της. (Tsujiimoto et al 2000)

Όλα τα πειράματα που αναφέρονται παραπάνω είναι γενετικά πειράματα και επομένως δεν γνωρίζουμε, αν οι μεταγραφικοί παράγοντες που προαναφέρθηκαν, προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου *DOG2*. Στον *Saccharomyces cerevisiae* έχουν πραγματοποιηθεί μεγάλης κλίμακας πειράματα (genome wide) συνανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης από μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι εκφράζονται χιμαιρικά με το επίτοπο Myc (140 γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως καταγράφονται στην βάση δεδομένων YPD) και έλεγχος των υποκινητών όλων των γονιδίων. (η ένθεση του επιτόπου γίνεται στο γένωμα και τα στελέχη αναπτύσσονται σε θρεπτικό YPD) (Lee et al 2002) Στον υποκινητή του γονιδίου *DOG2* έχει βρεθεί να προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας SIP4, ο οποίος συμμετέχει στην θετική ρύθμιση της γλυκονεογένεσης.

Περίληψη

Όσο αναφορά την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *DOG1*, δεν υπάρχουν γενετικά στοιχεία. Οι πληροφορίες προέρχονται: 1) από τα μεγάλης κλίμακας πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Όνομα μεταγραφικού παράγοντα που προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου <i>DOG1</i>	Ρόλος
RFX1 (P=0.005)	Δράση καταστολέα της μεταγραφής. Σχετίζεται με απόκριση σε καταστροφή του DNA και το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου.
HAP3 (P=0.005)	Δράση ενεργοποιητή της μεταγραφής. Σχετίζεται με τη ρύθμιση της μεταγραφής στο μεταβολισμό υδατανθράκων.

2) από στοιχεία για την παρουσία ή όχι της *Dog1p* σε διάφορα στελέχη. Σε κύτταρα αγρίου τύπου, που δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ουσία DOG (στέλεχος: ENY.WA-1A), και που αναπτύσσονται παρουσία γλυκόζης, η πρωτεΐνη *Dog1p* δεν είναι ανιχνεύσιμη σε κυτταρικό εκχύλισμα (αντίσωμα κατά της ίδιας της *Dog1p* πρωτεΐνης). Αντίθετα σε στελέχη που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην ουσία DOG (WA[*Yep11HP*]), η *Dog1p* είναι ανιχνεύσιμη. (Randez-Gil et al 1995)

Ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα

Βάση της δημοσίευσης Ghaemmaghami et al, (κατά την οποία εκφράσανε όλες τις πρωτεΐνες με τον επίτοπο TAP από τον ενδογενή υποκινητή τους και στη συνέχεια μέτρησαν το ποσοστό έκφρασης τους) το ποσοστό της έκφρασης των πρωτεϊνών *Dog2p*, *Dog1p*, *Yol022c*, *Mac1p*, *Rad9* είναι:

YMR021C/ <i>Mac1p</i>	Both	1.48E+04	-
YDR217C/ <i>Rad9p</i>	Both	4.00E+02	-
YHR043C/ <i>Dog2p</i>	Both	2.40E+03	-
YHR044C/ <i>Dog1p</i>	TAP	7.52E+02	-
YOL022C	Both	1.25E+02	-

Περίληψη

Στην πρώτη στήλη βρίσκεται το όνομα του γονιδίου, στην δεύτερη η λέξη Both σημαίνει ότι η πρωτεΐνη ανιχνεύτηκε τόσο με αντίσωμα κατά του επίτοπου TAP (western), όσο και με GFP (microscopy). Η τρίτη στήλη περιέχει την ποσότητα της πρωτεΐνης εκφρασμένης σε μόρια πρωτεΐνης ανά κύτταρο. Η τέταρτη στήλη δηλώνει αν υπάρχει ανιχνεύσιμη ζώνη πήκτωμα. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι ATCC 201388: *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* και οι συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους για το πείραμα είναι θρεπτικό μέσο YEPD και θερμοκρασία 30 °C (Ghaemmaghani et al 2003). Στην περίπτωση αυτή βάση των προηγούμενων δεν θα έπρεπε να εκφράζεται το Dog2p, αλλά αυτό είναι σχετικό με το στέλεχος μια και ορισμένα στελέχη εκφράζουν ανθεκτικότητα στην DOG σε όλες τις συνθήκες. Εξάλλου η ποσότητα που παρουσιάζεται παραπάνω είναι πολύ μικρή.

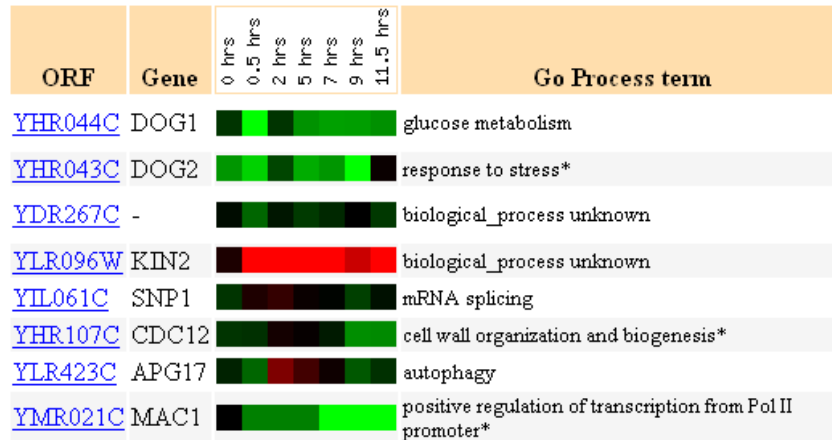
Microarrays

Η έκφραση των γονιδίων του *Saccharomyces cerevisiae* έχει μελετηθεί με τη βοήθεια DNA microarrays σε διάφορες συνθήκες. Η γνώση της έκφρασης ενός γονιδίου μπορεί να δώσει πληροφορίες για την βιολογική σημασία του γονιδίου αυτού. Παρακάτω παραθέτονται πληροφορίες για την έκφραση των γονιδίων *DOG1* και *DOG2* σε διαφορετικά πειράματα microarrays.

1) Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του διπλοειδούς στελέχους YSC328 κατά την διαδικασία της σπορίωσης.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται αρχικά σε YPA medium (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% KoAc (20 g/l Potassium acetate)) μέχρι O.D.550 = 6. RNA από τα κύτταρα αυτά αποτελεί το δείγμα αναφοράς (control). Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε SPM medium (2% KOAC, 0.2 g/l glucose), όπου και αρχίζει να μετράει ο χρόνος. Το θρεπτικό μέσο SPM δεν έχει άζωτο, οπότε και επάγει την σπορίωση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

Περίληψη



Εικόνα 10

Η έκφραση και των 2 γονιδίων *DOG1* και *DOG2* μειώνεται απουσία αζώτου σχετικά νωρίς. Η έκφραση των 2 αυτών γονιδίων κάτω τις παραπάνω συνθήκες είναι όμοια με συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο του 0,8. (Chu et al 1998) ⁶

2) **Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων κυτάρων *Saccharomyces cerevisiae* του στελέχους DBY7286, υπό την επίδραση περιβαλλοντικών αλλαγών.** (Gasch et al 2000)

A) Μελέτη της επίδρασης της αύξησης της θερμοκρασίας από 25°C σε 37°C.

Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 2 τρόποι μεταβολής της θερμοκρασίας στην καλλιέργεια. Κατά τον πρώτο τρόπο (expt 1), YPD το οποίο έχει προθερμανθεί στους 49°C, προστίθεται σε καλλιέργειες που μεγαλώνουν στους 25°C και βρίσκονται στην αρχή της λογαριθμικής φάσης, μέχρι η θερμοκρασία των καλλιεργειών να φτάσει στους 37°C. Από εκεί και πέρα οι καλλιέργειες επιστρέφουν στους 37°C και δείγματα παίρνονται σε καθορισμένους χρόνους για απομόνωση RNA.

Βάσει του δεύτερου τρόπου (expt 2), τα κύτταρα κατακρημνίζονται, στη συνέχεια επαναιωρούνται σε προθερμασμένο θρεπτικό στους 37 °C και συνεχίζουν να μεγαλώνουν στους 37 °C.

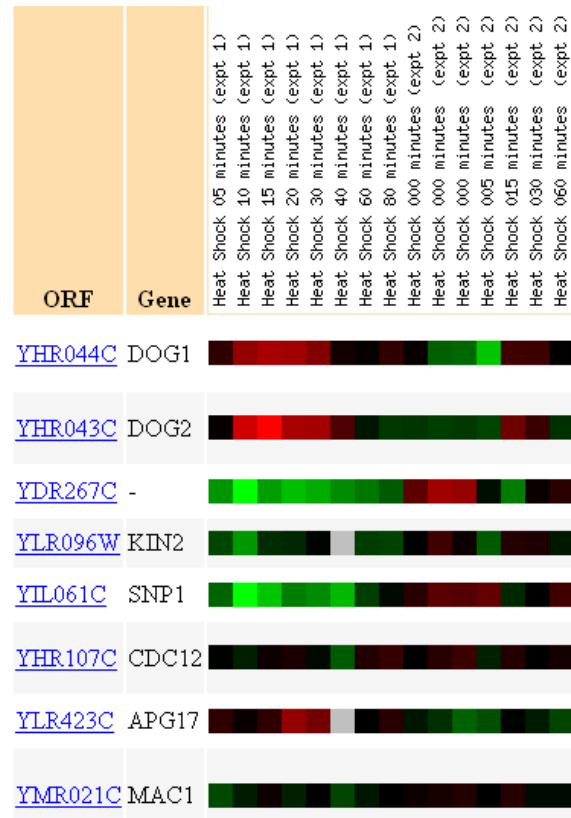
Για την δημιουργία του δείγματος αναφοράς κατά την υβριδοποίηση, χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA από όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του μη

⁶ Η μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων είναι ανάλογη με την ένταση του χρώματος, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (πράσινο καταστολή, κόκκινο επαγωγή) (www.yeastgenome.org)



Περίληψη

επαγμένου δείγματος (control). Για την δημιουργία της τελικής εικόνας, η μεταβολή της έκφρασης κάθε γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί με βάση το μη επαγόμενο δείγμα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 11

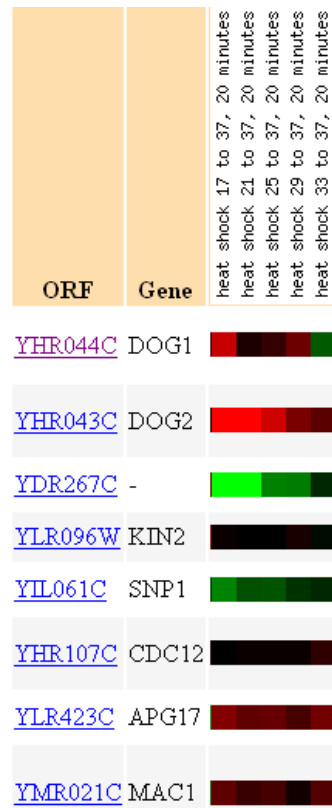
Από την παραπάνω εικόνα συμπεραίνουμε, ότι για το πρώτο τρόπο επαγωγής θερμικού σοκ, η έκφραση του κυρίως γονιδίου *DOG2* αλλά και του *DOG1* επάγεται.

Β) Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων μετά από θερμικό σοκ. (Ποικίλες θερμοκρασίες ανάπτυξης της αρχικής καλλιέργειας).

Έξι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο YPD, σε θερμοκρασίες 17°C, 21°C, 29°C, 33°C και 37°C κατά την διάρκεια της νύκτας. Στη συνέχεια η καλλιέργειες αραιώνονται, ώστε να βρίσκονται σε λογαριθμική φάση στις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Η μισή ποσότητα από κάθε μια από τις έξι καλλιέργειες συλλέγεται και θεωρείται ως το δείγμα αναφοράς. Η υπόλοιπη μαζεύεται και επαναδιαλύεται σε θρεπτικό που έχει θερμοκρασία 37°C. Παραμένει σε αυτή τη θερμοκρασία για 20 λεπτά και συνέχεια

Περίληψη

χρησιμοποιείται για την απομόνωση RNA. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



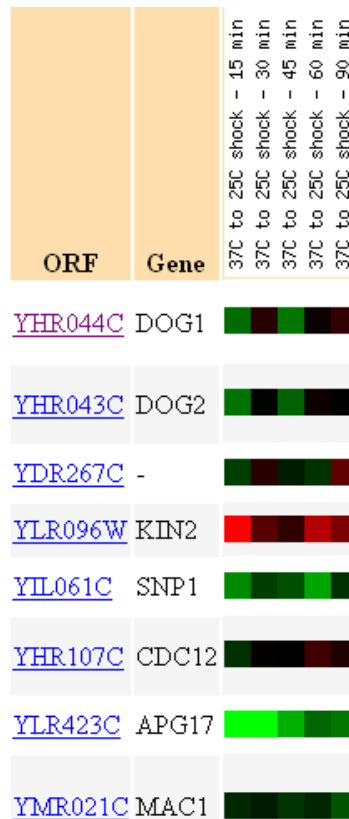
Εικόνα 12

Από το παραπάνω πείραμα διαπιστώνουμε, ότι το *DOG2* επάγεται περισσότερο σε συνθήκες θερμικού σοκ από ότι το *DOG1* και μάλιστα επάγεται τόσο περισσότερο, όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά στις θερμοκρασίες. Η επαγωγή του *DOG2* είναι αποκλειστικά λόγω της μεταβολής της θερμοκρασίας, γιατί σε πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας καλλιέργειες που μεγαλώνουν συνεχώς σε θερμοκρασίες 17°C, 21°C, 29°C, 33°C και 37°C και βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης δεν παρουσιάζεται καμία διαφορά στην έκφραση ούτε του *DOG1*, ούτε του *DOG2* γονιδίου. (Το πείραμα κανονικοποιείται βάση της επαγωγής που υπάρχει στα γονίδια αυτά στην θερμοκρασία των 33°C. Ως δεύτερο δείγμα RNA για την υβριδοποίηση χρησιμοποιήθηκε μείγμα από όλες τις συνθήκες)

Στην περίπτωση που έχουμε μείωση της θερμοκρασίας από 37°C σε 25°C για διάφορους χρόνους, δεν παρατηρούμε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *DOG1*, *DOG2*, αλλά αντίθετα μια μικρή μείωση της έκφρασης τους κατά της χρονικές στιγμές 15

Περίληψη

και 45 λεπτά μετά την επαγωγή του θερμικού σοκ. Αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια επάγονται μόνο κατά την αύξηση της θερμοκρασίας (heat shock).

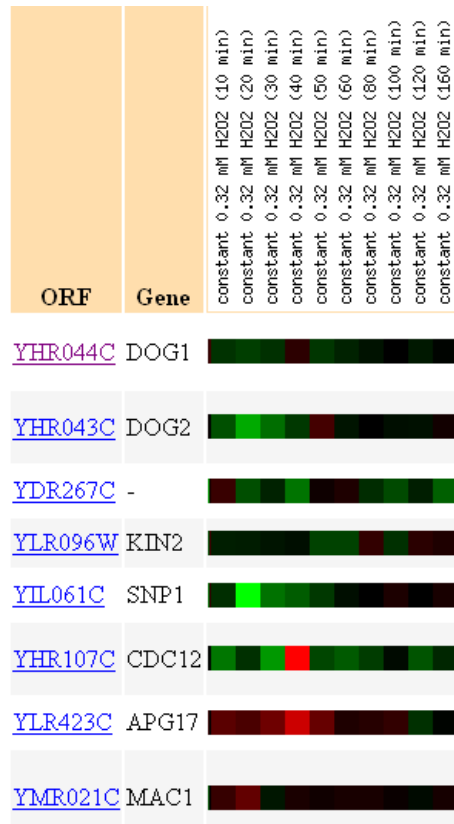


Εικόνα 13

Γ) Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων παρουσία H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο.

Επειδή το H_2O_2 απομακρύνεται ταχύτατα από το θρεπτικό μέσο εξαιτίας των κυττάρων, γίνεται συνεχώς προσθήκη H_2O_2 στην καλλιέργεια. Η συγκέντρωση του H_2O_2 διατηρείται σε $0,32 \pm 0,03$ mM. Ως δείγμα αναφοράς θεωρείται καλλιέργεια που μεγαλώνει σε YPD. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται παρακάτω:

Περίληψη

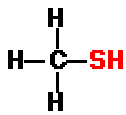


Εικόνα 14

Από το παραπάνω πείραμα συμπεραίνουμε ότι το H₂O₂ δεν επάγει την έκφραση των γονιδίων *DOG1* και *DOG2*. Αντίθετα παρατηρούμε μια μικρή μείωση στην έκφραση του γονιδίου *DOG2* στα 20 λεπτά.

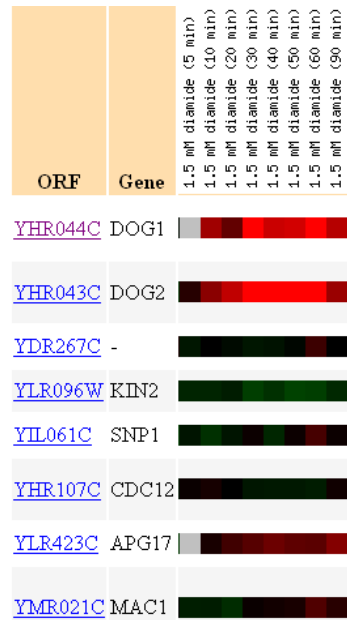
Δ) Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων ως απόκριση στην ύπαρξη της ουσίας diamide στο θρεπτικό μέσο.

Η diamide είναι ένας παράγοντας που προκαλεί οξειδωση στις σουλφιδικές ομάδες



Τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία 1,5 mM diamide. Ως δείγμα αναφοράς θεωρείται καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο YPD. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:

Περίληψη



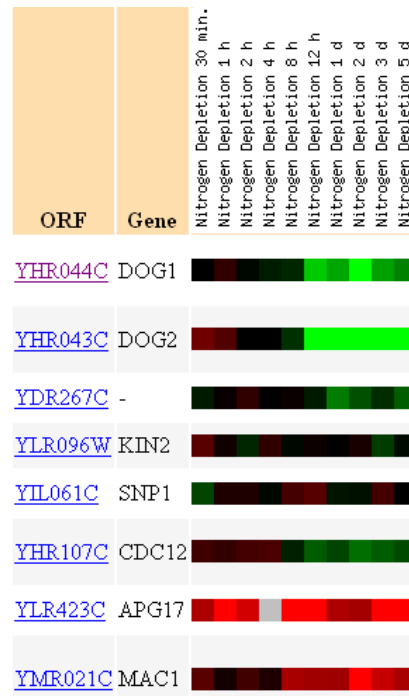
Εικόνα 15

Από το παραπάνω πείραμα φαίνεται, ότι η έκφραση και των δυο γονιδίων *DOG1* και *DOG2* επάγεται από την παρουσία diamide. Επομένως τα γονίδια *DOG1* *DOG2* επάγονται σε οξειδωτικό stress, που προκαλείται όμως από το diamide και όχι από το H_2O_2 .

Ε) Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων σε συνθήκες έλλειψης αζώτου.

Κύτταρα που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο SC στους 30°C και αποτελούν την καλλιέργεια αναφοράς, μεταφέρονται σε θρεπτικό χωρίς αμινοξέα και αδενίνη με μειωμένη συγκέντρωση αμμωνίας (ammonium sulfate) (YNB-AA-AS, 2% glucose, 20 mg/L uracil, 0,025% ammonium sulfate). Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

Περίληψη

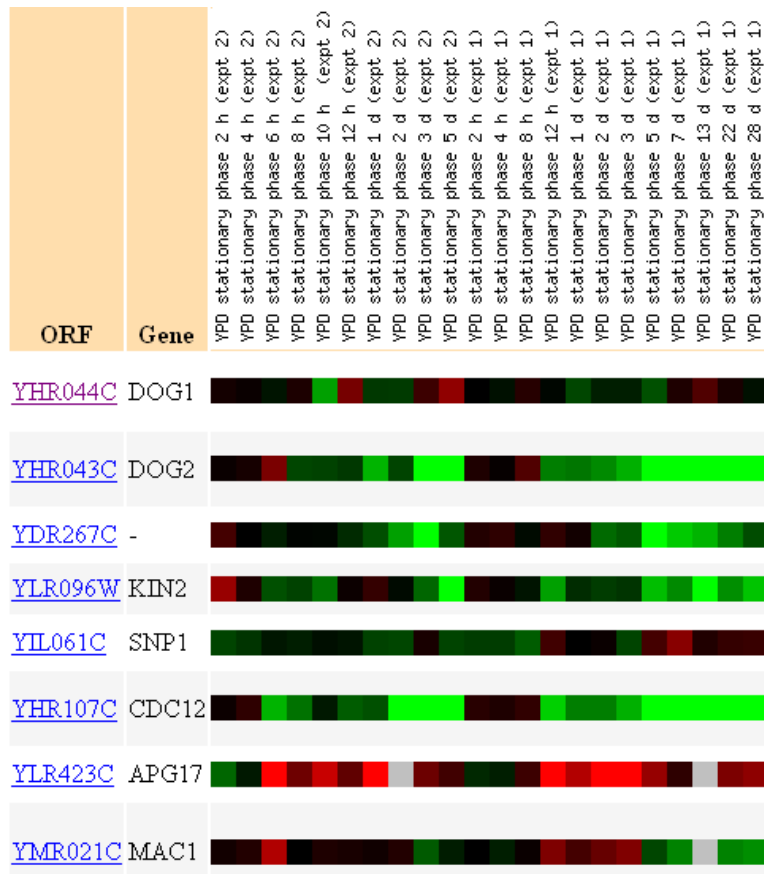


Εικόνα 16

Τα γονίδια *DOG1* *DOG2* καταστέλλονται (το *DOG2* ισχυρότερα) από την απουσία αζώτου μετά την πάροδο 12 ωρών. Εδώ πιθανόν να υπάρχει συσχέτιση της μείωσης της έκφρασης των γονιδίων με την αναστολή της διαδικασίας εκβλάστησης των κυττάρων (Υπενθυμίζεται ότι η πρωτεΐνες Dog1p και Dog2p αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Cdc12, η οποία σχετίζεται με την διαδικασία της εκβλάστησης)

Ζ) Μελέτη της έκφρασης γονιδίων σε καλλιέργειες που βρίσκονται σε πλατό στην καμπύλη ανάπτυξης.

Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε YPD σε θερμοκρασία 25°C (expt1) και σε 30°C (expt2). Ως καλλιέργεια αναφοράς θεωρείται καλλιέργεια σε YPD, οπτικής πυκνότητας 0,3 στις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:



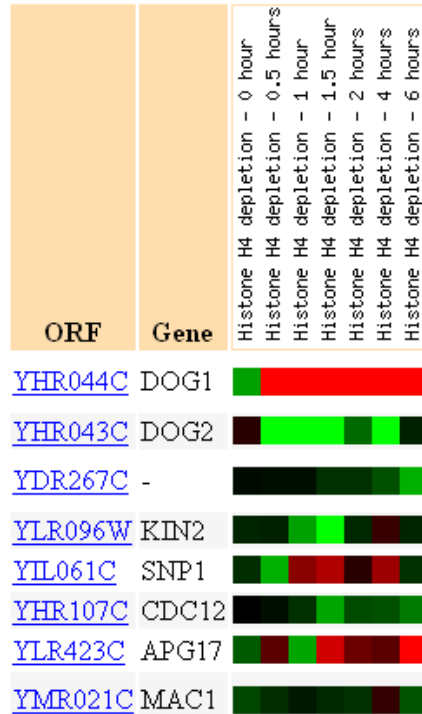
Εικόνα 17

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι μόνο η έκφραση του γονιδίου *DOG2* μειώνεται στην καλλιέργεια που αναπτύσσεται στους 30°C μετά την πρώτη μέρα, ενώ στους 25°C η έκφραση του αρχίζει να μειώνεται μετά από 12 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας.

3)Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων στην περίπτωση που παύει να εκφράζεται η ιστόνη 4.

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος UKY403, στο οποίο το γονίδιο της ιστόνης 4 ελέγχεται από τον υποκινητή *GAL1*. Τα κύτταρα αναπτύσσονται αρχικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γαλακτόζη (YEPGalactose) και στη συνέχεια μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη (YPD). Καλλιέργεια αναφοράς θεωρείται καλλιέργεια αγρίου τύπου που μεταφέρεται από YEPGalactose σε YPD. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

Περίληψη



Εικόνα 18

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι το γονίδιο *DOG1* πιθανών καταστέλλεται από την παρουσία ιστονών, ενώ αντίθετα το γονίδιο *DOG2* επάγεται πιθανόν από την παρουσία ιστονών (Η έκφραση των γονιδίων *DOG1* και *DOG2* δεν μεταβάλλεται σημαντικά ούτε σε diauxic shift, αλλά ούτε σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M).

Φαινότυποι

Παρόλο που η έκφραση τουλάχιστον του γονιδίου *DOG2* επάγεται σε συνθήκες stress, δεν έχει παρατηρηθεί κανένας φαινότυπος (Μεταβολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων στην καλλιέργεια) σε σχέση με τον άγριο τύπο ούτε σε μόνα, ούτε σε δίπλα μεταλλάγματα *dog1Δ/dog2Δ*, στις παρακάτω συνθήκες και κυτταρικές διαδικασίες:

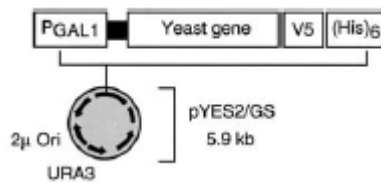
1. Ανάπτυξη σε θρεπτικά με διαφορετική πηγή άνθρακα. (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη και ραφινόζη) (Randez-Gil et al 1995, Sanz et al 1994)
2. Επανάκαμψη μετά από συνθήκες έλλειψης αζώτου ή άνθρακα. (Randez-Gil et al 1995) (Randez-Gil et al 1995, Sanz et al 1994)

Περίληψη

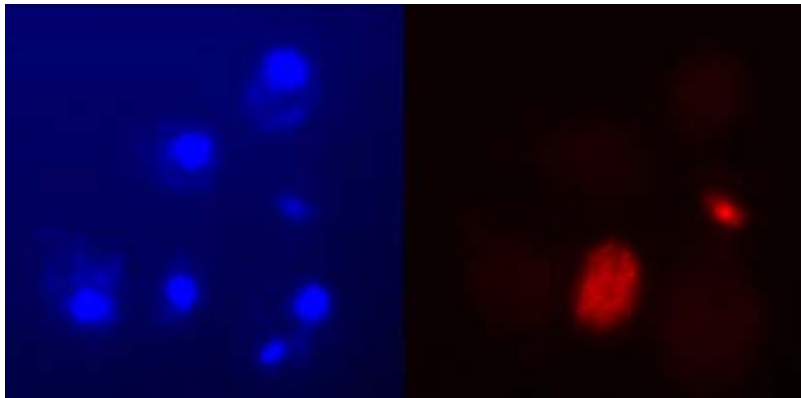
3. Διαδικασίες σύζευξης και σπορίωσης. (Randez-Gil et al 1995, Sanz et al 1994)
4. Συνθήκες οξειδωτικού και οσμωτικού stress. (Tsujimoto et al 2000)

Εντοπισμός των πρωτεϊνών Dog1p και Dog2p

Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο έχει μεγάλη σημασία για τον καθορισμό της λειτουργίας της. Για την Dog1p πρωτεΐνη δεν υπάρχει καμία πληροφορία για το που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο. Αντίθετα για την Dog2p πρωτεΐνη, όταν αυτή υπερεκφράζεται στο πλασμίδιο pYES/GS χιμαιρικά με το επίτοπο V5, όπως φαίνεται στη παρακάτω εικόνα, εδράζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και πυρηνικά (όπως φαίνεται στην εικόνα 20).



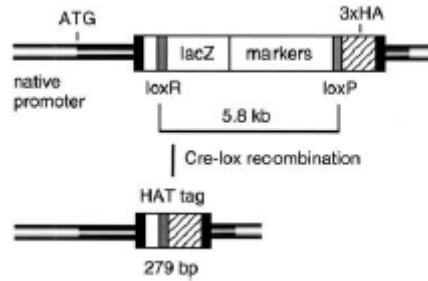
Εικόνα 19



Εικόνα 20

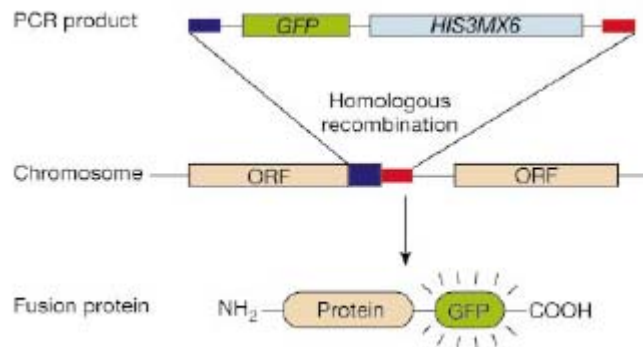
Αντίθετα όταν εκφράζεται χιμαιρικά, με τον επίτοπο 3XHA, στο γένωμα (στέλεχος Y800), όπως φαίνεται στην εικόνα 11, τότε εντοπίζεται μόνο κυτταροπλασματικά. (Kumar et al 2002)

Περίληψη



Εικόνα 21

Το ότι η πρωτεΐνη Dog2p είναι και πυρηνική επιβεβαιώνεται και από άλλη πηγή, όπου κάθε πρωτεΐνη εκφράζεται υβριδικά με GFP από τον ενδογενές υποκινητή. (Huh et al 2003)



Εικόνα 22

Ομολογίες με άλλες πρωτεΐνες του *Saccharomyces cerevisiae*

Η πρωτεΐνες Dog1p και Dog2p εμφανίζουν σημαντική ομολογία με τις παρακάτω πρωτεΐνες: (οι συγκρίσεις γίνονται βάση της αλληλουχίας της Dog2p):

Πίνακας 7

Όνομασία	Ταυτότητα	Ομολογία	Ρόλος
Dog1p (247aa)	89,5%	94,3%	2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase
HOR2 (251aa)	30,9%	43,1%	Δράση φωσφατάσης της glycerol-3-P (συμμετέχει στη βιοσύνθεση της γλυκερόλης, και στο οσμωτικό stress)
RHR2 (272 aa)	28,3%	40,6%	Δράση φωσφατάσης της glycerol-3-P (συμμετέχει στη βιοσύνθεση της γλυκερόλης, και στο οσμωτικό stress)

Περίληψη

PKH1* 5,2% 9% ser/thr protein kinases
(767aa) (συμμετέχει στο μονοπάτι για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και στην ενδοκύττωση)

* Η περιοχή από το αμινοξύ 364-624 της πρωτεΐνης PKH1 εμφανίζει με την πρωτεΐνη Dog2p ομολογία 26,4% (ταυτότητα 14,9%)

Ομολογίες με πρωτεΐνες άλλων οργανισμών

Πολλές φορές η ύπαρξη ομόλογων πρωτεϊνών σε άλλους οργανισμούς μπορεί να επιβεβαιώσει τη σημασία της πρωτεΐνης για τη ζωή του οργανισμού. Παρακάτω φαίνεται ένας πίνακας με ομόλογες πρωτεΐνες της Dog2p από άλλους οργανισμούς (Blast).

Πίνακας 8

Οργανισμός	Όνομα γονιδίου	Λειτουργία	Μήκος πρωτεΐνης	Ταυτότητα	Ομολογία
<i>C.albicans</i> cosmid Ca20C1	"Dog2p" "Ca20C1.01"	putative 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase	240	97/235 (41%)	123/235 (52%)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (strain C58, Cereon)	hypothetical protein AGR_L_3128		228	74/199 (37%)	101/199 (50%)
<i>Brucella suis</i> 1330 chromosome I section 75 of 190 of the complete genome	BR0861	hydrolase,haloacid dehalogenase-like family	227	76/207 (36%)	103/207 (49%)
<i>Brucella melitensis</i> (strain 16M)	glycerol-3-phosphatase 1 (EC 3.1.3.-)	glycerol-3-phosphatase 1	227	76/207 (36%)	103/207 (49%)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (strain 1021)	probable 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase protein (EC 3.1.3.-)		259	68/196 (34%)	99/196 (49%)
<i>Emericella nidulans</i>	gppA	glycerol-3-phosphatephosphatase	236	77/235 (32%)	110/235 (46%)
<i>R.meliloti</i>	ORF24		233	68/196 (34%)	99/196 (49%)
<i>Escherichia coli</i> (strain K-12)	hypothetical protein b2293		222	68/229 (29%)	Positives = 107/229 (46%)
<i>Escherichia coli</i> (strain O157:H7, substrain RIMD 0509952)	probable phosphatase		216	68/229 (29%)	107/229 (46%)
<i>Yersinia pestis</i> (strain CO92)	probable haloacid dehalogenase-like hydrolase (EC 3.1.3.-)		220	75/231 (32%)	110/231 (47%)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment 6/29	"SCO1560"; "SCL11.16c"	putative phosphatase	216	74/236 (31%)	109/236 (45%)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> (strain CT18)	probable phosphatase STY2564		225	64/228 (28%)	103/228 (45%)
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2, section 109 of 220 of the complete genome	yfbT	putative phosphatase	225	64/228 (28%)	103/228 (45%)

Περίληψη

Από τον παραπάνω πίνακα γίνεται φανερό, ότι τις μεγαλύτερες ομολογίες τις συναντάμε με πρωτεΐνες προκαρυωτικών οργανισμών.

Yol022c

Οι πληροφορίες που υπάρχουν για την πρωτεΐνη αυτή είναι ελάχιστες. Το γονίδιο *YOL022c* αποτελείται από 1.227 νουκλεοτίδια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 409 αμινοξέων μοριακού βάρους 45.990 Da. Ακόμα δεν είναι ξεκάθαρο αν ο φαινότυπος σε μετάλλαγμα *yol022cΔ* είναι βιώσιμος ή μη, ή απλά το μετάλλαγμα αυτό εμφανίζει μειωμένη ταχύτητα ανάπτυξης. Ο ρόλος του στο κύτταρο ή ο βιοχημικός του ρόλος είναι άγνωστος (www.yeastgenome.org).

Υλικά και μέθοδοι

***In vivo* συνανοσοκατακρήμιση**

Αρχικά οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύσσονται έως ότου η O.D.550 τους να φτάσει στο 1.0. Κατόπιν, οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται και στη συνέχεια πλένονται με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Σε επόμενη φάση επαναδιαλύονται σε 400λ IP buffer που περιέχει και αναστολείς πρωτεασών. Επόμενο βήμα είναι η προσθήκη γυάλινων σφαιριδίων (glass beads) ίσου όγκου και η πραγματοποίηση vortex 8 φορές για 10 sec με ενδιάμεση τοποθέτηση στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4⁰C για 20 min και κατόπιν λαμβάνεται το υπερκείμενο το οποίο χωρίζεται σε δύο ποσότητες. Τα μιν 10λ θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση τύπου Western, ενώ τα υπόλοιπα για την ανοσοκατακρήμιση.

Ακολούθως προστίθενται 5λ αντίσωμα anti - Myc και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 4⁰C σε rocker για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα προσθέτουμε protein A Sepharose (που έχει ήδη εξισορροπηθεί σε IP buffer w/o BSA, PMSF, NP40, DTT) για 4-5h στους 4⁰C. Μετά την πάροδο των 4h συλλέγονται τα beads (ανοσοσύμπλοκο) και πλένονται με IP buffer. Η πλύση (IP buffer w/o BSA, PMSF, NP40, DTT) διαρκεί 5 min, επαναλαμβάνεται τρεις φορές και πραγματοποιείται στους 4⁰C. Τέλος ακολουθεί επαναδιάλυση σε buffer και βράσιμο για 1 min. Τελικό βήμα είναι ο διαχωρισμός σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και η ανάλυση τύπου Western. (Current Protocol)

IP buffer

50mM Hepes pH 7,5

10mM MgAc

0,1% NP-40

75mM CH₃COOK

0,5mg/ml BSA

1mM DTT

20mM Glycerol phosphatase

1mM NaF

1x Leupeptin(1000x)

1mM PMSF (100mM) (αναστολέας πρωτεασών)

Υλικά και μέθοδοι

10% Glycerol

Εκχύλιση για ΕΜΟ (Ενεργές Μορφές Οξυγόνου)

Για εκχύλιση ΕΜΟ, τα κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκε, και φυγοκεντρήθηκε στις 2,500 rpm. Στην συνέχεια ελήφθη το υπερκείμενο (εξωκυττάριο υγρό) ενώ το ίζημα κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 100 mM Κ-φωσφορικό οξύ (pH 6.8) και ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια μικρών γυάλινων σφαιριδίων (Vortex 10 sec – Πάγο Χ 8) . Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 12,000 rpm στους 4 °C για 20 min. Για τον εσωτερικό έλεγχο του πρωτοκόλλου προστέθηκε στο διάλυμα εκχύλισης H₂O₂ γνωστής συγκέντρωσης

Προσδιορισμός H₂O₂

Η μέτρηση της συγκέντρωσης H₂O₂ τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά έγινε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης (luminl, Sigma, Munchen, Germany) όπως έχει ήδη περιγραφεί (Murphy & Huerta 1990).

i) Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης H₂O₂

Ο προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης H₂O₂ πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 ml, τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 690 μl διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 10 mM Tris pH 7,0, 1 mM CaCl₂ και 0,1 mM KCl), 100 μl από 1 mM φρέσκου διαλύματος λουμινόλης, 0,1 μονάδα υπεροξειδάσης σε 20 mM K₃PO₄ (pH 7,4) και 500 μl εκχύλισμα ΕΜΟ. Ο δοκιμαστικός σωλήνας σπινθηρισμού τοποθετήθηκε αμέσως σε μετρητή σπινθηρισμού (LS 8000, Beckman) και μετρήθηκε η χημειοφωταύγεια. Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 15 sec για 1 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη προκειμένου να συσχετιστούν οι τιμές της χημειοφωταύγειας (cpm) με την συγκέντρωση του H₂O₂ και επίσης χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες για κάθε περίπτωση.

ii) Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης H₂O₂

Ο προσδιορισμός της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης H₂O₂ πραγματοποιήθηκε κατά τα ίδια πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν 390 μl διαλύματος αντίδρασης και 500 μl υπερκείμενου από τις καλλιέργειες.

Προσδιορισμός O_2^-

Η παραγωγή του O_2^- ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά μελετήθηκε με την βιοδοκιμή της χημειοφωταύγειας της λουσιγενίνης (lucigenin, Sigma, Munchen, Germany), η οποία είναι ειδική για την ανίχνευση του O_2^- (Corbisier et al 1987).

i) Προσδιορισμός ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^-

Η μέτρηση ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^- πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 ml, τοποθετώντας σε δοκιμαστικό σωλήνα σπινθηρισμού τα ακόλουθα: 700 μl διαλύματος αντίδρασης (που περιείχε 0,1 M Glycine NaOH pH 9,0 και 1 mM EDTA), 100 μl από 1 mM διαλύματος λουσιγενίνης, και 500 μl εκχυλίσματος ΕΜΟ. Όλες οι άλλες συνθήκες, που περιγράφηκαν για την βιοδοκιμή του H_2O_2 ακολουθήθηκαν και στην περίπτωση του O_2^- . Οι κρούσεις μετρήθηκαν κάθε 6 sec για 0,5 min και οι δύο τελευταίες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.

ii) Προσδιορισμός εξωκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^-

Όπως και στην περίπτωση του H_2O_2 ο προσδιορισμός της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης O_2^- πραγματοποιήθηκε όπως για την ενδοκυτταρική συγκέντρωση με μόνη διαφορά, ότι χρησιμοποιήθηκαν 400 μl διαλύματος αντίδρασης και 500 μl.

Για όλες τις υπόλοιπες μικροβιολογικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα από το Current Protocol.

Αποτελέσματα

Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1p έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Dog2p, Yol022 και Rad9 με την μέθοδο των δυο υβριδίων (Voutsina, unpublished data). Μένει επομένως να επιβεβαιωθούν οι αλληλεπιδράσεις αυτές και με άλλες μεθόδους. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται η μέθοδος της *in vivo* συνανοσοκατακρήμνισης για τις 3 αυτές πρωτεΐνες. Κάθε πείραμα που περιγράφεται παρακάτω έχει επαναληφθεί τουλάχιστον 2 φορές.

***In vivo* συνανοσοκατακρήμνιση της Dog2p χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.**

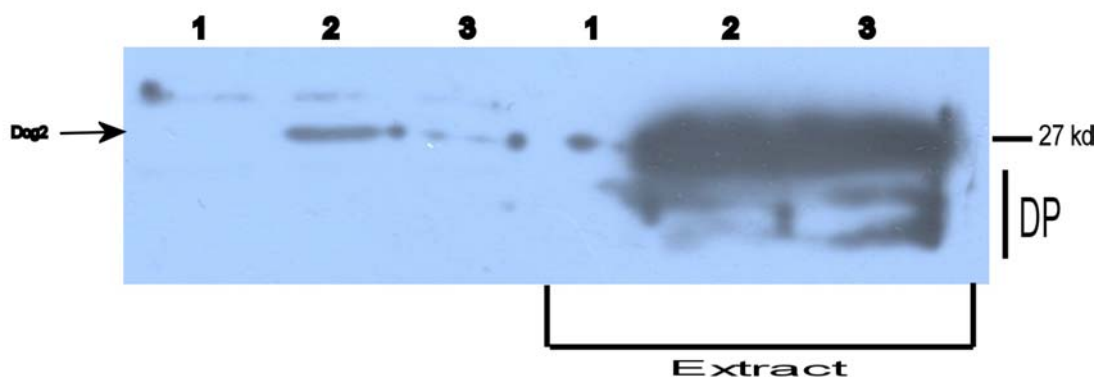
Η πρωτεΐνη Dog2p εκφράζεται υβριδικά με το επίτοπο Flag από το πλασμίδιο pDB20 (Διπλωματική, Καγιαμπάκης). Η έκφραση της υβριδικής αυτής πρωτεΐνης ελέγχεται από τον υποκινητή ADH1 (alcohol dehydrogenase I promoter), ο οποίος είναι συνεχώς ενεργός, οπότε η υβριδική πρωτεΐνη υπερεκφράζεται.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1p αντίθετα εκφράζεται από τον ενδογενή υποκινητή. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη Mac1p εκφράζεται υβριδικά με το επίτοπο Myc, 9 επαναλήψεις του επίτοπου αυτού, έχουν εισαχθεί στο γένωμα στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο *MAC1* (κατασκευάστηκε από την Βουτσινά Α.).

Για τη διαδικασία της συνανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BJ5457, μια και έχει μηδενικές μεταλλαγές σε δυο πρωτεύουσες. (*MATa ura3-52 trp1 lys2-801 his3[Delta]200 pep4::HIS3 prb1[Delta]1.6R can1 Gal +*), στου οποίου το γένωμα έχει εντεθεί 9 φορές το επίτοπο Myc, στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο Mac1p. Το στέλεχος μετασχηματίσθηκε με το πλασμίδιο pDB20 flag Dog2p. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό SC μέχρι $O.D._{550} = 1.0$.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:

Αποτελέσματα



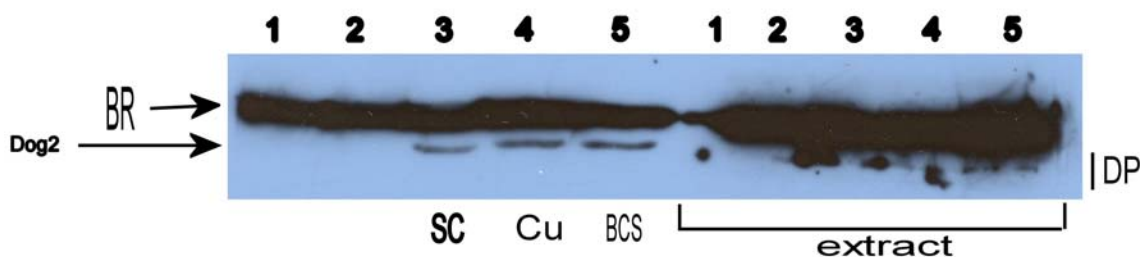
Εικόνα 23 Western blot με anti-flag. Τα δείγματα από το 1 έως το 3 στην αριστερή πλευρά της εικόνας έχουν συνανοσοκατακρημνισθεί. Η ποσότητα που φορτώθηκε σε κάθε ζώνη είναι η ίδια και οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του ίδιου όγκου και είχαν την ίδια $O.D._{550} \sim 1.0$ (~400ml καλλιέργειας). Παρόλο που εμφανίζονται κάποιες διαφορές στην ποσότητα του background όταν η μεμβράνη βαφτεί με ροζο μεταξύ του δείγματος 1 και 2, αυτό πιθανό να οφείλεται στο ότι στο δείγμα 1 δεν προστέθηκε anti Myc αντίσωμα για την συνανοσοκατακρήμνιση. Για την δέσμευση της Mac1p σε κολώνα σεφαρόζης χρησιμοποιήθηκε μονόκλωνο αντίσωμα anti-Myc. Τα δείγματα από το 4 έως το 6 (extract) περιέχουν ολικό εκχύλισμα κυτάρων. Έχει φορτωθεί ποσότητα εκχυλίσματος αντίστοιχης με 25 ml καλλιέργειας. Για την ανίχνευση της Dog2p χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-flag. (DP: προϊόντα διάσπασης της Dog2p, πυκνότητα αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12%. Όλα τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω ακολουθούν την ίδια λογική.)

- 1 - 4) BJ5457 *MAC1-9Myc* – ρDB20 *Flag*
- 2 - 5) BJ5457 *MAC1-9Myc* – ρDB20 *Flag-DOG2*
- 3 - 6) BJ5457 *MAC1* – ρDB20 *Flag-DOG2*

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η πρωτεΐνη Dog2p συνανοσοκατακρημνίζεται με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p (στήλη 2). Ακόμα φαίνεται ότι η πρωτεΐνη Dog2p έχει μικρή συνάφεια είτε με την κολώνα σεφαρόζης, είτε με το μονόκλωνο αντίσωμα anti-Myc (στήλη 3).

Έλεγχος αν η αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα Mac1p διατηρείται παρουσία και απουσία χαλκού.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1p αλλάζει στερεοδιαμόρφωση και γίνεται ανενεργός παρουσία χαλκού (Jensen & Winge 1998). Το γεγονός αυτό μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της πρωτεΐνης αυτής να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό επαναλήφθηκε το παραπάνω πείραμα συνανοσοκατακρήμνισης, τόσο σε συνθήκες παρουσίας, όσο και σε συνθήκες έλλειψης χαλκού. Η καλλιέργεια του στελέχους BJ5457 *MAC1-9Myc* που έχει μετασηματισθεί με το πλασμίδιο *pDB20 Flag -DOG2* αναπτύχθηκε 4 ώρες σε θρεπτικό μέσο SC, το οποίο περιείχε 10μM BCS (bathocuproine disulfonic acid), μια χημική ουσία που δεσμεύει το ιόντα χαλκού, μέχρι O.D. = 1. Παράλληλα το ίδιο μετασηματισμένο στέλεχος αναπτύχθηκε σε θρεπτικό SC και 20min πριν η O.D. γίνει περίπου ίση με 1.0 προστέθηκε στην καλλιέργεια CuSO_4 , ώστε η τελική συγκέντρωση του στο θρεπτικό να είναι 100μM. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 24 (Western blot με anti-flag. BR: Background που οφείλεται στο αντίσωμα anti-Myc, DP: Degradation products πιθανόν να οφείλεται στις πολύ μεγάλες ποσότητες που εκφράζεται η Dog2p. Πυκνότητα αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12%)

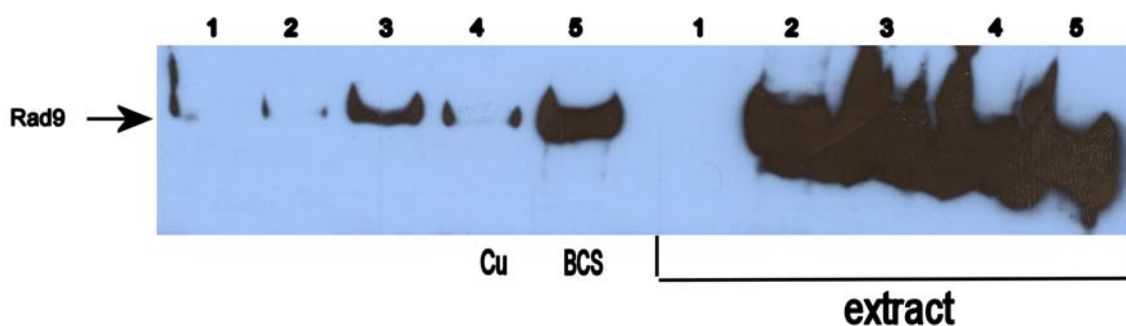
- 1) BJ5457 *MAC1-9Myc* – *pDB20 Flag SC* (περιέχει 0,25 μM CuSO_4)
- 2) BJ5457 *MAC1* – *pDB20 Flag -DOG2 SC*
- 3) BJ5457 *MAC1-9Myc* – *pDB20 Flag -DOG2 SC*
- 4) BJ5457 *MAC1-9Myc* – *pDB20 Flag -DOG2 100μM CuSO_4* (τελική συγκέντρωση) 20min
- 5) BJ5457 *MAC1-9Myc* – *pDB20 Flag -DOG2 10μM BCS 4 h*

Αποτελέσματα

Από το παραπάνω πείραμα διαπιστώνεται ότι η πρωτεΐνη Dog2p αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ιόντων χαλκού (στήλες 3, 4, 5).

***In vivo* συνανοσοκατακρήμνιση της Rad9p χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.**

Όπως στην περίπτωση της Dog2p, έτσι και στην περίπτωση της Rad9p χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BJ5457 *MAC1-9Myc*, μετασχηματισμένο αυτή τη φορά με το πλασμίδιο pDB20 *Flag-RAD9*. Εξετάστηκε η αλληλεπίδραση της Rad9p με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p, τόσο σε συνθήκες παρουσίας, όσο και απουσίας χαλκού. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 25 (Western blot με anti-flag. Πυκνότητα αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 6%. Rad9p: 148,396 Da)

- 1) BJ5457 *MAC1-9Myc* – pDB20 *Flag SC* (περιέχει 0,25 μM CuSO_4)
- 2) BJ5457 *MAC1* – pDB20 *Flag -RAD9 SC*
- 3) BJ5457 *MAC1-9Myc* – pDB20 *Flag -RAD9 SC*
- 4) BJ5457 *MAC1-9Myc* – pDB20 *Flag -RAD9* 100 μM CuSO_4 (τελική συγκέντρωση) 20min
- 5) BJ5457 *MAC1-9Myc* – pDB20 *Flag -RAD9* 10 μM BCS 4 h

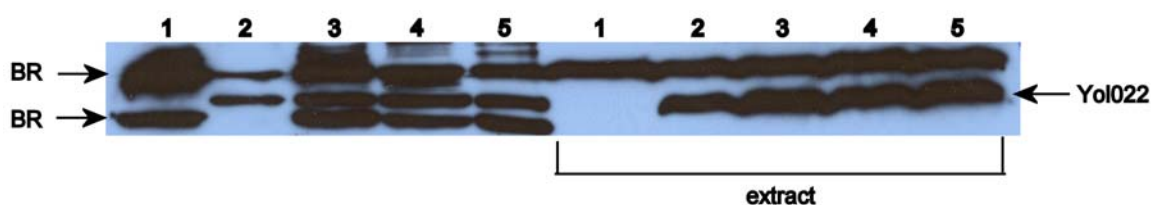
Από το παραπάνω πείραμα διαπιστώνεται ότι η πρωτεΐνη Rad9p αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p, όταν το μετασχηματισμένο στέλεχος αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο SC (στήλη 3) και όταν αναπτύσσεται στο ίδιο θρεπτικό μέσο αλλά απουσία χαλκού (στήλη 5). Αντίθετα οι δυο αυτές πρωτεΐνες δεν φαίνεται να

Αποτελέσματα

αλληλεπιδρούν παρουσία περίσσιας χαλκού, όπου και ο μεταγραφικός παράγοντας δεν βρίσκεται πάνω στο DNA (στήλη 4).

***In vivo* συνανοσοκατακρήμνιση της Yol022cp χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.**

Και στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για την πρωτεΐνη Dog2p και Rad9. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 26 (Western blot με anti-flag. Πυκνότητα αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12%. Yol022cp: 45,993 Da)

- 1) BJ5457 *MAC1-9Myc* – pDB20 *Flag* SC (περιέχει 0,25 μ M CuSO_4)
- 2) BJ5457 *MAC1* – pDB20 *Flag* - *YOL022c* SC
- 3) BJ5457 *MAC1-9Myc* – pDB20 *Flag* - *YOL022c* SC
- 4) BJ5457 *MAC1-9Myc* – pDB20 *Flag* -*YOL022c* 100 μ M (τελική συγκέντρωση) CuSO_4 20min
- 5) BJ5457 *MAC1-9Myc* - pDB20 *Flag* - *YOL022c* 10 μ M BCS 4 h

Η Yol022cp παρουσιάζει μεγάλη συνάφεια κυρίως με την κολώνα σεφαρόζης (στήλη 2), όπου και δεν έχει χρησιμοποιηθεί το anti - Myc αντίσωμα. Δεν μπορεί επομένως με αυτή την προσέγγιση να διαπιστωθεί αν η Yol022cp αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.

Πειράματα σταθερότητας και μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων της Mac1p.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1p φωσφορυλιώνεται και η φωσφορυλίωση αυτή παίζει ρόλο στην πρόσδεση του πάνω στο DNA. Μόνο η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης μπορεί να προσδεθεί σε αυτό. (Heredia et al 2001). Επίσης η πρωτεΐνη αυτή διασπάται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης χαλκού στο θρεπτικό μέσο (10 μ M) (Zhu et al 1998).

Τα παρακάτω πειράματα έγιναν με σκοπό 1) να διαπιστωθεί αν είναι δυνατή η ανίχνευση των δυο μορφών (φωσφορυλιωμένη και μη) της Mac1p, και 2) αν παρατηρείται καθόλου διάσπαση της πρωτεΐνης αυτής παρουσίας χαλκού.

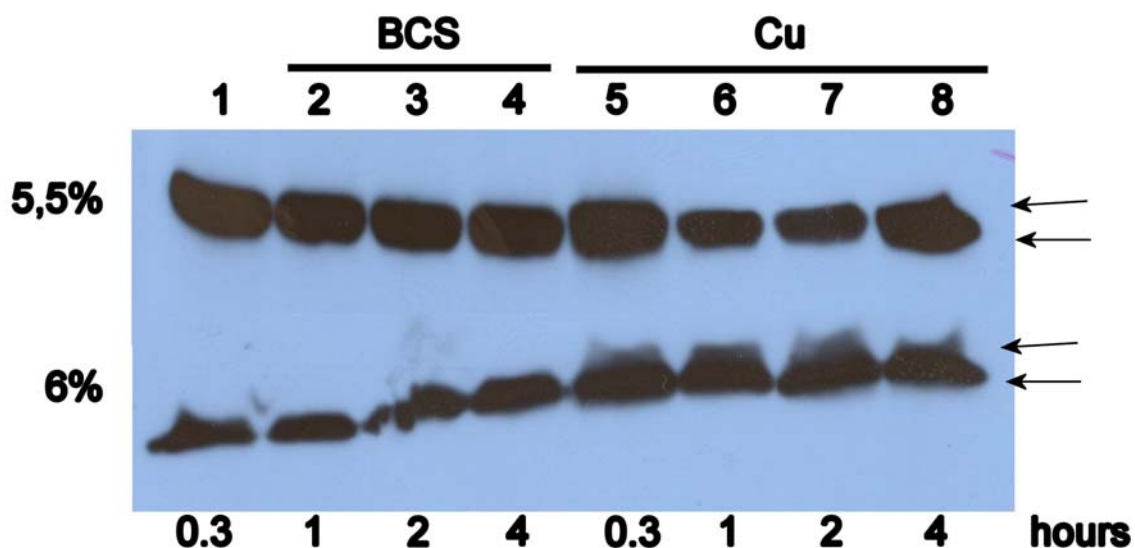
Πιο αναλυτικά πιθανόν τα αλληλεπιδρώντα της Mac1p να σχετίζονται με κάποια μεταμεταφραστική τροποποίηση της. Για να διαπιστωθεί αυτό θα πρέπει να μπορούν οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις να γίνουν «ορατές». Η Dog2p έχει χαρακτηριστεί ως φωσφατάση της ουσίας DOG και επομένως πιθανόν να σχετίζεται με αποφωσφορυλιώσεις, αλλά για να διαπιστωθεί αν αυτή η υπόθεση είναι αληθής θα πρέπει να μπορούν να διαχωριστούν οι δυο μορφές της Mac1p.

Όσο αφορά τη σταθερότητα του μεταγραφικού αυτού παράγοντα η προσθήκη ενός τόσο μεγάλου επιτόπου, όπως είναι 9 επαναλήψεις του επιτόπου Myc (EQKLISEEDL), μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες της πρωτεΐνης αυτής και είναι κάτι που πρέπει να διερευνηθεί, ώστε να διαπιστωθεί η ορθότητα των πειραμάτων.

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη BJ5457 και FT5 (*ura3, trp1, his3, leu2*). Και στα δυο αυτά στελέχη έχει εισαχθεί στο γένωμα τους και στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο *MAC1*, η αλληλουχία του επιτόπου Myc 9 φορές.

Αρχικά το ερώτημα που τέθηκε ήταν αν μπορούν να διαχωριστούν οι διάφορες μορφές του μεταγραφικού παράγοντα Mac1p σε διάφορες συνθήκες. Σύμφωνα με τα πειράματα του Heredia (Heredia et al 2001), όταν τα κύτταρα μεγαλώνουν σε θρεπτικό μέσο απουσία χαλκού, τότε μπορούμε να διακρίνουμε τις δυο μορφές του μεταγραφικού παράγοντα, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο αντίσωμα. Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι στα πειράματα του Heredia ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1p εκφράζεται από το πλασμίδιο pGPD και ο επιτόπος 3HA έχει εισαχθεί εσωτερικά στην πρωτεΐνη μεταξύ των αμινοξέων 222-223.

Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 27 (Western blot με anti-Myc. 5,5% και 6% είναι η πυκνότητα του πηκτώματος SDS – πολυακρυλαμίδης. Οι αριθμοί στη γραμμή hours αντιπροσωπεύουν το χρόνο στο οποίο η καλλιέργεια αναπτυσσόταν παρουσία BCS ή CuSO_4 . Η ποσότητα που φορτώθηκε σε κάθε ζώνη είναι η ίδια μια και οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του ίδιου όγκου και είχαν την ίδια $\text{O.D.}_{550} \sim 1.0$ (~100ml καλλιέργειας))

Εικόνα 28

- 1) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC
- 2) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC BCS 10 μM 1hour
- 3) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC BCS 10 μM 2 hours
- 4) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC BCS 10 μM 4 hours
- 5) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC CuSO_4 100 μM (τελική συγκέντρωση) 20 min
- 6) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC CuSO_4 100 μM (τελική συγκέντρωση) 1 hour
- 7) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC CuSO_4 100 μM (τελική συγκέντρωση) 2 hours
- 8) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC CuSO_4 100 μM (τελική συγκέντρωση) 4 hours

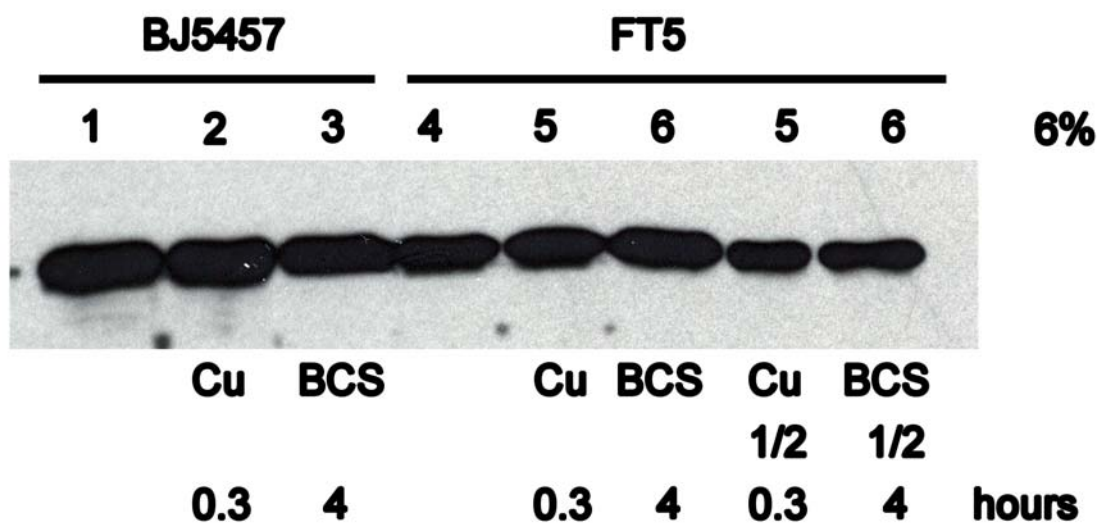
Από το παραπάνω πείραμα διαπιστώνουμε ότι στο στέλεχος BJ5457, η Mac1p με τον επίτοπο 9Myc είναι σταθερή, ανεξάρτητα αν το στέλεχος αναπτύχθηκε παρουσία ή απουσία ιόντων χαλκού. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα πειράματα του Zhu (Zhu et al 1998), σύμφωνα με τα οποία η Mac1p είχε διασπασθεί μετά από 15min από την προσθήκη 10 μM CuSO_4 (τελική συγκέντρωση) στο θρεπτικό μέσο (Στο πείραμα που πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιήθηκε 10X παραπάνω CuSO_4). Αξίζει στο σημείο

Αποτελέσματα

αυτό να αναφερθεί ότι στα πειράματα αυτά η Mac1p έχει σημανθεί με έναν επίτοπο HA που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (pRSMAc1(HA)).

Όσο αφορά τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις διαπιστώνεται ότι πιθανόν να υπάρχουν δυο ζώνες, αν και οι ζώνες αυτές δεν μπορούν να διαχωριστούν καλά ώστε να αποτελούν ισχυρή ένδειξη της ύπαρξης μεταμεταφραστικής τροποποίησης. Η ζώνη που αντιπροσωπεύει αυτή με το μικρότερο μοριακό βάρος φαίνεται να είναι σε περίσσεια (ζώνες 5, 6, 7, 8 στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 6%) σε σχέση με τη ζώνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Το αν αυτές οι ζώνες οφείλονται σε διαφορετικά ποσοστά φωσφορυλίωσης, άλλης μεταμεταφραστικής τροποποίησης, όπως π.χ. γλυκοζυλίωσης ή αποτελούν προϊόντα μερικής διάσπασης της πρωτεΐνης δεν μπορεί να εξαχθεί από το πείραμα αυτό. Γεγονός πάντως είναι ότι θα περίμενε κανείς απουσία χαλκού η ζώνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους να γίνεται εντονότερη και το αντίστροφο, πράγμα όμως που δεν παρατηρείται.

Το επόμενο πείραμα έγινε για να ελεγχθεί αν αυτές οι δυο ζώνες και η σταθερότητα που παρατηρείται στην Mac1p είναι χαρακτηριστική μόνο για το συγκεκριμένο στέλεχος ή είναι μια γενικότερη παρατήρηση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος FT5 *MAC1-9Myc* που έχει περιγραφή παραπάνω. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 29 (Western blot με anti-Myc. 6% είναι η πυκνότητα του πηκτώματος SDS – πολυακρυλαμίδης)

1) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC

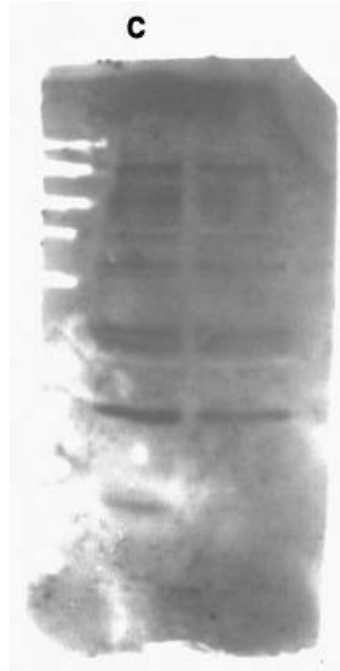
Αποτελέσματα

- 2) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC 100μM Cu (τελική συγκέντρωση) 20 min
- 3) BJ5457 *MAC1-9Myc* SC BCS 4 hours
- 4) FT5 *MAC1-9Myc* SC
- 5) FT5 *MAC1-9Myc* SC 100μM CuSO₄ (τελική συγκέντρωση) 20 min
- 6) FT5 *MAC1-9Myc* SC 10μM BCS 4 hours
- 7) FT5 *MAC1-9Myc* SC 100μM CuSO₄ (τελική συγκέντρωση) 20 min (1/2 της ποσότητας του 5)
- 8) FT5 *MAC1-9Myc* SC 10μM BCS 4 hours (1/2 της ποσότητας του 6)

Σύμφωνα με το παραπάνω πειράματα η Mac1p που εκφράζεται με τον επίτοπο 9Myc είναι σταθερή και στο στέλεχος FT5. Το αν και πως επηρεάζει η σταθερότητα της πρωτεΐνης την λειτουργικότητά της, δεν είναι εύκολο να ειπωθεί μια και η πρωτεΐνη αυτή είναι λειτουργική και μάλλον χαλκορυθμιζόμενη, όπως φαίνεται από πειράματα RNA για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *CTR1* παρουσία και απουσία ιόντων χαλκού. (Βουτσινά Α.) Επίσης και εδώ βλέπει κανείς διπλές ζώνες που πιθανόν να αντιστοιχούν με τις δυο μορφές της Mac1p.

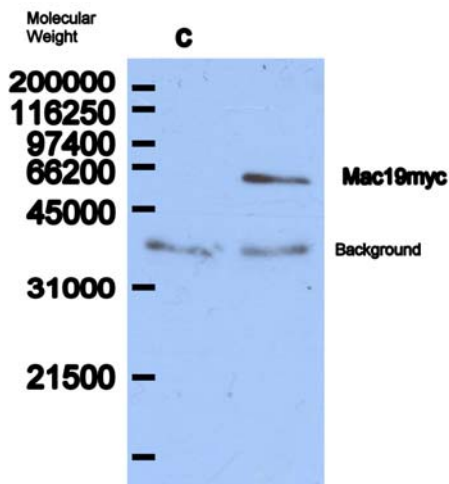
Όπως προαναφέρθηκε το παραπάνω πείραμα δεν μπορεί να επιβεβαιώσει αν αυτές οι δυο ζώνες, που φαίνονται κατά το διαχωρισμό της Mac1p στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στην εικόνα 29, οφείλονται σε φωσφορυλίωση της Mac1p ή σε κάποια άλλη αιτία βιολογική ή τεχνική. Για να διαπιστωθεί αν οι δυο ζώνες οφείλονται σε διαφορετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της φωσφοσερίνης (Mouse Monoclonal Anti-Phosphoserine, Sigma, Product Number: P-3430). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Prosite (<http://us.expasy.org/>) υπάρχουν τουλάχιστον 13 πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης θρεονίνης). Αντισώματα κατά της φωσφορυλιωμένης θρεονίνης και τυροσίνης δεν ήταν διαθέσιμα. Για την εκτέλεση του πειράματος αρχικά έγινε συνανοσοκατακρήμνιση της Mac1p με το πολύκλωνο αντίσωμα anti-Myc από ολικό εκχύλισμα κυττάρων στελέχους BJ5757 *MAC1-9Myc* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο SC μέχρι O.D.₅₅₀ ~ 1.0. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες που είχαν κατακρημνισθεί διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 6,5%. Για την ανίχνευση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της φωσφορυλιωμένης σερίνης σε αραιώση 1/500. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

Αποτελέσματα



Εικόνα 30 (Western blot με Anti-Phosphoserine. 6,5% είναι η πυκνότητα του πηκτώματος SDS – πολυακρυλαμίδης. Όπου c είναι το control BJ5457 και δίπλα του είχε φορτωθεί το δείγμα BJ5457 *MAC1-9Myc*)

Η ίδια μεμβράνη απουβριδοποιήθηκε και υβριδοποιήθηκε πάλι με το αντίσωμα anti-*Myc*, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι μέσα στις πρωτεΐνες που συνανοσοκατακρημνίσθηκαν βρισκόταν και η πρωτεΐνη *Mac1p*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 31 (c: control. Το θεωρητικό μοριακό βάρος της *Mac1p 9Myc* είναι 57309,98 Da)

Αποτελέσματα

Από τις εικόνες 30 και 31 συμπεραίνει κανείς ότι με την χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος δεν μπορεί να διαπιστωθεί αν η Mac1p είναι φωσφορυλιωμένη, μια και το δείγμα αναφοράς δεν διαφέρει καθόλου από το δείγμα που περιείχε την ανοσοκατακρημνισμένη Mac1p. Οι λόγοι που οδήγησαν στο συγκεκριμένο αποτέλεσμα είναι δυο 1) είτε το αντίσωμα δεν προσδένεται ειδικά στις φωσφορυλιωμένες σερίνες, αλλά προσδένεται μη ειδικά σε όλες τις πρωτεΐνες που έχουν συνανοσοκατακρημνιστεί με την πρωτεΐνη Mac1p, 2) είτε η Mac1p δεν υφίσταται φωσφορυλιώσεις σε σερίνες στις συνθήκες αυτές σε τέτοιο βαθμό, ώστε να είναι ανιχνεύσιμες με το συγκεκριμένο αντίσωμα οπότε βλέπουμε μόνο το background.

Ενας τρόπος για να απαντηθεί το ερώτημα αν η Dog2p σχετίζεται με την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα Mac1p αποτελεί η χρησιμοποίηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης ουρίας χωρίς SDS. Το πλεονέκτημα αυτού του τρόπου αντιμετώπισης είναι ότι η διακριτική ικανότητα εντοπισμού διαφορών στην φωσφορυλίωση είναι μεγαλύτερη. Πιο συγκεκριμένα το SDS καλύπτει την επιφάνεια της αποδιαταγμένης πρωτεΐνης δίνοντας της αρνητικό φορτίο. Έτσι σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάση του μοριακού βάρους τους. Αν η πρωτεΐνη είναι φωσφορυλιωμένη πιστεύεται ότι το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων, επηρεάζει την κατανομή των μορίων SDS στην επιφάνεια της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να επηρεαστεί και η κινητικότητα της στο πήκτωμα. Μια άλλη θεωρεία υποστηρίζει ότι οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες εμφανίζουν διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμίδης, επειδή δεν αποδιατάσσονται πλήρως λόγω δεσμών που σχηματίζουν οι φωσφορικές ομάδες. Στην περίπτωση της ουρίας το αποδιατακτικό δεν είναι το SDS αλλά η ουρία. Η πρωτεΐνη διαχωρίζεται στο πήκτωμα βάση του φορτίου της. Εδώ είναι σημαντικό ένα control όπου η Mac1p θα απομονώνεται από *E.coli*, ώστε να είναι αποφωσφορυλιωμένη και να μπορεί να εκτιμηθεί το ποσοστό φωσφορυλίωσης σε διάφορες συνθήκες παρουσίας ή απουσίας χαλκού.

Αναζήτηση φαινοτύπου.

Από τα παραπάνω έγινε αντιληπτό ότι τουλάχιστον οι Dog2p και Rad9p αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p. Ωστόσο το επόμενο ερώτημα είναι ποίος ο βιολογικός ρόλος αυτών των αλληλεπιδράσεων. Σε αυτή την μελέτη δεν αναφέρεται η Rad9p (Master: Καλλιόπη Γκούσκου). Η αρχική υπόθεση είναι ότι και αυτές οι πρωτεΐνες σχετίζονται με κάποιο τρόπο με την ομοϊόσταση του χαλκού επηρεάζοντας

Αποτελέσματα

την δράση της Mac1p. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η συσσώρευση *CTR1* mRNA, το οποίο ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.

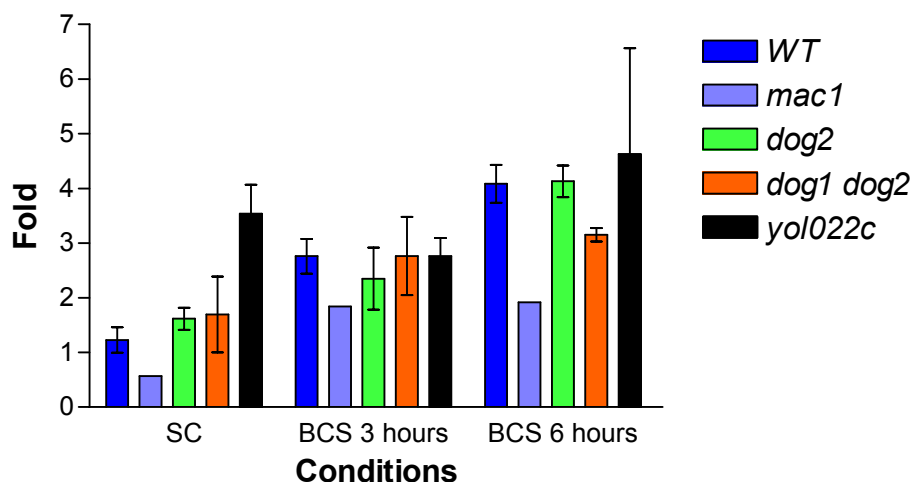
Οι συνθήκες και τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο παρακάτω πίνακα

Στελέχη	Συνθήκες
RHII68	SC
RHII68	BCS 3h
RHII68	BCS 6h
RHII68 <i>dog2::KANMX4</i>	SC
RHII68 <i>dog2::KANMX4</i>	BCS 3h
RHII68 <i>dog2::KANMX4</i>	BCS 5h
RHII68 <i>dog1 - dog2::KANMX4</i>	SC
RHII68 <i>dog1 - dog2::KANMX4</i>	BCS 3h
RHII68 <i>dog1 - dog2::KANMX4</i>	BCS 5h
RHII68 <i>yol022c::KANMX4</i>	SC
RHII68 <i>yol022c::KANMX4</i>	BCS 3h
RHII68 <i>yol022c::KANMX4</i>	BCS 5h
RHII68 <i>mac1::URA3</i>	SC
RHII68 <i>mac1::URA3</i>	BCS 3h
RHII68 <i>mac1::URA3</i>	BCS 6h

Πίνακας 9

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων RNA όπως ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια του PhosphorImager και ImageQuant παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

Διάγραμμα μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου *CTR1* κανονικοποιημένο βάση της έκφρασης του γονιδίου *CMD1*



Εικόνα 32 Northern Analysis (10mM BCS)

Από το παραπάνω πείραμα συμπεραίνουμε ότι η έκφραση του γονιδίου *CTR1* σε συνθήκες απουσίας χαλκού, δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της *Dog2p*, αλλά ούτε και από την έλλειψη των *Dog1p* και *Dog2p* μαζί. Στην περίπτωση της συνθήκης BCS 6 hours στο διπλό μετάλλαγμα *dog1Δ dog2Δ* παρατηρείται πτώση της έκφρασης του *CTR1* κατά 1 μονάδα σε σχέση με τον άγριο τύπο (control), δεν μπορεί όμως να εκτιμηθεί αν η διάφορα αυτή είναι σημαντική ή όχι. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι το πείραμα για την έκφραση του *CTR1* στο στέλεχος *mac1Δ* έγινε μόνο μια φορά για πρακτικούς λόγους και η έκφραση του είναι σαφώς μεγαλύτερη από την αναμενόμενη. Ωστόσο το μικρό standard error των άλλων μετρήσεων δείχνει ότι μπορούμε να εμπιστευτούμε τις άλλες μετρήσεις.

Το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί με την παραδοχή ότι δεν σχετίζεται η δράση των πρωτεϊνών *Dog* με την ομοιοστάση του χαλκού, ωστόσο υπάρχουν και άλλες πιθανές εκδοχές. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο SC, το οποίο περιέχει γλυκόζη. Έχει αναφερθεί ότι το γονίδιο *DOG2* καταστέλλεται από γλυκόζη (Tsujiimoto et al 2000). Και εδώ όμως υπάρχει και άλλη παράμετρος. Υπάρχουν στελέχη που δείχνουν ανθεκτικότητα στην ουσία *DOG* (Sanz et al 1994), (Τα στελέχη άγριου τύπου δεν παρουσιάζουν αυτήν την ανθεκτικότητα) γεγονός που σημαίνει ότι το γονίδιο *DOG2* υπερεκφράζεται ανεξάρτητα από το θρεπτικό στο οποίο αναπτυσσόταν. Θα πρέπει επομένως να ελεγχθεί αν τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι ανθεκτικά

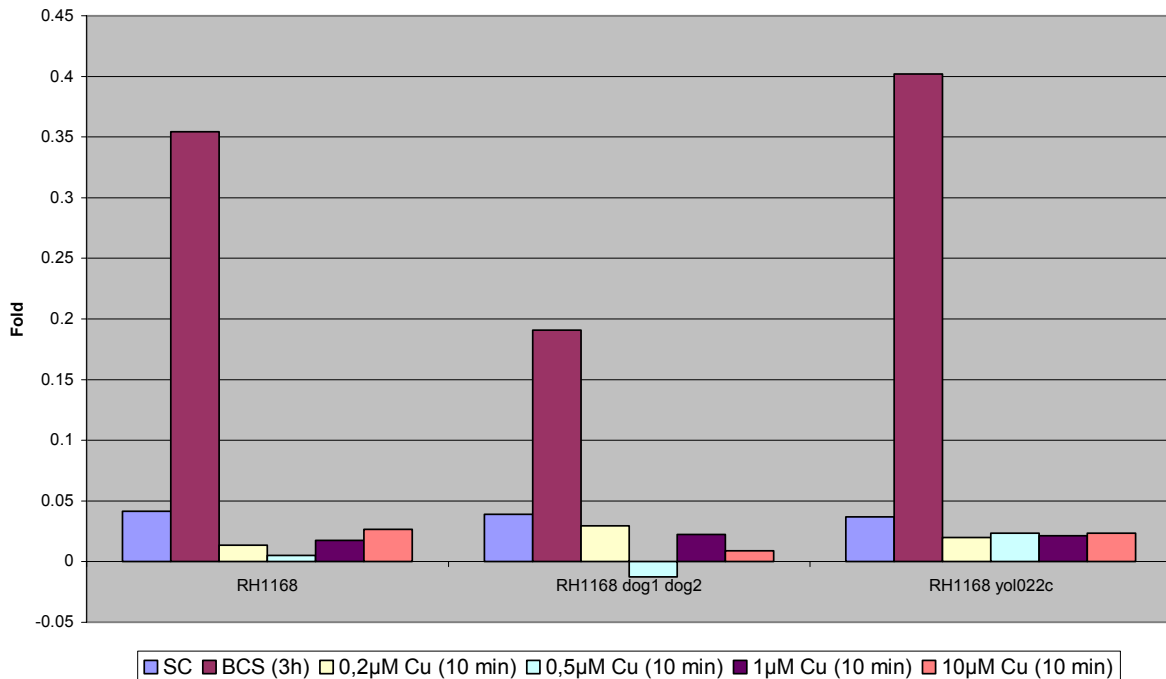
Αποτελέσματα

ή όχι στην ουσία DOG. Αν δεν είναι ανθεκτικά τότε το πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας ΥΡ, δηλαδή θρεπτικό το οποίο να μην περιέχει γλυκόζη (Υποθέτει κανείς ότι το πείραμα απέτυχε, γιατί στα control η έκφραση του γονιδίου *DOG2* είναι πολύ χαμηλή). Αν τα στελέχη είναι ανθεκτικά, τότε είναι μάλλον βέβαιο ότι οι *Dog1p* και *Dog2p* δεν συμμετέχουν στην λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα *Mac1p* τουλάχιστον με ένα επικρατή τρόπο, όσο αφορά την ρύθμιση του γονιδίου *CTR1* απουσία χαλκού.

Κάνοντας μια αναφορά στην *Yol022cp*, φαίνεται ότι απουσία της πρωτεΐνης αυτής επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου *CTR1* σε συνθήκες SC και μάλιστα πρέπει να δρα ως καταστολέας της έκφρασης του *CTR1* στις συνθήκες αυτές. Δυστυχώς για το λόγο ότι δεν έχει επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση της *Yol022cp* με το μεταγραφικό παράγοντα *Mac1p*, δεν μπορεί να εξαχθεί κανένα συμπέρασμα για το ρόλο της *Yol022cp*.

Επιστρέφοντας στο θέμα της *Dog2p*, έχει δειχθεί από τα πειράματα της *in vivo* συνανοσοκατακρίμνησης, ότι η *Dog2p* αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα *Mac1p* και σε συνθήκες παρουσίας χαλκού στο θρεπτικό μέσο. Επομένως πιθανόν η πρωτεΐνη να έχει κάποιο ρόλο π.χ. στην αποδεύσμεση του μεταγραφικού παράγοντα από το DNA. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται πείραμα RNA χρησιμοποιώντας τα ίδια στελέχη που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακα 7) αλλά σε συνθήκες παρουσίας χαλκού. Ουσιαστικά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού στον ίδιο χρονικό διάστημα (10min). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.

Διάγραμμα μεταβολής της μεταγραφής του *FRE1* (κανονικοποιημένο με *CMD1*) σε συνάρτηση με ποσότητες Cu στην καλλιέργεια.



Εικόνα 33

Στο πείραμα αυτό μετρήθηκε η μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *FRE1* (το ίδιο πείραμα με μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *CTR1* απέτυχε). Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι ο μηχανισμός απόκρισης στο χαλκό είναι πολύ ευαίσθητος και φυσικά πάρα πολύ γρήγορος. Είναι επομένως ιδιαίτερα δύσκολο να μπορέσουμε να μελετήσουμε το ρόλο της *Dog2p*, σε συνθήκες χαλκού, μετρώντας τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *FRE1* (και πολύ πιθανό και του γονιδίου *CTR1*).

Παραρτημα: Κατασκευή στελεχών για τη δημιουργία του διπλού μεταλλάγματος *dog1 - dog2Δ :: KanMX4*

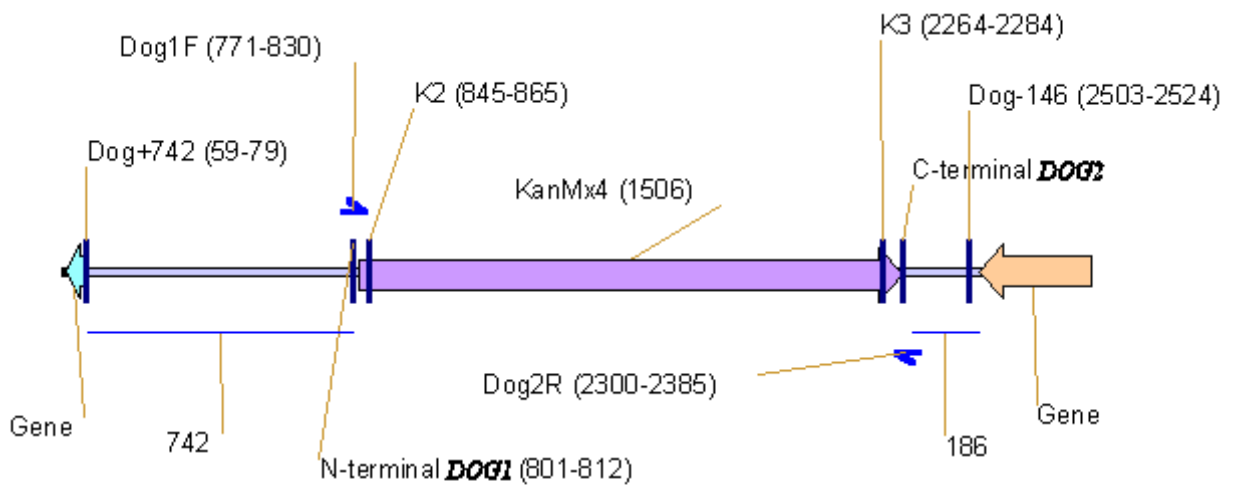
Για τη δημιουργία διπλών μεταλλαγμάτων *DOG1* και *DOG2* χρησιμοποιήθηκε η δυνατότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού. Έτσι, σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι εμφανίζουν ομολογία με περιοχές του γενωμικού DNA.

Αποτελέσματα

DogF	TTGCCACTCACGTAAGAAGTTCAAAGGATAatggcagaatttCGTACGCTGCA GGTCGAC
Dog R	TCTGCGATGTCCTTATTTATtaatctctcgtaaagggtATCGATGAATTCGAGCT CG

Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η αλληλουχία, οι οποία είναι ομόλογη με την 5' με μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *DOG1*, όσον αφορά το DogF, και με την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του *DOG2* για τον εκκινητή DogR. Η κόκκινη περιοχή αντιστοιχεί με την κωδική αλληλουχία μέσα στο γονίδιο *DOG1* για τον πρώτο εκκινητή, και *DOG2* για τον δεύτερο εκκινητή. Με μαύρο χρώμα συμβολίζεται η αλληλουχία η οποία είναι ομόλογη με την αρχή και το τέλος της κασέτας της καναμυκίνης. Η παραπάνω επιλογή έγινε, γιατί υπήρχαν ομοιότητες των μη μεταφραζόμενων περιοχών των συγκεκριμένων γονιδίων με άλλες περιοχές στο γένωμα. Με τον τρόπο αυτό θα εμποδιστεί ο τυχαίος ανασυνδυασμός των υποκινητών αυτών στο γένωμα.

Για την επιβεβαίωση των στελεχών με την διπλή μεταλλαγή χρησιμοποιήθηκε PCR. Όλοι οι διαθέσιμοι εκκινητές για την συγκεκριμένη περιοχή φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:

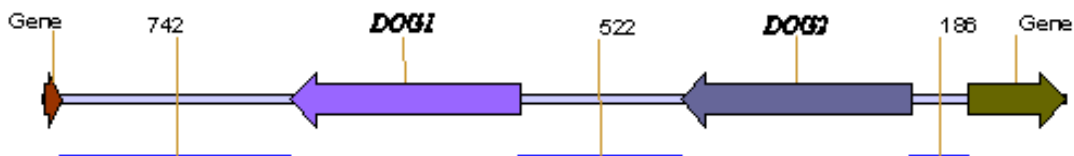


*DOG1*Δ and *DOG2*Δ with KanMx4

2838 bp

Εικόνα 34

Αποτελέσματα



DOG1(742) and DOG2(522) with upstream region (Chromosome VIII)

3304 bp

Εικόνα 35 (Η γενωμική περιοχή για τα γονίδια *DOG1 DOG2*)

K2 (R)	acagatctggcgcgccttaat
K3 (F)	cgattcgataactaacgccgcc
Dog-186 (R)	TGCTCATCAACTTTTGCCGCT
Dog2p+742 (F)	TCAGCCCACTGATCAAGCCTTC

Πίνακας 10 (Οι αλληλουχίες των εκκινητών)

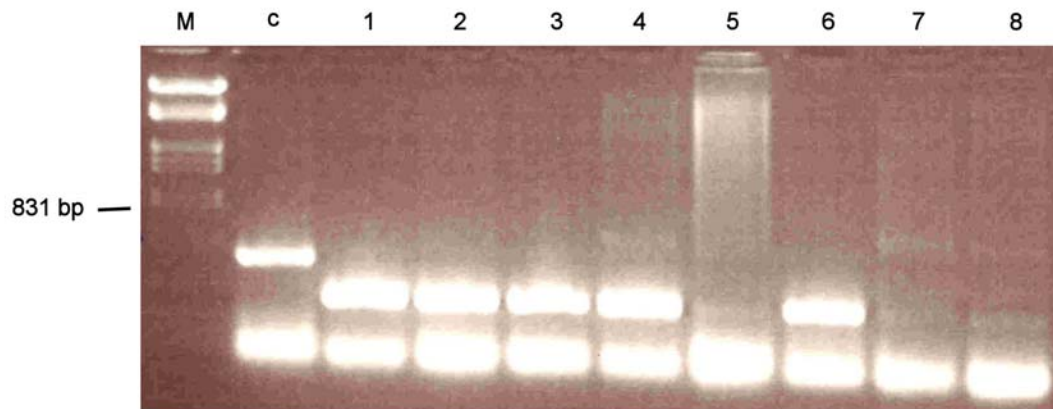
Για τον συνδυασμό των εκκινητών K2, K3 και Dog – 146 το T_m είναι 55°C και ο χρόνος δράσης της πολυμεράσης είναι 30 sec. Το αναμενόμενο αποτελέσματα για ένα στέλεχος με το διπλό μετάλλαγμα *dog1 dog2 Δ* είναι 260bp, ενώ για ένα στέλεχος με το απλό μετάλλαγμα *dog2Δ* το αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι 500bp.

Για το συνδυασμό των εκκινητών DOGF, DOG-146 το T_m είναι 56°C και ο χρόνος δράσης της πολυμεράσης 90 sec. Το αναμενόμενο αποτελέσματα για ένα στέλεχος με το διπλό μετάλλαγμα *dog1 dog2 Δ* είναι 1700bp .

Ο εκκινητής Dog2 + 742 δεν είναι λειτουργικός.

Για την περίπτωση του στελέχους RH168 τα αποτελέσματα του PCR με εκκινητές K2, K3, Dog-186 (R) φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

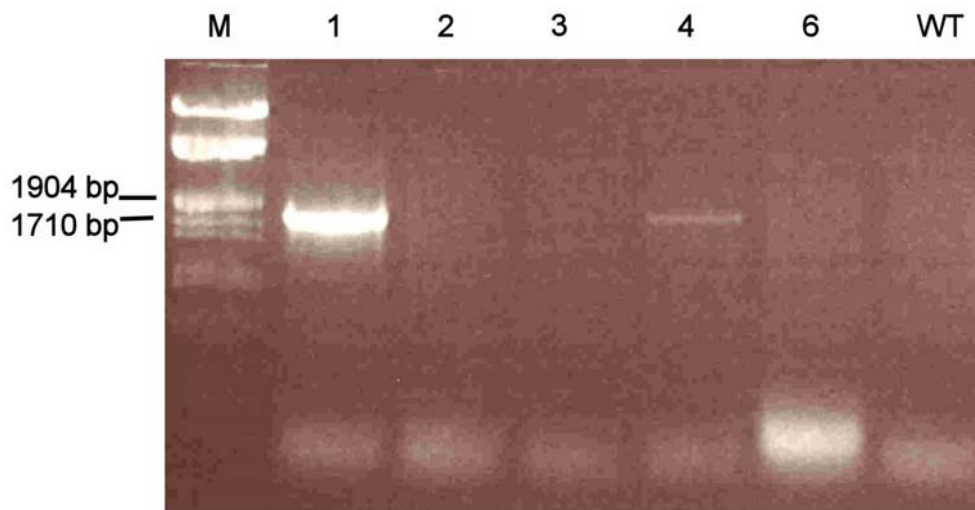
Αποτελέσματα



Εικόνα 36

Όπου M είναι ο marker, c είναι το control (RHII68 *dog2Δ::KanMX4*), και από 1 ως 8 τα δείγματα. Τα στελέχη 1 ως 4 και το 6 έχουν την διπλή μεταλλαγή *dog1 dog2 Δ*.

Χρησιμοποιώντας το ζευγάρι των εκκινητων DOGF, DOG-146 έγινε PCR με γενωμικό DNA από τα θετικά στελέχη του προηγούμενου πειράματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

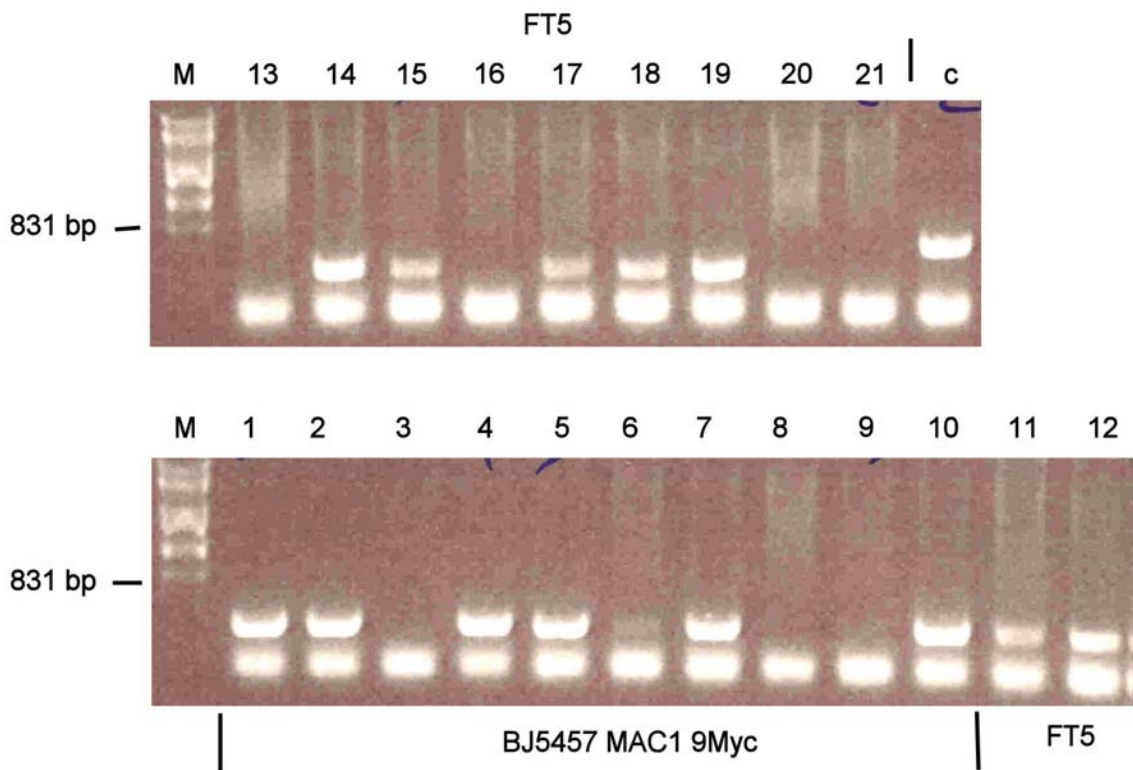


Εικόνα 37

Οι αποικίες 1 και 4 θεωρούνται θετικές.

Αποτελέσματα

Για τα στελέχη BJ5457 MAC1 9Myc πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία με εκκινητές K2, K3, Dog-186 (R). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 38

Από το 1 ως το 10 είναι τα στελέχη BJ5457 *MAC1-9Myc*, ενώ από 11 ως 21 είναι τα στελέχη FT5. Το c είναι το control (RH1168 *dog2Δ::KanMX4*). Τα στελέχη που έχουν αφαίρεση γονιδίων *DOG1 DOG2* είναι 1,2,4,5,7, 10 από το BJ5457 και 11, 12,14, 15, 17-19 από το FT5.

Αναζήτηση φαινοτύπου με γενετικό τρόπο

Μια και οι προσπάθειες για την εύρεση φαινοτύπου στηριζόμενη στην μέτρηση της έκφρασης του *CTR1* και *FRE1*, στις συγκεκριμένες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω, δεν έδωσαν καμία πληροφορία για το ρόλο που παίζει η αλληλεπίδραση της Dog2p με το μεταγραφικό παράγοντα Mac1p (εκτός από το ότι δεν παίζει ρόλο ή δεν μπορούμε να τον δούμε με αυτήν την προσέγγιση) χρησιμοποιήθηκε ένας γενετικός τρόπος για να δειχθεί πιθανή συσχέτιση των Dog1p, Dog2p με το μεταβολισμό του χαλκού. Η υπόθεση είναι απλή και στηρίζεται στο γεγονός ότι αν οι πρωτεΐνες Dog

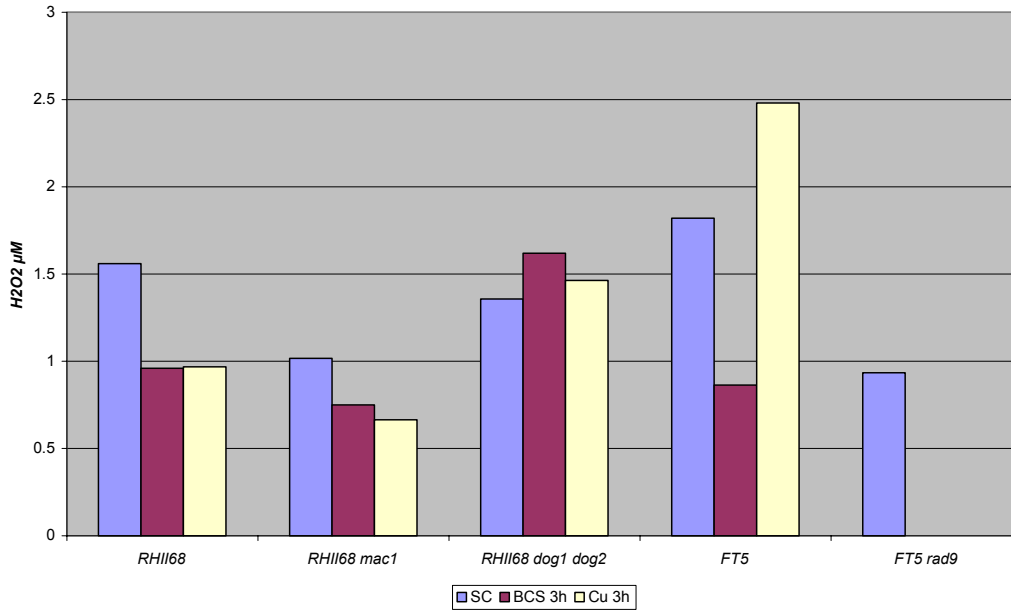
Αποτελέσματα

σχετίζονται με κάποιο τρόπο, έμμεσο ή άμεσο, με το μεταβολισμό του χαλκού, τότε έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών θα επηρεάζει το ποσοστό των ελευθέρων ριζών μέσα στο κύτταρο. Η υπόθεση αυτή έχει δυο πλεονεκτήματα. Το πρώτο είναι ότι έχει παρατηρηθεί σε πειράματα microarray ότι σε αυξημένο H_2O_2 αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου *DOG2* (Γενικά το γονίδιο *DOG2* βάση περαμάτων DNA microarray έκφρασης κατατάσσεται στα stress response gene). Οπότε ο ρόλος της Dog2p, εφόσον σχετίζεται με stress από χαλκό και είναι επικρατής θα γίνει αντιληπτή σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού. Το δεύτερο θετικό σημείο είναι ότι η όλη διαδικασία δεν μετρίεται με την βοήθεια της έκφρασης των γονιδίων *CTR1* ή *FRE1*, των οποίων η κινητική είναι ταχύτερη όταν εκτεθούν σε χαλκό (Είναι μάλλον απίθανο σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα το κύτταρο να έχει υποστεί stress από την παρουσία χαλκού.) Φυσικά τα αρνητικά σημεία της υπόθεσης αυτής είναι περισσότερα. Το πρώτο είναι ότι δεν γνωρίζουμε σε πια συγκέντρωση χαλκού στα κύτταρα μας παρατηρείται σχηματισμός ελευθέρων ριζών στο κύτταρο και δεύτερο και πιο σημαντικό είναι ότι απαιτείται μια ευθεία συσχέτιση της ποσότητας του χαλκού και της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Σε γενικές γραμμές το προσδοκώμενο αποτέλεσμα είναι ότι σε έλλειψη των Dog1p Dog2p, η ποσότητα των ελευθέρων ριζών θα είναι μεγαλύτερη μια και με κάποιο τρόπο οι πρωτεΐνες αυτές προστατεύουν από την τοξικότητα του χαλκού (stress response). Φυσικά το ερώτημα παραμένει πως εφόσον ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1p, ο οποίος έχει αναφερθεί να καταστρέφεται ως απάντηση σε αυξημένη ποσότητα χαλκού (Zhu et al 1998), αλληλεπιδρά με την Dog2p σε πραγματικές συνθήκες. Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα πιθανόν να είναι ότι η αλληλεπίδραση να διαρκεί μέχρι να διασπαστεί ο μεταγραφικός παράγοντας και μέχρι τότε η πρωτεΐνη Dog2p να έχει πραγματοποιήσει το ρόλο της. Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε το πείραμα μέτρησης των ριζών υπεροξειδίου περιγράφεται αναλυτικά στα «υλικά και μέθοδοι».

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.

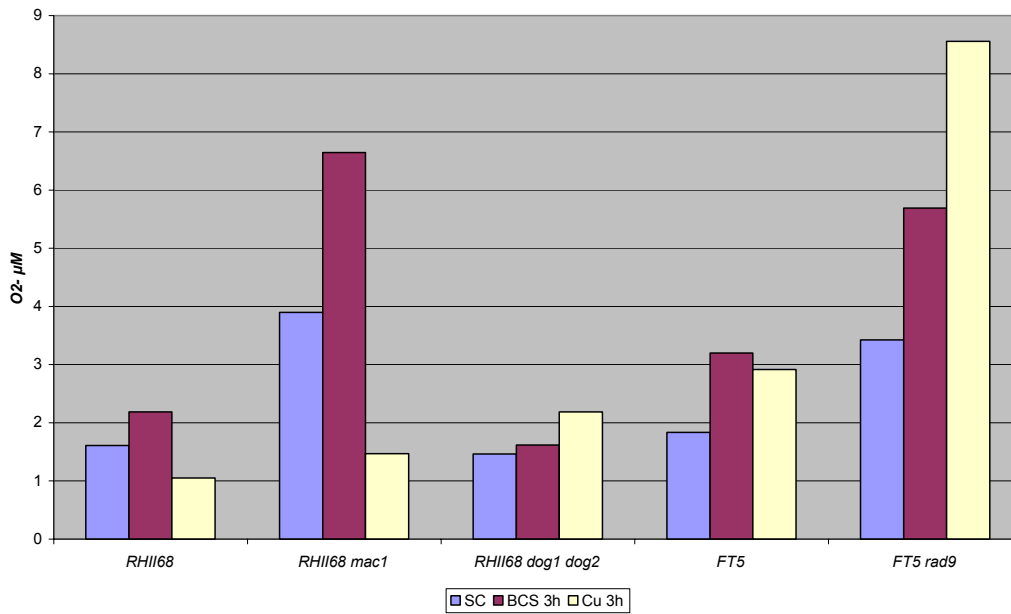
Αποτελέσματα

Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου μέσα στα διαφορετικά στελέχη σε συνάρτηση με τις συνθήκες.



Εικόνα 39 (10μM BCS, 100μM CuSO₄)

Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης των ριζών οξυγόνου μέσα στα διαφορετικά στελέχη σε συνάρτηση με τις συνθήκες.



Εικόνα 40 (10μM BCS, 100μM CuSO₄)

Αποτελέσματα

Στο πρώτο διάγραμμα (εικόνα 39) που αφορά τη συγκέντρωση H_2O_2 , οι τιμές για το στέλεχος FT5 *rad9Δ* δεν υπάρχουν στο διάγραμμα για το λόγο ότι οι τιμές αυτές είναι κάτω από το control (το διάλυμα με το οποίο διαλύσαμε τα κύτταρα). Αξίζει όμως στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι το ποσοστό των κυττάρων που περιέχεται στα δείγματα αυτά είναι ~4 φορές κάτω από τα κύτταρα που περιέχονται στα άλλα δείγματα. Έτσι θεωρείται ότι απλά οι τιμές αυτές δεν προσδιορίζονται. (Αν γίνει κανονικοποίηση των τιμών των κυττάρων, τότε η συγκέντρωση H_2O_2 στα δείγματα αυτά είναι μεγάλη από τα αντίστοιχα RH1168 στελέχη, αλλά αυτό θα μεγάλωνε πιθανό σφάλμα των τιμών.).

Επίσης όλες οι τιμές για την συγκέντρωση O_2^- που μετρήθηκαν για το θρεπτικό, (εξωκυττάρια ουσία) στο οποίο μεγάλωναν τα κύτταρα, (η υπόθεση είναι ότι οι ελεύθερες ρίζες αποβάλλονται από το κύτταρο στο εξωκυττάριο χώρο) είναι ίσες ή μικρότερες από το control (το διάλυμα με το οποίο διαλύσαμε τα κύτταρα).

Από το παραπάνω πείραμα δεν μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα μια και πραγματοποιήθηκε μόνο μια φορά. Απλά η τάση που φαίνεται είναι ότι τα όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν δεν έχουν μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση H_2O_2 στις διαφορετικές συνθήκες. Όσο αφορά την συγκέντρωση O_2^- , το οποίο είναι και πιο σταθερό, φαίνεται ότι το στέλεχος FT5 *rad9Δ* παρουσιάζει αυξημένη συγκέντρωση O_2^- σε όλες τις συνθήκες και κυρίως παρουσία χαλκού. Επίσης διαπιστώνεται ότι και το στέλεχος RH1168 *mac1* είναι ευαίσθητο σε BCS. Αντίθετα το διπλό μετάλλαγμα RH1168 *dog1 dog2Δ* δεν εμφανίζει τόσο έντονες διαφορές με το στέλεχος αγρίου τύπου. Πρέπει επομένως να γίνουν και άλλα αντίστοιχα πειράματα για να υπολογιστεί το standard error των μετρήσεων.

Confocal Microscopy

Μια και ούτε με τον τρόπο αυτό βρέθηκε μια «καθαρή» συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων *DOG1* και *DOG2* με το χαλκό, το ερώτημα που τέθηκε είναι αν το πείραμα της συνανοσοκατακρήμνησης είναι ψευδές, με την έννοια ότι βλέπουμε τις Dog2p και Mac1p να αλληλεπιδρούν, αλλά στην πραγματικότητα δεν βρίσκονται ποτέ μαζί στο ίδιο κυτταρικό διαμέρισμα (η ιδέα αυτή έρχεται από το γεγονός ότι η Dog2p αποφωσφορυλιώνει την ουσία DOG οι οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα). Η πειραματική διαδικασία της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού περιγράφεται αναλυτικά από την Δελή Αλεξάνδρα (Αναφορά ροτάτιον). Δυστυχώς το πείραμα δεν μπόρεσε ποτέ να

Αποτελέσματα

επιβεβαιωθεί μια και η πρωτεΐνη Dog2p φαίνεται να βρίσκεται παντού αλλά και το ίδιο φαίνεται και η Mac1p, οι οποία έπρεπε να είναι πυρηνική. Βέβαια στο σημείο αυτό σταθήκαμε τυχεροί μια και η πληροφορία έρχεται από την δημοσίευση Huh WK, *et al.* (2003), όπου η Dog2p εκφράζεται από το ενδογενές υποκινητή με 2 διαφορετικούς επίτοπους στο καρβοξυτελικό άκρο. Στα πειράματα αυτά η Dog2p είναι και πυρηνική, οπότε είναι δυνατόν να αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα Mac1p *in vivo*.

Κατασκευή πλασμιδίου pYX142 – DOG2 για πειράματα ChIP.

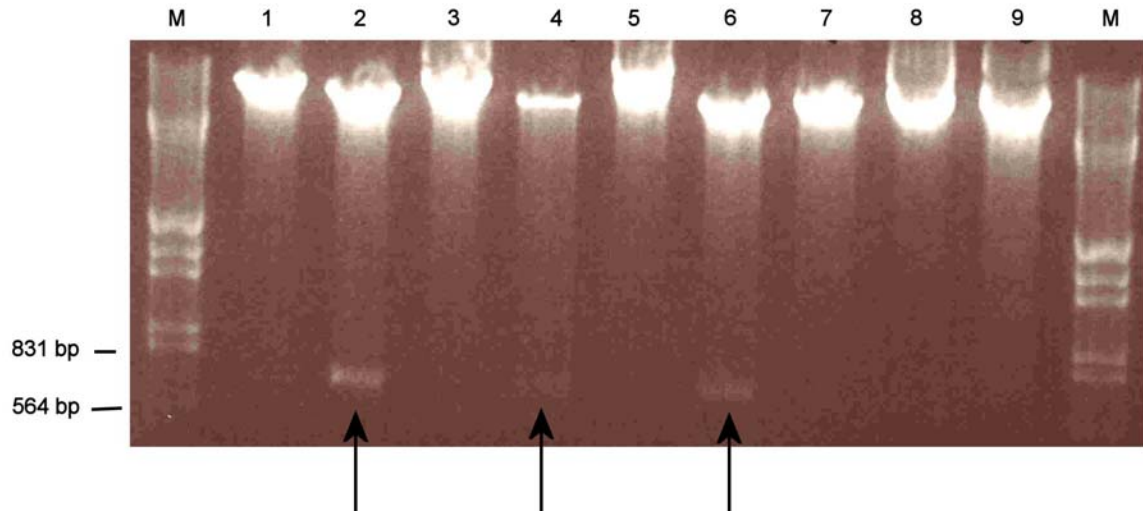
Το πείραμα ChIP που για το οποίο κατασκευάστηκε αυτό το πλασμίδιο είναι επιβεβαιωτικό, μια και ουσιαστικά επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση των δυο αυτών πρωτεϊνών με έναν ακόμα τρόπο. Ακόμα δίνει πληροφορία για το αν η στρατολόγηση της Dog2p στο υποκινητή του *CTR1* εξαρτάται ή όχι από την Mac1p. Ένα άλλο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί, είναι για τον πιθανό ρόλο της Dog2p μια και θα περιμένει κανείς να δρα μέσα στον πυρήνα και όχι π.χ. στο κυτταρόπλασμα στην αποδόμηση της Mac1p. Αν το πείραμα είναι αρνητικό τότε η απάντηση πρέπει να αναζητηθεί στην ευαισθησία των 2 αυτών μεθόδων.

Η διαδικασία κατασκευής έχει ως εξής: Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητες για την πραγματοποίηση PCR αντίδρασης.

Αλληλουχία		
5'ataagaatg cgggccgc tATGCCACAATTTTCAGTAGATC3'	5' εκκινητής	Dog2p
5'ataagaatg cgggccgc TTAATCTCTCGTCAAAGGGT3'	3' εκκινητής	

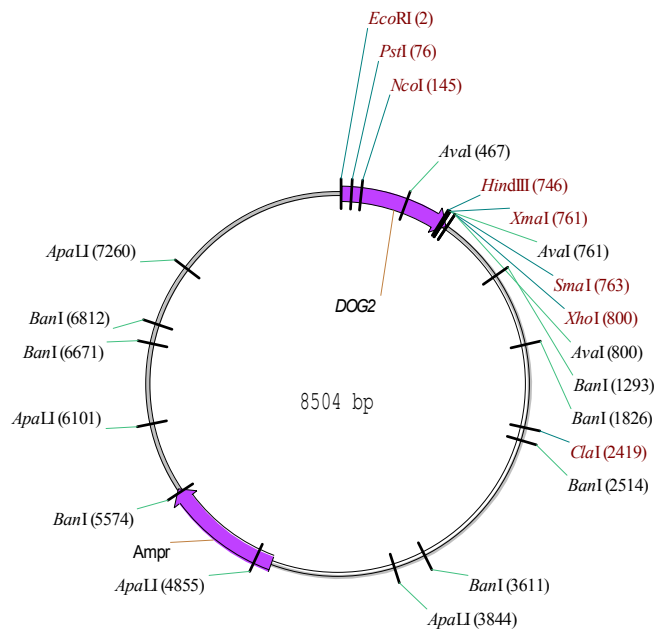
Στη συνέχεια το προϊόν του PCR έγινε πέψη με HindIII – EcoRI. Με τα ίδια ένζυμα κόπηκε και το πλασμίδιο pYX142. Τα αποτελέσματα της πέψης του πλασμιδίου pYX142 DOG2 με τα ένζυμα HindIII – EcoRI φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

Αποτελέσματα



Εικόνα 41 (θετικά είναι τα δείγματα 2,4,6)

Ο χάρτης του πλασμιδίου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα



pYX142 with DOG2 (HindIII EcoRI)

Εικόνα 42 (Επίτοπος HA)

Συζήτηση

Από όλα όσο έχουν αναφερθεί παραπάνω γίνεται φανερό ότι μόνο το πείραμα που αφορά την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών είναι πληροφοριακό όσο αφορά τις Rad9p και Dog2p. Η κατάσταση για την Yoi002cp είναι ακόμα χειρότερη μια και ο συγκεκριμένος τρόπος προσέγγισης δεν είναι ικανός να δώσει πληροφορίες αν αλληλεπιδρά ή όχι με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1p.

Ο λόγος που τα υπόλοιπα πειράματα που έγιναν δεν είναι πληροφοριακά είναι, επειδή μπορούν να θεωρηθούν ως ένας τυχαίος βηματισμός μήπως και υπάρξει κάποια ένδειξη η οποία να μπορεί να μας οδηγήσει σε μια πιο συγκεκριμένη κατεύθυνση (Η αρχικές πληροφορίες που έχουμε για την δράση της Dog2p αλλά και Yoi022cp είναι μηδαμινές). Δυστυχώς και πάλι οι πληροφορίες που έχουν συλεγεί είναι λίγες. Υπάρχουν όμως δύο τρόποι προσέγγισης που πιθανόν να δώσουν πληροφορίες ή και να αποκλείσουν κάποια ενδεχόμενα και οι οποίοι μπορούν να πραγματοποιηθούν παράλληλα.

Ο πρώτος τρόπος είναι να μελετηθούν κάποιες βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης χωρίς να είναι αναγκαία η σύνδεση της με κάποιο φαινότυπο (Η πιθανή γνώση του βιοχημικού ρόλου της πρωτεΐνης μπορεί πιθανόν να δώσει πληροφορίες και για τον ρόλο αυτών των πρωτεϊνών). Ένα παράδειγμα για αυτό είναι να μελετηθεί η Dog2p επηρεάζει την φωσφορυλιωση του μεταγραφικού παράγοντα Mac1p, διαχωρίζοντας τις 2 μορφές, χρησιμοποιώντας πήκτωμα ουρίας σε στελέχη WT και *dog1 – dog2Δ*. Επίσης μπορεί να μελετηθεί αν αλληλεπιδρά ή όχι και η Dog1p, η οποία εμφανίζει 91,5% ταυτότητα με την Dog2p. Εστί μπορούν να συγκεντρωθούν πληροφορίες για το πια περιοχή ευθύνεται για την αλληλεπίδραση. Σε αυτήν την προσέγγιση απαραίτητο είναι η αλληλεπίδραση να επιβεβαιωθεί και *in vitro* αλλά επίσης και από το ChIP.

Ο άλλος τρόπος είναι η προσπάθεια μελέτης του συστήματος. Ο τροπος αυτός είναι πιθανόν πιο δύσκολος αλλά οι πληροφορίες που συγκεντρώνονται είναι πιο σημαντικές. Κατά πρώτο λόγο θα πρέπει να γίνει γνωστό αν τα στελέχη μας είναι ανθεκτικά ή όχι στην ουσία DOG για να μπορέσουν να αξιολογηθούν τα πειράματα RNA με το *CTR1*, οι κατασκευές που εκφράζουν την Dog2p αλλά και τα στελέχη που έχουν καταστραφεί τα γονίδια *DOG1* και *DOG2*. Οι πληροφορίες αυτή θα βοηθήσει για το καλύτερο σχεδιασμό πειράματος RNA με μάρτυρα το *CTR1*.

Συζήτηση

Στα πειράματα RNA θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και ο φαινότυπος που προκαλεί το στέλεχος *Mac1^{up}*. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι αν οι *Dog1p* και *Dog2p* δρουν σε περιπτώσεις stress, τότε απαραίτητο είναι να προσδιοριστεί πότε έχουμε stress. Αν το πείραμα με τις συγκεντρώσεις H_2O_2 και O_2^- γίνει πιστευτό, τότε ακόμα και 3h με 100μM χαλκό δεν προκαλούν stress στα συγκεκριμένα στελέχη.

Ακόμα για τις μετρήσεις κατά την προσπάθεια της ανίχνευσης φαινοτύπου μεταξύ για παράδειγμα των στελεχών *Dog1p Dog2p* σε σχέση με το WT, θα πρέπει να υπάρξει ένας άλλος μάρτυρας, πέρα από την μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *CTR1*. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό μια και η κινητική της απόκρισης στην παρουσία χαλκού του συγκεκριμένου γονιδίου είναι παρά πολύ γρήγορη, μικρότερη από 1 min. Έτσι ενώ το γονίδιο *CTR1* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας σε πειράματα έλλειψης χαλκού δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του stress από χαλκό. Ως μάρτυρας για τις διαφορές των στελεχών σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης χαλκού πιθανόν να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συγκέντρωση H_2O_2 και O_2^- καθώς και η μέτρηση της περιεκτικότητας χαλκού αυτής καθεαυτής (^{64}Cu). Ακόμα και στην περίπτωση του αντίλογου ότι η *Mac1p* διασπάται σε αυξημένη συγκέντρωση χαλκού αυτό γίνεται σε ~ 10 min από την έκθεση των κυττάρων στο χαλκό, αλλά και αυτό μένει να δειχθεί στα στελέχη που μας είναι διαθέσιμα.

Τέλος απαραίτητο είναι να πραγματοποιηθούν σύνθετα πειράματα βιωσιμότητας των στελεχών για να εντοπισθεί πιθανόν και άλλος ρόλος της *Mac1p*. Είναι γνωστό για παράδειγμα ότι η έκφραση του γονιδίου *DOG2* αυξάνεται ως απόκριση σε περιβαλλοντικά stress, όπως αυξημένης θερμοκρασίας και H_2O_2 . Είναι λογικό να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των στελεχών σε παρουσία χαλκού και θερμικού σοκ, ή παρουσία χαλκού και υπεροξειδίου σε στελέχη με το τριπλό μετάλλαγμα *dog1Δ, dog2Δ, Mac1^{up}*, ή σε στελέχη όπως *dog1Δ, dog2Δ, sod1Δ*. Φυσικά η πολυπλοκότητα της εξήγησης των αποτελεσμάτων αυξάνεται με αυτόν τον τρόπο. Οι πληροφορίες που θα πάρει κανείς από την μελέτη του συστήματος είναι πολύτιμες για την κατανόηση του όλου μηχανισμού της διαχείρισης του χαλκού από το κύτταρο.

Παράρτημα

E.coli stab

Name	Number
pACT2 + RTG3 all	1
pACT2 + PTR3 all	2
pSSN6	3
pSSN6 V16	4
pACT2	5
pGBT9	6
pSSN6 LexA	7
pDB20 + Flag	8
pDB20 + Flag + DOG2	9
pDB20 + Flag + DOG2	10
pDB20 + Flag + RAD9	11
pBluescript II Ks (+)	12
pYX142	13
pYX142 + MAC1	14
pDB20 + Flag + YOL022c	15
pDB20 + Flag + YOL022c	16
pDB20 + Flag + YOL022c	17
pGEX 2T	18
pRSET A	19
pRSET B	20
pRSET C	21
KanMX4	22
pDB20 + Flag + RAD9	23
pDB20 + Flag + RAD9	24
pYEP 352	25
pDB20 + Flag + YOL022c	26
pBluescript Dog2Δ KanMX4	27
pBluescript Dog2Δ KanMX4	28
pGEX 2T DOG2	29
pBluescript Ks(+) Dog2Δ ura3	34
pBluescript Ks(+) Dog2Δ ura3	35
pGEX-2T with RAD9 (MscI HincII)	36
pGEX-2T with RAD9 (MscI HincII)	37
pGEX - 2T with YOL022c	38
pGEX - 2T	39
pGEX - 2T with YOL022c	40
pDB20 lex Flag HIR1	41
pGEX - 2T (SmaI) with RAD9 (MscI NotI)	43
pGEX - 2T (SmaI) with RAD9 (MscI NotI)	44
pGEX - 2T (SmaI) with RAD9 (MscI NotI)	45
pGEX - 2T (SmaI) with RAD9 (MscI NotI)	46
pGEX - 2T (BamHI) with RAD9 (AccI NotI)	47

Παράρτημα

YEP 24	48
pGEX-2T (BamHI) with RAD9(Accl NotI)	49
YCPAGR1 LacZ	50
pBluescript Ks+ YOL022Δ KanMX4	51
pBluescript Ks+ YOL022Δ KanMX4	52
pBluescript Ks+ YOL022Δ KanMX4	53
pBluescript Ks+ DOG2	54
pBluescript Ks (+) YOL022c	55
pBluescript Ks (+) YOL022c	56
pBluescript Ks (+) YOL022c	58
pBluescript Ks (+) YOL022c	60
pBluescript Ks (+) YOL022c	61
pDB20 Flag	62
pYX142 DOG2	63
pYX142 DOG2	64
pYX142 DOG2	65

Yeast Stab

<i>dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	1
<i>dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	2
<i>dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	3
<i>dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	4
<i>dog2Δ ura3 RHII68</i>	5
<i>dog2Δ ura3 RHII68</i>	6
<i>dog2Δ ura3 RHII68</i>	7
<i>dog2Δ ura3 RHII68</i>	8
<i>dog2Δ KanMX4 PG694a</i>	9
<i>dog2Δ KanMX4 PG694a</i>	10
<i>dog2Δ KanMX4 PG694a</i>	11
<i>dog2Δ KanMX4 mac1Δ RHII68</i>	12
<i>dog2Δ KanMX4 mac1Δ RHII68</i>	13
<i>dog2Δ KanMX4 mac1Δ RHII68</i>	14
<i>dog2Δ KanMX4 mac1Δ RHII68</i>	15
<i>dog2Δ KanMX4 mac1Δ RHII68</i>	16
<i>BJ5457 MAC1-9myc TRYP</i>	17
<i>RHII68</i>	18
<i>BJ5457</i>	19
<i>dog1 dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	20
<i>dog1 dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	21
<i>dog1 dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	22
<i>dog1 dog2Δ KanMX4 RHII68</i>	23
<i>BJ5457 MAC1-9myc TRYP dog1 dog2Δ KanMX4</i>	24
<i>BJ5457 MAC1-9myc TRYP dog1 dog2Δ KanMX4</i>	25
<i>BJ5457 MAC1-9myc TRYP dog1 dog2Δ KanMX4</i>	26
<i>FT5 MAC1-9myc TRYP dog1 dog2Δ KanMX4</i>	27
<i>FT5 MAC1-9myc TRYP dog1 dog2Δ KanMX4</i>	28
<i>FT5 MAC1-9myc TRYP dog1 dog2Δ KanMX4</i>	29
<i>RHII68 mac1Δ KanMX4 YOL022c ura3</i>	30
<i>RHII68 mac1Δ KanMX4 YOL022c ura3</i>	31

Παράρτημα

RHII68 <i>yol022cΔ</i> KanMX4	32
RHII68 <i>yol022cΔ</i> KanMX4	33
RHII68 <i>yol022cΔ</i> KanMX4	34
FT5 <i>rad9Δ</i> KanMX4	35
FT5 <i>rad9Δ</i> KanMX4	36

Βιβλιογραφία

1. Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, et al. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282: 699-705
2. Corbisier P, Houbion A, Remacle A. 1987. A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Ann. Biochem.* 164: 240-7
3. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, et al. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-57
4. Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141-7
5. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, et al. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-41
6. Heredia J, Crooks M, Zhu Z. 2001. Phosphorylation and Cu⁺ coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J Biol Chem* 276: 8793-7
7. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, et al. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415: 180-3
8. Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, et al. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-91
9. Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 27002-9
10. Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4569-74
11. Jensen LT, Winge DR. 1998. Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 17: 5400-8

Βιβλιογραφία

12. Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matson S, Heidtman M, et al. 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* 16: 707-19
13. Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, et al. 2002. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298: 799-804
14. Lutfiyya LL, Iyer VR, DeRisi J, DeVit MJ, Brown PO, Johnston M. 1998. Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150: 1377-91
15. Murphy TM, Huerta AJ. 1990. Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol. Plant.* 78: 247-53
16. Pena MM, Lee J, Thiele DJ. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 129: 1251-60
17. Posas F, Saito H. 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *Embo J* 17: 1385-94
18. Puig S, Thiele DJ. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* 6: 171-80
19. Randez-Gil F, Blasco A, Prieto JA, Sanz P. 1995. DOGR1 and DOGR2: two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed. *Yeast* 11: 1233-40
20. Sanz P, Randez-Gil F, Prieto JA. 1994. Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxyglucose resistance in yeast. *Yeast* 10: 1195-202
21. Shukla AK, Futrell JH. 2000. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *J Mass Spectrom* 35: 1069-90
22. Tsujimoto Y, Izawa S, Inoue Y. 2000. Cooperative regulation of DOG2, encoding 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase, by Snf1 kinase and the high-osmolarity glycerol-mitogen-activated protein kinase cascade in stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 182: 5121-6
23. Zhu Z, Labbe S, Pena MM, Thiele DJ. 1998. Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1p transcription factor. *J Biol Chem* 273: 1277-80