

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας
και Βιοϊατρικής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη στον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*:

A) πιθανής πρόσδεσης παραλόγων πρωτεϊνών Ynl032w, Ynl056w και Ynl099 σε περιοχές κινητοχώρων

B) πιθανής αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης ελέγχου Rad9 με υποκινητές *CTR1*, *FRE1* και *FRE2*

Γ) μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων με DNA μικροσυστοιχίες σε στελέχη *rad9Δ* και σε στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφράζεται

ΧΡΗΣΤΟΣ ΑΝΔΡΕΑΔΗΣ

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Δέσποινα Αλεξανδράκη

Υπεύθυνος εξεταστής: Γεώργιος Θηραίος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Summary.....	4
Περίληψη.....	5
Σκοπός της εργασίας.....	6
I) Οι πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c, Spl2 και Tid3.....	7
1) Οι πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c.....	7
2) Οι πρωτεΐνες Tid3 και Spl2	9
3) Προηγούμενα πειράματα σε σχέση με τις παράλογες πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c.....	10
Αποτελέσματα-Συζήτηση	
Έλεγχος πρόσδεσης μελών της οικογένειας <i>SIW14</i> σε περιοχές των κινητοχώρων.....	12
IIA) Η ζύμη ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη του μεταβολισμού χαλκού και σιδήρου.....	15
1) Μεταβολισμός σιδήρου.....	16
2) Μεταβολισμός χαλκού.....	18
3) Ο μεταγραφικός παράγοντας Aft1.....	20
IIΒ) Η πρωτεΐνη Rad9.....	24
1) Σημεία ελέγχου καταστροφής DNA στη ζύμη (DNA damage checkpoints).....	24
2) Rad9: η πρωτότυπη πρωτεΐνη ελέγχου της καταστροφής του DNA.....	26
Αποτελέσματα-Συζήτηση	
1) Μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ελέγχου Rad9 με τους μεταλλορυθμιζόμενους υποκινητές <i>FRE1</i> , <i>FRE2</i> , <i>CTR1</i>	29
2) Μελέτη μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων με μικροσυστοιχίες DNA	

σε στελέχη <i>rad9Δ</i> και σε στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες επαγωγής (BCS και H ₂ O ₂) αντίστοιχα	34
Παράτημα Ι: Υλικά και Μέθοδοι.....	53
Στελέχη.....	54
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	54
Θρεπτικό μέσο YPD (Yeast Peptone Dextrose).....	57
Θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete).....	58
Διαλύματα Αμινοξέων – νουκλεοτιδίων.....	58
Μετασχηματισμός κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
Πρωτεϊνικό εκχύλισμα για Western.....	60
Παρασκευή πρωτεϊνικού πηκτώματος.....	61
Αποτύπωμα Western (Western blot).....	62
Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP assay).....	66
PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	70
Απομόνωση RNA και σήμανση για μικροσυστοιχίες DNA.....	73
Μικροσυστοιχίες DNA.....	80
Αποτύπωμα κατά Northern.....	80
RT-PCR.....	83
Φορέας υπερέκφρασης.....	85
Παράτημα ΙΙ.....	87
Παράτημα ΙΙΙ.....	88
Βιβλιογραφία.....	98

SUMMARY

In the present work 3 subjects were studied in the organism *Saccharomyces cerevisiae*: **a)** the possible localization of the Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c and Spl2 proteins in the regions of kinetochores, **b)** the likely localization of the checkpoint protein Rad9 on the promoters of *CTR1*, *FRE1* and *FRE2* genes under specific growth conditions in wild type strains and in strains where the Aft1 transcription factor is absent and **c)** the study of the transcriptional profile of yeast genes in *rad9* Δ strains and in strains where Rad9 is overexpressed in normal growth conditions and upon BCS (copper starvation) / H₂O₂ respectively, using yeast DNA microarrays. Concerning the first subject it was found that the paralog proteins Ynl032w, Ynl056w and Ynl099c do not bind to kinetochore chromatin under the conditions used. As concerns the second subject, Rad9 protein was found to bind on the promoters of *CTR1* and *FRE1* genes but not *FRE2*. Aft1 seems to play a role in Rad9 localization on the *CTR1* promoter, as when it is absent upon iron starvation, Rad9 localization falls down several times. The DNA microarray experiments showed that Rad9 protein influences the transcription of other genes and, in particular, affects considerably the transcription of genes that are related to the regulation of copper and iron homeostasis.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 3 θέματα στον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*: **α)** ο έλεγχος της πιθανής πρόσδεσης σε περιοχές των κινητοχώρων των πρωτεϊνών Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c και Spl2, **β)** η μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ελέγχου Rad9 με τους υποκινητές των γονιδίων *CTR1*, *FRE1* και *FRE2* κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης σε στελέχη αγρίου τύπου και σε στελέχη όπου απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας Aft1 και **γ)** η μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων σε στελέχη *rad9Δ* και σε στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες επαγωγής (BCS, πείνα σε χαλκό) και H₂O₂ αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες DNA. Σχετικά με το πρώτο θέμα διαπιστώθηκε ότι οι παράλογες πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w και Ynl099c δεν προσδένονται σε περιοχές των κινητοχώρων. Όσον αφορά το δεύτερο θέμα, η πρωτεΐνη Rad9 βρέθηκε να προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων *CTR1* και *FRE1* αλλά όχι και με του *FRE2*. Ο Aft1 φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στον εντοπισμό της Rad9 στον υποκινητή του *CTR1*, αφού απουσία του και κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου, η Rad9 εντοπίζεται λιγότερο. Τα πειράματα με τις DNA μικροσυστοιχίες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Rad9 επηρεάζει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων και μάλιστα εμπλέκεται σημαντικά με τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την ρύθμιση της ομοιόστασης χαλκού και σιδήρου.

Σκοπός της εργασίας

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας αφορούσαν τρία θέματα: **α)** Τον έλεγχο της πιθανής πρόσδεσης σε περιοχές των κινητοχώρων των πρωτεϊνών Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c και Spl2. Οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Tid3 των κινητοχώρων (Βλέπε Ενότητα Ι3 Εισαγωγή) και με τα πειράματα αυτά έγινε προσπάθεια να βρεθεί αν οι πρωτεΐνες της *SIW14* οικογένειας εντοπίζονται στους κινητοχώρους. **β)** Τη μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Rad9 με τους υποκινητές των *CTR1*, *FRE1* και *FRE2* σε στελέχη αγρίου τύπου και σε στελέχη όπου απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας Aft1 σε διάφορες συνθήκες ανάπτυξης, προκειμένου να μελετηθεί το πώς επηρεάζεται ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Rad9 στους παραπάνω υποκινητές από την απουσία του Aft1 με δεδομένο ότι, αφενός η Rad9 και ο Aft1 αλληλεπιδρούν (Καλλιόπη Γκούσκου) και αφετέρου ο Aft1 εντοπίζεται στον υποκινητή του Mac1-ρυθμιζόμενου γονιδίου *CTR1*, ενώ απουσιάζουν οι γνωστές αλληλουχίες πρόσδεσης του (Γιώργος Φραγκιαδάκης). Ένα άλλο ερώτημα που πρόκειται να μελετηθεί είναι το αν η πρωτεΐνη Rad9 μετακινείται από τον υποκινητή στην κωδικεύουσα περιοχή του γονιδίου *RAD9* (όπως έχει ήδη παρατηρηθεί από την Καλλιόπη Γκούσκου). **γ)** Τη μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων σε στελέχη *rad9Δ* και σε στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες επαγωγής (BCS) και H₂O₂ αντίστοιχα με μικροσυστοιχίες DNA προκειμένου να βρεθεί αν η Rad9 επηρεάζει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων και αν υπάρχει συσχετισμός της Rad9 με τα γονίδια που εμπλέκονται στην ομοιόσταση χαλκού και σιδήρου.

I) Οι πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c, Spl2 και Tid3

1) Οι πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c

Οι πρωτεΐνες Ynl032w (Siw14), Ynl056w και Ynl099c (Oca1) ανήκουν σε μια οικογένεια παραλόγων πρωτεϊνών (μαζί με την Ydr067c η οποία δε μελετήθηκε στην παρούσα εργασία). Η Ynl032w περιλαμβάνει ένα τέλειο μοτίβο που φέρουν οι πρωτεΐνες φωσφατάσες τυροσίνης, η Ynl056w είναι μια STYX πρωτεΐνη (Βλ. παρακάτω), η Ynl099c είναι επίσης μια πιθανή φωσφατάση τυροσίνης, ενώ η Ydr067c έχει σημαντικές αμινοξικές ομοιότητες με τις άλλες τρεις πρωτεΐνες αλλά δεν περιλαμβάνει χαρακτηριστική αλληλουχία φωσφατάσης τυροσίνης (PTP). Η αμινοξική ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνών φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

	Ynl032w	Ynl056w	Ynl099c
Ydr067	24% ταυτότητα 46% ομοιότητα	26% ταυτότητα 43% ομοιότητα	24% ταυτότητα 46% ομοιότητα
Ynl032w		37% ταυτότητα 57% ομοιότητα	34% ταυτότητα 53% ομοιότητα
Ynl056w			35% ταυτότητα 58% ομοιότητα

Έχουν γίνει πειράματα λειτουργικής ανάλυσης φαινοτύπου τα οποία περιλαμβάνουν στελέχη όπου οι παραπάνω πρωτεΐνες υπερκεφράζονται ή υπάρχει μονή ή πολλαπλή έλλειψη στο γονίδιό τους υπό διάφορες συνθήκες, αλλά και πειράματα σάρωσης γενωμικής βιβλιοθήκης ζύμης με το σύστημα των δύο υβριδίων προκειμένου να γίνει χαρακτηρισμός της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών (Voutsina et al., unpublished data). Οι φαινότυποι που ταυτοποιήθηκαν έδειξαν εμπλοκή και των τεσσάρων παραλόγων σε σηματοδοτικά μονοπάτια και σε κυτταροσκελετικές λειτουργίες που σχετίζονται με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, δείχτηκε αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με πρωτεΐνες των κινητοχώρων και ομο- ή ετεροδιμερισμοί μεταξύ των μελών της οικογένειας υποδεικνύοντας συνεργατική ή ανταγωνιστική λειτουργία των Siw14 παραλόγων.

Στη ζύμη, η φωσφορυλίωση Tyr είναι ουσιώδης για την ενεργότητα των κινασών MAP που απαιτούνται για τη σύζευξη και τη δημιουργία διπλοειδούς, την

απόκριση στο stress, την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, την ανάπτυξη με ινίδια και ψευδοϋφές και τη δημιουργία του τοιχώματος των σπορίων. Οι πρωτεΐνες φωσφατάσες τυροσίνης ρυθμίζουν αρνητικά τις κινάσες MAP (Gustin et al., 1998) και περιλαμβάνουν την χαρακτηριστική συντηρημένη αλληλουχία HCX₅R (Denu and Dixon, 1998) ή την (H/V)CX₅R(S/T) (Kolmodin and Aqvist, 2001) ή την DX_nCX₅R (Wishart and Dixon, 1998).

Η **Ynl032w (Siw14, Synthetic interaction with *whi2Δ*)** περιλαμβάνει μεταξύ των καταλοίπων 212-224 ένα τέλειο μοτίβο φωσφατάσης τυροσίνης (IHCNRGKHRTGCL). Παίζει ρόλο στην οργάνωση των ινιδίων ακτίνης, στην ενδοκύτωση και στην απόκριση στο stress και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Το μετάλλαγμα *ynl032w (swi14)* ταυτοποιήθηκε ως συνθετικό θνησιγόνο (synthetic lethal) με το μετάλλαγμα *whi2* σε ελάχιστο (minimal) θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (Care et al., 2004). Η πρωτεΐνη Whi2 δρα στο μονοπάτι απόκρισης σε stress και όταν απουσιάζει, τα κύτταρα δε σταματούν στην φάση G1 σε συνθήκες πείνας. Το γονίδιο *SIW14* αλληλεπιδρά γενετικά με τα *ARK1* και *PRK1* που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες κινάσες που ρυθμίζουν τη σύνδεση της φλοιικής ακτίνης με την μηχανή ενδοκύτωσης φωσφορυλιώνοντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες (Care et al., 2004). Το *SIW14* αλληλεπιδρά γενετικά και με το γονίδιο *SLT2* που κωδικοποιεί για μια κινάση Ser/Thr MAP που όταν λείπει προσδίδει ευαισθησία σε stress καφεΐνης (Care et al., 2004). Μεταλλάγματα της Ynl032w είναι βιώσιμα αλλά φέρουν αποδιοργανωμένη ακτίνη και δε σταματούν τον κυτταρικό κύκλο σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικού, ενώ υπάρχει ευαισθησία σε καφεΐνη (5mM) (SGD).

Για την **Ynl056w** είναι γνωστό ότι πρόκειται για μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που απαιτείται για την αντιγραφή του Brome mosaic ιού. Αυτό βρέθηκε με πειράματα συστηματικής ταυτοποίησης σε όλο το γονιδίωμα της ζύμης για να βρεθούν γονίδια που επηρεάζουν την αντιγραφή των (+)RNA ιών στους φυσικούς τους ξενιστές (Kushner et al., 2003).

Η **Ynl099c (Oca1, Oxidant-induced Cell cycle Arrest)** είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, πιθανή φωσφατάση τυροσίνης (περιέχει το εναλλακτικό μοτίβο DX_nCX₅RT) (Wishart and Dixon, 1998) που απαιτείται για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε οξειδωτική καταστροφή του DNA. Η κωδικεύουσα περιοχή του *YNL099c* έχει βρεθεί ότι απαιτείται για το σταμάτημα στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο υπεροξείδιο του λινολεϊκού οξέος (Alic et al., 2001). Η Ynl099c και η Ynl032w περιλαμβάνουν το

μοτίβο STYX (phospho-Serine or Threonine or tYrosine interACTion). Η Ynl056w επίσης κωδικοποιεί για μοτίβο STYX που φέρει την υποκατάσταση C₁₀₂->S στο ενεργό κέντρο PTP.

Οι περιοχές STYX είναι ενδογενείς, μη καταλυτικές δομές που μοιάζουν με φωσφατάσες τυροσίνης και συγκεκριμένα με αυτές που είναι ικανές να υδρολύουν τόσο φωσφοσερίνη/φωσφοθρεονίνη όσο και φωσφοτυροσίνη. Σε αυτές ένα κατάλοιπο Cys έχει υποκατασταθεί από Gly και έτσι έχουν καταστεί ανενεργές ως φωσφατάσες, αλλά προσδένονται σε φωσφορυλιωμένα υποστρώματα έχοντας αρνητική επικρατή (dominant-negative) λειτουργία (Wishart et al., 1995). Πιθανώς ετεροδιμερίζονται ή ανταγωνίζονται με ενεργές PTPs για ένα κοινό υπόστρωμα.

Σχετικά με τη λειτουργία της **Ydr067c** δεν υπάρχει διαθέσιμη πληροφορία. Δεν φαίνεται να κωδικοποιεί για ενεργή φωσφατάση αφού έχει στο κέντρο PTP μια υποκατάσταση R->I που την καθιστά ανενεργή.

In silico πρόβλεψη του κυτταρικού εντοπισμού των τεσσάρων παράλογων γονιδίων με βάση την αλληλουχία τους (PSORT II πρόγραμμα, Αλεξάνδρα Βουτσινά) έδειξε ότι η Ynl032w είναι 82.6% πυρηνική, η Ynl056w 52.2% κυτταροπλασματική, η Ynl099c 56.5% κυτταροπλασματική και 26.1% πυρηνική και η Ydr067c 56.5% πυρηνική και 26.1% μιτοχονδριακή. Σύμφωνα με την GFP βάση δεδομένων στη ζύμη οι Ynl032w, Ynl056w, Ydr067c και Ynl099c εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στο εκβλάστημα, η Spl2 έχει διάστικτο εντοπισμό στο κυτταρόπλασμα και η Tid3 εντοπίζεται στους πόλους της ατράκτου.

2) Οι πρωτεΐνες Tid3 και Spl2

Σε παλιότερα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σαρώσεις με το σύστημα των δύο υβριδίων χρησιμοποιώντας ως δόλωμα την Ynl032w για να βρεθούν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Voutsina et al., unpublished data). Σε αυτά τα πειράματα η Ynl032w βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Tid3, Spl2, Rtg3, Ykr017c και Ynl099c.

Η **Tid3** (Ndc80) είναι ουσιώδες συστατικό των κινητοχώρων και βρίσκεται σε σύμπλοκο μαζί με άλλες 3 πρωτεΐνες: τις Nuf2 (NUclear Filament), Spc24 και Spc25 (Spindle Pole Component). Πρόκειται για συντηρημένη coiled-coil πρωτεΐνη, συστατικό της ατράκτου που σχετίζεται με διαχωρισμό χρωμοσωμάτων και δημιουργία κινητοχώρων. Έχει μάλιστα βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με κεντρομερικές πρωτεΐνες (Wigge and Kilmartin, 2001). Ως συστατικό του κυτταροσκελετού, η Tid3

είναι απαραίτητη για τη σύνδεση των μικροσωληνίσκων της ατράκτου στους κινητοχώρους κατά τη μίτωση και απαιτείται για τις σταθερές συνδέσεις κινητοχώρων-μικροσωληνίσκων στα κεντρομερή, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Μεταλλάγματα όπου η Tid3 απουσιάζει δεν είναι βιώσιμα. Τα κατάλοιπα Y188 και Y507 της Tid3 είναι πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης και έτσι, η Ynl032w φωσφατάση ίσως ρυθμίζει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων αποφωσφορυλιώνοντας την Tid3 υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Η (Suppressor of PLC1 deletion) πρωτεΐνη **Spl2** εμφανίζει ομοιότητες με κυκλινο-εξαρτώμενους αναστολείς κινασών και με τις επαναλήψεις αγκυρίνης της Pho81 (Spl1) πρωτεΐνης (Flick and Thorner, 1998). Η Plc1 πρωτεΐνη είναι ένα ομόλογο μιας ισομορφής της PI-PLC (Phosphoinositide-specific phospholipase C) η οποία βρίσκεται στα κεντρομερή και συνδέεται με το σύμπλοκο των κινητοχώρων CBF3 ως ενδοπυρηνική φωσφολιπάση C (Lin et al., 2000). Επομένως, η αλληλεπίδραση της Ynl032w με την Spl2 δείχνει κεντρομερική λειτουργία στον κυτταρικό κύκλο που επηρεάζεται από την πρόσληψη εξωκυτταρικών σημάτων. Ωστόσο, παρόλο που η Spl2 περιλαμβάνει 7 κατάλοιπα Tyr κανένα από αυτά δε βρίσκεται σε αλληλουχία που φωσφορυλιώνεται.

3) Προηγούμενα πειράματα σε σχέση με τις παράλογες πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c

Η ενασχόληση με το θέμα αυτό βασίστηκε σε άλλη εργασία (Αλεξάνδρα Βουτσινά και Κωστιάννα Σερέτη) όπου εφαρμόζοντας μεθόδους ανοσοκατακρήμνισης GST (κολώνα γλουταθειόνης) επιβεβαιώθηκε η *in vivo* αλληλεπίδραση της Ynl032w με τον εαυτό της και με τις Ynl056w και Ynl099c που είχε βρεθεί με το σύστημα των δύο υβριδίων. Το ότι αλληλεπιδρά με τον εαυτό της ίσως σημαίνει ότι η αποφωσφορυλίωση των υποστρωμάτων-στόχων πιθανώς ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από το σχηματισμό ομοδιμερών έχοντας υπόψη ότι η Ynl032w είναι μια ενεργή φωσφατάση τυροσίνης. Η πρωτεΐνη Ynl056w, όπως αναφέρθηκε παραπάνω περιέχει μια περιοχή STYX που της δίνει τη δυνατότητα να δεσμεύεται σε φωσφορυλιωμένα υποστρώματα χωρίς όμως να δρα ως φωσφατάση. Έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες STYX μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης δρώντας ανταγωνιστικά ως προς τις

φωσφατάσες τυροσίνης (Wishart and Dixon, 1998). Με βάση τη θεωρία αυτή μπορεί να ερμηνευτεί η παρατηρούμενη αλληλεπίδραση της Ynl032w με τη Ynl056w. Είναι πιθανό η Ynl056w να αναστέλλει τη δράση της Ynl032w. Ένας υποψήφιος μηχανισμός είναι η Ynl056w να ανταγωνίζεται τη Ynl032w και να σχηματίζονται ετεροδιμερή Ynl032w-Ynl056w που να δεσμεύονται στο υπόστρωμα χωρίς να είναι ικανά να το αποφωσφορυλιώσουν (στην περίπτωση που η Ynl032w αποφωσφορυλιώνει ως διμερές).

Οι πρωτεΐνες Ynl099c και Ynl032w, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν μεγάλη αμινοξική ομοιότητα μεταξύ τους και η πρώτη αποτελεί μια πιθανή φωσφατάση τυροσίνης λόγω του χαρακτηριστικού μοτίβου που περιέχει (Wishart and Dixon, 1998). Εξαιτίας της μεγάλης ομοιότητας μεταξύ των δύο πρωτεϊνών μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η Ynl099c εμφανίζει παρόμοιο τρόπο δράσης με την Ynl032w. Το γεγονός ότι αυτές οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι σχηματίζεται ετεροδιμερές μεταξύ Ynl032w και Ynl099c.

Στην ίδια εργασία (Κωστιάννα Σερέτη, Πτυχιακή εργασία), με πειράματα ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη μέθοδο των δύο υβριδίων (Αλεξάνδρα Βουτσινά), βρέθηκε ότι η Ynl032w αλληλεπιδρά *in vivo* με τις πρωτεΐνες Tid3 και Spl2 ενώ η Ynl056w με την Spl2. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύτηκαν σε εκχυλίσματα ζύμης με τη μέθοδο της κατακρήμνισης συγγένειας σε κλώνα γλουταθειόνης, ενώ ελέγχθηκαν και οι αλληλεπιδράσεις των υπόλοιπων μελών της οικογένειας *SIW14* με τις Tid3 και Spl2. Όλες οι πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν τόσο με την Tid3 όσο και με την Spl2 (η Ynl099c δεν ελέγχθηκε). Η Tid3 πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται από την κινάση Ipr1 σε κατάλοιπο Ser ή Thr, επομένως η φωσφατάση τυροσίνης Ynl032w δε συμμετέχει στη συγκεκριμένη αποφωσφορυλίωση. Ωστόσο, η Tid3 περιέχει 17 κατάλοιπα Tyr που αποτελούν πιθανούς στόχους για φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες και πιθανή αποφωσφορυλίωση από Ynl032w. Με τον τρόπο αυτό η Ynl032w ίσως συμμετέχει στη συγκρότηση των κινητοχώρων. Το γεγονός ότι η Ynl056w αλληλεπιδρά με την Tid3 και σχηματίζει ετεροδιμερές με την Ynl032w, ίσως σημαίνει ότι το ετεροδιμερές Ynl032w-Ynl056w αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Tid3 εμποδίζοντας την δέσμευση του ομοδιμερούς Ynl032w-Ynl032w.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας *SIW14* (εκτός της Ynl099c που δεν ελέγχθηκε) βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με την Spl2 πρωτεΐνη (Κωστιάννα Σερέτη, Πτυχιακή εργασία) η οποία φέρει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης Tyr (Flick and Thorner,

1998). Επομένως η φωσφατάση Ynl032w ίσως ρυθμίζει το επίπεδο φωσφορυλίωσης της Spl2 και με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση και απενεργοποίησή της. Γενικά, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Ynl032w και Ynl056w με την Spl2 ίσως αποτελεί ένδειξη συμμετοχής αυτών στις διεργασίες στις οποίες συμμετέχει και η Spl2.

Από τα προαναφερθέντα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με GST φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας *SIW14* πιθανώς εμπλέκονται στην οργάνωση του κινητοχώρου.

Αποτελέσματα-Συζήτηση:

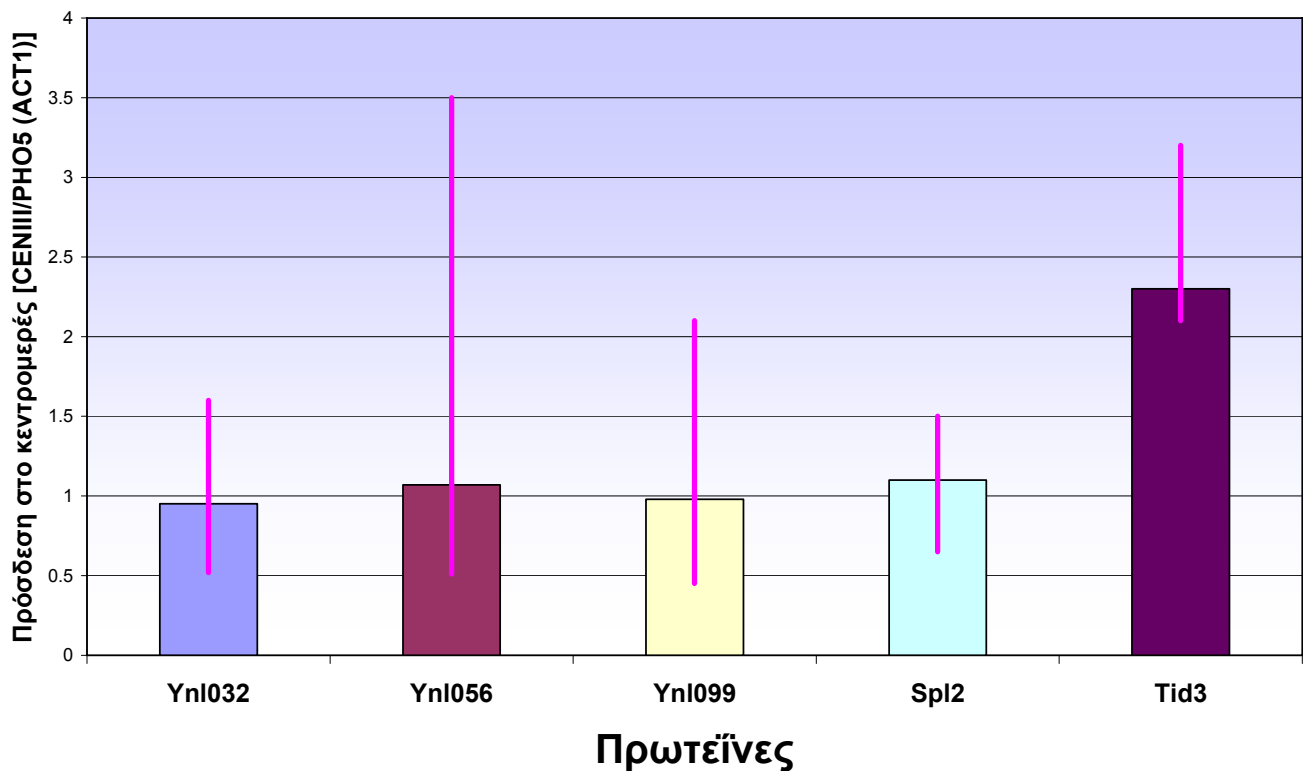
Έλεγχος πρόσδεσης μελών της οικογένειας *SIW14* σε περιοχές των κινητοχώρων

Στο συγκεκριμένο τμήμα της εργασίας εξετάστηκε με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης αν τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών *SIW14* (Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c) προσδέονται σε περιοχές των κινητοχώρων, όπως επίσης και η πρωτεΐνη Spl2.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για να διαπιστωθεί αν οι πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c και Spl2 εντοπίζονται σε περιοχές του κινητοχώρου. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε πιθανή πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών στην περιοχή του κεντρομερούς του χρωμοσώματος III. Σαν θετικός έλεγχος της τεχνικής για πρόσδεση στην περιοχή του κεντρομερούς χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Tid3 που είναι γνωστό ότι εντοπίζεται στα κεντρομερή (αλληλεπιδρά με τους κινητοχώρους). Σαν αρνητικός έλεγχος της τεχνικής μελετήθηκε αν οι πρωτεΐνες προσδέονται στον υποκινητή του *PHO5* (όπου φυσιολογικά δεν έχουν εντοπιστεί). Τα πειράματα αυτά αποσκοπούν στο να ισχυροποιήσουν την υπόθεση της συμμετοχής των πρωτεϊνών της οικογένειας *SIW14* στην οργάνωση των κινητοχώρων στα κεντρομερή.

Αναπτύχθηκαν καλλιέργειες στελεχών ζύμης σε θρεπτικό SC (L,U,H,T) που έφεραν σημασμένη μία από τις ακόλουθες πρωτεΐνες με επίτοπο HA (σε πλασμίδιο): Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c και Spl2, ενώ η Tid3 υπήρχε σε στέλεχος ζύμης ως υβριδική με GST. Η Tid3 ελέγχθηκε με ανάλυση Western για να διαπιστωθεί ότι υπάρχει ως υβριδική με GST. Ύστερα από την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-HA (ή anti-GST) πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας εκκινητές για περιοχή του κεντρομερούς του

χρωμοσώματος III (CENIII) και εκκινητές για *PHO5* ως αρνητικό έλεγχο για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές χρησιμοποιώντας PCR πραγματικού χρόνου και τρεις φορές με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων IPs και INPUTs σε πήκτωμα αγαρόζης ύστερα από απλή PCR με τους ίδιους εκκινητές, χρώση του πηκτώματος με CYBR green και μέτρηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα Scion Image. Στη δεύτερη περίπτωση οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν τόσο σε SC όσο και σε YPD θρεπτικό μέσο, ενώ η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε τόσο με εκκινητές του γονιδίου *PHO5* όσο και με του *ACT1*. Το αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα από τα πειράματα αυτά φαίνεται στην Εικ.1.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Μελέτη πρόσδεσης πρωτεϊνών Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c, Spl2 στους κινητοχώρους

Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από όλα τα πειράματα, του ποσοστού πρόσδεσης καθεμιάς από τις πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c και Spl2 σε περιοχή του κεντρομερούς του χρωμοσώματος III (CENIII) ως προς το ποσοστό πρόσδεσης τους στον υποκινητή *PHO5* (ή *ACT1*) όπου είναι γνωστό ότι δεν προσδένονται (αρνητικός έλεγχος). Επομένως, τιμή ίση με τη μονάδα σημαίνει ουσιαστικά μη πρόσδεση της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη των κινητοχώρων Tid3 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος. Με τις ροζ στήλες φαίνεται η χαμηλότερη και η υψηλότερη τιμή που παρατηρήθηκε.

Τα αποτελέσματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c και Spl2 δεν προσδέονται στους κινητοχώρους (Εικ. 1). Οι πρωτεΐνες που βρέθηκε να αλληλεπιδρούν με την Ynl032w εφαρμόζοντας το σύστημα των δύο υβριδίων (Voutsina et al., unpublished data) έδειξαν πιθανή λειτουργία που σχετίζεται με συστατικά των κινητοχώρων. Η Ynl032w πιθανώς εμπλέκεται με μονοπάτια αντίληψης εξωκυτταρικών σημάτων συμπεριλαμβανομένης της διαθεσιμότητας θρεπτικών και του ρυθμιζόμενου από τον κυτταρικό κύκλο διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων. Η Ynl056w που αλληλεπιδρά τόσο με την Ynl032w όσο και με την Spl2 ίσως παίζει ρόλο στο να αναστέλλει την Ynl032w και να οδηγεί σε υπερφωσφορύλωση των πρωτεϊνών των κινητοχώρων. Το ότι η Ynl032w αλληλεπιδρά με τον εαυτό της, την Ynl056w και την Ynl099c (η οποία αλληλεπιδρά και με την Ynl056w) (Voutsina et al., unpublished data) δείχνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες δρουν συνεργαζόμενες. Η φωσφατάση Ynl032w και η πιθανή φωσφατάση Ynl099 ίσως σχηματίζουν ομο- ή ετεροδιμερή για τη μεταφορά σημάτων. Η αλληλεπίδραση με την ανενεργή φωσφατάση Ynl056w ίσως ρυθμίζει τα επίπεδα δραστηριότητας φωσφατάσης τυροσίνης σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Η Ynl099c έχει βρεθεί ότι απαιτείται για σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση ως απόκριση στο υπεροξειδίο του λινολεϊκού οξέος (Alic et al., 2001). Οι φαινότυποι ευαισθησίας στην καφεΐνη (Voutsina et al., unpublished data) δείχνουν για τις παράλογες πρωτεΐνες συσχέτιση σε σηματοδοτικά μονοπάτια.

Σε κάθε κύτταρο σύμφωνα με την GFP βάση δεδομένων της ζύμης έχει βρεθεί ότι υπάρχουν 1160 μόρια Tid3, 4070 μόρια Ynl032w, 4530 μόρια Ynl056w, 2310 μόρια Ynl099c και 2180 μόρια Spl2. Όπως προαναφέρθηκε, με *in vivo* GST πειράματα δείχτηκε ότι οι Ynl032w, Ynl056w και Ynl099c αλληλεπιδρούν με την Tid3 και εντοπίζονται πιθανώς στους κινητοχώρους. Με τα πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας δείχτηκε ότι δεν εντοπίζονται στους κινητοχώρους. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο ότι στα στελέχη με τις σημασμένες Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c υπήρχε και η ενδογενής έκφραση της πρωτεΐνης (δεν υπήρχε deletion) που πιθανώς ανταγωνίζεται την έκφραση των σημασμένων πρωτεϊνών και μάλιστα τα μόρια των πρωτεϊνών της οικογένειας *SIW14* είναι περισσότερα σε κάθε κύτταρο συγκριτικά με αυτά της Tid3.

Επίσης, σύμφωνα με την GFP βάση δεδομένων οι πρωτεΐνες της οικογένειας *SIW14* έχουν κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα

από τα *in vivo* πειράματα GST (Κωστιάννα Σερέτη) που δείχνουν αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών της οικογένειας *SIW14* με την Tid3, η διαφοροποίηση με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας (ο μη εντοπισμός στους κινητοχώρους) μπορεί να οφείλεται στο ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με την Tid3 γίνεται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα οπότε δεν ήταν δυνατό να βρεθεί στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που έγιναν εδώ. Για το λόγο αυτό πρέπει να γίνουν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου όπως π.χ. κατά τη διάρκεια της μίτωσης που διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα. Είναι πιθανό οι πρωτεΐνες της *SIW14* οικογένειας να αλληλεπιδρούν με την Tid3 μετά την πρόφαση όταν η Tid3 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα αφού η πυρηνική μεμβράνη έχει διαλυθεί.

Επίσης, ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών αυτών θα αποκαλυφθεί με την ταυτοποίηση όλων των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι PTP ή οι STYX περιοχές τους (αλλά και πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν εκτός των consensus περιοχών), ώστε να γίνει κατανοητό το πώς επηρεάζονται οι downstream στόχοι τους. Περισσότερες πληροφορίες για το ρόλο των πρωτεϊνών της οικογένειας *SIW14* μπορούμε να πάρουμε πραγματοποιώντας γονιδιακές αφαιρέσεις και παρατηρώντας το φαινότυπο ή σημαίνοντας με TAP (Tandem Affinity Purification) επίτοπο τις πρωτεΐνες. Το τελευταίο μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας κατάλληλες στρατηγικές κλωνοποίησης ώστε οι σημασμένες με TAP πρωτεΐνες να εισαχθούν στη ζύμη σε πλασμίδιο ή ενδογενώς σε χρωμόσωμα με ανασυνδυασμό. Στη συνέχεια, με TAP assays θα καθοριστούν οι πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανώς σχηματίζουν σύμπλοκο αυτές της οικογένειας *SIW14* και έτσι θα ληφθούν περισσότερες πληροφορίες για τη δράση τους με βάση τη δράση των υπόλοιπων πρωτεϊνών που θα συμμετέχουν στο σύμπλοκο.

IIA) Η ζύμη ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη του μεταβολισμού χαλκού και σιδήρου

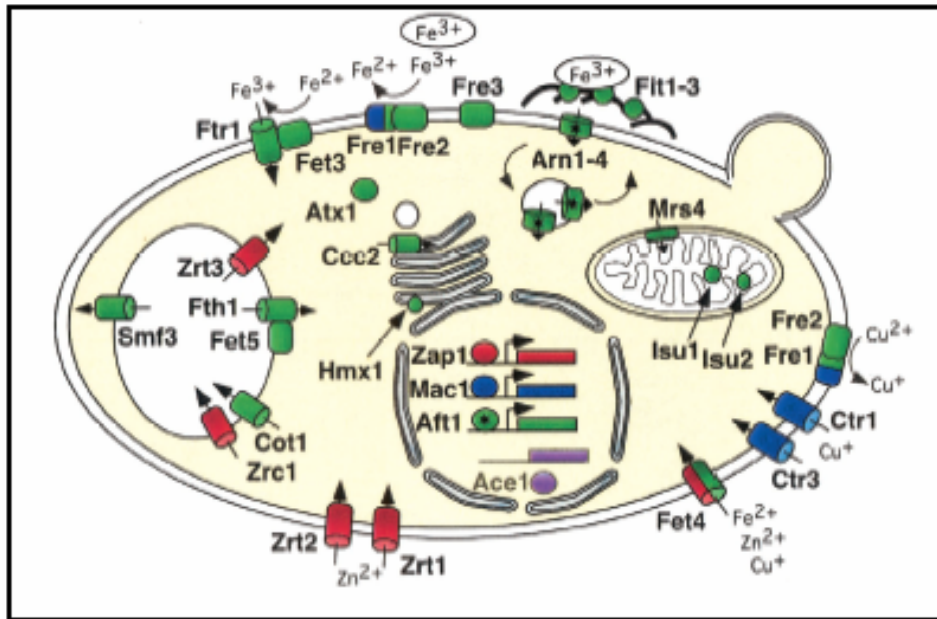
Ο σίδηρος και ο χαλκός είναι δύο μέταλλα απαραίτητα για τη ζωή γιατί βρίσκονται ως προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών που καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις παίζοντας έτσι ουσιώδη ρόλο σε διαδικασίες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Ωστόσο, τα μέταλλα αυτά μπορεί να γίνουν τοξικά για το κύτταρο εάν

τα επίπεδα και η κατανομή τους δεν είναι σωστά ρυθμιζόμενα, οδηγώντας για παράδειγμα, στη δημιουργία τοξικών ριζών οξυγόνου. Οι οργανισμοί θα πρέπει να διατηρούν τις κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις των μετάλλων σε επίπεδα μη τοξικά αλλά και ικανά για την φυσιολογική ανάπτυξη του κυττάρου και του οργανισμού. Για τη διατήρηση αυτής της ομοιόστασης, έχουν αναπτυχθεί πολύπλοκοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί συντηρημένοι εξελικτικά στους διάφορους οργανισμούς. Στη ζύμη υπάρχουν μεταλλορυθμιζόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες ικανοί να αντιληφθούν αλλαγές στη συγκέντρωση των μετάλλων και να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη, κατανομή και χρήση των μετάλλων.

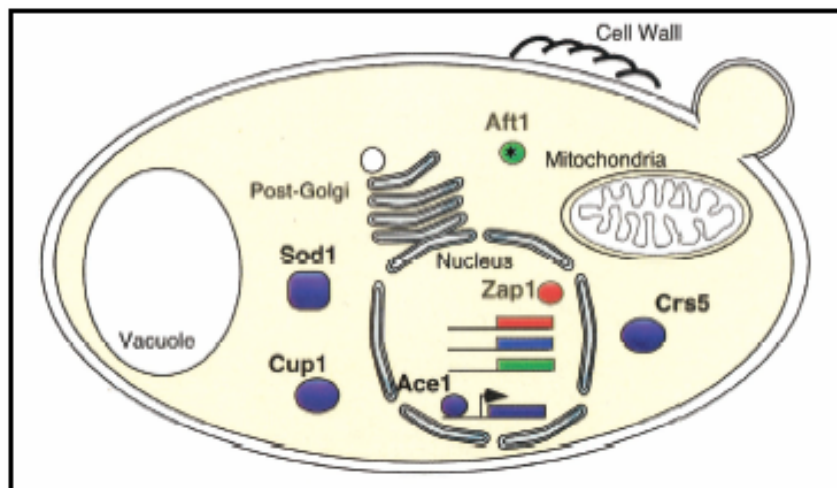
1) Μεταβολισμός σιδήρου

Η ζύμη περιέχει μια ποικιλία γονιδίων των οποίων η μεταγραφή επάγεται ως απόκριση σε χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου και κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με την πρόσληψη σιδήρου από την επιφάνεια του κυττάρου. Ο ελεύθερος σίδηρος εισέρχεται στο κύτταρο μέσω υψηλής αλλά και χαμηλής συγγένειας μεταφορικά συστήματα (πρωτεΐνες Fet3, Ftr1 και Fet4) (Dix et al., 1994; Stearman et al., 1996) (Εικ. 2). Το υψηλής συγγένειας σύμπλοκο περιλαμβάνει την φεροξειδάση Fet3 η οποία απαιτεί τον χαλκό ως συμπαράγοντα. Έτσι, τα γονίδια που εμπλέκονται στη μεταφορά του χαλκού σε αυτήν την πρωτεΐνη (*ATX1* και *CCC2*) ρυθμίζονται σε μεταγραφικό επίπεδο από τον σίδηρο. Για την υψηλής συγγένειας πρόσληψη σιδήρου απαιτείται η ύπαρξη στην κυτταρική επιφάνεια δράσης αναγωγάσης του σιδήρου (Dancis et al., 1990; Dancis et al., 1992) ρόλο τον οποίο παίζουν κατά κύριο λόγο 2 φλαβοκυτοχρώματα, τα Fre1 και Fre2, τα οποία ανάγουν τον σίδηρο ώστε υπό αυτή τη μορφή να εισέλθει στο κύτταρο (Georgatsou et al., 1994; Georgatsou et al., 1997) (Εικ. 2). Ουσιαστικά, ο ανηγμένος σίδηρος παγιδεύεται από το σύμπλοκο Fet3/Ftr1 και οξειδώνεται και πάλι από την Fet3 οξειδάση για να μεταφερθεί στη συνέχεια μέσω της Ftr1 περμεάσης στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης (Stearman et al., 1996) (Εικ. 2). Η ζύμη μπορεί να προσλάβει σίδηρο και μέσω σιδηροφόρων, τα οποία είναι χαμηλού μοριακού βάρους οργανικά μόρια που δεσμεύουν ειδικά τον σίδηρο. Τα σιδηροφόρα δεν παράγονται από τη ζύμη αλλά προσλαμβάνονται από μια οικογένεια μεταφορέων (Arn1-Arn4) που ανακυκλώνονται μεταξύ κυτταρικής επιφάνειας και ενδοσώματος (Yun et al., 2000) (Εικ. 2). Ο σίδηρος των σιδηροφόρων μπορεί να αναχθεί από τις αναγωγάσες της επιφάνειας του κυττάρου (Fre1-Fre4),

ώστε στην ανηγμένη του μορφή να αποτελέσει υπόστρωμα για το σύμπλοκο Fet3/Ftr1 (Yun et al., 2000). Οι μαννοπρωτεΐνες Fit1-Fit3 διευκολύνουν την πρόσληψη σιδηροφόρων στρατολογώντας τα στο κυτταρικό τοίχωμα. Άλλα γονίδια που επάγονται μεταγραφικά σε χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου περιλαμβάνουν τις Fet5, Fth1, Smf3 που κωδικοποιούν για κενοτοπικά μεταφορικά συστήματα, τον μιτοχονδριακό μεταφορέα Mrs4 και τις Isu1 και Isu2 πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των clusters Fe-S.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ομοίωση των μετάλλων στην *S. cerevisiae* σε συνθήκες έλλειψης του μετάλλου (Cu, Fe, Zn)



ΕΙΚΟΝΑ 3: Πρωτεϊνικά προϊόντα μεταλλορυθμιζόμενων γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοίωση των μετάλλων στην *S. cerevisiae* σε συνθήκες περίσσειας του μετάλλου.

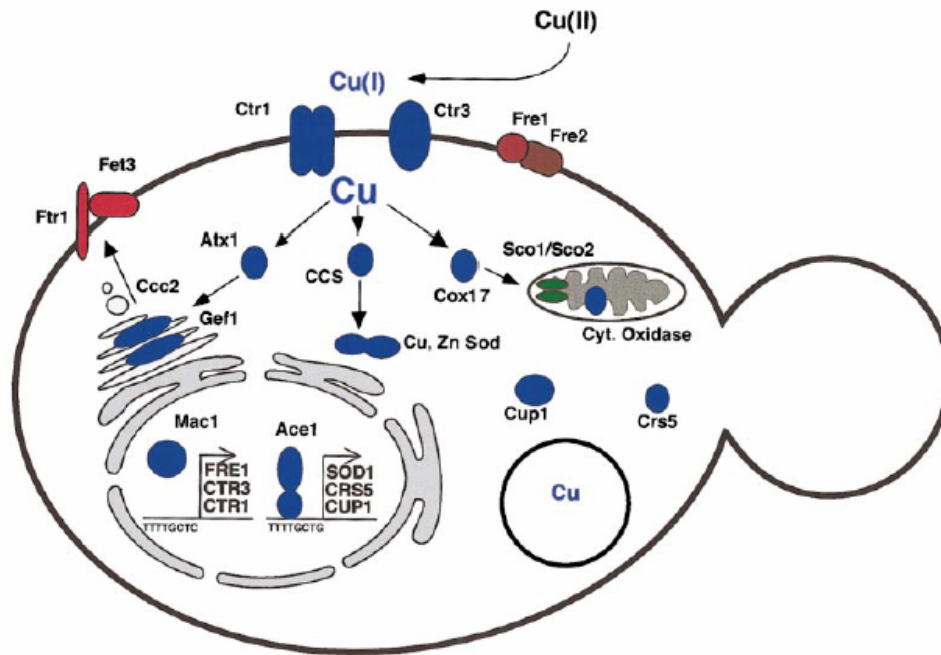
Οι πρωτεΐνες που παράγονται από γονίδια που επάγονται από Aft1 φαίνονται με πράσινο χρώμα (Ftr1, Fet3, Fre1, Fre2, Fre3, Flt1-3, Arn1-4, Mrs4, Fet4, Ccc2, Atx1, Isu1-2, Smf3, Fth1, Fet5, Cot1), αυτές που επάγονται από Mac1 φαίνονται με μπλε χρώμα (Fre1, Ctr1, Ctr3) αυτές που επάγονται από Zap1 (επαγωγή σε συνθήκες έλλειψης ψευδαργύρου) φαίνονται με κόκκινο χρώμα (Zrt1-3, Zrc1, Fet4) και με μωβ αυτές που επάγονται από Ace1 (Cup1). Ο προσδεδεμένος σε σιδηροφόρα σίδηρος είναι κυκλωμένος, ενώ με αστερίσκο σημειώνονται οι πρωτεΐνες που μετακινούνται εξαρτώμενα από σίδηρο. Σημειώνονται επίσης τα ιόντα μετάλλων ως προς τα οποία εξειδικεύονται οι πρωτεΐνες.

Η σιδηροεξαρτώμενη ρύθμιση γονιδίων στη ζύμη γίνεται από 2 μεταγραφικούς παράγοντες ενεργοποιητές της μεταγραφής (τους **Aft1** και **Aft2**, Activators of ferrous transport) οι οποίοι ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων όταν ο σίδηρος βρίσκεται σε έλλειψη. Επομένως η έλλειψη των παραγόντων αυτών οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν (Casas et al., 1997; Rutherford et al., 2001; Yamaguchi-Iwai et al., 1995; Yamaguchi-Iwai et al., 1997) (Για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε παρακάτω στην Εισαγωγή και στο Παράρτημα II όπου παρατίθεται κατάλογος με τα γονίδια που ρυθμίζονται από Aft1 και Aft2).

2) Μεταβολισμός χαλκού

Στην περίπτωση του χαλκού, υπάρχουν επίσης παράγοντες που ενεργοποιούνται ως απόκριση στην έλλειψη χαλκού και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πρόσληψη χαλκού ή/και στην προστασία από την τοξικότητά του. Η πρόσληψη του χαλκού γίνεται από το σύστημα υψηλής συγγένειας μεταφοράς χαλκού που προϋποθέτει την αναγωγή του Cu από δισθενή σε μονοσθενή. Η αναγωγή αυτή γίνεται από τις αναγωγάσες Fre1 και Fre2 και στη συνέχεια τα ιόντα χαλκού μεταφέρονται κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης μέσω των μεταφορέων Ctr1 και Ctr3. Η Ctr1 επάγεται μεταγραφικά σε συνθήκες έλλειψης χαλκού και αποδομείται σε συνθήκες περίσσειας χαλκού. Η Ctr3 ταυτοποιήθηκε ως μεταλλαγή/καταστολέας που συμπληρώνει τους φαινοτύπους έλλειψης χαλκού της μεταλλαγής *ctr1*. Ctr1 και Ctr3 αλληλεπικαλύπτονται ως προς τη λειτουργία τους.

Από τη στιγμή που ο χαλκός θα εισέλθει στο κύτταρο δεν παραμένει ελεύθερος ως ιόν αλλά δεσμεύεται από μικρές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που αποτελούν μοριακές συνοδούς χαλκού και οι οποίες παραδίδουν το χαλκό σε συγκεκριμένα μόρια ή υποκυτταρικά διαμερίσματα. Στην Εικ. 4 φαίνονται σχηματικά τα μονοπάτια μεταφοράς χαλκού.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Μονοπάτια μεταφοράς χαλκού στη ζύμη

Η **Atx1** μεταφέρει χαλκό στο εκκριτικό μονοπάτι αλληλεπιδρώντας αρχικά με την Ccc2 ATPάση του trans-Golgi δικτύου, στη συνέχεια ο χαλκός ενσωματώνεται στην οξειδάση Fet3 με τη βοήθεια της Gef1 η οποία λειτουργεί ως κανάλι ανιόντων παρέχοντας ιόντα Cl⁻ ώστε να είναι δυνατή η μεταφορά κατιόντων χαλκού στο trans-Golgi δίκτυο όπου το pH είναι όξινο. Η Ccs μεταφέρει χαλκό στην Cu/Zn υπεροξειδική δισμουτάση (SOD, Super Oxide Dismutase) και η N-τελική της περιοχή μοιάζει με την Atx1 που περιέχει μοτίβο πρόσδεσης μετάλλου. Η Cox17 συμβάλλει στη μεταφορά του χαλκού στα μιτοχόνδρια και ειδικότερα στην οξειδάση του κυτοχρώματος. Κινείται μεταξύ κυτταροπλάσματος και ενδομεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου, ενώ η Sco1 πιθανώς βοηθά στη μεταφορά χαλκού από την Cox17 στην οξειδάση του κυτοχρώματος μέσω μοτίβου πρόσδεσης χαλκού που περιλαμβάνει. Ο κύριος μηχανισμός άμυνας απέναντι στην τοξικότητα της περίσσειας του χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου γίνεται μέσω της μεταλλοθειονίνης **Cup1** που απομονώνει ελεύθερο χαλκό στο κυτταρόπλασμα αλλά και της μεταλλοθειονίνης **Crs5**. Ένας άλλος μηχανισμός αποτοξίνωσης είναι η αποθήκευση χαλκού σε κενοτόπιο ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί αργότερα σε συνθήκες έλλειψης χαλκού (αυτό γίνεται πιθανώς από την πρωτεΐνη Ctr2).

Η ρύθμιση του μεταβολισμού του χαλκού γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο από 2 κυρίως μεταγραφικούς παράγοντες: τον Ace1 (Cup2) που ενεργοποιεί σε συνθήκες περίσσειας χαλκού τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την αποθήκευση ή την απομάκρυνσή του χαλκού και τον Mac1 που ενεργοποιεί σε συνθήκες έλλειψης χαλκού τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με πρόσληψη χαλκού.

Ο μεταγραφικός παράγοντας **Ace1** ρυθμίζει την επαγωγή του γονιδίου **CUP1** (Εικ. 3) που κωδικοποιεί για μια μεταλλοθειονίνη που προσδένει χαλκό εμποδίζοντας την τοξική δράση του σε περιπτώσεις περίσσειας αυτού (Butt et al., 1984; Fogel et

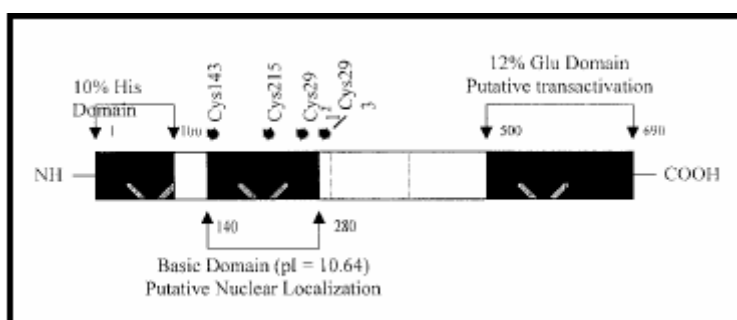
al., 1982; Winge et al., 1985). Ο παράγοντας Ace1 ρυθμίζει επίσης και την έκφραση του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης *CRS5* και του γονιδίου της υπεροξειδικής δισμουτάσης χαλκού και ψευδαργύρου *SOD1* (Culotta et al., 1994; Gralla et al., 1991) το πρωτεϊνικό προϊόν της οποίας μετατρέπει τις τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου σε H₂O₂ που με τη σειρά του αποτοξινώνεται με καταλάση σε νερό.

Σε περιπτώσεις έλλειψης χαλκού, ο παράγοντας **Mac1** προστατεύει τα κύτταρα από την έλλειψη χαλκού ενεργοποιώντας την έκφραση συστημάτων πρόσληψης χαλκού που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *CTR1* και *CTR3* (Εικ. 2). Ο Mac1 ρυθμίζει επίσης την έκφραση της αναγωγάσης Fe³⁺/Cu²⁺ Fre1 της επιφάνειας του κυττάρου, καθώς και μιας πιθανής αναγωγάσης άγνωστου εντοπισμού της Fre7 (Geargatsou et al., 1997; Martins et al., 1998). Επίσης, η μετα-μεταφραστική αποδόμηση της Ctr1 σε συνθήκες περίσσειας χαλκού απαιτεί Mac1 (Yonkovich et al., 2002). Ένας κατάλογος των γονιδίων που ρυθμίζονται από Mac1 και Ace1 βρίσκεται στο Παράρτημα II. Έχουν επίσης γίνει πειράματα με DNA μικροσυστοιχίες σε *mac1Δ* στελέχη για να βρεθούν τα γονίδια των οποίων η μεταγραφή μεταβάλλεται (de Freitas et al., 2004) καθώς και πειράματα για ταυτοποίηση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τα επίπεδα χαλκού (Gross et al., 2000). Ο Mac1 ρυθμίζει την απόκριση σε έλλειψη χαλκού προσδεδεμένος ως ομοδιμερές, σε συγκεκριμένα *cis* στοιχεία (CuREs, copper responsive *cis*-acting elements) (Jamison et al., 1999; Joshi et al., 1999; Labbe et al., 1997; Serpe et al., 1999; Yamaguchi-Iwai et al., 1997). Ο Mac1 δρα ως ομοδιμερής (Heredia et al., 2001; Joshi et al., 1999; Serpe et al., 1999), ενώ είναι ενεργός και ως μονομερές (Voutsina et al. 2001). Επίσης, ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης (για βέλτιστη πρόσδεση στα CuREs), ενώ σε περίσσεια χαλκού ο Mac1 καθίσταται ανενεργός λόγω του ότι η περιοχή ενεργοποίησης και η περιοχή πρόσδεσής του στο DNA αλληλεπιδρούν με αποτέλεσμα να χάνουν και οι δύο τη λειτουργικότητά τους. Παρουσία χαλκού η ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων στόχων του Mac1 μειώνεται δραματικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο Mac1, σε αντίθεση με τον Aft1, εντοπίζεται συνεχώς στον πυρήνα ανεξάρτητα από το αν ο χαλκός βρίσκεται σε περίσσεια ή έλλειψη. Επίσης, σε περίσσεια χαλκού έχει βρεθεί και αποδόμηση του Mac1 (Zhu et al., 1998).

3) Ο μεταγραφικός παράγοντας Aft1

Παρόλο που ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ανάπτυξη της ζύμης, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι υψηλά κυτταροτοξικός

παράγοντας. Για τον έλεγχο της ομοιόστασης του σιδήρου, η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχει 2 παράλογα γονίδια που κωδικοποιούν για τους αποκρινόμενους σε σίδηρο μεταγραφικούς ενεργοποιητές Aft1 και Aft2 (Activator of Ferrous Transport 1 & 2), οι οποίοι παίζουν ρόλους κλειδιά στην απόκριση σε έλλειψη σιδήρου, αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταφορά του σιδήρου και την υποκυτταρική κατανομή και χρησιμοποίησή του (Rutherford et al., 2004). Το γονίδιο *AFT1* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 98kDa η οποία είναι πλούσια σε ιστιδίνες στο N-τελικό της άκρο και πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμίνης στο C-τελικό άκρο. Στην Εικ. 5 φαίνεται η δομή της πρωτεΐνης.



ΕΙΚΟΝΑ 5: Δομή του μεταγραφικού παράγοντα Aft1 (από De Freitas et al., 2003)

Εκτός από την πλούσια σε His N-τελική περιοχή και την πλούσια σε Glu C-τελική περιοχή διακρίνεται επίσης μια βασική περιοχή με 4 κατάλοιπα Cys πιθανώς υπεύθυνα για τον πυρηνικό εντοπισμό (NLSs), ενώ προσδένει και σίδηρο. Η είσοδος στον πυρήνα ρυθμίζεται και από μια άμεση αλληλεπίδραση με τον παράγοντα Pse1 (Ueta et al., 2003). Η C-τελική περιοχή είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής μιας σειράς γονιδίων κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου.

Ο μεταγραφικός παράγοντας **Aft1** εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες επάρκειας σιδήρου και στον πυρήνα σε κύτταρα που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου, όπου προσδέεται στο DNA ενεργοποιώντας τη μεταγραφή μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη σιδήρου από την πλασματική μεμβράνη. Τέτοια γονίδια είναι αυτά που κωδικοποιούν για το υψηλής συγγένειας μεταφορικό σύμπλοκο Fe^{+2} που αποτελείται από τα γονίδια *FET3* (οξειδάση), *Ftr1* (περμεάση σιδήρου) (Askwith et al., 1994; Stearman et al., 1996), το γονίδιο *CCC2* (P-type ATPάση υπεύθυνη για τη μεταφορά χαλκού στην Fet3p) (Yuan et al., 1995), τα γονίδια για τις μεταλλοαναγωγάσες (*FRE1-FRE4*) της πλασματικής μεμβράνης (Georgatsou et al., 1999; Yun et al., 2001), τα γονίδια (*ARN1-ARN4*) για τους μεταφορείς σιδηροφόρων

(Yun et al., 2000; Lesuisse et al., 2001), και γονίδια για μαννοπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος που διευκολύνουν την πρόσληψη σιδήρου από σιδηροφόρα (*FIT1-FIT3*). Ο παράγοντας Aft1 σχετίζεται επίσης και με την ενεργοποίηση και άλλων γονιδίων όπως το *FTH1* που κωδικοποιεί για κενοτοπικό μεταφορέα σιδήρου, άλλα γονίδια της οικογένειας *FRE* (*FRE5* και *FRE6*), καθώς και το *CTH2* γονίδιο που σχετίζεται με την αποδόμηση του mRNA σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Puig et al., 2005). Στην Εικ. 6 φαίνονται τα γονίδια στόχοι του Aft1 μεταγραφικού παράγοντα.

Gene	Function
FRE1	Ferric reductase involved in iron uptake
FRE2	Ferric reductase involved in iron uptake
FET3	Cuproprotein involved in high affinity iron uptake
CCC2	PATPase Cu transporter, delivers Cu to Fet3p
FTR1	High affinity iron permease
FTH1	Vacuolar iron transport
FRE3	Siderophore-iron reductase
FRE4	Siderophore-iron reductase
FRE5	Homology to ferric reductase
FRE6	Homology to ferric reductase
ATX1	Cytosolic Cu chaperone responsible for delivering Cu to Fet3p
ARN1	Siderophore-mediated iron transport
ARN2/TAF1	Siderophore-mediated iron transport
ARN3/SIT1	Siderophore-mediated iron transport
ARN4/ENB1	Siderophore-mediated iron transport
YOR382w	Gp1-anchor glycoprotein involved in siderophore-mediated iron uptake
YOR383c	Gp1-anchor glycoprotein involved in siderophore-mediated iron uptake
YOR534c	Gp1-anchor glycoprotein involved in siderophore-mediated iron
YLR136c	Post-transcriptional regulator of iron responsive genes
ISU1	Mitochondrial assembly of iron sulfur clusters
ISU2	Mitochondrial assembly of iron sulfur clusters
FET5*	Vacuolar iron transport
YLR205c**	Homology to heme oxygenase

ΕΙΚΟΝΑ 6: Γονίδια στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα Aft1 (από De Freitas et al., 2003, τροποποιημένο)

Ο παράγοντας Aft1 (αλλά και ο Aft2), ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω ενός στοιχείου (αποκρινόμενου σε σίδηρο) που περιλαμβάνει την αλληλουχία 5'-PyPuCACCCPu-3' (Rutherford et al., 2003). Η αυτορύθμιση του Aft1 (έχει βρεθεί *in vivo* ότι προσδένεται στον υποκινητή του) ίσως επηρεάζει το μεταγραφικό έλεγχο που ασκεί (Lee et al., 2002). Ο μηχανισμός με τον οποίο ο Aft1 (και ο Aft2) αντιλαμβάνονται τον σίδηρο δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Ο εντοπισμός του Aft1 τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα είναι ουσιώδης για την ικανότητα ενός κυττάρου να αντιλαμβάνεται το σίδηρο. Το σήμα ωστόσο που αλλάζει την ισορροπία του εντοπισμού του Aft1 που καταλήγει στην μετατόπισή του

στον πυρήνα δεν είναι γνωστό. Η αναστολή της δράσης του Aft1 (και του Aft2) έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από ένα σήμα από το μιτοχόνδριο στη μεταφορά του οποίου συμμετέχει ο μεταφορέας της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου Atm1 (συμμετοχή του μονοπατιού βιογένεσης Fe-S του Fe-S cluster). Ωστόσο, ο παράγοντας Aft1 έχει πρόσφατα βρεθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τις αντιοξειδωτικές πυρηνικές γλουταρεδοξείνες Grx3 και Grx4 οι οποίες απομακρύνουν γλουταθειόνες από πρωτεΐνες (οι οποίες σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό με τις γλουταθειόνες) (Ojeda et al., 2006). Η αλληλεπίδραση αυτή είναι κρίσιμη για την αναστολή του Aft1. Η αναστολή του Aft1 παρουσία σιδήρου απαιτεί ένα μιτοχονδριακό σήμα σιδήρου που εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του Atm1 μεταφορέα (Rutherford et al., 2005). Δεν είναι γνωστό το πώς ο Aft1 αντιλαμβάνεται το σήμα αυτό και πού γίνεται αυτή η αντίληψη αλλά έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ Aft1 και Grx3/Grx4 μέσα στον πυρήνα προδιαθέτει τον Aft1 στο να αντιληφθεί το ανασταλτικό σήμα. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση αυτή δεν είναι το ανασταλτικό σήμα αφού δε ρυθμίζεται από το ποσό του σιδήρου. Το ανασταλτικό σήμα μάλλον προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στον Aft1 η οποία αποσταθεροποιεί την DNA πρόσδεση και επάγει την έξοδο από τον πυρήνα. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι οι Grx3/Grx4 μπορεί να βρίσκονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (Shenton et al., 2002). Ίσως με τον τρόπο αυτό να μεταφέρουν το ανασταλτικό σήμα από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα και έτσι να αναστέλλεται ο Aft1 σε περίσσεια σιδήρου. Εναλλακτικά, ίσως η περιορισμένη ποσότητα Grx3/Grx4 στο κυτταρόπλασμα σε περίσσεια σιδήρου παγιδεύει τον Aft1 στο κυτταρόπλασμα και έτσι αναστέλλει τη δράση του.

Άλλα πειράματα έχουν δείξει ότι ο Aft1 μεταγραφικός παράγοντας εντοπίζεται στον υποκινητή του Mac1-ρυθμιζόμενου γονιδίου *CTR1*, ενώ απουσιάζουν οι γνωστές αλληλουχίες πρόσδεσης του Aft1 (FeREs) (Γιώργος Φραγκιαδάκης), καθώς και ότι ο Aft1 αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη Rad9 (Καλλιόπη Γκούσκου) (Βλ. παρακάτω).

Τα στελέχη *aft1Δ* είναι βιώσιμα αλλά εμφανίζουν σημαντικό πρόβλημα στην ανάπτυξη σε οξειδωτικές συνθήκες, ενώ και τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον Aft1 παρουσιάζουν προβλήματα στην έκφραση. Τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται πολύ αργά σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Έχει επίσης δείχτει ότι η έλλειψη είτε του Aft1 είτε του Aft2 οδηγεί σε μια αύξηση του άλλου παραλόγου εξαρτώμενη από σίδηρο

(Courel et al., 2005). Αυτό υποδεικνύει μερική επικάλυψη της λειτουργίας των δύο πρωτεϊνών.

Ο μεταγραφικός παράγοντας **Aft2** παρουσιάζει 39% ομοιότητα με τον Aft1 και κωδικοποιεί για μια μικρότερη πρωτεΐνη 47kDa. Όπως ο Aft1, έτσι και ο Aft2 έχει κατάλοιπα Cys στα οποία πιθανώς προσδένεται ο σίδηρος ή η σιδηρούχα ένωση (Fe-S). Τα *aft2Δ* στελέχη είναι βιώσιμα αλλά με μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης σε πλούσιο θρεπτικό μέσο YPD και δεν εμφανίζουν φαινότυπο εξαρτώμενο από σίδηρο. Τα διπλά μεταλλάγματα *aft1Δaft2Δ* είναι περισσότερο ευαίσθητα κατά την ανάπτυξη σε συνθήκες μειωμένου σιδήρου (Rutherford et al., 2001) καθώς και σε οξειδωτικό περιβάλλον (H₂O₂, Blaiseau et al., 2001).

Για τους Aft1 και Aft2 παράγοντες έχουν γίνει και πειράματα με μικροσυστοιχίες DNA για να γίνει διάκριση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον έναν και τον άλλον παράγοντα (Rutherford et al., 2003).

IIΒ) Η πρωτεΐνη Rad9

Η πρωτεΐνη Rad9 αποτελεί την πρωτότυπη πρωτεΐνη ελέγχου της καταστροφής του DNA. Ωστόσο, με πειράματα με το σύστημα των δύο υβριδίων (Αλεξάνδρα Βουτσινά) και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Καλλιόπη Γκούσκου) βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον Mac1 μεταγραφικός παράγοντα. Επίσης έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά και με τον Aft1 (Καλλιόπη Γκούσκου). Αυτό προσδίδει μια νέα διάσταση στη δράση της Rad9 πρωτεΐνης, αφού εκτός από πρωτεΐνη ελέγχου πιθανώς εμπλέκεται και με τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με μεταλλορύθμιση.

1) Σημεία ελέγχου καταστροφής DNA στη ζύμη (DNA damage checkpoints)

Η βλάβη στο γενωμικό DNA είναι ένα σημαντικό και συνεχές πρόβλημα για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Περιβαλλοντικά μεταλλαξιγόνα, ιονίζουσα ακτινοβολία, ακόμα και ο οξειδωτικός μεταβολισμός μέσα στα ίδια τα κύτταρα μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA. Αυτό οδηγεί σε ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, όπως αλλαγή στην έκφραση διαφόρων γονιδίων, σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (Zhou et al., 2000). Αν το

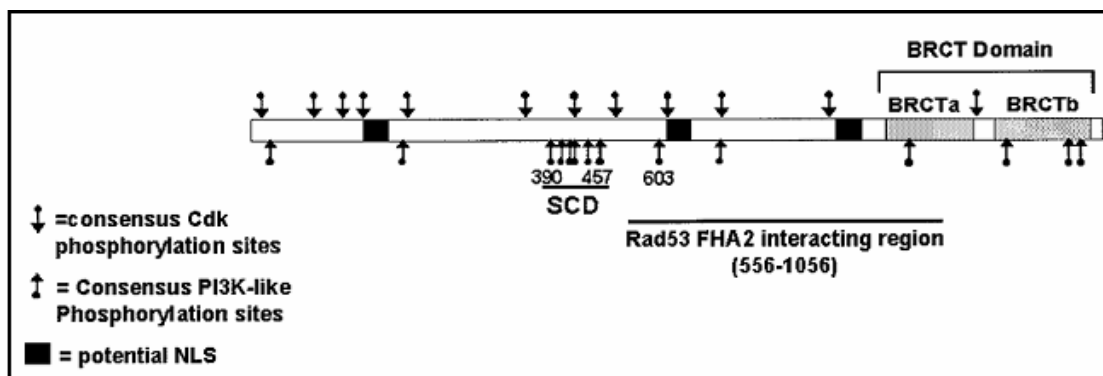
DNA δεν επισκευαστεί, διάφορες μεταλλαγές και σπασίματα του DNA μπορεί να εμπλακούν σε διαδικασίες όπως η αντιγραφή του DNA, η γονιδιακή μεταγραφή και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων.

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς επιβίωσης (σημεία ελέγχου βλάβης του DNA, DNA-damage checkpoints) που αντιλαμβάνονται τις βλάβες που συμβαίνουν στο γονιδίωμα και αποκρίνονται σε αυτές. Αυτά τα μονοπάτια ελέγχου της βλάβης του DNA διασφαλίζουν συντονισμένες κυτταρικές αποκρίσεις στις βλάβες του DNA μέσω καθυστέρησης των κυτταρικών κύκλων και ενεργοποίησης μηχανισμών επιδιόρθωσης που περιλαμβάνουν μεταγωγή συγκεκριμένου σήματος σε downstream μόρια, ώστε να ολοκληρωθεί η κυτταρική απόκριση σε βλάβη του DNA. Επίσης, τα σημεία ελέγχου μειώνουν τη συχνότητα της μεταλλαξιγένεσης, τη γενωμική αστάθεια και τη θνησιμότητα των κυττάρων που προκύπτουν από καταστροφή του DNA με το να ρυθμίζουν άμεσα τη δραστηριότητα των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA.

Αφού το κατεστραμμένο DNA γίνει αντιληπτό, ξεκινά μια εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία αντιδράσεων που περιλαμβάνει κινάσες της οικογένειας των PIKKs (phosphoinositide 3-kinase-like kinases) μεταξύ των οποίων οι Mec1 και Tel1 (Abraham et al., 2001; Durocher et al., 2001). Αυτές οι κινάσες ελέγχουν την ενεργοποίηση δύο τάξεων σηματοδοτικών κινασών ελέγχου, των Chk1 και Rad53 (Rhind et al., 2000; Sanchez et al., 1999; Sancez et al 1996; San et al., 1996). Στην περίπτωση της ζύμης, η καταστροφή του DNA καταλήγει σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και/ή στην G2 φάση, αλλά και σε καθυστέρηση της φάσης S (Paulovich et al., 1995). Ο γενετικός έλεγχος της καθυστέρησης του κυτταρικού κύκλου αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Weinert και Hartwell (1988), οι οποίοι έδειξαν ότι το γονίδιο *RAD9* απαιτείται για σταμάτημα στην G₂/M φάση ύστερα από ιονίζουσα ακτινοβολία. Το ίδιο γονίδιο έχει βρεθεί να εμπλέκεται και στα G1/S (Siede et al., 1993; Siede et al., 1994) και S σημεία ελέγχου (Paulovich et al., 1997). Μετέπειτα γενετικές αναλύσεις αναγνώρισαν έξι επιπλέον γονίδια, τα *RAD53*, *MEC1*, *RAD17*, *RAD24*, *MEC3* και *DDC1*, τα οποία απαιτούνται για τα G1/S, S και G2/M σημεία ελέγχου (Elledge, 1996; Longhese et al., 1997).

2) Rad9: η πρωτότυπη πρωτεΐνη ελέγχου της καταστροφής του DNA

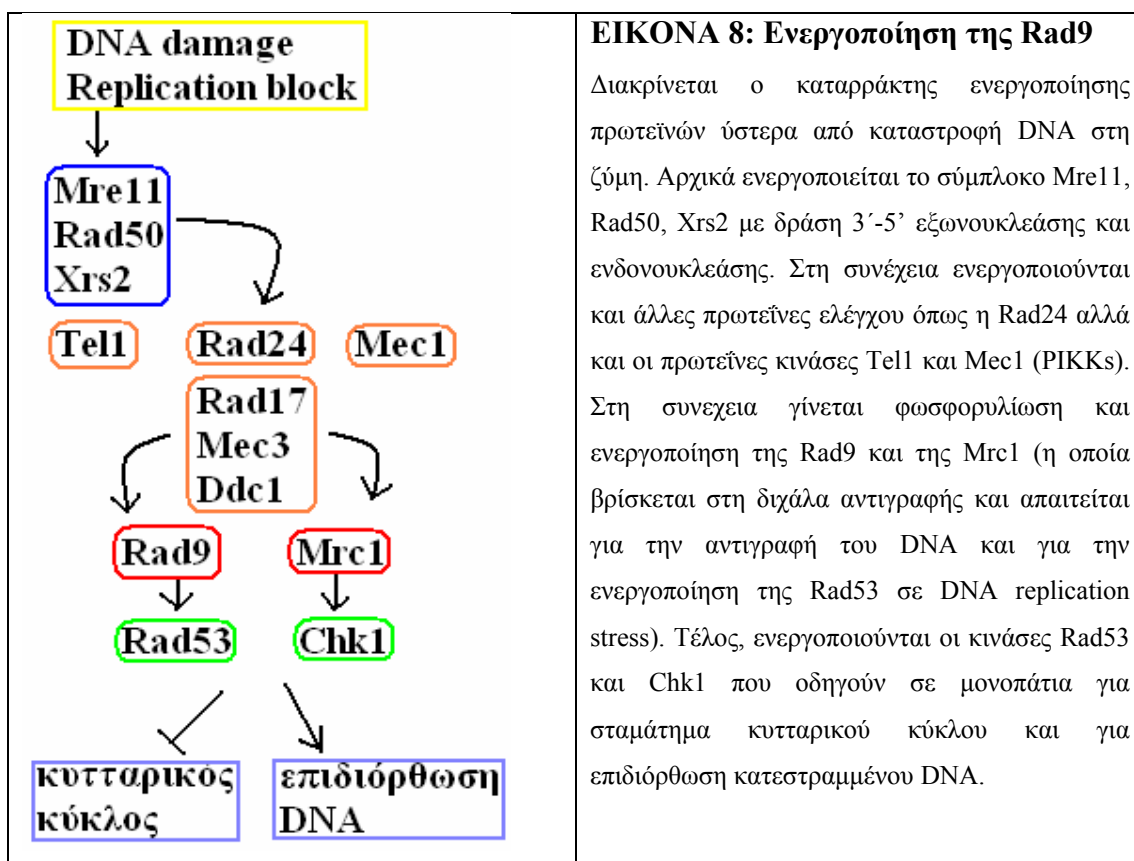
Το γονίδιο ελέγχου *RAD9* απαιτείται για τον έλεγχο της καταστροφής του DNA σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Paulovich et al., 1995; Siede et al., 1993) και απώλειά του διαταράσσει το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου που επάγεται λόγω βλάβης του DNA, ενώ αυξάνεται και η γενωμική αστάθεια (Weinert et al., 1988; Weinert et al., 1990). Η πρωτεΐνη Rad9 αποτελείται από 1309 αμινοξέα και η μοριακή της μάζα είναι 148.4kDa. Περιλαμβάνει τέσσερις χαρακτηριστικές περιοχές οι οποίες από το N- προς το C-τελικό άκρο είναι: α) η CAD [α 40-200] (Chk1 activation domain), β) [α 390-458] η SCD (S/T Cluster Domain) που περιλαμβάνει κατάλοιπα Ser και Thr που φωσφορυλιώνονται ως απόκριση σε καταστροφή DNA (και τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα αυτής αλληλεπιδρούν με τη Rad53, Βλ. παρακάτω), γ) [α 782-906] η περιοχή TUDOR μέσω της οποίας η Rad9 αναγνωρίζει μεθυλιωμένες ιστόνες και δ) η BRCT [α 998-1309] (Breast Cancer associated C-terminus) η οποία απαιτείται για τον ολιγομερισμό της Rad9 ως απόκριση σε καταστροφή DNA (Soulier et al., 1999). Η C-τελική της περιοχή περιέχει τμήμα με παρόμοια αλληλουχία με την BRCA1 πρωτεΐνη καταστολέα των θηλαστικών που περιέχει διαδοχικές επαναλήψεις του μοτίβου BRCT. Στην Εικ. 7 φαίνεται η δομή της πρωτεΐνης Rad9.



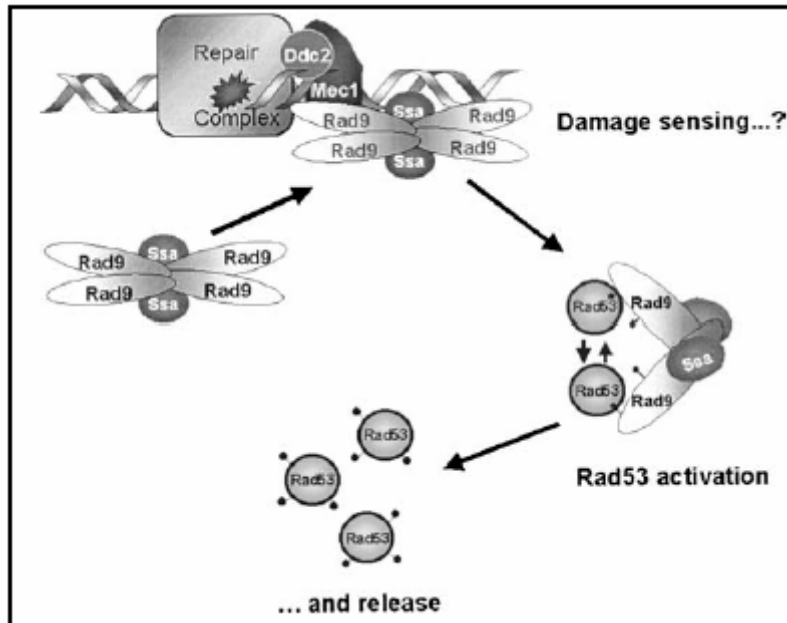
ΕΙΚΟΝΑ 7: Δομή της πρωτεΐνης Rad9 της ζύμης (από Toh et al., 2003).

Η πρωτεΐνη Rad9 της *S. cerevisiae* αποτελείται από 1309 αμινοξέα και προβλεπόμενη μοριακή μάζα 148.4kDa. Διακρίνονται τα σημεία που είναι πιθανοί στόχοι για φωσφορυλίωση από κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (Cdk, cyclin-dependent kinases) (με βέλη προς τα κάτω), καθώς και από PIKKs (βλέπε κείμενο) (με τα βέλη προς τα πάνω). Για λεπτομέρειες Βλ. κείμενο. NLS=nuclear localization signal, PI3K=phosphoinositide 3-kinase, SCD=S/T cluster domain.

Στην Εικ. 8 περιγράφεται ο καταρράκτης ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Rad9.



Ένας επίσης σημαντικός ρόλος της Rad9 είναι στην ενεργοποίηση της Rad53. Εκτός από την Chk1, η Rad9 είναι υπεύθυνη και για την ενεργοποίηση της Rad53 ως απόκριση σε καταστροφή του DNA (Sanchez et al., 1999; Navas et al., 1996). Η καταστροφή του DNA (αλλά όχι και το μπλοκάρισμα της αντιγραφής) επάγει την Mec1/Tel1-εξαρτώμενη υπερφωσφορυλίωση της Rad9, και αυτή η υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της Rad9 αλληλεπιδρά ειδικά με τη Rad53 *in vivo* (Sun et al., 1998; Emili 1998; Vialard et al., 1998). Η Rad9, όπως φαίνεται και στην Εικ. 7, περιλαμβάνει 12 πιθανούς στόχους φωσφορυλίωσης από την Cdc28, την κύρια κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση της ζύμης, και δεκατέσσερις πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις PIKKs (βλέπε παραπάνω). Η Rad9 φωσφορυλιώνεται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου (Vialard et al., 1998) και υπερφωσφορυλιώνεται ύστερα από καταστροφή DNA με Mec1- ή/και Tel1-εξαρτώμενο τρόπο (Emili 1998; Vialard et al., 1998). Πολλοί PIKK στόχοι στο εσωτερικό της Rad9 έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνονται ως απόκριση σε καταστροφή και απαιτούνται για την Rad9-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της Rad53 (Schwartz et al., 2002). Ένα βιοχημικό μοντέλο για τη δράση της Rad9 φαίνεται στην Εικ. 9.

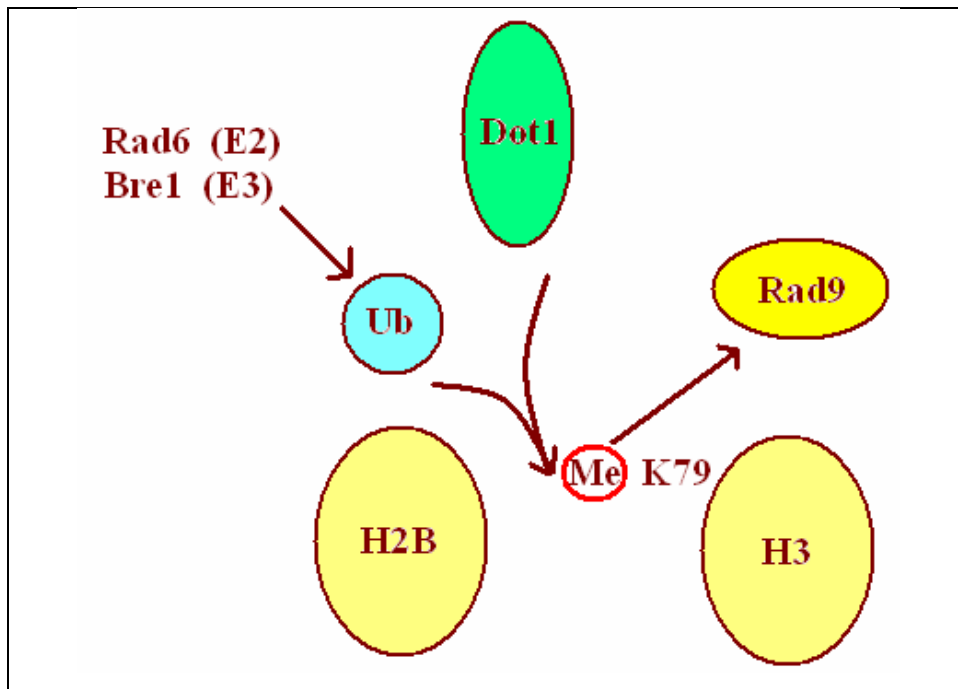


ΕΙΚΟΝΑ 9: Βιοχημικό μοντέλο για τη λειτουργία της Rad9 (Toh et al., 2003).

Η καταστροφή του DNA επάγει Mec1/Tel1 φωσφορυλίωση του Rad9 συμπλόκου (ολιγομερισμός της Rad9), που οδηγεί στην υπερφωσφορυλιωμένη μορφή του. Για την αλλαγή της διαμόρφωσης πιθανώς απαιτούνται σαπερόνες όπως οι Ssa1 και/ή Ssa2 (Stress Seventy subfamily). Η πρόσδεση υποφωσφορυλιωμένης Rad53 [μέσω των περιοχών της FHA] σε φωσφοκατάλοιπα που δημιουργούνται από τη Mec1 (PIKK) στην υπερφωσφορυλιωμένη Rad9 αυξάνει την τοπική συγκέντρωση της Rad53 σε επίπεδα που επιτρέπουν την *in trans* αυτοφωσφορυλίωσή της. Η Rad9 δρα σαν Mec1 προσδέτης για να επιτρέψει την ενεργοποίηση της Rad53. Ικανή φωσφορυλίωση της Rad53 επιτρέπει την απελευθέρωσή της από το σύμπλοκο Rad9, και αυτή η ενεργοποιημένη Rad53 στοχεύει ειδικά υποστρώματα που απαιτούνται για το ελεγχόμενο μονοπάτι του σταματήματος του κυτταρικού κύκλου και της αποτελεσματικής επιδιόρθωσης του DNA. Τα παραπάνω ενισχύονται και από άλλα πειράματα (Sweeney et al., 2005). Ddc2=DNA damage checkpoint 2.

Η Rad53 συμμετέχει επίσης και σε μηχανισμό που εμποδίζει τη συσσώρευση μη νουκλεοσωμικών ιστονών στο κύτταρο (Gunjan et al., 2003) και συγκεκριμένα απαιτείται για την μείωσή τους. Τα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η Rad53 είναι υπερευαίσθητα στην υπερέκφραση ιστονών και αποτυγχάνουν στο να αποδομούν την περίσσεια των ιστονών.

Η πρωτεΐνη Rad9 αναγνωρίζει και προσδέεται μέσω της περιοχής TUDOR σε μεθυλιωμένο κατάλοιπο K79 ιστόνης H3 με τρόπο που φαίνεται στην Εικ. 10 (Βλ. και ανασκόπηση Lydall and Whitehall, 2005).



ΕΙΚΟΝΑ 10: Μονοπάτι μεθυλίωσης H3K79 στη ζύμη

Μέσω του ενζύμου σύζευξης (E2) Rad6 και της E3 λιγάσης Bre1 γίνεται ουβικουιτινίωση στο κατάλοιπο K123 της ιστόνης H2B. Η μεθυλτρανσφεράση ιστονών Dot1 μεθυλιώνει το κατάλοιπο K79 της ιστόνης H3 ύστερα από καταστροφή του DNA. Η πρωτεΐνη Rad9 αναγνωρίζει το μεθυλιωμένο κατάλοιπο H3K79 μέσω της περιοχής της TUDOR και στρατολογείται για να δράσει ως απόκριση σε καταστροφή του DNA.

Αποτελέσματα-Συζήτηση:

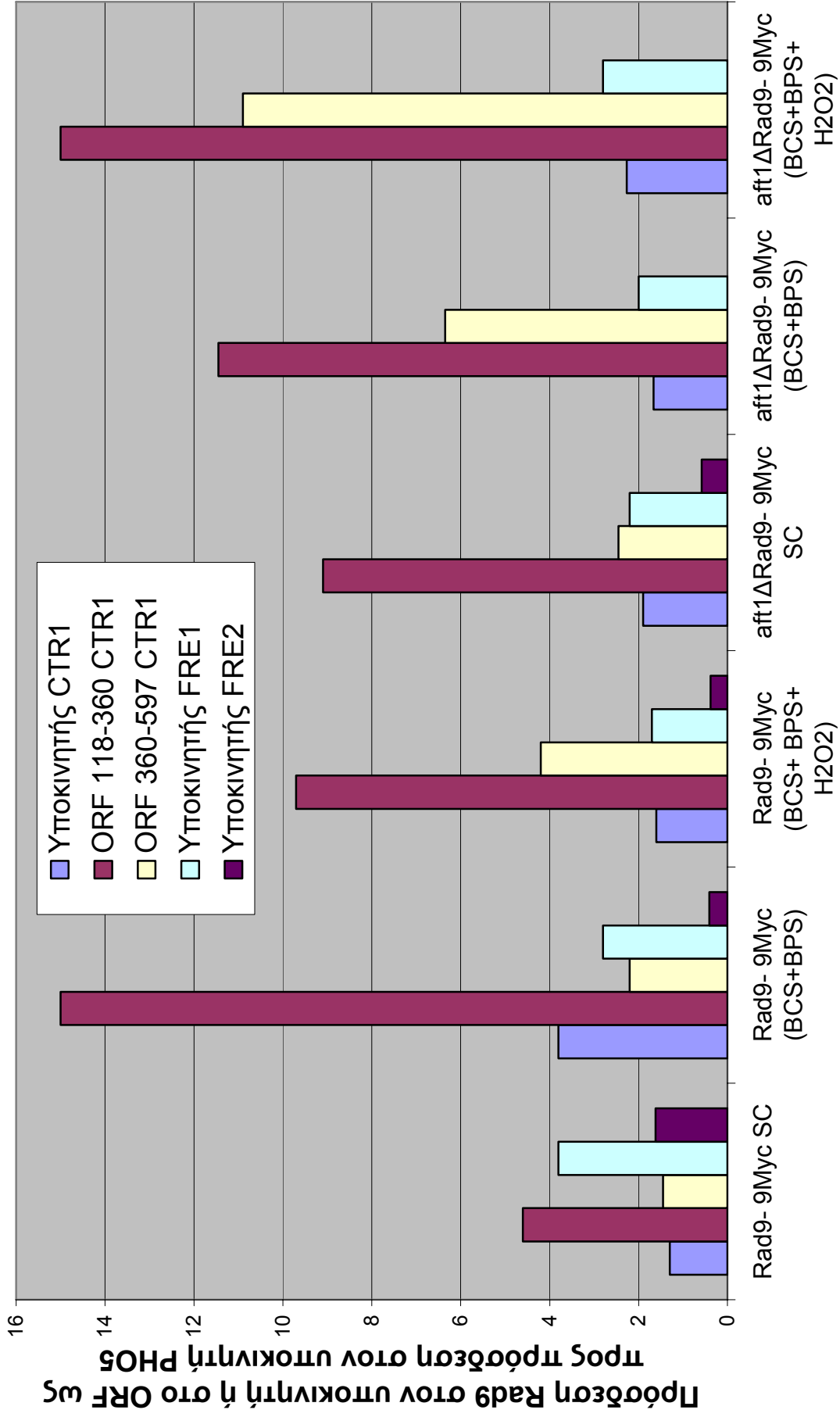
1) Μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ελέγχου Rad9 με τους μεταλλορυθμιζόμενους υποκινητές *FRE1*, *FRE2* και *CTR1*

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας μελετήθηκε η πιθανή πρόσδεση της πρωτεΐνης ελέγχου Rad9 στους υποκινητές των γονιδίων *CTR1*, *FRE1* και *FRE2* κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και κάτω από συνθήκες επαγωγή με BCS (ή BPS) και/ή H₂O₂ 0.3mM σε στελέχη αγρίου τύπου και σε *aft1Δ* στελέχη, από τα οποία απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας Aft1. Ειδικά για το γονίδιο *CTR1* μελετήθηκε και η πιθανή πρόσδεση της Rad9 σε περιοχές εσωτερικά του ανοιχτού πλαισίου διαβάσματος (ORF, κωδικεύουσα περιοχή) για να διαπιστωθεί αν η Rad9 μετακινείται εσωτερικά στην κωδικεύουσα περιοχή.

Τα πειράματα αυτά βασίστηκαν σε προηγούμενες παρατηρήσεις ότι α) η πρωτεΐνη Rad9 αλληλεπιδρά *in vivo* με τον μεταγραφικό παράγοντα Aft1 (Καλλιόπη Γκούσκου), β) ο Aft1 αλληλεπιδρά με τον χαλκορυθμιζόμενο υποκινητή του γονιδίου

CTR1 (Γιώργος Φραγκιαδάκης) και γ) πιθανώς ο Aft1 να επηρεάζει την πρόσδεση της πρωτεΐνης Rad9 στον υποκινητή του *CTR1* (Χρήστος Ανδρεάδης, Εργαστηριακή άσκηση rotation). Επίσης είχε βρεθεί ότι στην περίπτωση του υποκινητή του *FRE1* ο Aft1 επηρεάζει την πρόσδεση της Rad9, αφού απουσία του Aft1 η πρωτεΐνη Rad9 προσδένεται σε χαμηλότερο ποσοστό. Στην περίπτωση του υποκινητή του *FRE2* βρέθηκε ότι η Rad9 δεν κατεβαίνει σε σημαντικό ποσοστό σε κανένα στέλεχος (αγρίου τύπου ή *aft1Δ*) τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες επαγωγής [προηγούμενα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Χρήστος Ανδρεάδης, Εργαστηριακή άσκηση rotation)].

Στην παρούσα εργασία (σε συνεργασία με την Καλλιόπη Γκούσκου) πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που αναφέρονται παραπάνω για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων και επιπλέον να μελετηθεί η συμπεριφορά της Rad9 σε συνθήκες H₂O₂ ως προς την πρόσδεσή της στους υποκινητές *CTR1*, *FRE1* και *FRE2* αλλά και η πιθανή πρόσδεσή της στο εσωτερικό του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *CTR1*. Αναπτύχθηκαν καλλιέργειες στελεχών ζύμης που έφεραν Rad9-9Myc ή *aft1Δ* Rad9-9Myc σε θρεπτικό SC (με τα απαραίτητα αμινοξέα) κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και κάτω από συνθήκες επαγωγής (BCS και/ή BPS) (3 ώρες) και/ή H₂O₂ 0.3mM (20'). Με BCS γίνεται δέσμευση ιόντων χαλκού και επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με την πρόσληψη χαλκού, με BPS δεσμεύονται τα δισθενή κατιόντα σιδήρου (και χαλκού) ενώ με το H₂O₂ επάγεται οξειδωτικό στρες και εμπλοκή της Rad9. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-Myc και στη συνέχεια PCR πραγματικού χρόνου με εκκινητές για *CTR1* (στον υποκινητή και σε δύο περιοχές του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης), για *FRE1* και για *FRE2* (στον υποκινητή). Στην Εικ. 11 παρουσιάζεται το πείραμα όπου η επαγωγή έγινε με BCS και BPS.



Στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας

ΕΙΚΟΝΑ 11: Αποτελέσματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τη μελέτη της πρόσδεσης της πρωτεΐνης Rad9 σε υποκινητές *CTR1*, *FRE1*, *FRE2* καθώς και μέσα στην κωδικεύουσα περιοχή του γονιδίου *CTR1*.

Στον άξονα των X διακρίνονται τα στελέχη και οι συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στον άξονα των Y το ποσοστό πρόσδεσης της Rad9 στην εξεταζόμενη περιοχή (που αναφέρεται στο πλαίσιο) ως προς την πρόσδεσή της σε περιοχή του υποκινητή του *PHO5* (όπου είναι γνωστό ότι δεν προσδένεται). Στην περίπτωση του *CTR1* μελετήθηκε η πρόσδεση της Rad9 εκτός από τον υποκινητή και στην κωδικεύουσα περιοχή από 118-360 και από 360-597. Οι μετρήσεις για την πρόσδεση της Rad9 στην κωδικεύουσα περιοχή του *CTR1* 118-360 στα στελέχη αγρίου τύπου (BCS+BPS) και *aft1Δ*(BCS+BPS+H₂O₂) έχουν διαιρεθεί δια 10.

Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη Rad9 προσδένεται σε υποκινητές *CTR1* και *FRE1* όπως και στο εσωτερικό του ανοιχτού πλαισίου διαβάσματος του *CTR1* (κωδικεύουσες περιοχές 118-360 και 360-597) τόσο σε αγρίου τύπου στελέχη όσο και σε *aft1Δ*. Αυτό δείχνει εμπλοκή της πρωτεΐνης ελέγχου Rad9 με τη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την μεταφορά χαλκού και σιδήρου στη ζύμη το οποίο συμφωνεί και με άλλα πειράματα που έχουν γίνει (Καλλιόπη Γκούσκου). Σε συνθήκες επαγωγής των γονιδίων που ρυθμίζουν την είσοδο χαλκού ή σιδήρου (σε έλλειψη χαλκού ή σιδήρου με BCS ή BPS αντίστοιχα) η πρόσδεση της Rad9 στον *CTR1* υποκινητή (και εσωτερικά αυτού) είναι μεγαλύτερη, πράγμα που ενισχύει ακόμη περισσότερο την εμπλοκή της σε μονοπάτια εισόδου μετάλλων. Όταν επιπλέον απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας Aft1, τότε η Rad9 σε συνθήκες επαγωγής προσδένεται λιγότερο στον υποκινητή *CTR1* (δύο φορές). Μεταβολή του εντοπισμού της Rad9 μεταξύ των στελεχών *aft1Δ* και αγρίου τύπου παρατηρήθηκε και στις περιοχές της κωδικεύουσας αλληλουχίας του *CTR1*. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι ο παράγοντας Aft1 επηρεάζει την πρόσδεση της Rad9 στον υποκινητή και στις κωδικεύουσες περιοχές του *CTR1*. Επίσης, αν συγκριθούν τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που έγιναν σε BPS με αυτά που έγιναν σε BCS (δεν φαίνονται στην Εικ.11), φαίνεται ότι όταν ο παράγοντας Aft1 απουσιάζει, η Rad9 εντοπίζεται σε χαμηλότερο βαθμό στον υποκινητή του *CTR1* σε συνθήκες BPS που δεσμεύουν δισθενή ιόντα σιδήρου (και χαλκού), αλλά όχι και σε συνθήκες BCS που δεσμεύουν μόνο ιόντα δισθενούς χαλκού. Το γεγονός αυτό εμπλέκει τον εντοπισμό της Rad9 στο συγκεκριμένο υποκινητή με την παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Aft1 σε σχέση με την απουσία ιόντων σιδήρου.

Παρατηρείται επίσης ότι σε συνθήκες επαγωγής (BCS+BPS), η Rad9 προσδένεται λιγότερο στην κωδικεύουσα περιοχή 118-360 του *CTR1* σε *aft1Δ* στελέχη σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου (αρκετές φορές), και περισσότερο στην κωδικεύουσα περιοχή 360-597 (τέσσερις φορές). Αν συγκριθούν οι συνθήκες καλλιέργειας BCS+BPS με αυτές που περιλαμβάνουν BCS+BPS+H₂O₂, παρατηρείται ότι σε αγρίου τύπου στελέχη ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Rad9 στον υποκινητή και στις κωδικεύουσες αλληλουχίες του *CTR1* διαφοροποιείται σε σύγκριση με τα *aft1Δ* στελέχη. Τα παραπάνω προσδίδουν στον παράγοντα Aft1 ρόλο στον εντοπισμό της Rad9 όχι μόνο στον Mac1-ρυθμιζόμενο υποκινητή *CTR1* αλλά και στις κωδικεύουσες περιοχές αυτού. Αυτό είναι σημαντικό αν συνυπολογιστεί το γεγονός της αλληλεπίδρασης του Aft1 με τη Rad9 πρωτεΐνη που έχει ήδη βρεθεί (Καλλιόπη Γκούσκου).

Τόσο σε συνθήκες (BCS+BPS) όσο και σε συνθήκες (BCS+BPS+ H₂O₂), η Rad9 εντοπίζεται στο εσωτερικό της κωδικεύουσας περιοχής του *CTR1* και μάλιστα σε υψηλότερο ποσοστό στην περιοχή 118-360 σε σχέση με την 360-597. Το τελευταίο δείχνει ότι για κάποιο λόγο η Rad9 εντοπίζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στην αρχή της κωδικεύουσας αλληλουχίας. Το ότι η Rad9 εμφανίζεται να προσδένεται σε κωδικεύουσες περιοχές του *CTR1* γονιδίου δείχνει ότι με κάποιο τρόπο μετακινείται σε αυτές της περιοχές ξεκινώντας από τον υποκινητή, πιθανώς ακολουθώντας την πορεία της RNA πολυμεράσης κατά τη μεταγραφή. Πρόσφατα έχει βρεθεί με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης ότι όντως η πρωτεΐνη Rad9 ακολουθεί την πορεία της RNA πολυμεράσης στο γονίδιο *CTR1* (Καλλιόπη Γκούσκου).

Η Rad9 βρέθηκε να εντοπίζεται στον υποκινητή *FRE1* σε αγρίου τύπου στελέχη σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ σε στελέχη *aft1Δ* ο εντοπισμός πέφτει δύο φορές, ωστόσο υπάρχει. Ο εντοπισμός της Rad9 στον υποκινητή *FRE2*, ενώ υπάρχει στα αγρίου τύπου στελέχη είναι μηδαμινός σε *aft1Δ* στελέχη. Τα παραπάνω συσχετίζονται με το ότι ο υποκινητής *FRE1* ρυθμίζεται τόσο από τον Aft1, όσο και από τον Aft2 παράγοντα, ενώ ο υποκινητής *FRE2* ρυθμίζεται μόνο από τον Aft1.

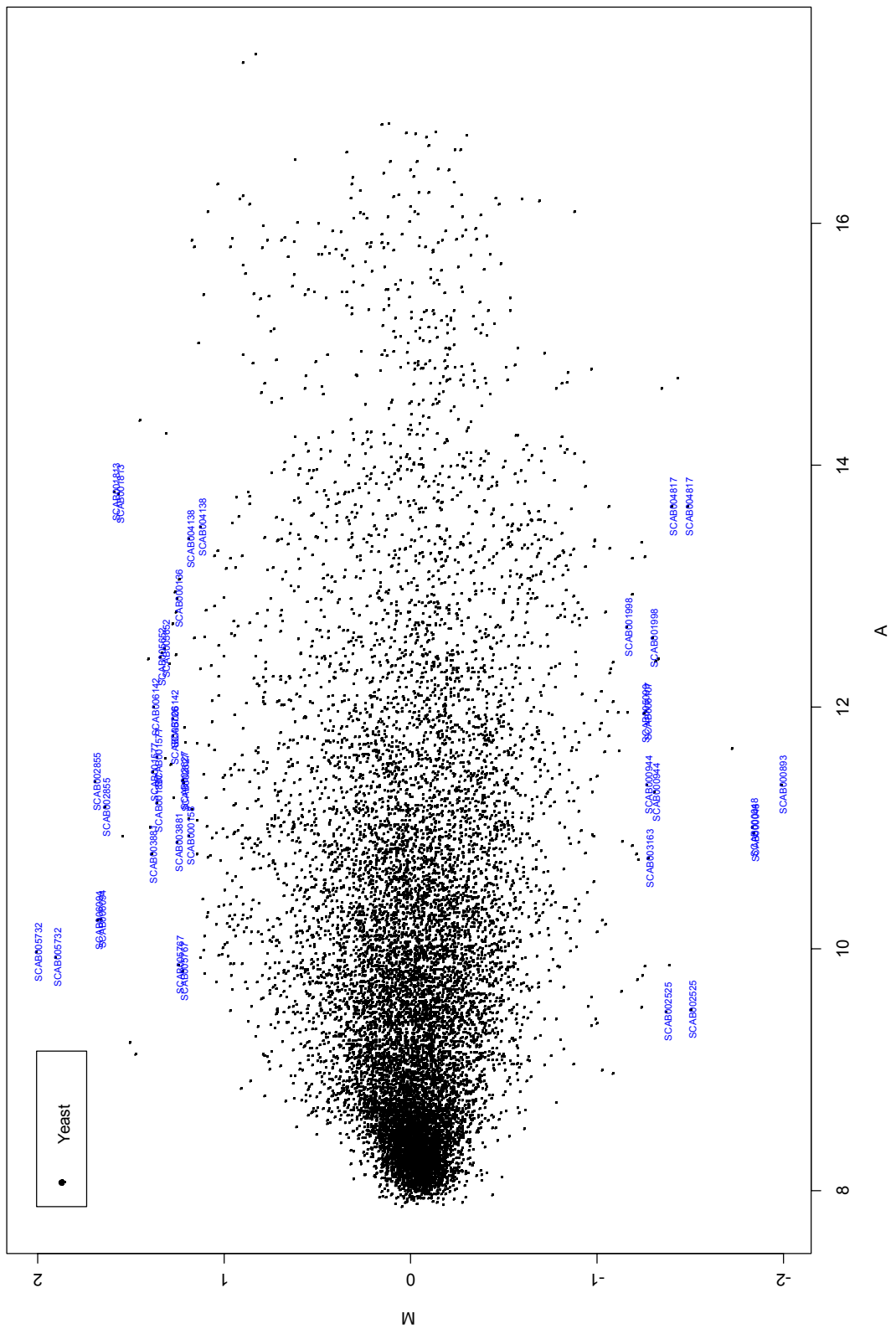
Αυτό που είναι σαφές από τα πειράματα που έγιναν είναι ότι ο παράγοντας Aft1 επηρεάζει την πρόσδεση της Rad9 στον *CTR1* υποκινητή (και στις κωδικεύουσες περιοχές αυτού) αλλά δεν είναι ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο το κάνει. Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στις συγκεκριμένες συνθήκες και στελέχη θα πρέπει να επαναληφθούν για να εξαχθεί ασφαλέστερο αποτέλεσμα.

2) Μελέτη μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων με μικροσυστοιχίες DNA σε στελέχη *rad9Δ* και σε στελέχη όπου η *Rad9* υπερεκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες επαγωγής (BCS και H₂O₂) αντίστοιχα

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας ξεκίνησαν πειράματα μελέτης του μεταγραφικού προτύπου των γονιδίων με μικροσυστοιχίες DNA σε στελέχη *rad9Δ* και σε στελέχη όπου η *Rad9* υπερεκφράζεται. Τα πειράματα που παρουσιάζονται εδώ έγιναν σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας και σε συνθήκες επαγωγής (BCS) (τρεις ώρες) και H₂O₂ (20'), προκειμένου να διερευνηθούν δύο ερωτήματα: το πρώτο έχει να κάνει με το αν η πρωτεΐνη ελέγχου *Rad9* επηρεάζει (έμεσα ή άμεσα) τη μεταγραφική έκφραση γονιδίων, ελέγχοντας όλα τα γονίδια της ζύμης, (έχει μέχρι στιγμής βρεθεί ότι απαιτείται για μεταγραφική απόκριση σε καταστροφή DNA Aboussekhra et al., 1996) και το δεύτερο αν επηρεάζει ειδικά τη μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζονται από χαλκό και υπεροξείδιο. Για τη συσχέτιση της *Rad9* με τη χαλκορυθμιζόμενη μεταγραφή υπάρχουν δεδομένα από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου (Καλλιόπη Γκούσκου, Βουτσινά Αλεξάνδρα) που έδειξαν την άμεση αλληλεπίδραση της *Rad9* με τον μεταγραφικό παράγοντα *Mac1*, την στρατολόγηση της πρωτεΐνης *Rad9* στον υποκινητή και στην κωδική περιοχή του γονιδίου *CTR1* και την λειτουργική εξάρτηση της *Mac1*-ρυθμιζόμενης μεταγραφής από την *Rad9*. Επίσης βρέθηκε σημαντική διαφορά του ποσοστού μεταγραφής των γονιδίων *CTR1* και *FRE1* στα στελέχη με έλλειψη ή υπερέκφραση της *Rad9* σε συνθήκες BCS και H₂O₂ (Καλλιόπη Γκούσκου). Είναι ήδη γνωστό ότι απαιτείται η παρουσία της *Rad9* για την επιβίωση των κυττάρων ζύμης παρουσία 0.3mM H₂O₂ (Flattery O'Brien and Dawes, 1998).

Για τα παρακάτω πειράματα παρασκευάστηκε mRNA από καλλιέργειες στελεχών ζύμης *rad9Δ* και στελεχών όπου η *Rad9* υπερεκφράζεται σε πλασμίδιο pDB20 καθώς και από στέλεχος αγρίου τύπου στις ίδιες συνθήκες για σύγκριση. Το mRNA σημάνθηκε σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο με διαφορετικές χρωστικές. Έπειτα από την υβριδοποίηση των σημασμένων δειγμάτων και τη σάρωση των αντικειμενοφόρων (Βλ. αντίστοιχο πρωτόκολλο) ακολούθησε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Imagine 5.5 (σε συνεργασία με τον Θανάση Μαργαρίτη, εργαστήριο Δημήτρη Καφετζόπουλου). Από την επεξεργασία αυτή

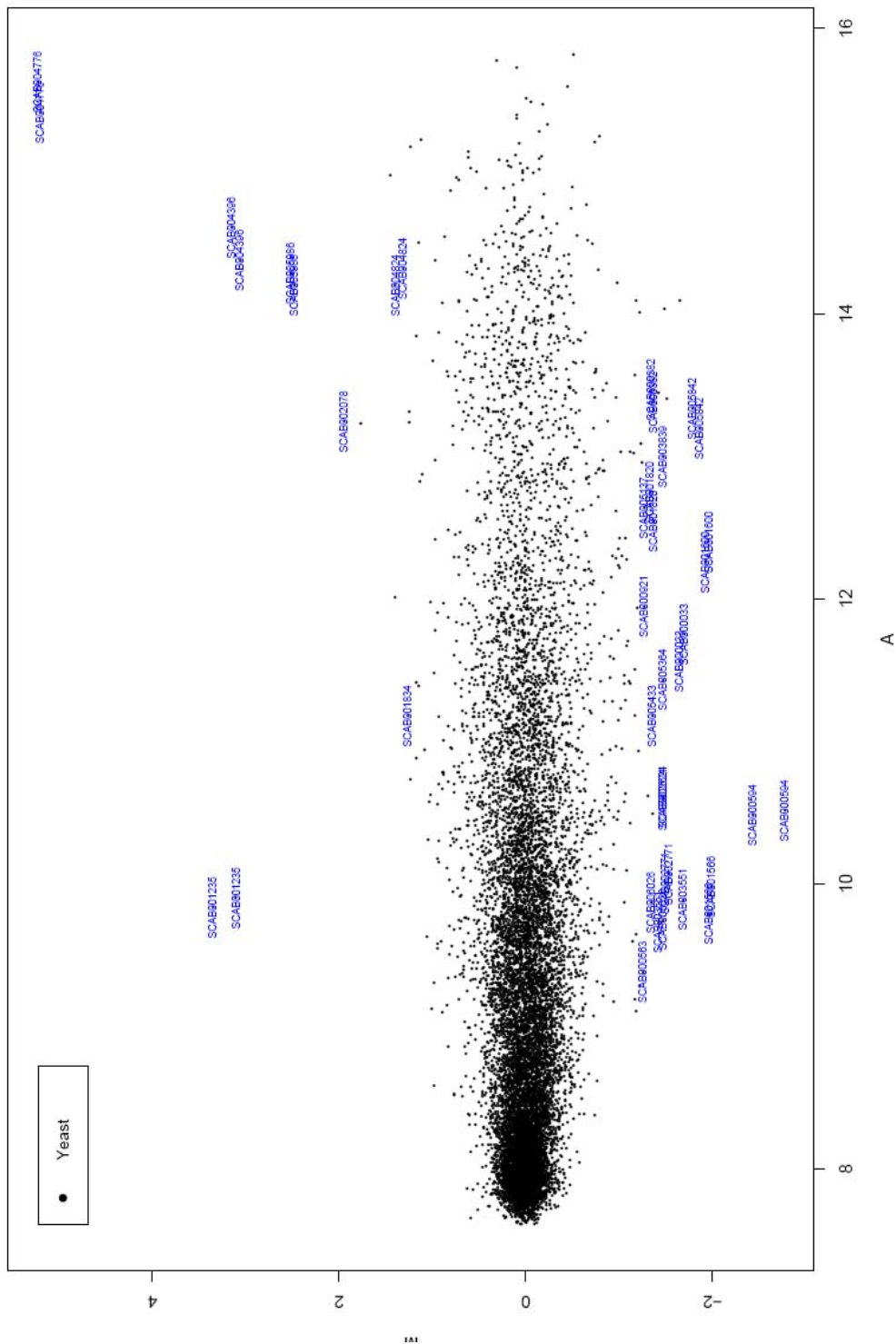
προκύπτει μεταξύ άλλων για το κάθε γονίδιο μια τιμή που αντιστοιχεί στο λόγο της τιμής της έντασης της χρωστικής για το μεταλλαγμένο στέλεχος προς την αντίστοιχη για το αγρίο τύπου. Τιμές του λόγου αυτού που είναι >2 είναι εμπιστευσιμες για αύξηση της μεταγραφής του συγκεκριμένου γονιδίου, ενώ τιμές <0.5 για μείωση μεταγραφής. Επίσης, γίνεται κατασκευή M-A plots (Εικ.ΙΙΙ) τα οποία δείχνουν την κατανομή των γονιδίων ως προς τα επίπεδα της μεταγραφής τους. Πρόκειται για τον κλασικό τρόπο παρουσίασης της μεταβολής του μεταγραφικού επιπέδου των γονιδίων με τον οποίο ελέγχεται και η επαναληψιμότητα των πειραμάτων (όταν τα σήματα από τα spots που αντιστοιχούν στα ίδια γονίδια συμπίπτουν). Τα M-A plots για τα δύο πειράματα DNA μικροσυτοιχιών που πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στις Εικ. 12 και 13.



ΕΙΚΟΝΑ 12: M-A plot για το πείραμα DNA μικροσυτοιχιών με τα στελέχη *rad9Δ* και αγρίου τύπου σε συνθήκες SC

Τα M-A plots κατασκευάζονται με βάση τις τιμές $M = \log R - \log G$ και $A = \frac{1}{2}[\log R + \log G]$ όπου R η απορρόφηση της κόκκινης χρωστικής και G η απορρόφηση της πράσινης χρωστικής με τις οποίες

έχουν σημειωθεί τα διαφορετικά δείγματα RNA. Στην εικόνα παρουσιάζονται με μπλε χρώμα τα 40 γονίδια με τη μεγαλύτερη ή τη μικρότερη μεταβολή. Η μεγάλη επαναληψιμότητα του πειράματος φαίνεται από το ότι τα 2 σημεία που αντιστοιχούν στο κάθε γονίδιο (το κάθε oligo βρίσκεται εις διπλούν) συμπίπτουν σε σημαντικό ποσοστό (ή βρίσκονται πολύ κοντά). Τιμές στον άξονα των M που είναι >2 δείχνουν εμπιστεύσιμη αύξηση της μεταγραφής στις συγκεκριμένες συνθήκες, ενώ τιμές <0.5 εμπιστεύσιμη μείωση της μεταγραφής.

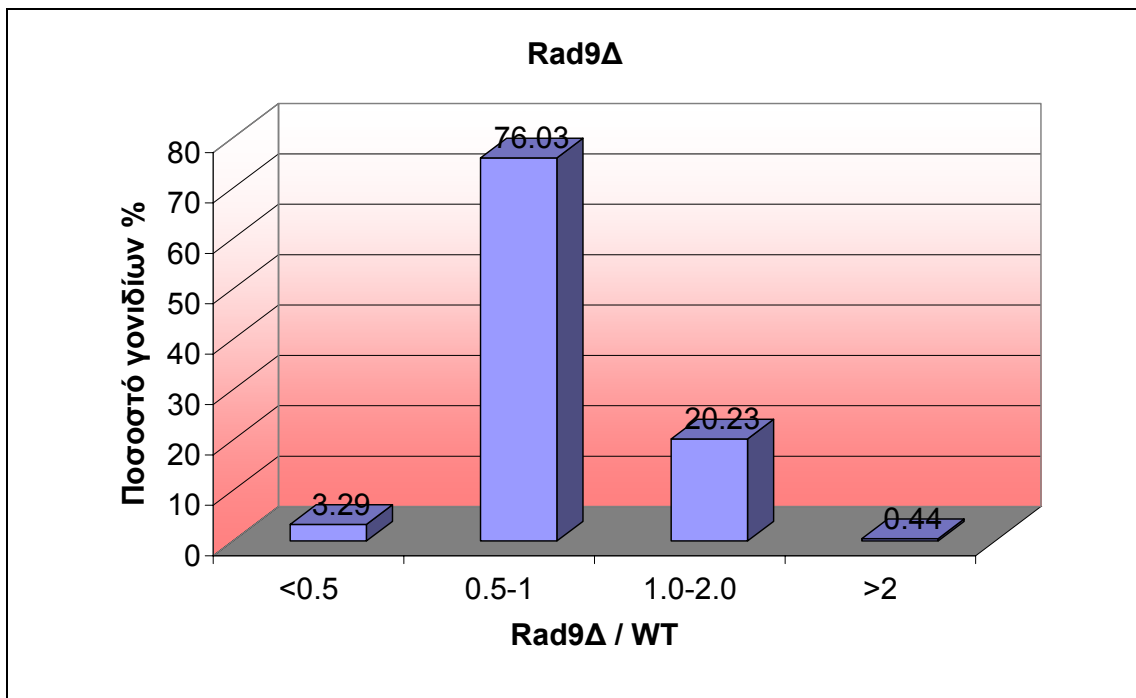


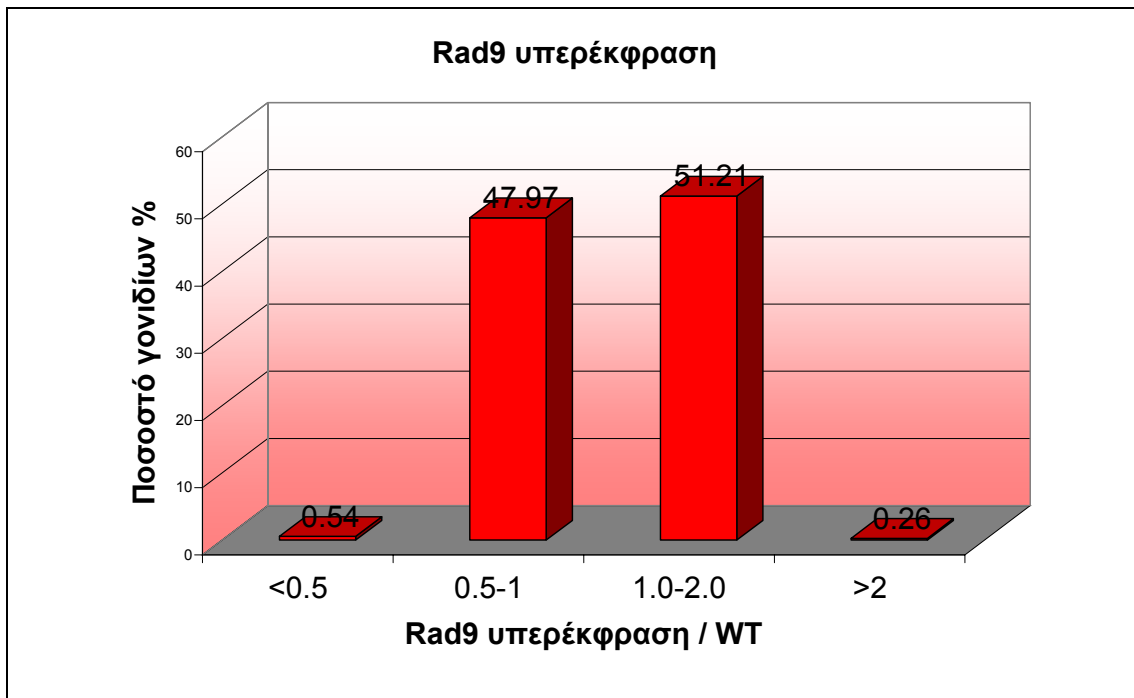
ΕΙΚΟΝΑ 13: M-A plot για το πείραμα DNA μικροσυστοιχιών με τα στελέχη για υπερέκφραση Rad9 και αγρίου τύπου σε συνθήκες 100μM BCS και 0.3mM H₂O₂

Για λεπτομέρειες Βλ. λεζάντα στην Εικ. 12. Και στην περίπτωση αυτή η επαναληψιμότητα του πειράματος είναι μεγάλη.

Στα δύο πειράματα που έγιναν με DNA μικροσυστοιχίες φάνηκε ότι η έλλειψη ή η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Rad9 όντως επηρεάζει την μεταγραφή πολλών γονιδίων. Στην Εικ.14 φαίνεται το ποσοστό των γονιδίων των οποίων η μεταγραφή μεταβάλλεται.

Ας σημειωθεί ότι τα δύο αυτά πειράματα δεν συγκρίνονται μεταξύ τους εφόσον οι συνθήκες καλλιέργειας διαφέρουν. Πειράματα με συγκρίσιμες συνθήκες πραγματοποιούνται αυτήν την περίοδο.

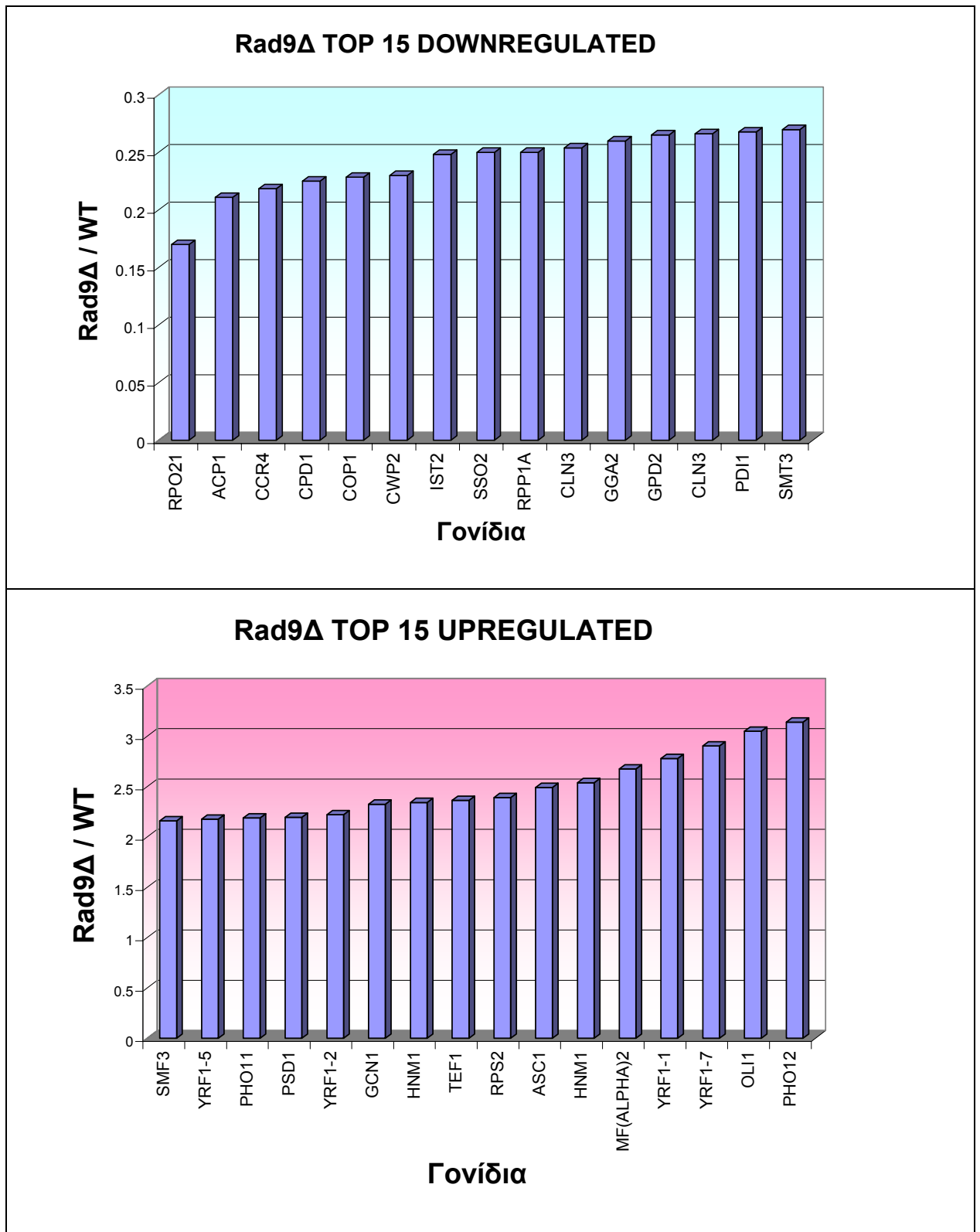




ΕΙΚΟΝΑ 14: Μεταβολή μεταγραφής γονιδίων σε έλλειψη (*rad9Δ/SC*) ή υπερέκφραση *Rad9/ BCS+H₂O₂*

Τα ποσοστά που αναφέρονται είναι επί του συνόλου των γονιδίων της ζύμης. Ο άξονας των X αντιπροσωπεύει το λόγο της τιμής της έντασης της χρωστικής με την οποία έχει σημειωθεί το mRNA από στελέχη *rad9Δ* ή με υπερέκφραση *Rad9* προς την αντίστοιχη τιμή για τα αγρίου τύπου στελέχη στις ίδιες συνθήκες. Τόσο από το πρώτο γράφημα (*rad9Δ*) όσο και από το δεύτερο (υπερέκφραση *Rad9*) φαίνεται ότι το μεταγραφικό προφίλ των γονιδίων μεταβάλλεται (ο παραπάνω λόγος αποκλίνει από τη μονάδα που αντιστοιχεί σε μη μεταβολή). Επομένως, η *Rad9* επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων όταν λείπει ή υπερεκφράζεται, πράγμα που απαντά στο πρώτο ερώτημα που τέθηκε.

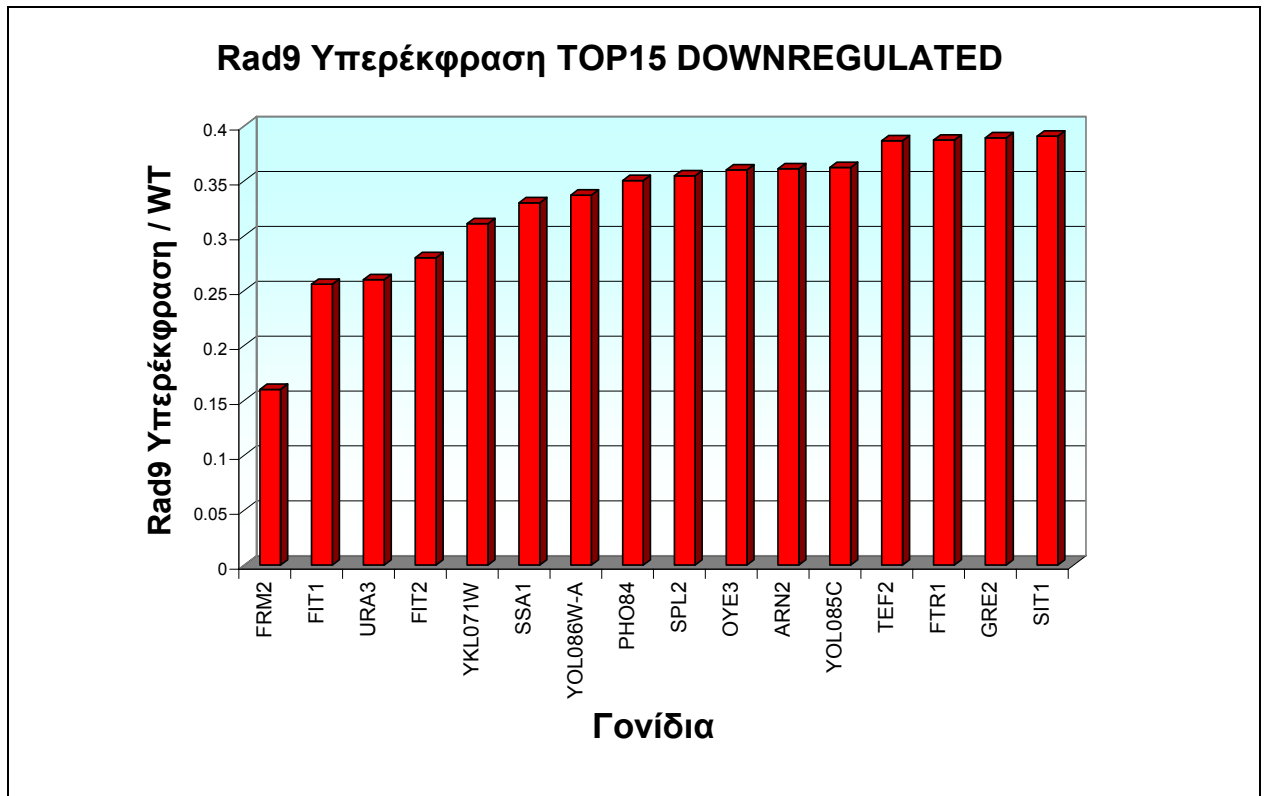
Στις Εικ.15 και 16 φαίνονται σε μορφή γραφήματος τα 15 γονίδια με τη μεγαλύτερη και τα 15 με τη μικρότερη μεταβολή στη μεταγραφή τους για τα πειράματα με *rad9Δ/SC* και υπερέκφραση *Rad9/BCS+H₂O₂* αντίστοιχα.

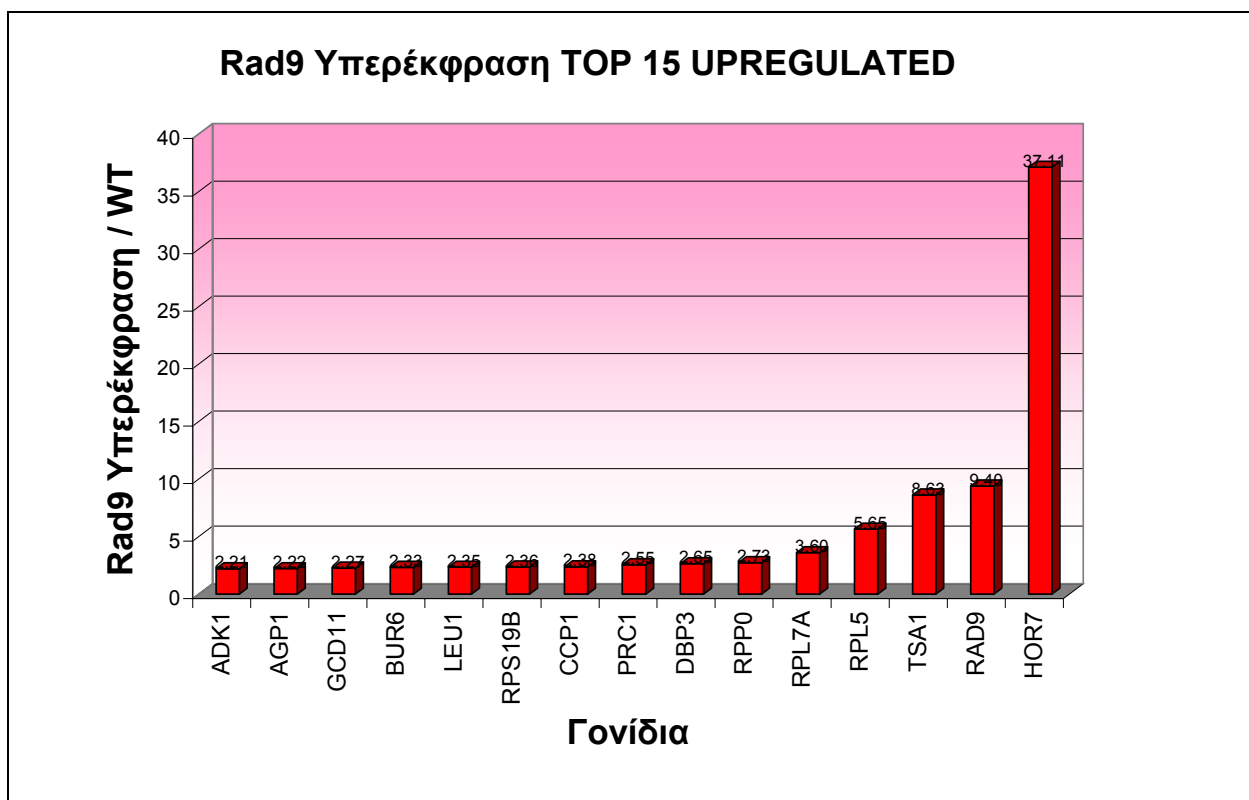


ΕΙΚΟΝΑ 15: 15 γονίδια με την υψηλότερη και χαμηλότερη μεταβολή μεταγραφής σε στελέχη *rad9Δ/SC*

Στο πρώτο γράφημα φαίνονται τα 15 γονίδια με τη μεγαλύτερη μείωση της μεταγραφής τους σε στελέχη *rad9Δ* σε συνθήκες SC και στο δεύτερο τα 15 με τη μεγαλύτερη αύξηση. Ο άξονας των Y αντιπροσωπεύει το λόγο της τιμής της έντασης της χρωστικής με την οποία έχει σημειωθεί το mRNA

από στελέχη *rad9Δ* προς την αντίστοιχη τιμή για τα αγρίου τύπου στελέχη στις ίδιες συνθήκες. Από τα γονίδια με τη μεγαλύτερη μείωση στη μεταγραφή ξεχωρίζουν το *RPO21* που κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II, το *CLN3* που κωδικοποιεί για μια G1/S κυκλίνη, καθώς και το *SMT3* που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που σουμυλιώνει (ομόλογη της SUMO-1 των θηλαστικών). Από τα γονίδια με τη μεγαλύτερη αύξηση στη μεταγραφή ξεχωρίζει το *SMF3* που κωδικοποιεί για μεταφορέα σιδήρου στο κενοτόπιο. Μια σύντομη περιγραφή της λειτουργίας όλων των αναφερθέντων γονιδίων βρίσκεται στο Παράρτημα III.





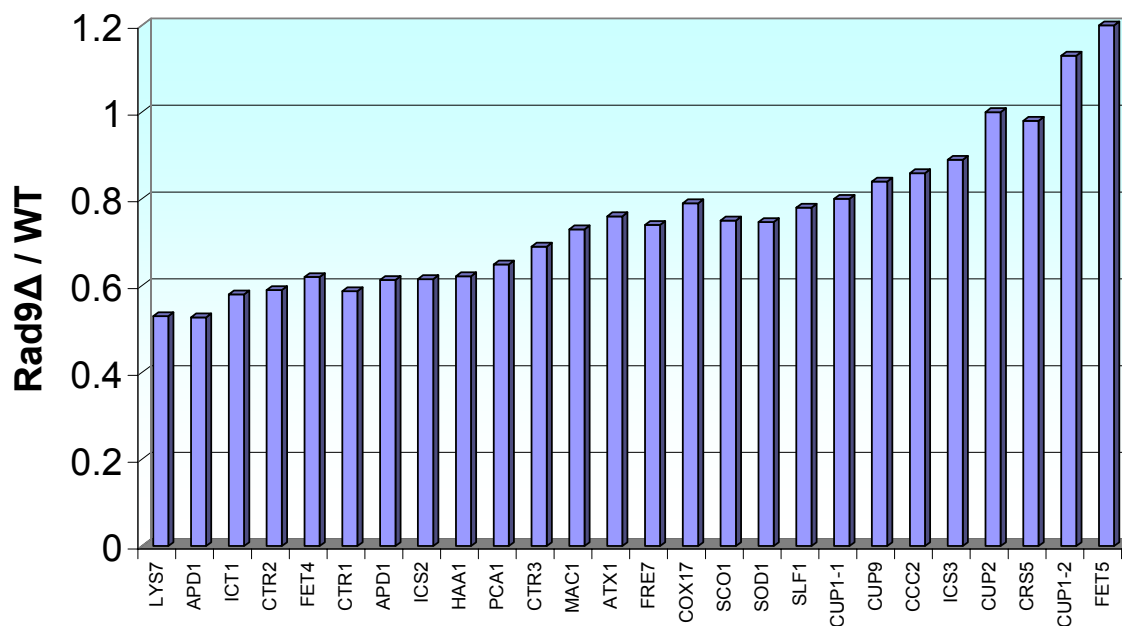
ΕΙΚΟΝΑ 16: 15 γονίδια με την υψηλότερη και χαμηλότερη μεταβολή μεταγραφής σε στελέχη που υπερεκφράζουν την Rad9 (BCS+H₂O₂)

Στο πρώτο γράφημα φαίνονται τα 15 γονίδια με τη μεγαλύτερη μείωση της μεταγραφής τους σε στελέχη που υπερεκφράζουν τη Rad9 σε συνθήκες BCS/H₂O₂ και στο δεύτερο τα 15 με τη μεγαλύτερη αύξηση. Ο άξονας των Y αντιπροσωπεύει το λόγο της τιμής της έντασης της χρωστικής με την οποία έχει σημειωθεί το mRNA από στελέχη που υπερεκφράζουν την Rad9 προς την αντίστοιχη τιμή για τα στελέχη αγρίου τύπου στις ίδιες συνθήκες. Από τα γονίδια με τη μεγαλύτερη μείωση στη μεταγραφή ξεχωρίζουν τα *FIT1*, *FIT2*, *ARN2*, *FTR1* και *SIT1* τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια σιδηρορύθμισης και οξειδωτικού στρες (Βλ. και Εισαγωγή). Μια σύντομη περιγραφή της λειτουργίας όλων των αναφερθέντων γονιδίων βρίσκεται στο Παράρτημα III.

Από την Εικ.16 κυρίως φαίνεται ότι η Rad9 επηρεάζει σημαντικά τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου και οξειδωτικού στρες.

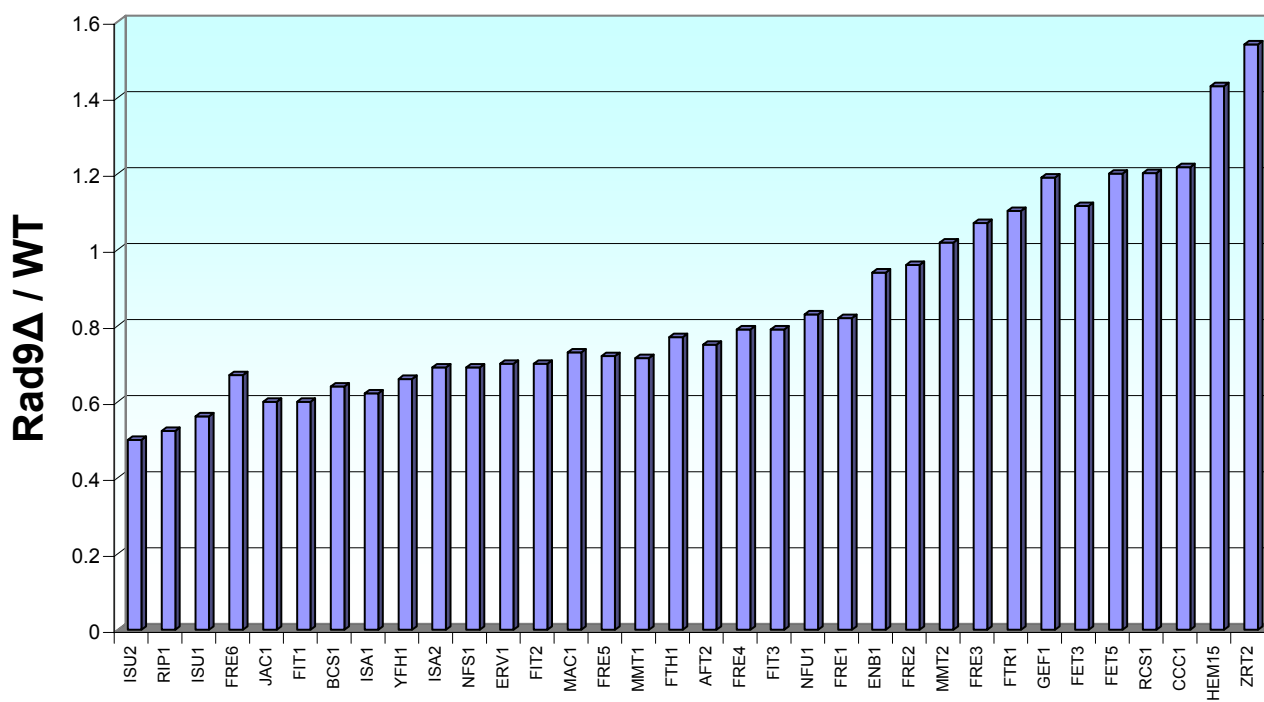
Στις Εικ. 17 και 18 επιλέχθηκαν και παρουσιάζονται τα γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση της ομοιόστασης χαλκού και σιδήρου καθώς μεταβάλλεται η μεταγραφή τους σε στελέχη *rad9Δ/SC* (μη επαγωγικές συνθήκες, επομένως τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν για σύγκριση σε επόμενα πειράματα *rad9Δ* σε επαγωγικές συνθήκες) και στελέχη που υπερεκφράζουν Rad9/BCS+H₂O₂ (επαγωγικές συνθήκες) αντίστοιχα.

Rad9Δ



ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΜΕ ΧΑΛΚΟ

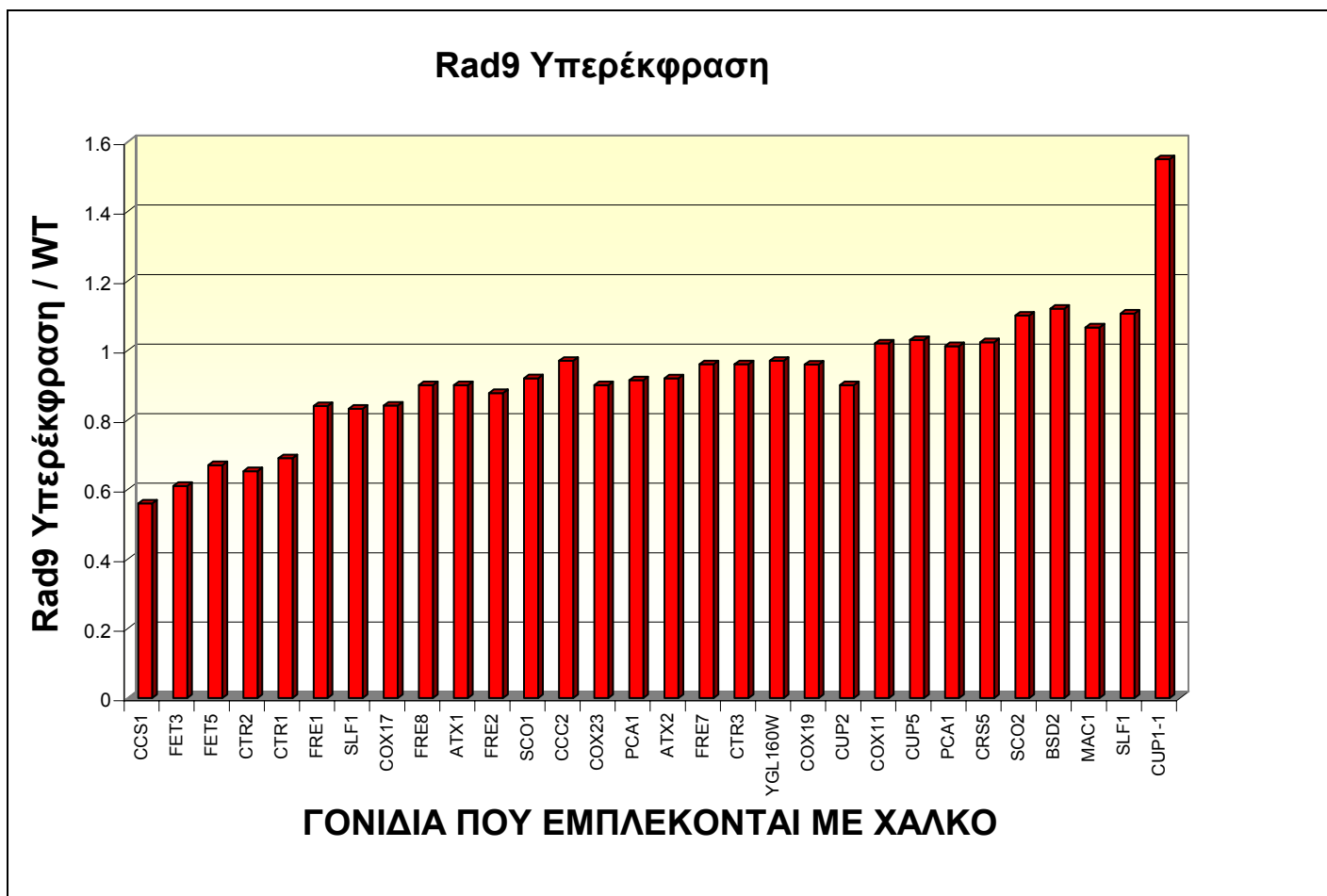
Rad9Δ



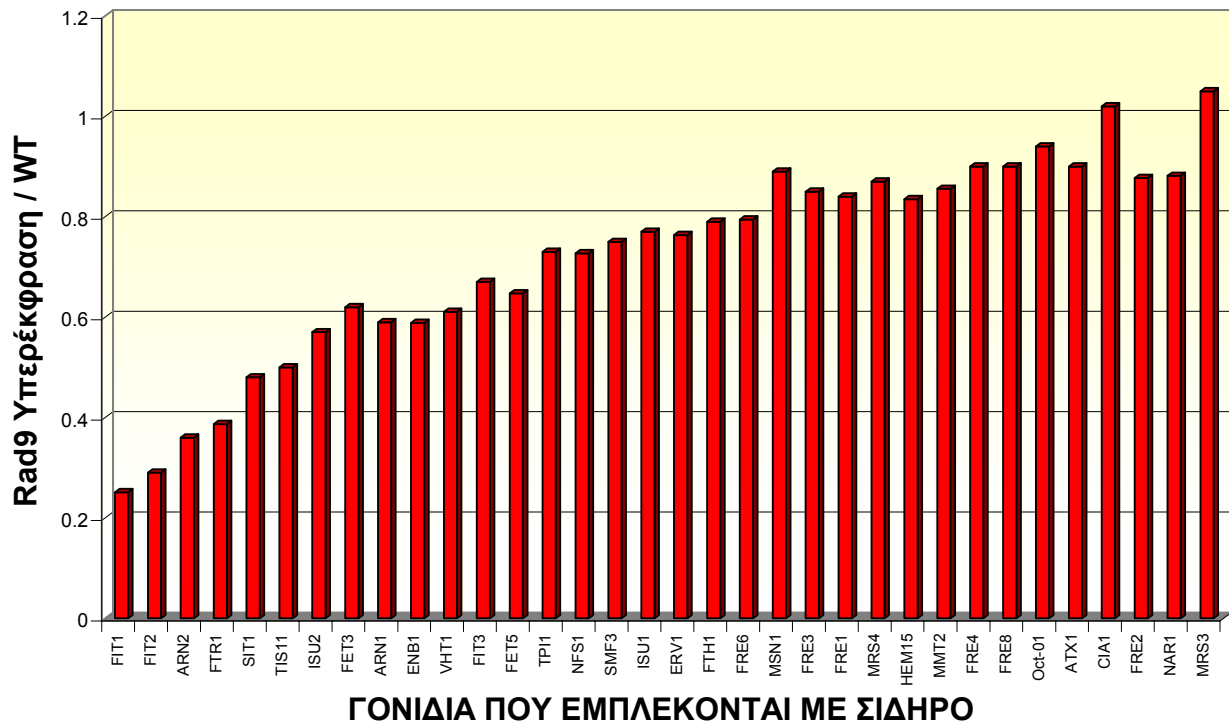
ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΜΕ ΣΙΔΗΡΟ

ΕΙΚΟΝΑ 17: Μεταβολή μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται με ομοιόσταση χαλκού και σιδήρου σε στελέχη *rad9Δ* που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SC

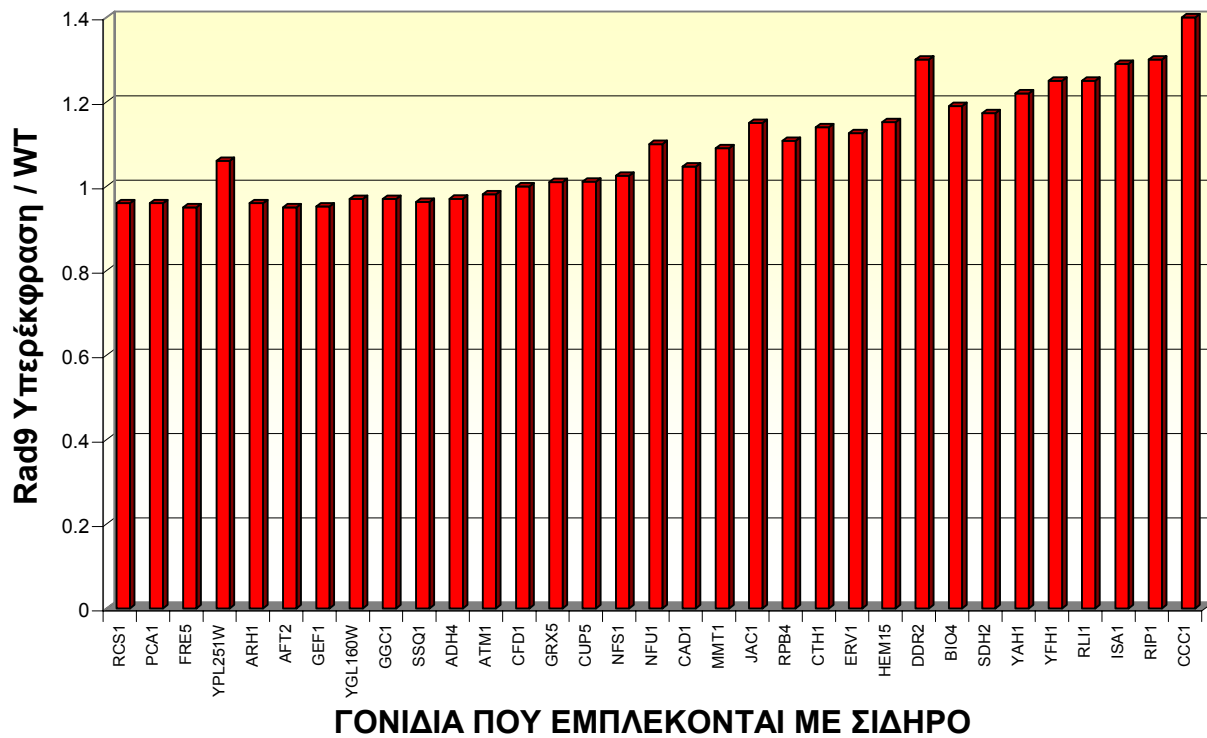
Ο άξονας των Y αντιπροσωπεύει το λόγο της τιμής της έντασης της χρωστικής με την οποία έχει σημανθεί το mRNA από στελέχη *rad9Δ* προς την αντίστοιχη τιμή για τα αγρίου τύπου στελέχη στις ίδιες συνθήκες. Μια σύντομη περιγραφή της λειτουργίας όλων των αναφερθέντων γονιδίων βρίσκεται στο Παράρτημα III.



Rad9 Υπερέκφραση



Rad9 Υπερέκφραση (Συνέχεια)



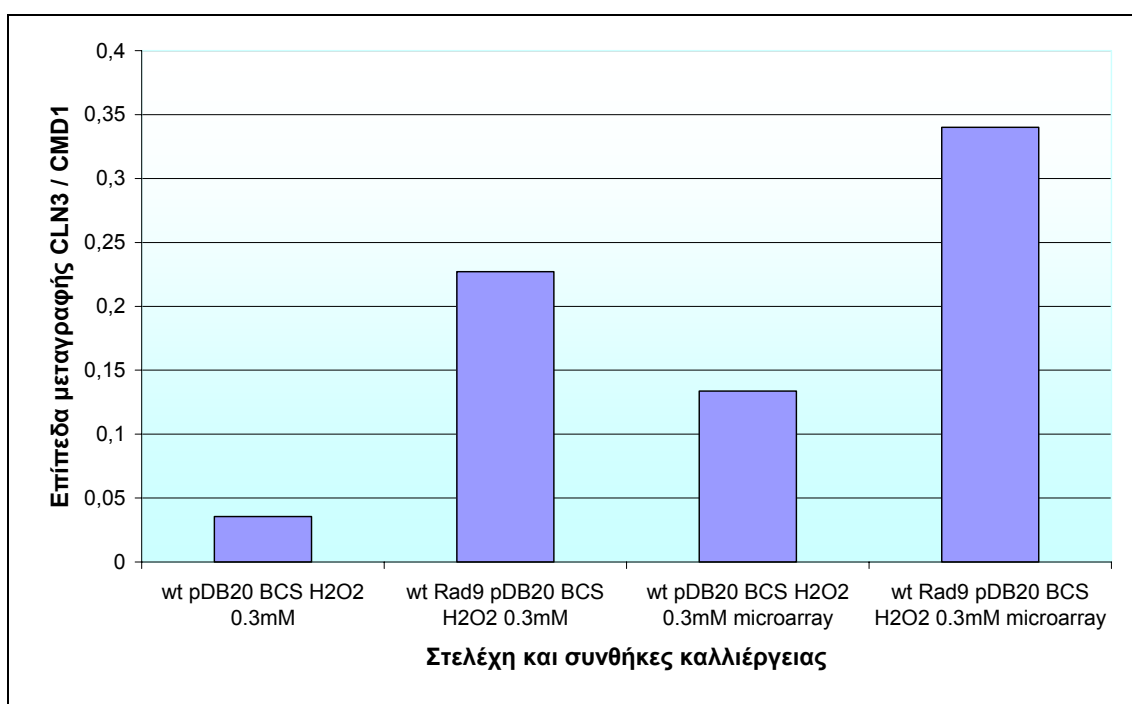
ΕΙΚΟΝΑ 18: Μεταβολή μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται με ομοιόσταση χαλκού και σιδήρου σε στελέχη που υπερεκφράζουν τη Rad9 που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες BCS H₂O₂ 0.3mM

Ο άξονας των Y αντιπροσωπεύει το λόγο της τιμής της έντασης της χρωστικής με την οποία έχει σημασθεί το mRNA από στελέχη που υπερεκφράζουν τη Rad9 προς την αντίστοιχη τιμή για τα αγρίου τύπου στελέχη στις ίδιες συνθήκες. Μια σύντομη περιγραφή της λειτουργίας όλων των αναφερθέντων γονιδίων βρίσκεται στο Παράρτημα III.

Τα πειράματα μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκαν και με αντίστροφη σήμανση των δειγμάτων RNA με τις δύο διαφορετικές χρωστικές (dye swap) προκειμένου να εξαληφθεί η πιθανότητα εμφάνισης θορύβου λόγω χρωστικής. Η ανταλλαγή χρωστικής (dye swap, Βλ. και πρωτόκολλο για σήμανση RNA για μικροσυστοιχίες) χρησιμοποιείται στο πείραμα DNA μικροσυστοιχιών ως ένα είδος ελέγχου για σφάλμα που προκύπτει κατά την αντίδραση σήμανσης με την κάθε μία χρωστική το οποίο εξαρτάται από ιδιότητες του μεταγράφου (transcript-dependent dye bias), καθώς τα μόρια της κάθε χρωστικής μπορεί να ενσωματωθούν στο δείγμα RNA με διαφορετική αποτελεσματικότητα (Rosenzweig et al., 2004).

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα των DNA μικροσυστοιχιών έγιναν πειράματα Northern στα οποία απομονώθηκαν ποσότητες RNA από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και καλλιεργήθηκαν στις ίδιες συνθήκες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μικροσυστοιχιών. Η ανάγκη της επιβεβαίωσης προκύπτει από το γεγονός ότι, σε πειράματα DNA μικροσυστοιχιών ακολουθείται πολλαπλασιασμός του RNA που είναι απαραίτητος σε περιπτώσεις όπου η ποσότητα του αρχικού RNA είναι πολύ μικρή, αλλά αυτό μπορεί να εισάγει ένα μικρό συστηματικό σφάλμα στην τελική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων (Puskas et al., 2002). Ως ανιχνευτές στα πειράματα Northern χρησιμοποιήθηκαν τμήματα από συγκεκριμένα γονίδια με ακραίες τιμές, που επιλέχθηκαν για λόγους που εξηγούνται παρακάτω. Κωδικεύουσα περιοχή των *CLN3* και *SMF3* (για τον έλεγχο του πειράματος μικροσυστοιχιών όπου η Rad9 απουσιάζει) και των *FIT1* και *TSA1* (για τον έλεγχο του πειράματος μικροσυστοιχιών όπου η Rad9 υπερεκφράζεται). Τα γονίδια αυτά οφείλουν να δείξουν σημαντική μείωση (*CLN3*- τέσσερις φορές, *FIT1*- τέσσερις φορές) ή αύξηση (*SMF3*- δύο φορές, *TSA1*- 8 φορές) της μεταγραφής (Βλ. και Εικ. 15 και 16). Κατά τη διαδικασία των αποτυπωμάτων Northern, οι ανιχνευτές FIT1 και SMF3 δεν υβριδοποιήθηκαν εμφανώς στις μεμβράνες με τα RNA και αυτό πιθανώς οφείλεται

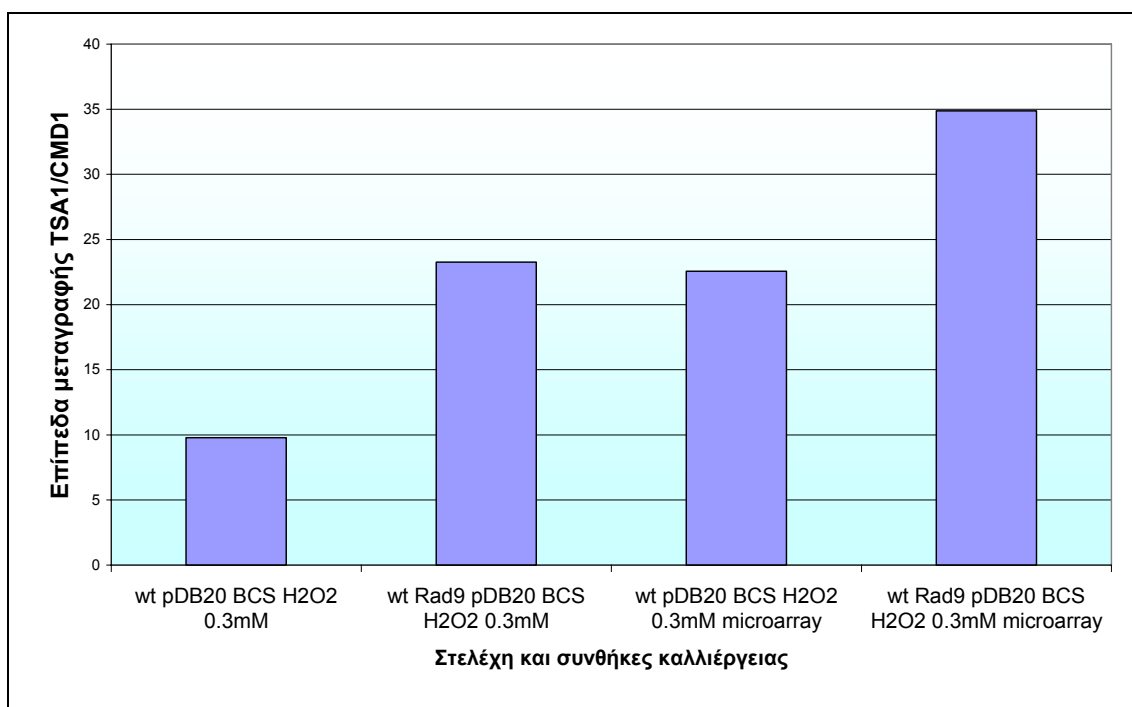
στο ότι τα μεταγράφα των *FIT1* και *SMF3* βρίσκονται σε πολύ χαμηλή σχετική ποσότητα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με τον ανιχνευτή για *CLN3* στα δείγματα RNA από τα στελέχη *rad9Δ* πράγμα που οφείλεται και εδώ πιθανώς στη χαμηλή ποσότητα μεταγράφου που υπήρχε. [Η ποσότητα RNA που ηλεκτροφορήθηκε από το κάθε δείγμα ήταν μικρή (4γ) εξαιτίας του μικρού πάχους του ηλεκτώματος.] Ο ανιχνευτής για *CLN3* όπως και αυτός για *TSA1* υβριδοποιήθηκαν ικανοποιητικά στις μεμβράνες με RNA από τα στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφράζεται και έδωσαν αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά των μικροσυστοιχιών ως προς την μείωση ή αύξηση της μεταγραφής (Εικ. 19 και 20).



ΕΙΚΟΝΑ 19: Αποτύπωμα Northern για μέτρηση επίπεδων μεταγραφής *CLN3* σε στελέχη όπου η πρωτεΐνη Rad9 υπερεκφράζεται σε συνθήκες BCS/H₂O₂ 0.3mM

Στον άξονα των X απεικονίζονται τα στελέχη και οι συνθήκες καλλιέργειας και στον άξονα των Y τα επίπεδα μεταγραφής *CLN3* κανονικοποιημένα ως προς *CMD1* που κωδικεύει για καλμοδοουλίνη. Η πρώτη και η δεύτερη στήλη αφορούν RNA που απομονώθηκαν από στελέχη αγρίου τύπου που φέρουν το πλασμίδιο pDB20 και από στελέχη που υπερεκφράζουν την Rad9 αντίστοιχα, όπως παρασκευάστηκαν μετά τη διαδικασία των πειραμάτων μικροσυστοιχιών. Στην τρίτη και στην τέταρτη στήλη, το RNA προέρχεται από το ίδιο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε και στο πείραμα των μικροσυστοιχιών. Η αύξηση στα επίπεδα μεταγραφής του *CLN3* όταν η Rad9 υπερεκφράζεται στις συγκεκριμένες συνθήκες (άνοδος 2.5 φορές) συμφωνεί με το αποτέλεσμα από το πείραμα μικροσυστοιχιών (λόγος έντασης χρωστικής σε δείγμα Rad9 υπερέκφραση/αγρίου τύπου = 1.3) στις ίδιες συνθήκες. Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί και με το αντίστοιχο που προκύπτει από πειράματα μικροσυστοιχιών σε *rad9Δ* στελέχη όπου παρατηρείται πτώση της μεταγραφής του *CLN3* και επομένως αυτή η μεταβολή της μεταγραφής οφείλεται πιθανώς στην παρουσία ή απουσία της Rad9.

Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα μεταξύ των δύο πειραμάτων μικροσυστοιχιών δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα λόγω των διαφορετικών συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν. Πειράματα όπου τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα γίνονται αυτήν την περίοδο.



ΕΙΚΟΝΑ 20: Αποτύπωμα Northern για μέτρηση επιπέδων μεταγραφής *TSA1* σε στελέχη όπου η πρωτεΐνη *Rad9* υπερεκφράζεται σε συνθήκες BCS/H₂O₂ 0.3mM

Στον άξονα των X απεικονίζονται τα στελέχη και οι συνθήκες καλλιέργειας και στον άξονα των Y τα επίπεδα μεταγραφής *TSA1* κανονικοποιημένα ως προς *CMD1* που κωδικεύει για καλμοδουλίνη. Η πρώτη και η δεύτερη στήλη αφορούν RNA που απομονώθηκαν από στελέχη αγρίου τύπου που φέρουν το πλασμίδιο pDB20 και από στελέχη που υπερεκφράζουν την *Rad9* αντίστοιχα, όπως παρασκευάστηκαν μετά τη διαδικασία των πειραμάτων μικροσυστοιχιών. Στην τρίτη και στην τέταρτη στήλη, το RNA προέρχεται από το ίδιο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε και στο πείραμα των μικροσυστοιχιών. Η άνοδος στα επίπεδα μεταγραφής σε στελέχη που υπερεκφράζουν τη *Rad9* στις συγκεκριμένες συνθήκες (2.5 φορές) όπως φαίνεται εδώ συμφωνεί με το αποτέλεσμα από το πείραμα μικροσυστοιχιών (άνοδος οκτώ φορές).

Για την περίπτωση όπου η *Rad9* υπερεκφράζεται σε συνθήκες BCS/H₂O₂ έχει γίνει Northern με ανιχνευτές *CTR1* και *FRE1* και βρέθηκε ότι η μεταγραφή των δύο αυτών γονιδίων μειώνεται ως προς το αντίστοιχο ποσό μεταγραφής σε στελέχη αγρίου τύπου (Καλλιόπη Γκούσκου). Αυτό συμφωνεί με το αποτέλεσμα από τα πειράματα των μικροσυστοιχιών όπου φαίνεται ότι η τιμή των επιπέδων μεταγραφής

του *CTR1* του μεταλλαγμένου στελέχους ως προς την αντίστοιχη του αγρίου τύπου είναι 0.65, ενώ η αντίστοιχη τιμή για *FRE1* είναι ~0.8 (Βλέπε και Εικ. 18).

Προκειμένου να ελεγχθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροσυστοιχιών για τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *CLN3*, *SMF3*, *FIT1* και *TSA1* πραγματοποιήθηκαν και πειράματα με RT-PCR (σε συνεργασία με Γιώργο Φραγκιαδάκη) που σαν μέθοδος εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία από το αποτύπωμα Northern και επομένως θεωρητικά θα μπορούσαν να ελεγχθούν και τα αποτελέσματα που δεν ήταν δυνατό να ελεγχθούν με αποτύπωμα Northern. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συμφωνούν με τα αντίστοιχα των πειραμάτων μικροσυστοιχιών DNA ως προς την αύξηση ή τη μείωση της μεταγραφής των γονιδίων που εξετάστηκαν (αν και η απόλυτη τιμή της αύξησης ή της μείωσης ήταν μικρότερες). Επίσης με την RT-PCR φάνηκε ότι για τα γονίδια των οποίων τα μετάγραφα δεν μπορούσαν να ανιχνευτούν στο Northern (*FIT1*, *CLN3*, *SMF3*) η σχετική ποσότητα RNA ήταν όντως πολύ μικρότερη αυτών που ανιχνεύθηκαν.

Στα δύο πειράματα μελέτης του μεταγραφικού προτύπου των γονιδίων με μικροσυστοιχίες DNA που παρουσιάστηκαν φάνηκε ότι η έλλειψη ή η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Rad9 επηρεάζει την μεταγραφή άλλων γονιδίων (Εικ. 14). Στο πείραμα με το στέλεχος *rad9Δ* υπήρξαν ορισμένα ενδιαφέροντα αποτελέσματα ως προς τα γονίδια που είχαν τη μεγαλύτερη μεταβολή στη μεταγραφή τους (Εικ. 15 και Παράρτημα III). Συγκεκριμένα, στα γονίδια με τη μεγαλύτερη υπορύθμιση περιλαμβάνονται το *RPO21* που κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II, το *CLN3* που κωδικοποιεί για μια G1/S κυκλίνη, καθώς και το *SMT3* που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που σουμοϋλιώνει (ομόλογη της SUMO-1 των θηλαστικών). Επομένως, η Rad9 φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων αφού απουσία της, υποεκφράζεται η μεγάλη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης. Επίσης, υποεκφράζεται η πρωτεΐνη Smt3 πράγμα που θα μπορούσε εμπλέκει τη Rad9 σε διαδικασίες σουμοϋλίωσης. Η σουμοϋλίωση συνήθως οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής και άρα η υποέκφραση της Smt3 σε στέλεχος *rad9Δ* υποδηλώνει ενεργοποίηση της μεταγραφής και υποδεικνύει κατασταλτικό ρόλο της Rad9 για τη μεταγραφή. Η κυκλίνη Cln3 ενεργοποιεί τη μεταγραφή των *CLN1* και *CLN2* (Barbet et al., 1996) και έχει βρεθεί ότι ένα μετάλλαγμα της (*cln3-2*) όταν υπερεκφράζεται ξεπερνά το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (στο G1 Start) που επάγεται σε συνθήκες περίσσειας σιδήρου σε στέλεχη *Aft-1^{up}* (που προσλαμβάνουν περίσσεια σιδήρου). Ωστόσο, το σταμάτημα αυτό του κυτταρικού κύκλου βρέθηκε

ότι δεν απαιτεί την Rad9 (Philpott et al., 1998), σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπου με έλλειψη της Rad9 το γονίδιο *CLN3* υποεκφράζεται σημαντικά και άρα υποδηλώνεται κάποια εμπλοκή μεταξύ των δύο. Για ασφαλέστερα συμπεράσματα θα πρέπει να ελεγχθεί μεταγραφή του *CLN3* σε συνθήκες περίσσειας σιδήρου σε στελέχη *Aft-1^{up}*. Από τα γονίδια με τη μεγαλύτερη αύξηση στη μεταγραφή ξεχωρίζει το *SMF3* που κωδικοποιεί για μεταφορέα σιδήρου στο κενοτόπιο και έτσι εμπλέκει τη Rad9 με τη μεταλλορύθμιση. Έλλειψη της Rad9 φαίνεται ότι ίσως προωθεί είσοδο σιδήρου στο κύτταρο. Αυτό έρχεται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος μικροσυστοιχιών όπου σε υπερέκφραση της Rad9 (σε συνθήκες όμως επαγωγής με BCS που επάγουν έκφραση γονιδίων που οδηγούν σε πρόσληψη χαλκού) υπάρχει σημαντική υπορύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με πρόσληψη σιδήρου (Βλ. παρακάτω).

Στο πείραμα μικροσυστοιχιών όπου η Rad9 υπερεκφράζεται σε συνθήκες BCS (έλλειψης χαλκού) και H₂O₂ βρέθηκε ότι στα γονίδια που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μείωση στη μεταγραφή τους περιλαμβάνονται τα *FIT1*, *FIT2*, *ARN2*, *FTR1* και *SIT1* τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια πρόσληψης σιδήρου (Εικ. 16 και Παράρτημα III). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ανασταλτική δράση της Rad9 σε μονοπάτια πρόσληψης σιδήρου. Με το συμπέρασμα αυτό συνηγορεί ένα άλλο πειραματικό δεδομένο του εργαστηρίου μας σύμφωνα με το οποίο σε ένα στέλεχος *rad9Δ* αυξάνει η δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης του *Aft1* σε σύστημα ενός υβριδίου (Μαρίλια Ιωάννου, Γιώργος Φραγκιαδάκης).

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η πρωτεΐνη Rad9, εκτός του ότι επηρεάζει (έμεσα ή άμεσα) τη μεταγραφή άλλων γονιδίων, εμπλέκεται και σε μονοπάτια ομοιόστασης χαλκού και σιδήρου, αφού επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταλλορύθμισης (Εικ. 17 και 18 και Παράρτημα III) οδηγώντας κυρίως σε πτώση μεταγραφής.

Η πρωτεΐνη Rad9 εμπλέκεται στα σημεία ελέγχου στις φάσεις G1 και G2 αλλά απαιτείται και για τη μεταγραφική απόκριση σε καταστροφή DNA (Aboussekhra et al., 1996). Έτσι, ύστερα από καταστροφή DNA ακολουθεί σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (για να εξασφαλιστεί ο χρόνος που απαιτείται για να επιδιορθωθεί το DNA) και επαγωγή μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται με την επιδιόρθωση. Northern ανάλυση μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με επιδιόρθωση DNA ύστερα από έκθεση σε UV κυττάρων σταματημένων στη G1 έδειξε ότι απουσία της Rad9 η μεταγραφή τους μειώνεται. Τα γονίδια που

εξετάστηκαν ήταν τα *RAD51*, *RAD54* (επιδιόρθωση κατά τον ανασυνδυασμό), *RAD2*, *RAD16*, *RAD23* (nucleotide excision repair), *RAD18* (επιδιόρθωση μετά την αντιγραφή), *MAG* (base excision repair), *CDC9* (γενικός μεταβολισμός DNA), *RNR1*, *RNR2*, *RNR3* (βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων), *DUN1* (κινάση που εμπλέκεται στη μεταγωγή της απόκρισης σε καταστροφή DNA), *PMS1* (mismatch επιδιόρθωση) και *RAD53* (κινάση που εμπλέκεται στη μεταγωγή της απόκρισης σε καταστροφή DNA). Στον πίνακα που ακολουθεί γίνεται μια σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αποτελέσματα από τα δύο πειράματα μικροσυστοιχιών της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα βέβαια για να είναι συγκρίσιμα θα πρέπει τα πειράματα να γίνουν σε κύτταρα *rad9Δ* που έχουν εκτεθεί σε UV.

Γονίδιο	<i>rad9Δ</i> /WT	Rad9 υπερέκφραση BCS H ₂ O ₂ /WT
<i>RAD51</i>	0.46	0.85
<i>RAD54</i>	0.83	0.93
<i>RAD2</i>	0.73	1.09
<i>RAD16</i>	0.79	1.03
<i>RAD23</i>	0.93	0.91
<i>RAD18</i>	0.89	0.93
<i>MAG</i>	0.72	1.18
<i>CDC9</i>	0.54	0.86
<i>RNR1</i>	0.75	0.69
<i>RNR2</i>	0.72	1.19
<i>RNR3</i>	0.65	1.05
<i>DUN1</i>	0.75	1.08
<i>PMS1</i>	0.8	0.9
<i>RAD53</i>	0.82	1

Η μεταβολή της μεταγραφής παρουσιάζεται ως λόγος της έντασης της χρωστικής στο συγκεκριμένο spot της αντικειμενοφόρου για το κάθε στέλεχος (*rad9Δ* ή Rad9 υπερέκφραση) προς την αντίστοιχη τιμή σε αγρίου τύπου στελέχη. Εμπιστευσιμες τιμές για μεταβολή των μεταγραφικών επιπέδων θεωρούνται αυτές που είναι <0.5 ή >2 για μείωση ή αύξηση της μεταγραφής αντίστοιχα.

Παρατηρείται ότι η μεταβολή στη μεταγραφή δεν είναι σημαντική, με εξαίρεση τα γονίδια *RAD51* και *CDC9* σε στέλεχη *rad9Δ* πράγμα που δείχνει εξάρτηση από τη Rad9 και που συμφωνεί με τους Aboussekhra et al (1996).

Για να διαπιστωθεί αν η υπορύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με πρόσληψη σιδήρου σε στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφράζεται σε BCS / H₂O₂ οφείλεται στην υπερέκφραση της Rad9 ή σε κάποια από τις συνθήκες έχει δρομολογηθεί μια σειρά πειραμάτων μικροσυστοιχιών όπου η Rad9 υπερεκφράζεται σε συνθήκες SC, BCS ή BCS/H₂O₂. Λόγω του ότι στα πειράματα μικροσυστοιχιών που έγιναν σε στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφράζεται σε συνθήκες BCS/H₂O₂ βρέθηκε ότι υποεκφράζονται πολλά Aft1 ρυθμιζόμενα γονίδια (*FIT1*, *FIT2*, *ARN2*, *FTR1*) θα γίνει και πείραμα DNA μικροσυστοιχιών όπου θα υπάρχει η συνθήκη BPS (δέσμευση δισθενών κατιόντων σιδήρου) στην οποία επάγονται τα γονίδια αυτά προκειμένου να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Επίσης, για να είναι άμεσα συγκρίσιμα τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών της παρούσας εργασίας θα πραγματοποιηθούν πειράματα με μικροσυστοιχίες σε στελέχη *rad9Δ* σε συνθήκες BCS/H₂O₂ (αλλά και BCS ή H₂O₂).

Ας σημειωθεί ότι εφόσον η επιρροή της Rad9 στα επίπεδα μεταγραφής γονιδίων μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση, η απόδειξη άμεσης εμπλοκής μπορεί να δειχθεί με πειράματα εντοπισμού της Rad9 στους υποκινητές των γονιδίων στόχων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Υλικά και μέθοδοι

[Όλα τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την έκδοση Molecular Cloning (Sambrook J. et al, 1989, τροποποιημένα), εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετική πηγή]

Στέλεχη

Το στέλεχος του *S. cerevisiae* είναι το BJ5457 που στερείται πρωτεασών (MATa ura3-52 trp1 lys2-801 his3[Delta]200 pep4::HIS3 prb1[Delta]1.6R can1 Gal+). Με βάση αυτό το στέλεχος δημιουργήθηκαν αυτά που έφεραν επιπλέον τα Rad9-9Myc (Leu, Ura, His) (Καλλιόπη Γκούσκου), *aft1Δ*-Rad9-9Myc (Leu, His) (Χρήστος Ανδρεάδης, *aft1Δ* από Γιώργο Φραγκιαδάκη), Ynl032w-HA, Ynl056w-HA, Ynl099c-HA, Spl2-HA (Leu, Ura, His, Trp) (Αλεξάνδρα Βουτσινά), Tid3-GST σε πλασμίδιο pVTU263 (Leu, Ura, His, Trp), *rad9Δ* (Leu, Ura, His, Trp) (Καλλιόπη Γκούσκου), Rad9 σε πλασμίδιο υπερέκφρασης pDB20 (Leu, His, Trp) (Καλλιόπη Γκούσκου). Η Rad9 έχει σημανθεί με 9Myc.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμεύει για τον πολλαπλασιασμό κομματιών DNA με συγκεκριμένη αλληλουχία που βρίσκονται μεταξύ δύο περιοχών με γνωστή αλληλουχία. Για την αντίδραση αυτή χρειάζονται τα παρακάτω συστατικά:

- 1) Εκκινητές (primers):** οι εκκινητές έχουν ελάχιστο μήκος 16 νουκλεοτίδια και κατά προτίμηση 20-24 νουκλεοτίδια με συγκέντρωση 100-200ng/λ.
- 2) Μητρικό DNA (template DNA):** προέρχεται συνήθως από γενωμική ή cDNA βιβλιοθήκη με συγκέντρωση 1μg/λ.
- 3) DNA πολυμεράση:** συνήθως χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή. Έχει 5'>3' δράση πολυμεράσης.
- 4) Ρυθμιστικό διάλυμα** μέσα στο οποίο δρα η DNA πολυμεράση συγκεντρωμένο 10 φορές (10X).
- 5) Νουκλεοτίδια (dNTPs):** νουκλεοτίδια αδερίνης, θυμίνης, κυτοσίνης, γουανίνης σε συγκέντρωση 10mM.
- 6) Νερό.**

Οι αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50λ. Μια τυπική αντίδραση PCR είναι η παρακάτω (με τα συστατικά να τοποθετούνται σε κατάλληλα eppendorfs με τη σειρά που αναφέρονται):

40λ H₂O

1λ μητρικό DNA (από βιβλιοθήκη cDNA συνήθως)

1λ εκκινητής 1

1λ εκκινητής 2

5λ 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNA πολυμεράσης

1λ 10mM dNTPs

1λ DNA πολυμεράση (συνήθως Taq πολυμεράση)

50λ τελικός όγκος

Μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιλαμβάνει 3 στάδια:

- 1) Στάδιο αποδιάταξης** (denaturation) του μητρικού DNA. Η αποδιάταξη γίνεται στους 94⁰C. Κατά την αποδιάταξη οι 2 κλώνοι του DNA χωρίζουν και έτσι δημιουργούνται 2 μονόκλωνα μόρια DNA.
- 2) Στάδιο υβριδοποίησης** (annealing) κατά το οποίο οι εκκινητές αναγνωρίζουν τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στο μητρικό DNA και προσδένονται σε αυτές. Η θερμοκρασία που επιλέγεται για την υβριδοποίηση εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται και επιλέγεται ύστερα από δοκιμές της αντίδρασης σε θερμοκρασίες μεταξύ των θερμοκρασιών τήξης του κάθε εκκινητή.
- 3) Στάδιο επιμήκυνσης** (extension) το οποίο γίνεται σε θερμοκρασία 72⁰C και κατά το οποίο λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός των κομματιών DNA που περιλαμβάνονται μεταξύ των εκκινητών.

Το πρόγραμμα της PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το ακόλουθο:

α) 5' στους 94⁰C (αποδιάταξη)

β) 30'' στους 94⁰C

γ) 30'' στους 52⁰C (υβριδοποίηση)

δ) 2' 30'' στους 72⁰C (επιμήκυνση)

ε) 10' στους 72⁰C

στ) επ' άπειρο 15⁰C

Τα βήματα β ως δ επαναλαμβάνονται 30 φορές.

Η επιλογή των εκκινητών γίνεται με τρόπο ώστε αυτοί να περιλαμβάνουν όσο το δυνατόν πιο μοναδικές αλληλουχίες βάσεων και η θερμοκρασίες τήξης κάθε ζεύγους εκκινητών να είναι παρόμοιες.

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA που βρίσκεται μεταξύ των αλληλουχιών του μητρικού DNA που αναγνωρίζουν οι εκκινητές. Σε κάθε ζεύγος εκκινητών που μετέχουν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ο ένας αναγνωρίζει και προσδέεται στη συμπληρωματική του αλληλουχία στον ένα κλώνο του μητρικού DNA και ο άλλος στην αντίστοιχη στον άλλο κλώνο. Αν και ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών στόχων είναι πολύ αποδοτικός, εντούτοις δεν αποτελεί μια απεριόριστη διαδικασία γιατί το ποσό της DNA πολυμεράσης γίνεται περιοριστικό έπειτα από 25-35 κύκλους περίπου. Έτσι, αν θέλουμε να συνεχίσουμε τη διαδικασία χρησιμοποιούμε μια αραίωση των πρώτων 25-30 κύκλων (συνήθως 1/100-1/200 ή και μεγαλύτερη) ως μητρικό DNA σε μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Γενικά, ύστερα από 60 περίπου κύκλους μπορούμε να έχουμε πολλαπλασιασμό του κομματιού DNA που θέλουμε κατά 10^9 με 10^{10} φορές.

Ύστερα από το τέλος της αντίδρασης τρέχουμε σε πήκτωμα αγαρόζης μια ποσότητα του προϊόντος (συνήθως 10λ) για να ελέγξουμε το μέγεθος των προϊόντων και επομένως το αν αυτά είναι σωστά.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βρίσκει πολλές εφαρμογές όπως στην παρασκευή ειδικών αλληλουχιών κλωνοποιημένου δίκλωνου DNA για χρήση σαν ανιχνευτών, στην παρασκευή cDNA βιβλιοθηκών από μικρές ποσότητες mRNA, στην παρασκευή μεγάλων ποσοτήτων DNA για προσδιορισμό της αμινοξικής αλληλουχίας (sequencing), στην ανάλυση μεταλλαγών και στη μεταλλαξιγένεση.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκαν στην εταιρία Minotech και είναι οι ακόλουθοι:

5' RAD9 S3:

5'-GATATTACGGACAATGATATATACAACACTATTTCTGAGGTTAGACGT
ACGCTGCAGGTCGAC-3'

3' RAD9 S2:

5'- AATCGTCCCTTTCTATCAATTATGAGTTTATATATTTTTATAATTATCGA
TGAATTCGAGCTCG-3'

CTR1 (για ανιχνευτή)

(+118) 5'-CGATATTATCGAGCATGTCATC-3'

(+944) 5'-TGTCTACCACATTGGCAGTTAC-3'

CMD1 (για ανιχνευτή)

5'-ATGTCCTCCAATCTTACCG-3'

5'-CTATTTAGATAACAAAGCAGC-3'

FRE1 (για ανιχνευτή)

(+1321F) 5'-GGAGCTTTCGCATACATG-3'

(+1804R) 5'-TTGTGTCCTCAACACTGG-3'

5 'FIT1 ORF (+637)

5'GCT CGT TCT CCA GTA ACA TCT G 3'

3 'FIT1 ORF (+1100)

5' GTC TCG ATA GTA GAG GAA GAA G 3'

5 ' TSA1 ORF (+165)

5'CTC AGA AGC TGC TAA GAA ATT C 3'

3 'TSA1 ORF (+518)

5' CAG TTA CAT GGC AAG ACA GTA C 3'

5 ' CLN3 ORF (+1247)

5'CAA ATG CTA CTA CTC CAA AGA G 3'

3 'CLN3 ORF (+1701)

5' ATC CAC AGA GGA AGT TGA TCT C 3'

5 ' SMF3 ORF (+890)

5' TAC TGG TCC ACT ACA TAT CTC C 3'

3 'SMF3 ORF (+1334)

5' TAG GTC AAC AAA CGA CTG TTA G 3'

Θρεπτικό μέσο YPD (Yeast Peptone Dextrose)

10gr yeast extract

20gr bacto peptone

20gr γλυκόζη

Τα υλικά αναφέρονται σε τελικό όγκο 1lt. Ακολουθεί αποστείρωση για 20' σε αυτόκαυστο. Αν θέλουμε στερεό θρεπτικό μέσο για άπλωμα τριβλίων, προσθέτουμε

πριν την αποστείρωση 20gr άγαρ και όταν το μίγμα κρυώσει (~60⁰C) μοιράζω σε τριβλία (25ml στο καθένα).

Θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete)

6.7gr yeast nitrogen base without aminoacids

20gr γλυκόζη

2gr μίγματος αμινοξέων

Τα υλικά αναφέρονται σε τελικό όγκο 1lt. Ακολουθεί αποστείρωση για 20' σε αυτόκαυστο. Αν θέλουμε στερεό θρεπτικό μέσο για άπλωμα τριβλίων, προσθέτουμε πριν την αποστείρωση 20gr άγαρ και όταν το μίγμα κρυώσει (~60⁰C) μοιράζω σε τριβλία (25ml στο καθένα).

Μίγμα αμινοξέων: 2gr από τα αμινοξέα Ala, Arg, Asp, Asn, Cys, Glu, Gln, Gly, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val.

Το θρεπτικό μέσο SC δεν είναι πλήρες αφού λείπουν τα αμινοξέα Ura (ουρακίλη), Leu, Trp και His. Αυτό γίνεται γιατί το θρεπτικό υλικό χρησιμεύει ως μέσο επιλογής και έτσι δεν γίνεται προσθήκη των αμινοξέων που αντιστοιχούν στις αυξοτροφίες διαφόρων στελεχών σακχαρομύκητα. Οι συγκεκριμένες αυξοτροφίες συμπληρώνονται με την εισαγωγή γονιδίων στο κύτταρο, που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι συγκεκριμένων αμινοξέων ή νουκλεοτιδίων.

Διαλύματα Αμινοξέων – νουκλεοτιδίων

Χρησιμοποιούνται για να γίνει η επιλογή των κυττάρων σε πιάτα με θρεπτικό SC, ανάλογα με την εκάστοτε αυξοτροφία.

Λευκίνη (Leu) 180 mM 100x

2.36 gr σε 100 ml H₂O

Ουρακίλη (Ura) 20 mM 100x

0.2242 gr σε 100 ml H₂O

Ιστιδίνη (His) 100 mM 300x

1.552 gr σε 100 ml H₂O

Τρυπτοφάνη (Trp) 55 mM 100x

1.123 gr σε 100 ml H₂O

Μετασχηματισμός κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*

Κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού γίνεται εισαγωγή DNA (συνήθως πλασμιδιακού) που φέρει κάποιες συγκεκριμένες ιδιότητες (για παράδειγμα κάποιον επίτοπο σε συγκεκριμένο γονίδιο, όπως εδώ το Rad9-9Myc).

- 1) Βάζουμε αρχική καλλιέργεια κυττάρων *S. cerevisiae* σε 5-10ml θρεπτικού YPD ολονύκτια στους 30°C.
- 2) Την επομένη, αραιώνουμε την αρχική καλλιέργεια σε 50ml YPD και περιμένουμε μέχρι η OD₅₅₀ ~0.6-0.8.
- 3) Μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε αποστειρωμένο falcon και φυγοκεντρούμε για 5' στις 3000rpm στους 4°C.
- 4) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1/2V νερό και φυγοκεντρούμε για 5' στις 3000rpm στους 4°C.
- 5) Αφαιρούμε το νερό και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 1ml 100mM LiAc και μεταφέρουμε το διάλυμα σε eppendorf.
- 6) Φυγοκεντρούμε για 7'' στις 13000rpm (spin) και αφιρούμε το υπερκείμενο.
- 7) Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 400λ 100mM LiAc και μοιράζουμε σε eppendorfs ανάλογα με τον αριθμό των μετασχηματισμών που θέλουμε να κάνουμε.

Σε κάθε μετασχηματισμό χρειάζονται 10⁸ κύτταρα

Όταν OD₅₅₀=1, τότε έχουμε 10⁷ κύτταρα/ml, άρα για OD₅₅₀=1 σε 100ml καλλιέργειας μπορούμε να κάνουμε 10 μετασχηματισμούς.

- 8) Φυγοκεντρούμε για 7'' στις 13000rpm (spin), αφαιρούμε το LiAc και προσθέτουμε αυστηρά με τη σειρά που αναγράφονται παρακάτω τα εξής:
240λ PEG 3350 50% (αποστειρωμένο)
36λ 1M LiAc
5λ φορέας-DNA (10γ/λ)
70λ νερό και πλασμιδιακό DNA (0.1-10γ)
- 9) Κάνουμε vortex για την επαναδιάλυση των κυττάρων.
- 10) Επωάζουμε για 30' στους 30°C.

- 11) Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 42⁰C για 30' προκειμένου να γίνει το heat shock των κυττάρων.
- 12) Φυγοκεντρούμε για 7'' στις 6-8000rpm (spin) και αφαιρούμε το μίγμα μετασχηματισμού.
- 13) Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 200λ SC ή νερό και απλώνουμε σε πιάτο επιλογής SC (αφού το στεγνώσουμε για ~15') που περιέχει τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυττάρων σακχαρομύκητα.

Πρωτεϊνικό εκχύλισμα για Western

(από Ausubel M. F., et al., 1999-2006)

- 1) Αφού μεγαλώσουν οι καλλιέργειες από τον μετασχηματισμό, παίρνουμε μονές και κάνουμε restreaking σε πιάτο επιλογής SC.
- 2) Όταν μεγαλώσουν και αυτές οι καλλιέργειες, ύστερα από την επώασή τους στους 30⁰C, βάζουμε αρχικές (starter) καλλιέργειες σε 5ml SC με τα απαραίτητα αμινοξέα (ή και σε YPD) και επωάζουμε ολονύκτια στους 30⁰C υπό ανακίνηση.
- 3) Την επομένη αραιώνουμε την καλλιέργεια ώστε να πάρουμε μια αρχική OD₅₅₀~0.2 και επωάζουμε στους 30⁰C υπό ανακίνηση μέχρι OD~0.8-1 (4-5 ώρες).
- 4) Μεταφέρουμε σε erpendorf των 2ml και φυγοκεντρούμε για 5', 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε 1ml παγωμένου νερού.
- 6) Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 4-5.
- 7) Προσθέτουμε 150λ 1.85M NaOH για να σπάσουν τα κύτταρα και 7.5% μερκαπτοαιθανόλη για να αναχθούν οι δυσουλφιδικοί δεσμοί.
2ml NaOH 1.85M + 7.5% μερκαπτοαιθανόλη
 370λ NaOH 10M
 150λ μερκαπτοαιθανόλη
 1480λ νερό
- 8) Αφήνουμε για 10' ακριβώς στον πάγο.

- 9) Προσθέτουμε 150λ TCA 55% για να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες.
- 10) Αφήνουμε για τουλάχιστον 10' στον πάγο.
- 11) Φυγοκεντρούμε για 10', 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- 12) Πετάμε το υπερκείμενο και ξαναφυγοκεντρούμε για να απομακρύνουμε όλη την ποσότητα του υπερκείμενου.
- 13) Επαναδιαλύουμε σε ~50λ χρωστικής (π.χ. Hu+DTT).

Παρασκευή πρωτεϊνικού πήκτωματος

Το πρωτεϊνικό πήκτωμα χρησιμοποιείται για να τρέξουμε πρωτεΐνες και να διακρίνουμε προσεγγιστικά το μέγεθός τους με τη βοήθεια μιας γνωστής πρωτεΐνης που τρέχει ταυτόχρονα (marker). Η οπτικοποίηση γίνεται με χρώση με χρωστική Coomassie. Το πρωτεϊνικό πήκτωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για να γίνει μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία του Western blot. Το πρωτεϊνικό πήκτωμα στη συνηθισμένη του μορφή αποτελείται από δύο τμήματα: το πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή running gel) και το πήκτωμα κατακάθισης (stacking gel), είναι δηλαδή ασυνεχές (discontinuous). Το δεύτερο χρησιμεύει στο να κατακαθίσουν οι πρωτεΐνες και να εισέλθουν όλες ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού όπου και θα δώσουν ύστερα από τη χρώση με Coomassie blue διαφορετικές ζώνες ανάλογα με το μέγεθός τους. Σε αυτό το πρωτεϊνικό πήκτωμα οι πρωτεΐνες τρέχουν με βάση το μέγεθός τους. Το ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο τρέχει το πήκτωμα αυτό είναι το SDS-PAGE.

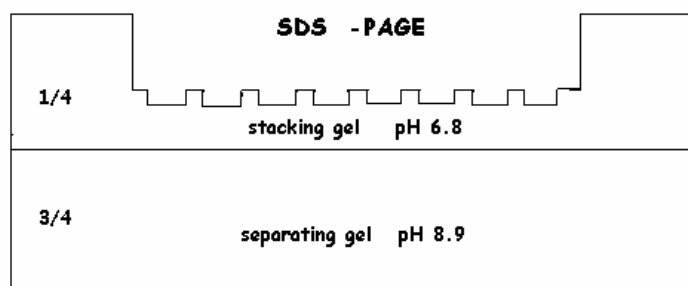
Για την παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού (περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα 12%) χρησιμοποιούνται με τη συγκεκριμένη σειρά τα συστατικά:

- 1) 6ml ακρυλαμίδα 30%.
- 2) 4.9ml απεσταγμένο νερό.
- 3) 3.8ml 1.5M Tris pH 8.8.
- 4) 150λ 10% SDS.
- 5) 150λ APS.
- 6) 6λ TEMED.

Τοποθετούμε το μίγμα αυτό σε κατάλληλη κατασκευή και καλύπτουμε με ισοπροπανόλη για την ευθυγράμμιση του διαλύματος μέχρι να πήξει. Αφού πήξει το

πήκτωμα διαχωρισμού, αφαιρούμε την ισοπροπανόλη, ξεπλένουμε με νερό, και κατασκευάζουμε το πήκτωμα κατακάθισης με τα συστατικά:

- 1) 830λ ακρυλαμίδα 30%.
- 2) 3.4ml απεσταγμένο νερό.
- 3) 630λ 1M Tris pH 6.8.
- 4) 50λ 10% SDS.
- 5) 50λ APS.
- 6) 5λ TEMED.



Αποτύπωμα Western (Western blot)

Το Western blot είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για τη μεταφορά πρωτεϊνών από ένα πρωτεϊνικό πήκτωμα σε μια μεμβράνη (συνήθως νιτροκυτταρίνης ή PVDF). Ύστερα από τη μεταφορά της πρωτεΐνης στη μεμβράνη γίνεται εφαρμογή του αντισώματος που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη για να γίνει εντοπισμός της πρωτεΐνης και περαιτέρω μελέτη της. Το Western blot χρησιμοποιείται συνήθως για τον έλεγχο της εξειδίκευσης κάποιου αντισώματος. Με Western blots γίνεται ο χαρακτηρισμός αντισωμάτων και ο έλεγχος του αν μια πρωτεΐνη υπάρχει μέσα στο δείγμα που φορτώσαμε στο πρωτεϊνικό πήκτωμα και σε ποια ποσότητα, ύστερα από την εφαρμογή του κατάλληλου αντισώματος που την αναγνωρίζει.

Υλικά:

- Χαρτί Watmann

- Μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF)

- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών

Για 2X:

0.1M Tris/HCl pH 8.0

0.2% μερκαπτοαιθανόλη

20% γλυκερόλη

2% SDS (στα native πηκτώματα δεν βάζουμε SDS)

0.002% bromophenol blue

Χρησιμοποιείται για το φόρτωμα των πρωτεϊνών σε πρωτεϊνικά πηκτώματα.

- PAGE ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer)

1X:

0.19M γλυκίνη

25mM Tris base

0.1% SDS

Χρησιμοποιείται για να τρέχουν τα αποδιατακτικά πρωτεϊνικά πηκτώματα.

- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)

20mM Tris base

150mM γλυκίνη

10% μεθανόλη

Χρησιμοποιείται κατά τη μεταφορά της πρωτεΐνης από ένα πρωτεϊνικό πηκτώμα σε μια μεμβράνη κατά το Western blot.

- Διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε μη ειδικές θέσεις (blocking solution)

5% γάλα σε TBS

Δεσμεύονται οι μη ειδικές θέσεις και έτσι το αντίσωμα, έχοντας μεγαλύτερη συγγένεια με την πρωτεΐνη που αναγνωρίζει, έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να αναγνωρίσει τη σωστή πρωτεΐνη και όχι κάποια άλλη.

-TBS

20mM Tris/HCl pH 7.5

200mM NaCl

- Διάλυμα ξεπλύματος A (Wash A, TTBS)

10mM Tris/HCl pH 7.5

0.9% NaCl

0.05% Tween 20

Το διάλυμα ξεπλύματος A χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα της μεμβράνης ύστερα από τη χρώση με βαφή Ponceau.

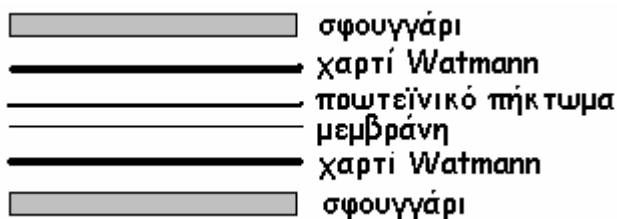
- Χρωστική Ponceau

20ml Ponceau S concentrate Sigma P7767 σε 180λ νερό ή 0.2% Ponceau S σε 3% (w/o) TCA.

1) Αρχικά τρέχουμε τα πρωτεϊνικά δείγματα σε πρωτεϊνικό πήκτωμα (συνήθως στα 80V) χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) 2X αραιωμένο σε 1X στον τελικό όγκο του δείγματος. Εάν πρόκειται για πήκτωμα με SDS (αποδιατακτικό) τότε τα δείγματα βράζονται για 5' στους 95°C ακριβώς πριν το φόρτωμα και το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης είναι επίσης με SDS.

2) Στη συνέχεια τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μαζί με τη μεμβράνη και τα χαρτιά Watmann (3 κομμάτια) ως εξής:

6 κομμάτια χαρτί Watmann και ένα κομμάτι μεμβράνης στο μέγεθός του πηκτώματος του οποίου τις πρωτεΐνες θέλουμε να μεταφέρουμε τοποθετούνται στη συσκευή με τη σειρά που φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί:



Πριν την τοποθέτηση βρέχουμε με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) τα σφουγγάρια και τα χαρτιά Watmann. Κόβουμε μόνο το πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή running πήκτωμα). Η PVDF μεμβράνη πριν τοποθετηθεί εμβαπτίζεται σε μεθανόλη ώστε να καταστεί υδρόφοβη. Επίσης, η μεμβράνη τοποθετείται έτσι ώστε κατά τη μεταφορά να είναι στραμμένη προς το θετικό πόλο. Αυτό γίνεται γιατί το SDS που περιέχεται στο πήκτωμα φορτίζει τις πρωτεΐνες αρνητικά οπότε αυτές μετακινούνται προς το θετικό πόλο.

3) Η μεταφορά γίνεται στα 110mA ολονύκτια.

- 4) Την επόμενη μέρα παίρνουμε τη μεμβράνη και τη βάζουμε με χρωστική Ponceau για 1-2' προσέχοντας η πλευρά της μεμβράνης πάνω στην οποία υπάρχουν οι πρωτεΐνες (αυτή που ήταν σε επαφή με το πήκτωμα) να είναι στραμμένη προς τα πάνω.
- 5) Ξεβάζουμε τη χρωστική Ponceau από τη μεμβράνη με TTBS μέχρι να φύγει εντελώς, αφού σημειώσουμε με μολύβι τις μπάντες του marker.
- 6) Προσθέτουμε το διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνες που δεσμεύονται στις μη ειδικές θέσεις (γάλα) και αφήνουμε για τουλάχιστον 1 ώρα.
- 7) Αφαιρούμε το γάλα και προσθέτουμε το α' αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε 1% γάλα (εδώ το anti-myc σε αραιώση 1/500), το οποίο και αφήνουμε για όλη τη νύχτα στους 4⁰C.
- 8) Την επόμενη μέρα αφαιρούμε το α' αντίσωμα και ξεπλένοντας για 10' με το διάλυμα ξεπλύματος A.
- 9) Ξεπλένουμε επιπλέον για 2X5' με το διάλυμα ξεπλύματος A.
- 10) Προσθέτουμε το β' αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση σε 1% γάλα (εδώ HRP σε 1/20000 αραιώση) το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στο α' το οποίο με τη σειρά του έχει προσδεθεί ειδικά στις πρωτεΐνες της μεμβράνης. Επώαζουμε για 45'-1 ώρα.
- 11) Αφαιρούμε το β' αντίσωμα ξεπλένοντας για 10' με το διάλυμα ξεπλύματος A.
- 12) Ξεπλένουμε επιπλέον για 2X5' με το διάλυμα ξεπλύματος A.
- 13) Ξεπλένουμε για 10' με το διάλυμα ξεπλύματος A.
- 14) Στη συνέχεια γίνεται η εμφάνιση των αποτελεσμάτων η οποία εδώ έγινε ύστερα από τη χρήση του supersignal trial kit (προσθήκη ίσων όγκων διαλυμάτων του kit και επώαση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου) για την ανίχνευση του HRP αντισώματος με το μηχάνημα LAS-3000 Intelligent Dark Box μετά από ικανή έκθεση της μεμβράνης.

Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP assay)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης κάποιας πρωτεΐνης με συγκεκριμένες περιοχές DNA. Αυτό γίνεται ακολουθώντας μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει καλλιέργεια των κυττάρων που παράγουν την πρωτεΐνη που επιθυμούμε, μονιμοποίηση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών στο DNA με φορμαλδεΰδη (crosslinking), σπάσιμο των κυττάρων, κατατεμαχισμός της χρωματίνης με χρήση υπερήχων, επώαση με το κατάλληλο αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη που θέλουμε να δούμε αν προσδέεται με το DNA και τέλος χρήση PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) με εκκινητές για συγκεκριμένες περιοχές DNA, ώστε να διαπιστωθεί αν η υπό μελέτη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με αυτές τις περιοχές του DNA.

TBS 20mM Tris/HCl pH 7.5 200mM NaCl	Proteinase K buffer 0.01M Tris/HCl pH 7.8 0.005M EDTA pH 8.0 0.5% SDS
FA 150mM NaCl 50mM Hepes pH 7.5 150mM NaCl 1mM EDTA pH 8.0 1% Triton X100 0.1% άλας δεοξυχολικού Na	FA 500mM NaCl 50mM Hepes pH 7.5 500mM NaCl 1mM EDTA pH 8.0 1% Triton X100 0.1% άλας δεοξυχολικού Na
Διάλυμα έκπλυσης III (Wash III) 10mM Tris/HCl pH 8.0 1mM EDTA pH 8.0 250mM LiCl 0.5% NP-40 0.5% άλας δεοξυχολικού Na	Διάλυμα έκλουσης (elution buffer) 50mM Tris/HCl pH 7.5 10mM EDTA pH 8.0 1% SDS

TE

10mM Tris/HCl pH 8.0

1mM EDTA pH 8.0

- 1) Βάζουμε σε 10ml SC (με τα απαραίτητα αμινοξέα επιλογής) ολονύκτια καλλιέργεια με το στέλεχος που επιθυμούμε.
- 2) Την επομένη, αραιώνουμε σε 50ml SC την καλλιέργεια (~1/5 αραιώση) ώστε $OD_{550} \sim 0.2$ και υπολογίζουμε σε πόση περίπου ώρα $OD_{550} \sim 0.6-0.8$ (κάθε 90' γίνεται ο διπλασιασμός των κυττάρων).
- 3) Προσθέτουμε σε κάθε καλλιέργεια των 50 ml 1.35ml HCHO και ανακινούμε σε shaker για 20' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Βάζουμε τις καλλιέργειες σε falcon των 50ml μαζί με 0.47gr γλυκίνη η οποία χρησιμεύει ως blocking για να μειώσει την μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος.
- 5) Φυγοκεντρούμε στις 2500rpm στους 4°C για 5'.
- 6) Ξεπλένουμε το ίζημα με 25ml (1/2V) παγωμένο TBS και φυγοκεντρούμε στις 2500rpm στους 4°C για 5'.
- 7) Επαναλαμβάνουμε το βήμα 6.
- 8) Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 400λ FA 150mM και τοποθετούμε σε eppendorfs που έχουν ~400λ glass beads και προσθέτουμε επίσης 6λ proteinase inhibitor cocktail.
- 9) Κάνουμε vortex για 40' σε στους 4°C για να σπάσουν τα κύτταρα.
- 10) Τρυπάμε το κάτω μέρος του eppendorf με μια αποστειρωμένη βελόνα και τοποθετούμε σε eppendorf των 2ml.
- 11) Φυγοκεντρούμε για 1' σε μέγιστες rpm, ώστε να πάρουμε την ποσότητα των σπασμένων κυττάρων στα eppendorf των 2ml. Επαναδιαλύουμε ήπια με την πιπέτα σε πάγο.
- 12) Ακολουθεί σπάσιμο της χρωματίνης με υπερήχους 5X12'' σε amplitude 40.
- 13) Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 30' στους 4°C.
- 14) Από το υπερκείμενο κρατάω 40λ ως IP, 40λ ως INPUT (το οποίο αποθηκεύω στους -20°C και 120λ (τα οποία αποθηκεύω στους -80°C). Τα IP δείγματα περιέχουν χρωματίνη πάνω στην οποία βρίσκεται προσκολλημένη η πρωτεΐνη που θα αναγνωριστεί από το αντίσωμα, ενώ τα INPUT δείγματα περιέχουν

χρωματίνη χωρίς επεξεργασία με αντίσωμα και χρησιμεύουν ως ποσότητες ελέγχου που θα βοηθήσουν στην κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μετά την διεξαγωγή της PCR πραγματικού χρόνου.

- 15) Για κάθε IP δείγμα προσθέτω 170 μ l FA 150mM και 8 μ l αντίσωμα [εδώ πολυκλωνικό rabbit c-Myc anti-rabbit IgG (για τη Rad9), anti-HA IgG (για τις Ynl032w, Ynl056w, Ynl099c και Spl2) ή anti-GST IgG (για την Tid3) της Santa Cruz Biotechnology] και αφήνω ολονύκτια σε περιστρεφόμενο ρότορα στους 4⁰C.

Ταυτόχρονα, προσθέτω σε eppendorf 0.1gr A sepharose beads (που θα προσδεθούν αργότερα στο αντίσωμα) μαζί με 1ml νερό και τα εξισορροπούμε ως εξής:

- α) Αναδεύουμε με το χέρι, φυγοκεντρούμε στις 4000rpm για 1' σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
 - β) Επαναλαμβάνουμε το βήμα (α) ύστερα από την προσθήκη άλλου 1ml νερού.
 - γ) Προσθέτουμε 1ml FA 150mM στο ίζημα, ανακινούμε με το χέρι και αφήνουμε σε περιστρεφόμενο ρότορα στους 4⁰C για 10'.
 - δ) Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm για 1' σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml FA 150mM. Αφήνουμε στον περιστρεφόμενο ρότορα ολονύκτια.
 - ε) Την επομένη, φυγοκεντρούμε στις 4000rpm για 1' σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρούμε το υπερκείμενο FA και προσθέτουμε 400 μ l φρέσκου FA 150mM.
- 16) Μοιράζουμε 50 μ l beads σε κάθε δείγμα μαζί με 2 μ l carrier DNA και αφήνουμε για 90' σε περιστρεφόμενο ρότορα στους 4⁰C.
- Στη θέση των A sepharose beads μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε G sepharose beads τα οποία και εξισορροπούμε ως εξής:
- α) Για κάθε eppendorf με δείγμα χρωματίνης χρησιμοποιούμε ~60-70 μ l G sepharose beads τα οποία και βάζουμε σε eppendorf.
 - β) Προσθέτουμε 1ml FA 150mM, αναδεύουμε με το χέρι, φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
 - γ) Επανάληψη του βήματος (β) 3 φορές.
 - δ) Από το τρίτο ξέπλυμα με FA αφήνουμε την ποσότητα FA με τα beads (~70 μ l) που θα χρησιμοποιήσουμε στα IPs.

- 17) Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1', στο ίζημα προσθέτουμε 1ml FA 150mM και αφήνουμε σε περιστρεφόμενο ρότορα σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- 18) Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1', στο ίζημα προσθέτουμε 1ml FA 500mM και αφήνουμε σε περιστρεφόμενο ρότορα σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- 19) Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1', στο ίζημα προσθέτουμε 1ml Wash III και αφήνουμε σε περιστρεφόμενο ρότορα σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- 20) Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1', στο ίζημα προσθέτουμε 1ml TE και αφήνουμε σε περιστρεφόμενο ρότορα σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- 21) Παράλληλα βγάζουμε τα INPUTs από τους -20°C και ξεπαγώνουμε RNase 10mg/ml. Σε 1ml TE διαλύουμε 20λ RNase.
- 22) Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1', στο ίζημα των INPUT και των IP δειγμάτων προσθέτουμε 100λ από το μίγμα TE/RNase και επωάζουμε στους 37°C για 20'.
- 23) Στα INPUTs προσθέτουμε 350λ διάλυμα έκλουσης και 40λ 2.5M NaCl και επωάζουμε στους 65°C για τουλάχιστον 5 ώρες (ή ολονύκτια).
- 24) Στα IPs προσθέτουμε 1ml TE, φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και πετάμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 250λ διάλυμα έκλουσης και αφήνουμε σε περιστρεφόμενο ρότορα σε θερμοκρασία δωματίου για 15'. Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και κρατάμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf. Στα beads προσθέτουμε άλλα 250λ διαλύματος έκλουσης και ακολουθώντας την ίδια διαδικασία τοποθετούμε και αυτά στο erpendorf ώστε τελικά να έχουμε 500λ διαλύματος έκλουσης (που θα φέρει τις πρωτεΐνες προσκολλημένες στη χρωματίνη). Σε αυτή την ποσότητα προσθέτουμε 40λ 2.5M NaCl.
- 25) Επωάζουμε τα δείγματα των IPs μαζί με αυτά των INPUTs στους 65°C για τουλάχιστον 5 ώρες (ή ολονύκτια).
- 26) Προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 100% και αφήνουμε ολονύκτια στους -20°C για κατακρήμνιση.
- 27) Την επομένη, φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 30' στους 4°C και πετάμε το υπερκείμενο.

- 28) Στο ίζημα προσθέτουμε 500λ αιθανόλης 70%, φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου, πετάμε το υπερκείμενο και αφήνουμε στους 37⁰C τα ιζήματα να στεγνώσουν.
- 29) Στο χρόνο αυτό φτιάχνουμε ένα μίγμα που περιέχει:
700λ νερό
77λ 10X ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης K
14λ πρωτεΐνάση K 20mg/ml
- 30) Από το παραπάνω μίγμα προσθέτουμε σε κάθε στεγνό ίζημα 112λ και επωάζουμε για 30' στους 42⁰C.
- 31) Προσθέτουμε 390λ νερό για αύξηση του όγκου στα 500λ περίπου και παράλληλα προσθέτουμε 1/10V 3M οξικό νάτριο pH 5.2 (εδώ 50λ), 250λ φαινόλη, 250λ χλωροφόρμιο και κάνουμε vortex.
- 32) Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10-15' σε θερμοκρασία δωματίου και κρατάμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorf.
- 33) Προσθέτουμε 500λ χλωροφόρμιο, κάνουμε vortex, φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10-15' σε θερμοκρασία δωματίου και κρατάμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorf.
- 34) Προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 100% και 1λ γλυκογόνο και αφήνουμε στους -80⁰C ολονύκτια για κατακρήμνιση.
- 35) Την επομένη φυγοκεντρούμε για 30' στους 4⁰C, αφαιρούμε το υπερκείμενο, ξεπλένουμε με αιθανόλη 70% και φυγοκεντρούμε για 5' στις 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα στους 37⁰C για να στεγνώσει.
- 36) Επαναδιαλύουμε τα IP και INPUT δείγματα με τις χρωματίνες σε 50λ αποστειρωμένο νερό και συνεχίζουμε με PCR πραγματικού χρόνου.

PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου εμφανίζει σε σχέση με την κλασική PCR το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων της αντίδρασης. Επίσης, είναι δυνατή η ανίχνευση της συσσώρευσης του προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Από κάθε δείγμα INPUT παίρνουμε ορισμένη ποσότητα (π.χ. 5λ) και φτιάχνουμε ένα μίγμα από το οποίο κάνουμε με αποστειρωμένο νερό 6 διαδοχικές αραιώσεις (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64), οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν ως standard ποσότητες για την κατασκευή της καμπύλης με βάση την οποία θα γίνουν οι μετρήσεις των προϊόντων της PCR.

Στην ποσότητα των INPUT που περισσεύει προσθέτουμε νερό μέχρι τελικού όγκου 250λ. Από αυτή την ποσότητα, τα 5λ χρησιμοποιούνται για την PCR, ενώ 5λ χρησιμοποιούνται επίσης και από την ποσότητα των IPs (αρχική ποσότητα χρωματίνης IP=50λ).

Μια τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω:

11.88λ νερό

5λ INPUT ή IP

1λ εκκινητής I (forward) 200ng/λ

1λ εκκινητής II (reverse) 200ng/λ

0.5λ dNTPs 10mM

2λ MgCl₂ 25mM

2.5λ ρυθμιστικό διάλυμα Taq πολυμεράσης 5 u/λ

0.12λ Taq πολυμεράση

1λ χρωστική SYBRE green

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 25λ και συνήθως παρασκευάζεται ένα συμπυκνωμένο μίγμα (π.χ. 20X) με όλα τα παραπάνω υλικά εκτός του μητρικού DNA από το οποίο μοιράζουμε 20λ σε κάθε αντίδραση. Η χρωστική CYBRE green έχει την ικανότητα να παρεισφρύει μέσα σε δίκλωνο DNA και καθώς το κάνει αυτό, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται κατά το ποσοστό αύξησης του προϊόντος (γραμμική σχέση μεταξύ έντασης φθορισμού και ποσότητας δίκλωνου DNA).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στη συνέχεια:

PHO5

ORF1: 5'-CGATATCCTAAACTTTTTGAC-3'

ORF2: 5'-GTTTCAATTGGAACAACAGCA-3'

CEN3

5'-CGC TTA TAG TAC AGT ACC TA-3'

5'-ACG TTT CAT ATA TCC ATT CA-3'

CTR1

5'-CCCTACTATACTACAAACCGATA-3'

5'-CCTCTCGAGATGACAATAC-3'

CTR1 (+118----+360)

(+118) 5'-CGATATTATCGAGCATGTCATC-3'

(+360) 5'-ATCCAT CCCTGAAGAGCTACTG-3'

CTR1 (+360----+597)

(+360) 5'-TATGGACATGAGTATGGGAATG-3'

(+597) 5'-GGAGTTTGCTGAAGGTAAAGTG-3'

FRE1

5'-GTTGAAGAATACCCGATA-3'

5'-GTAGATTAATCATCGCAAGAT-3'

FRE2

5'-ACGAATGATACACCCATATT-3'

5'-ATTGCGTTGTGTGACTCTAA-3'

ACT1

5'-TGATGGTGTACTCACGT-3'

5'-CCATCTGGAAGTTCGTAGG-3'

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με το πρόγραμμα Vector NTI και η παραγωγή τους από την εταιρία Minotech.

Οι εκκινητές για *PHO5* χρησιμοποιήθηκαν για αρνητικό έλεγχο αφού οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες δεν εμπλέκονται στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Το προϊόν που προέκυψε από αυτά τα δείγματα PCR χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αντίστοιχων προϊόντων που προέκυπταν από τους υπόλοιπους εκκινητές.

Ένα δεύτερο επίπεδο κανονικοποίησης έγινε χρησιμοποιώντας τα προϊόντα PCR από τα INPUT δείγματα ως προς τα αντίστοιχα από τα IPs, για να μην υπάρχουν αποκλίσεις οφειλόμενες σε διαφορετικές ποσότητες αρχικής χρωματίνης.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στη real time PCR με τους εκκινητές *CTR1*, *FRE1*, *CEN3*, *PHO5* ήταν:

- 1) Incubate at 94⁰C for 2'
- 2) Incubate at 94⁰C for 30''
- 3) Incubate at **52⁰C** for 30'' (56⁰C για CENIII εκκινητές)
- 4) Incubate at 72⁰C for 30''
- 5) Incubate at 79⁰C for 1''
- 6) Plate read

- 7) Incubate at 81⁰C for 1’’
- 8) Plate read
- 9) Incubate at 83⁰C for 1’’
- 10) Plate read
- 11) Incubate at 84⁰C for 1’’
- 12) Plate read
- 13) Incubate at 85⁰C for 1’
- 14) Plate read
- 15) Go to line 2 for **35** times more
- 16) Incubate at 72⁰C for 2’
- 17) Perform melting curve from 60⁰C to 94⁰C, read every 0.5⁰C, hold for 1’ between reads
- 18) Incubate at 15⁰C for 1’’

Απομόνωση RNA και σήμανση για μικροσυστοιχίες DNA

Σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο γίνεται απομόνωση RNA που θα χρησιμοποιηθεί σε διαδικασία μικροσυστοιχίας DNA. Τα βήματα που περιλαμβάνει είναι η απομόνωση RNA από κύτταρα ζύμης, η επεξεργασία με DNA εφόσον το δείγμα RNA δεν είναι καθαρό από DNA, αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση του πρώτου κλώνου με βάση το RNA, σύνθεση δεύτερου κλώνου cDNA, απομόνωση cDNA, *in vitro* μεταγραφή για την παρασκευή του mRNA που πρόκειται να σημειωθεί, καθαρισμός του mRNA με κολώνα, ποσοτικοποίηση και εκτίμηση της ποιότητας του δείγματος, σήμανση του mRNA και τέλος, υβριδοποίηση με την κατάλληλη χρωστική. Για κάθε πείραμα microarray παρασκευάζεται mRNA από το στέλεχος προς μελέτη αλλά και από αγρίου τύπου στέλεχος με βάση το οποίο θα γίνει η σύγκριση της αλλαγής του μεταγραφικού προτύπου. Τα 2 δείγματα mRNA από το κάθε πείραμα σημαίνονται με διαφορετική χρωστική και το πείραμα επαναλαμβάνεται με τα 2 δείγματα σημασμένα αντίστροφα με τις χρωστικές (dye swap).

I) Απομόνωση RNA με θερμή όξινη φαινόλη

- 1) Ανάπτυξη καλλιιεργειών (50ml) μέχρι OD 0.5-0.8 ώστε να επιτευχθεί εκθετική φάση.
- 2) Σύλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε 2500g σε θερμοκρασία δωματίου (για να αποφευχθεί το σοκ ψύξης που αλλάζει το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων).
- 3) Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 2.25ml AE ρυθμιστικό διάλυμα. Μεταφορά σε σωλήνα των 15ml που περιέχει 2.5ml όξινη φαινόλη προθερμασμένη στους 65⁰C σε υδατόλουτρο και 250λ 10% SDS. Γίνεται vortex για 15-20''. Μεταφορά του σωλήνα στους 65⁰C για 1 ώρα, κάνοντας vortex για 15'' κάθε 10'.
- 4) Μετά το τελικό vortex, πάγωμα του σωλήνα σε πάγο για 10' όπου οι φάσεις διαχωρίζονται και προσθήκη 250λ 3M CH₃COONa pH 5.2 (1/10V).
- 5) Διαχωρισμός των φάσεων με φυγοκέντρηση στις 2500g για 5' στους 4⁰C (ή και σε θερμοκρασία δωματίου).
- 6) Επεξεργασία 1 φορά με φαινόλη-χλωροφόρμιο (1.25ml από το καθένα) και 1 φορά με χλωροφόρμιο (2.5ml).
- 7) Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωλήνα και προσθήκη 6.875ml 100% αιθανόλη (2.5V) και επώαση για 1 ώρα στους -80⁰C ή τουλάχιστον 6 ώρες στους -20⁰C.
- 8) Φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 30' στους 4⁰C.
- 9) Ξέπλυμα με 500λ 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση για 5' στις 3000rpm.
- 10) Επαναδιάλυση σε 100λ νερό και ηλεκτροφόρηση σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης για να διαπιστωθεί αν υπάρχει DNA καθώς και η ποιότητα του RNA.

3M CH₃COONa pH (MW 82.03) pH 6.0 (100ml)	Ρυθμιστικό διάλυμα AE
CH ₃ COONa 24.61gr	50mM CH ₃ COONa pH 6.0 (833λ 3M για 50ml)
προσθήκη νερού μέχρι περίπου 50ml	10mM EDTA pH 8.0 (1ml EDTA 0.5M για 50ml)
ρύθμιση pH με οξικό οξύ	
προσθήκη νερού μέχρι 100ml (το νερό δε χρειάζεται να είναι αποστειρωμένο ή	

DEPC, καθώς θα προστεθεί σε ολόκληρα κύτταρα)	
---	--

II) Επεξεργασία με DNase

Το βήμα αυτό πραγματοποιείται εφόσον από την προηγούμενη ηλεκτροφόρηση παρατηρηθεί ότι στο δείγμα RNA υπάρχει και DNA.

Γίνεται η παρακάτω αντίδραση:

20γ (Xλ) RNA

10λ RQ1 RNase free DNase

10λ DNase

(100-X)λ νερό

100λ

Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 2.5V αιθανόλη 100% και 1/10V CH₃COONa pH 5.2 και τέλος, επαναδιάλυση σε 20λ νερό. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης και ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση.

III) Αντίστροφη μεταγραφή-σύνθεση πρώτου κλώνου

Υλικά

OligoT primer, 5' MC-T7-(dT)24V 3', 65mer (100ng)

5X First Strand Buffer (Superscript)

0.1M DTT

dNTPs (10mM each)

Superscript III 200u/λ

- 1) Σε σωλήνα 0.2ml προσθήκη 4γ RNA σε τελικό όγκο 11.5λ (maximum).
- 2) Προσθήκη 1.5λ OligoT εκκινητή, 5' MC-T7-(dT)24V 3', 65mer (100ng)
- 3) Ρύθμιση όγκου στα 13λ με DEPC νερό αν είναι απαραίτητο.
- 4) Επώαση στους 70⁰C για 10' (αποδιάταξη) και στη συνέχεια γρήγορη φυγοκέντρηση (spin).
- 5) Προετοιμασία μίγματος (χωρίς το ένζυμο) και προθέρμανση αυτού στους 50⁰C για 5'.
- 6) Προσθήκη 7λ μίγματος: 4λ 5X First strand buffer
1λ 0.1M DTT
1λ dNTPs (10mM each)

Προσθήκη του μίγματος στο RNA και προσθήκη 1λ αντίστροφης μεταγραφάσης (Superscript III 200u/λ).

- 7) Επώαση: 20' στους 44⁰C
1 ώρα 45' στους 50⁰C
15' στους 75⁰C (απενεργοποίηση αντίστροφης μεταγραφάσης)
- 8) Η διαδικασία προχωρά απευθείας στη σύνθεση του δεύτερου κλώνου cDNA.

IV) Σύνθεση του δεύτερου κλώνου cDNA

Αντίδραση (100λ τελικός όγκος)

- 1) 20λ αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (αν είναι μικρότερος ο όγκος συμπληρώνουμε με DEPC νερό).
- 2) Μίγμα αντίδρασης (προετοιμασία στον **πάγο**)
55λ DEPC νερό (στον πάγο)
20λ 5X second strand buffer
1.5λ dNTPs1(0mM each)
- 3) Προσθήκη
2λ DNA pol I (10u/λ)
1λ RNase H (2u/λ)
0.5λ *E.coli* DNA ligase (10u/λ)
- 4) Επώαση στους 16⁰C για 2 ώρες.
- 5) Προσθήκη 1.5λ T4 πολυμεράσης (3u/λ).
- 6) Επώαση στους 16⁰C για 15'.
- 7) Αποθήκευση στους -20⁰C ή προχωράμε στην απομόνωση του cDNA

Η προσθήκη της T4 πολυμεράσης δεν είναι απαραίτητα καθώς η απουσία της δεν επηρεάζει την τελική ποσότητα ή ποιότητα του mRNA που θα παραχθεί.

V) Απομόνωση cDNA

- 1) Προσθήκη DEPC νερού μέχρι τελικού όγκου 200λ.
- 2) Προσθήκη 200λ φαινόλης/χλωροφορμίου, ανάμιξη με vortex, φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 5' και μεταφορά σε καθαρό σωλήνα.
- 3) Προσθήκη 200λ χλωροφορμίου ανάμιξη με vortex, φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 5' και μεταφορά σε καθαρό σωλήνα.

- 4) Φυγοκέντρηση ξανά στις 12000rpm και απομάκρυνση της οργανικής φάσης (αν υπάρχει).
- 5) Προσθήκη: 100λ 7.5M οξικό αμμώνιο
1λ γλυκογόνο
400λ ισοπροπανόλη
- 6) Καλή ανάμιξη και επώαση για 30' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 20'
- 8) Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του ιζήματος με 75% αιθανόλη.
- 9) Προχωράμε ή αποθήκευση στους -20°C.
- 10) Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 5' και απομάκρυνση αιθανόλης.
- 11) Στέγνωμα ιζήματος στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και προχωράμε στην *in vitro* μεταγραφή.

VI) *In vitro* μεταγραφή

Σε σωλήνες των 0.2ml (για αποφυγή εξάτμισης)

Αντίδραση (20λ τελικός όγκος)

7.25λ νερό (αποστειρωμένο, RNase free από το kit)

2λ 10X T7 ρυθμιστικό διάλυμα

1.5λ ATP (100mM)

1.5λ GTP (100mM)

1.5λ CTP (100mM)

0.75λ UTP (100mM)

1.5λ aaUTP (50mM)

2λ 0.1M DTT

2λ T7 πολυμεράση (OXI ΣΤΟ ΜΙΓΜΑ)

Το 10X T7 ρυθμιστικό διάλυμα προθερμαίνεται στους 37°C για 10' για την αποφυγή δημιουργίας κατακρημνισμάτων. Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάζεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- 1) Επαναδιάλυση του ιζήματος που πήραμε από την απομόνωση του cDNA σε 18λ μίγμα αντίδρασης.
- 2) Προσθήκη του ενζύμου (2λ).
- 3) Επώαση στους 42°C (ή 37°C) για 6 ώρες.
- 4) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%, 1-2λ της αντίδρασης.

- 5) Απομόνωση του mRNA με το RNeasy mini kit και ποσοτικοποίηση με Nanodrop.

VII) Καθαρισμός mRNA με κολώνα RNeasy

Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

- 1) Για κάθε δείγμα mRNA παίρνουμε **0.35ml RLT** ρυθμιστικό διάλυμα και πριν τη χρήση γίνεται προσθήκη **β-μερκαπτοαιθανόλης** (10λ/ml RLT).
- 2) Ρύθμιση όγκου **στα 100λ με DEPC** νερό. **Προσθήκη του RLT** με τη β-μερκαπτοαιθανόλη και καλή ανάμιξη.
- 3) Προετοιμασία μιας RNeasy κολώνας που τοποθετείται μέσα σε σωλήνα 2ml (kit). Προσθήκη **250λ απόλυτης αιθανόλης** στο δείγμα και καλή ανάμιξη με την πιπέτα. Δεν πρέπει να γίνει φυγοκέντρηση γιατί τα νουκλεϊκά οξέα βρίσκονται σε ημι-κατακρημνισμένη κατάσταση.
- 4) Το δείγμα (700λ) τοποθετείται στην κολώνα και γίνεται **φυγοκέντρηση σε μέγιστες rpm για 15''**. Το μη κατακρατηθέν υλικό (flow-through) περνά από την κολώνα **για μια ακόμη φορά** και στη συνέχεια το πετάμε μαζί με το σωλήνα συλλογής.
- 5) Μεταφορά της κολώνας σε νέο 2ml σωλήνα συλλογής (kit). Προσθήκη **500λ RPE** ρυθμιστικό διάλυμα (με αιθανόλη) στην κολώνα και **φυγοκέντρηση σε μέγιστες rpm για 15''**. Πετάμε το μη κατακρατηθέν υλικό αλλά ξαναχρησιμοποιούμε το σωλήνα συλλογής.
- 6) Προσθήκη άλλων **500λ RPE** ρυθμιστικού διαλύματος (με αιθανόλη) στην κολώνα και **φυγοκέντρηση σε μέγιστες rpm για 2'** σε μέγιστες rpm. Πετάμε το μη κατακρατηθέν υλικό και το σωλήνα συλλογής.
- 7) Επαναφυγοκέντρηση σε σωλήνα των 1.5ml για 1' και πετάμε το μη κατακρατηθέν υλικό και το σωλήνα συλλογής. Τοποθέτηση κολώνας σε 1.5ml RNase free σωλήνα (kit).
- 8) Τοποθέτηση στην κολώνα **40λ RNase free νερό** (kit) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2'. Έκλουση με φυγοκέντρηση σε μέγιστες rpm για 1'. Επανάληψη της έκλουσης με άλλα 40λ RNase free νερό. Τοποθέτηση του σωλήνα σε πάγο. Δεν πετάμε την κολώνα μέχρι να γίνει η ποσοτικοποίηση.

VIII) Σήμανση mRNA

Η διαδικασία γίνεται στο **σκοτάδι** σε θερμοκρασία δωματίου.

- 1) Χρησιμοποιείται ποσότητα 6γ δείγματος RNA. Στην ποσότητα αυτή γίνεται προσθήκη 15λ SIC RNA μίγμα (Spiked In Controls για κανονικοποίηση, από *Bacillus subtilis*). Αυτός ο όγκος δείγματος ρυθμίζεται στα 8λ ύστερα από μείωσή του σε επιταχυντή που χρησιμοποιεί κενό αέρος (speed-vac).
- 2) Αντίδραση (20λ τελικός όγκος)
8λ aaRNA (6γ RNA+SIC), αν ο όγκος είναι μικρότερος, ρυθμίζεται στα 8λ με DEPC νερό.
2λ 0.5M δικαρβονικό νάτριο pH 9.0
10λ DMSO
- 3) Θέρμανση μίγματος στους 50⁰C για 5'.
- 4) Μεταφορά των 20λ του δείγματος στο στεγνό ίζημα της χρωστικής (Alexa 555 ή Alexa 647) και επαναδιάλυση με την πιπέτα (OXI φυγοκέντρηση).
- 5) Επώαση για 2-2.5 ώρες στο σκοτάδι στους 50⁰C.
- 6) Προσθήκη 5λ νερού για να αυξηθεί ο όγκος στα 25λ.
- 7) Καθαρισμός του σημασμένου RNA με κολώνα G50 **2 φορές**.
- 8) Προσθήκη 15λ νερού για αύξηση του όγκου σε 40λ.
- 9) Ποσοτικοποίηση 2λ σε Nanodrop.

IX) Υβριδοποίηση του mRNA

Πριν την υβριδοποίηση γίνεται priming και προϋβριδοποίηση της συσκευής για 1 ώρα 30' με 5X SSC, 0.1% SDS.

- 1) Από τα 38λ δείγματος που περισσεύουν από το βήμα VIII παίρνουμε 2.5γ από το καθένα από τα 2 δείγματα RNA (στελέχους που μας ενδιαφέρει και αγρίου τύπου) σε τελικό όγκο 18λ (αν είναι μεγαλύτερος μειώνεται με speed-vac, αν είναι μικρότερος αυξάνεται με DEPC νερό) γίνεται προσθήκη 2λ ρυθμιστικού διαλύματος θραύσης (fragmentation buffer). Ακολουθεί επώαση στους 70⁰C για 15'. Το ρυθμιστικό διάλυμα θραύσης περιέχει Zn και δημιουργεί σπασίματα στο RNA. Με το πέρας των 15' γίνεται προσθήκη 2λ STOP ρυθμιστικού διαλύματος (περιέχει EDTA) που σταματά τη δράση του ρυθμιστικού διαλύματος θραύσης.
- 2) Για μια υβριδοποίηση, γίνεται προσθήκη:
1.5λ σπέρμα σολωμού

85.5λ ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης (50% φορμαμίδη, 5X SSC, 0.1% SDS)

25.5 λ RNA (δηλαδή γίνεται προσθήκη 3.5λ νερού στο δείγμα)

3) Ακολουθεί sonic bath (για την απομάκρυνση των φυσαλίδων).

4) Η υβριδοποίηση γίνεται για 16 ώρες στους 42⁰C. Οι αντικειμενοφόροι με τα μονιμοποιημένα τμήματα των γονιδίων από ολόκληρο το γονιδίωμα της ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο του Frank Holsteg. Κάθε γονίδιο υπάρχει εις διπλούν μαζί με άλλους δείκτες που εξασφαλίζουν την εκτίμηση της ποιότητας της τεχνικής.

5) Η σάρωση της αντικειμενοφόρου με τα υβριδοποιημένα δείγματα έγινε με σαρωτή Scan Array 5000 (GSI Lumonics).

Μικροσυστοιχίες DNA

Οι μικροσυστοιχίες DNA που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από το Εργαστήριο Γενωμικής του Πανεπιστημίου της Ουτρέχτης (UMC Utrecht, <http://www.microarrays.med.uu.nl/home/index.php>)

Η μικροσυστοιχία περιέχει τυπωμένα 6.357 γονίδια του *S. cerevisiae*, τυπωμένα 2 φορές το καθένα, καθώς και 2838 control DNAs για την εκτίμηση της ποιότητας της υβριδοποίησης, τον καθορισμό των επιπέδων θορύβου και την κανονικοποίηση (<http://www.microarrays.med.uu.nl/microarrays/yeast.htm>)

Αποτύπωμα κατά Northern

Στο πρωτόκολλο αυτό γίνεται απομόνωση RNA, ηλεκτροφόρησή του σε κατάλληλο πήκτωμα, μεταφορά του σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και υβριδοποίηση αυτής με τον κατάλληλο ραδιενεργό ανιχνευτή.

Η απομόνωση του RNA γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί θερμή όξινη φαινόλη (Βλ. Πρωτόκολλο “Απομόνωση RNA και Σήμανση”). Μετά την απομόνωση του RNA γίνεται δοκιμαστική ηλεκτροφόρηση μιας μικρής ποσότητας RNA σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης για να εξεταστεί η ποιότητα του RNA.

Στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρηση μιας συγκεκριμένης ποσότητας RNA (περίπου 40γ από το κάθε δείγμα) μαζί με χρωστική για RNA σε κατάλληλο πήκτωμα που φέρει την ακόλουθη σύσταση:

Για 50ml: 37.5ml νερό

0.75gr αγαρόζη

5ml MOPS 10X

7.5ml φορμαλδεΐδη 37%

Λιώνουμε την αγαρόζη σε νερό, προσθέτουμε MOPS και περιμένουμε μέχρι η θερμοκρασία να πέσει στους 55°C οπότε προστίθεται η φορμαλδεΐδη.

Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε 1X MOPS.

10X MOPS (για 1lt)	Διάλυμα φωσφορικών 1M (για 1lt)
40.86gr MOPS (20mM)	71gr Na ₂ HPO ₄
4.1gr CH ₃ COONa anhydrous (5mM)	4ml H ₃ PO ₄ 85%
20ml 0.5M EDTA (1mM)	
Ρύθμιση του pH στο 7.0 με NaOH. Διατήρηση σε σκοτεινό μπουκάλι.	
Church διάλυμα υβριδοποίησης	20X SSC
0.5M διάλυμα φωσφορικών pH 7.2	3M NaCl
7% SDS	0.3M κιτρικό οξύ
1% BSA	
Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης RNA	
50% γλυκερόλη	
1mM EDTA (pH 8.0)	
0.25% bromophenol blue	
0.25% xylene cyanol FF	

Αφού αναλυθεί το RNA στο πήκτωμα, στη συνέχεια γίνεται η μεταφορά του σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης NytranN (Schleicher & Schuell Bioscience) μέσω κατάλληλης κατασκευής που περιλαμβάνει κατασκευή γέφυρας με Watmann μέσα σε φωσφορικά (950ml νερό και 50ml διάλυμα φωσφορικών). Η μεταφορά γίνεται για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη μέρα γίνεται η μονιμοποίηση στη μεμβράνη του RNA (crosslinking) και η παρασκευή του ανιχνευτή. Η μονιμοποίηση του RNA γίνεται με έκθεση σε UV για 4'. Ο τρόπος με τον οποίο έγινε εδώ η παρασκευή του ανιχνευτή είναι μέσω nick translation. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) Σε σωλήνα των 1.5ml προσθέτουμε:
 - 5λ νερό
 - 1λ DNA θραύσμα ανάλογα με τον ανιχνευτή
 - 2λ dNTT 1mM
 - 2λ dNTG 1mM
 - 2λ EcoPolII ρυθμιστικό διάλυμα
- 2) Αραίωση DNase 1/30000.
- 3) Προσθήκη 4λ dNTC*
 - 4λ dNTA*
 - 1λ DNase από την 1/30000 αραίωση
 - 1λ EcoPolII
- 4) Επώαση για 60' στους 16⁰C.
- 5) Ταυτόχρονα γίνεται εξισορρόπηση της κολώνας G50. Σε σύριγγα ινσουλίνης τοποθετείται ψαρόμαλλο, στη συνέχεια G50 beads, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1' στις 2000rpm.
- 6) Προσθήκη 80ml νερού στην αντίδραση αφού περάσει η μια ώρα.
- 7) Τα 100λ του ανιχνευτή περνούν από την κολώνα των G50, όπου συγκρατούνται τα ελεύθερα ραδιενεργά νουκλεοτίδια με φυγοκέντρηση για 1' στις 2000rpm. Ο ραδιενεργός ανιχνευτής συγκεντρώνεται σε σωλήνα των 1.5ml. Αν δε χρησιμοποιηθεί αμέσως μπορεί να αποθηκευτεί στους -20⁰C.
- 8) Εφόσον οι κρούσεις που δίνει ο ανιχνευτής είναι ικανοποιητικές, γίνεται η υβριδοποίηση. Πριν από αυτήν γίνεται η επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα προϋβριδοποίησης. Σε κύλινδρο υβριδοποίησης τυλίγεται η μεμβράνη με την πλευρά όπου έχει προσκολληθεί το RNA προς τα μέσα. Στη συνέχεια τοποθετούνται 5-6ml διαλύματος υβριδοποίησης Church (προθερμασμένου στους 65⁰C) στον κύλινδρο με τη μεμβράνη ο οποίος περιστρέφεται για 30' στους 65⁰C.
- 9) Ο ανιχνευτής θερμαίνεται για 5' στους 100⁰C για να αποδιαταχθεί και τοποθετείται στον κύλινδρο ο οποίος περιστρέφεται για όλη τη νύχτα στους 65⁰C.

10) Την επόμενη μέρα η μεμβράνη ξεπλένεται 2 φορές για 30 λεπτά με προθερμασμένο στους 65⁰C (για το πρώτο ξέπλυμα) διάλυμα:

50ml SDS 20%

50ml διάλυμα φωσφορικών 1M

900ml νερό

11) Η μεμβράνη εκτίθεται σε κασέτα για ³²P για τουλάχιστον 6 ώρες ή και περισσότερο ανάλογα με τον ανιχνευτή και στη συνέχεια γίνεται σάρωση με το πρόγραμμα Storm Scan σε μηχάνημα Storm 840 (Amrsham Molecular Dynamics).

Χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές για τα γονίδια FIT1, TSA1, CLN3 και SMF3 (η αλληλουχία τους βρίσκεται στο πρωτόκολλο για την PCR) οι οποίοι προέκυψαν ύστερα από 30 κύκλους PCR με το πρόγραμμα:

- 94⁰C, 5'
- 94⁰C, 30''
- 56⁰C, 30''
- 72⁰C, 2'
- 72⁰C, 10'
- 15⁰C, forever

Τα μεγέθη των θραυσμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές είναι: 463bp (FIT1), 353bp (TSA1), 454bp (CLN3), 444bp (SMF3) (Βλ. και πρωτόκολλο για PCR). Τα θραύσματα καθαρίστηκαν με το QIAquick PCR Purification kit (Qiagen).

RT-PCR

Η RT-PCR χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθούν τα αποτελέσματα από τις μικροσυστοιχίες DNA. Παρασκευάστηκε ποσότητα RNA από καλλιέργειες αγρίου τύπου (SC/BPS 100μM, ως control αφού σε BPS επάγεται η μεταγραφή των σιδηρορυθμιζόμενων γονιδίων), αγρίου τύπου (SC), *rad9Δ* (SC), αγρίου τύπου με το πλασμίδιο pDB20 (SC/BCS 100μM, H₂O₂ 0.3mM) και στελέχη που υπερεκφράζουν την Rad9 σε pDB20 πλασμίδιο (SC/BCS 100μM, H₂O₂ 0.3mM). Ακολούθησε επεξεργασία με DNase:

1.5γ RNA (6λ από 0.25γ/λ)

2λ 10X RQ1 ρυθμιστικό διάλυμα DNase

10λ νερό

20λ

Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο, χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 100% αιθανόλη, ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 7λ νερό.

Ακολούθησε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής:

7λ RNA (που έχει υποστεί την επεξεργασία με DNase)

2λ random primers (100ng/λ)

6λ νερό

Επώαση για 7' στους 65⁰C και αμέσως μετά για 5' στον πάγο. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη:

3.4λ νερό

1.25λ dNTPs (10mM από το καθένα)

5λ 5X ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (MMLV)

0.25λ RNAsin

0.1λ αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (200 units/λ)

25λ

Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα και 30' στους 37⁰C και στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε δείγμα 100λ νερό.

Στη συνέχεια έγινε η PCR χρησιμοποιώντας για κάθε δείγμα

4.5λ cDNA

2λ 10X ρυθμιστικό διάλυμα RNA πολυμεράσης

1.2λ MgCl₂ 1.5mM

0.4λ dNTPs (0.2mM)

1λ εκκινήτης forward (FIT1, SMF3, CLN3, TSA1, CMD1)

1λ εκκινήτης reverse (FIT1, SMF3, CLN3, TSA1, CMD1)

0.25λ DNA πολυμεράση

9.65λ νερό

20λ

Παράλληλα, ελέγχθηκε και η γραμμικότητα των δειγμάτων (στην αντίδραση με *CMD1*). Η PCR έγινε σύμφωνα με το πρόγραμμα:

94⁰C για 5'

94⁰C για 30''

55⁰C για 30''

72⁰C για 45''

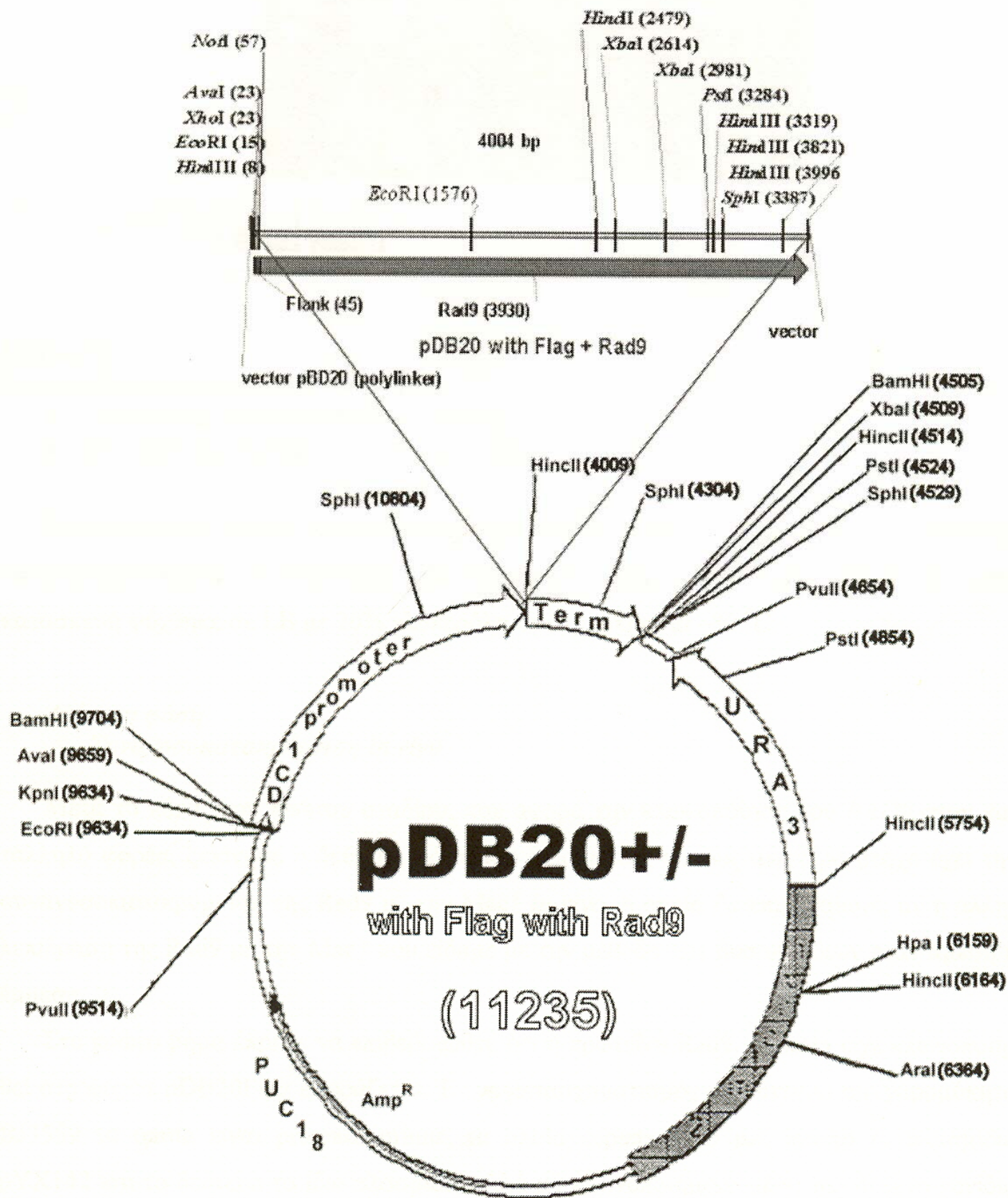
72⁰C για 5'

15⁰C επ' άπειρον

Πραγματοποιήθηκαν 25 κύκλοι. Στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% το 1/3 της ποσότητας από κάθε αντίδραση και ακολούθησε επώαση του πηκτώματος με χρωστική SYBRE green για 20'. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε μηχανήμα LAS 3000 Intelligent Dark Box.

Φορέας υπερέκφρασης

Ο φορέας υπερέκφρασης που χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της Rad9 είναι ο pDB20+/- με την αλληλουχία για την Rad9 να έχει εισαχθεί σε αυτόν όπως φαίνεται στον παρακάτω χάρτη του πλασμιδίου.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Στην Εικόνα που ακολουθεί παραθέτονται τα γονίδια που ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες που αποκρίνονται σε μέταλλα.

Transcription factor ^a	Description	Gene name(s)
Aft1	Transporters	<i>FET4, FET5, FTR1, FTH1, SMF3, MRS4, CCC2, COT1</i>
	Cu chaperone	<i>ATX1</i>
	Ferroxidase	<i>FET3, FET5</i>
	Metalloreductases	<i>FRE1, FRE2, FRE3, FRE4, FRE5, FRE6</i>
	Cell wall proteins	<i>FIT1, FIT2, FIT3</i>
	Siderophore transport	<i>ARN1, ARN2, ARN3, ARN4</i>
	Fe-S biosynthesis	<i>ISU1, ISU2</i>
	Other ^d	<i>TIS11, HMX1, AKR1, PCL5, YOR387c, YHL035c, YMR034c, ICY2, PRY1, YDL124w</i>
Aft2	Transporters	<i>SMF3, MRS4, FTR1, COT1</i>
	Cu chaperone	<i>ATX1</i>
	Ferroxidase	<i>FET3, FET5</i>
	Metalloreductase	<i>FRE4</i>
	Cell wall protein	<i>FIT1, FIT3, FIT2</i>
	Fe-S biosynthesis	<i>ISU1</i>
	Other ^d	<i>BN42, ECM4, LAP4, TIS11, YOL083w, YGR146c, YHL035c</i>
Fep1	Transporter	<i>fep1⁺</i>
	Ferroxidase	<i>fio</i>
	Siderophore transport	<i>sr1⁺, sr2⁺, sr3⁺</i>
SREA	Siderophore biosynthesis	<i>sidA, sidB, sidC, amc4, airH, estA</i>
	Siderophore transport	<i>mirA, mirB, mirC</i>
	Other ^d	<i>cycA, accA, lysF</i>
Urbs1	Siderophore biosynthesis	<i>sid1, sid2</i>
Ace1	Cu metallothioneins	<i>CUP1, CRS5</i>
	Cellular stress response	<i>SOD1</i>
Amt1	Cu metallothioneins	<i>MT-I, MT-IIa, MT-IIb</i>
	Gene regulation	<i>AMT1</i>
Crf1	Cu metallothioneins	<i>MTP1, MTP2</i>
Msc1	Cu transporters	<i>CTR1, CTR3</i>
	Metalloreductases	<i>FRE1, FRE7</i>
	Other ^d	<i>YFR055w, YJL217w, YLR213c</i>
Cuf1	Cu transporters	<i>ctr4⁺, ctr5⁺, ctr6⁺</i>
	Fe transport	<i>fep⁺</i>
	Metalloreductase	<i>fep1⁺</i>
	Multicopper oxidase	<i>fio1⁺</i>
GRISEA	Cu transport	<i>PuCTR3</i>
	Cellular stress response	<i>PuSOD2</i>
Crr1	Heme biosynthesis	<i>CPX1</i>
	Photosystem I maintenance	<i>CRD1, CTH1^c</i>
	Electron transfer	<i>CYC6</i>
Zap1	Zn transporters	<i>ZRT1, ZRT2, ZRT3, ZRC1, FET4, ZRG17</i>
	Gene regulation	<i>ZAP1, NRG2</i>
	Phosphate/lipid metabolism	<i>YOL002c</i>
	Metabolic enzymes	<i>DPP1, ADH4, MNT2, ADE17, TKL2, URA10</i>
	Vacuolar proteases	<i>PRC1, PEP4</i>
	Other ^d	<i>MCD4, ZPS1, RAD27, ZIP1, GRE2, BAG7, FLO1, YNL254c, YLL020c, YGL258w, YOR387c, YR061w, YMR086w, YOL131w, GPG1, COS1, COS2, COS3, COS4, COS6, COS8, YJL132w, KY2, PST1, YBL048w, YBL049w, YNL234w, YDR492w, YKL174c, PHM7</i>

Γονίδια που ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες που αποκρίνονται σε μέταλλα (από Rutherford et al., 2004, τροποποιημένο).

Με κίτρινο χρώμα διακρίνονται οι αναφερόμενοι στο κείμενο μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση γονιδίων ως απόκριση σε σίδηρο και με γαλάζιο αυτοί που σχετίζονται με τη ρύθμιση γονιδίων ως απόκριση σε χαλκό (για λεπτομέρειες βλέπε κείμενο Εισαγωγής). Στην πρώτη στήλη διακρίνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες, στην τρίτη τα γονίδια που ρυθμίζουν και στη δεύτερη τα χαρακτηριστικά των γονιδίων αυτών. Τα γονίδια που αναφέρονται είναι μεταλλορυθμιζόμενα και διαθέτουν consensus αλληλουχία (ή αλληλουχία που της μοιάζει) στην οποία προσδένεται ο εκάστοτε μεταγραφικός παράγοντας. Τα γονίδια που έχουν αναλυθεί σε βαθμό που να δείχνουν άμεση αλληλεπίδραση με τον κάθε μεταγραφικό παράγοντα παρουσιάζονται με έντονα γράμματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται μια σύντομη περιγραφή των γονιδίων που αναφέρονται στα αποτελέσματα των πειραμάτων των μικροσυστοιχιών. Στην πρώτη στήλη αναφέρονται τα γονίδια και στη δεύτερη μια σύντομη περιγραφή της λειτουργίας τους σύμφωνα με την *Saccharomyces* Genome Database (SGD).

(Από Εικ. 15, *Rad9Δ* TOP 15 DOWNREGULATED)

RPO21	RNA polymerase II, largest subunit
ACP1	Acyl carrier protein, component of mitochondrial type II fatty acid synthase
CCR4	Component of the CCR4 transcriptional complex and catalytic component of the major cytoplasmic mRNA deadenylase with 3' to 5' exonuclease activity, member of magnesium-dependent ExoIII-APE nuclease family
CPD1	Cyclic nucleotide phosphodiesterase
COP1	Coatmer (COPI) complex alpha chain (alpha-COP) of secretory pathway vesicles required for retrograde Golgi to endoplasmic reticulum transport, member of WD (WD-40) repeat family
CWP2	Mannoprotein of the cell wall, member of the PAU1 family
IST2	Putative ion channel protein, has a role in sensitivity to NaCl
SSO2	Syntaxin homolog (t-SNARE) involved in vesicle transport from Golgi to plasma membrane
RPP1A	Acidic ribosomal protein P1A (A1, YP1alpha, E. coli L12eIIA, human and rat P1)
CLN3	G1/S-specific cyclin that interacts with Cdc28p protein kinase to control events at START
GGA2	Protein involved in trafficking of proteins between the trans-Golgi network and the vacuole
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD ⁺), involved in glycerol production converting glycerol-3-phosphate and NAD ⁺ to dihydroxyacetone phosphate and NADH
CLN3	G1/S-specific cyclin that interacts with Cdc28p protein kinase to control events at START
PDI1	Protein disulfide isomerase and oxidoreductase
SMT3	Ubiquitin-related protein, homolog of human SUMO-1 protein, becomes conjugated to other proteins in a process requiring ATP, Uba2p, Aos1p, and Ubc9p

(Από Εικ. 15, *Rad9Δ* TOP 15 UPREGULATED)

SMF3	Possible metal transporter, has similarity to Smf1p and Smf2p, member of the Nramp family of membrane transporters
YRF1-5	Y'helicase with near identity to other subtelomerically-encoded proteins including Yer189p, Yml133p, and Yjl225p
PHO11	Acid phosphatase, secreted, nearly identical to Pho12p - subtelomerically encoded
PSD1	Phosphatidylserine decarboxylase, mitochondrial isozyme, converts phosphatidyl-L-serine to phosphatidylethanolamine
YRF1-2	Protein with similarity to other subtelomerically-encoded proteins including Yil177p
GCN1	Component of a protein complex required for activation of Gcn2p protein kinase in response to starvation for amino acids or purines
HNM1	Choline permease, member of the amino acid permease family of membrane transporters
TEF1	Translation elongation factor EF-1alpha, identical to Tef2p
RPS2	Ribosomal protein S2 (yeast S4, YS5, YP9, rp12, E. coli S5, rat S2)

ASC1	Ribosomal protein of the 40S ribosomal subunit that influences translational efficiency and cell size, contains two WD (WD-40) repeats
HNM1	Choline permease, member of the amino acid permease family of membrane transporters
MF(ALPHA)2	Mating pheromone alpha-factor, processed from a precursor polypeptide to produce two nearly identical mature alpha-factor peptides, one of which is identical to alpha-factor encoded by MFALPHA1
YRF1-1	Protein with near identity to the family of subtelomerically-encoded proteins that includes Yil177p, Yhl049p, Ylr467p, and Yjl225p
YRF1-7	Protein with near identity to other subtelomerically-encoded protein, including Ygr296p
OLI1	Subunit 9 of the F0 subunit of ATP synthase-mitochondrial respiratory complex V, mitochondrially encoded, ATP synthase is involved in ATP generation during cellular respiration and is required for mitochondrial cristae formation
PHO12	Acid phosphatase, secreted [PHO11 and PHO12 code for nearly identical proteins]

(Από Εικ. 16, Υπερέκφραση **RAD9 TOP 15 DOWNREGULATED**)

FRM2	Protein of unknown function, involved in the integration of lipid signaling pathways with cellular homeostasis.
FIT1	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, involved in the retention of siderophore-iron in the cell wall.
URA3	Orotidine-5-phosphate (OMP) decarboxylase, catalyzes the sixth enzymatic step in the de novo biosynthesis of pyrimidines, converting OMP into uridine monophosphate (UMP); converts 5-FOA into 5-fluorouracil, a toxic compound.
FIT2	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, involved in the retention of siderophore-iron in the cell wall.
YKL071W	Hypothetical protein.
SSA1	ATPase involved in protein folding and nuclear localization signal (NLS)-directed nuclear transport; member of heat shock protein 70 (HSP70) family; forms a chaperone complex with Ydj1p; localized to the nucleus, cytoplasm, and cell wall.
YOL086W-A	Hypothetical protein identified by homology. See FEBS Letters [2000] 487:31-36..
PHO84	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p.
SPL2	Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors, overproduction suppresses a plc1 null mutation; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern.
OYE3	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN), homologous to Oye2p with slight differences in ligand binding and catalytic properties; may be involved in sterol metabolism.
ARN2	Transporter, member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; responsible for uptake of iron bound to the siderophore triacetylfusarinine C.
YOL085C	Hypothetical protein.
TEF2	Translational elongation factor EF-1 alpha; also encoded by TEF1; functions in the binding reaction of aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) to ribosomes.
FTR1	High affinity iron permease involved in the transport of iron across the plasma membrane; forms complex with Fet3p; expression is regulated by iron.
GRE2	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway.
SIT1	Ferrioxamine B transporter, member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; transcription is induced during iron deprivation and diauxic shift; potentially phosphorylated by Cdc28p.

(Από Εικ. 16, Υπερέκφραση *RAD9* TOP 15 UPREGULATED)

ADK1	Adenylate kinase, required for purine metabolism; localized to the cytoplasm and the mitochondria; lacks cleavable signal sequence.
AGP1	Low-affinity amino acid permease with broad substrate range, involved in uptake of asparagine, glutamine, and other amino acids; expression is regulated by the SPS plasma membrane amino acid sensor system (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p).
GCD11	Gamma subunit of the translation initiation factor eIF2, involved in the identification of the start codon; binds GTP when forming the ternary complex with GTP and tRNA ⁱ -Met.
BUR6	Protein that forms a heterodimeric histone-fold NC2 general transcription regulator complex with Ydr1p that binds to TBP and represses RNA pol II transcription during assembly of the preinitiation complex, homologous to human NC2alpha.
LEU1	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway.
RPS19B	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; nearly identical to Rps19Ap and has similarity to rat S19 ribosomal protein.
CCP1	Mitochondrial cytochrome-c peroxidase; degrades reactive oxygen species in mitochondria, involved in the response to oxidative stress.
PRC1	Vacuolar carboxypeptidase Y (proteinase C), involved in protein degradation in the vacuole and required for full protein degradation during sporulation.
DBP3	Putative ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family involved in ribosomal biogenesis.
RPP0	Conserved ribosomal protein P0 similar to rat P0, human P0, and E. coli L10e; shown to be phosphorylated on serine 302.
RPL7A	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl7Bp and has similarity to E. coli L30 and rat L7 ribosomal proteins; contains a conserved C-terminal Nucleic acid Binding Domain (NDB2).
RPL5	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit with similarity to E. coli L18 and rat L5 ribosomal proteins; binds 5S rRNA and is required for 60S subunit assembly.
TSA1	Ubiquitous housekeeping thioredoxin peroxidase, reduces reactive oxygen, nitrogen and sulfur species using thioredoxin as hydrogen donor; mediates redox regulation of the nuclear localization of Yap1p; deletion results in mutator phenotype.
RAD9	DNA damage-dependent checkpoint protein, required for cell-cycle arrest in G1/S, intra-S, and G2/M; transmits checkpoint signal by activating Rad53p and Chk1p; hyperphosphorylated by Mec1p and Tel1p; potential Cdc28p substrate.
HOR7	Protein of unknown function; overexpression suppresses Ca ²⁺ sensitivity of mutants lacking inositol phosphorylceramide mannosyltransferases Csg1p and Csh1p; transcription is induced under hyperosmotic stress and repressed by alpha factor.

(Από Εικ. 17, *rad9Δ* ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΜΕ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΧΑΛΚΟΥ)

LYS7	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p
APD1	Protein required for normal cellular structure, localization of actin patches, and resistance to copper
ICT1	Protein required for normal sensitivity to copper
CTR2	Low-affinity copper transport protein
FET4	Low-affinity Fe(II) transport protein, also functions in low-affinity copper transport and in zinc transport
CTR1	Copper transport protein required for high-affinity uptake of copper, member of the copper transporter-1 (Ctr1) family of membrane transporters
APD1	Protein required for normal cellular structure, localization of actin patches, and resistance to copper
ICS2	Protein required for normal resistance to copper
HAA1	Nuclear protein that activates transcription of several genes including TPO2 and YRO2, has homology to the copper-activated transcription factor Ace1p
PCA1	P-type copper-transporting ATPase, involved in resistance to cadmium

CTR3	High-affinity copper transporter, member of the copper transporter-2 (Ctr2) family of membrane transporters
MAC1	Transcription factor involved in induction of genes required for the reduction and utilization of iron and copper
ATX1	Antioxidant protein and metal homeostasis factor, functions in a copper trafficking pathway (Ctr1p-Atx1p-Ccc2p)
FRE7	Protein with weak similarity to Fre1p and Fre2p, subject to regulation by copper
COX17	Protein involved in delivery of copper ions to mitochondrial cytochrome oxidase
SCO1	Protein with a possible role in copper transport or insertion of copper into cytochrome oxidase, paralog of Sco2p
SOD1	Copper-zinc superoxide dismutase
SLF1	Ribosome-associated protein possibly involved in regulation of copper-dependent mineralization of copper complexes on the cell surface, member of a subfamily of La motif proteins
CUP1-1	Metallothionein (copper chelatin), identical to Cup1Bp
CUP9	Homeodomain protein involved in copper homeostasis and in regulation of peptide import
CCC2	Copper-transporting P-type ATPase, member of the heavy-metal transporting P-type ATPases in the superfamily of P-type ATPases
ICS3	Protein required for normal resistance to copper, has a possible role in signal transduction
CUP2	Copper-dependent transcription factor responsible for induction of CUP1A, CUP1B, CRS5, and SOD1
CRS5	Metallothionein-like protein that provides copper resistance in the absence of Cup1p
CUP1-2	Metallothionein (copper chelatin), identical to Cup1Ap
FET5	Multicopper oxidase involved in ferrous iron transport

(Από Εικ. 17, *rad9Δ* ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΜΕ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ)

ISU2	Protein with similarity to iron-sulfur cluster nitrogen fixation proteins
RIP1	Ubiquinol cytochrome c reductase iron-sulfur protein (Rieske iron-sulfur protein), component of ubiquinol cytochrome c reductase complex (cytochrome bc1 complex)
ISU1	Protein with similarity to iron-sulfur cluster nitrogen fixation proteins
FRE6	Protein with similarity to ferric reductase Fre2p, subject to regulation by iron
JAC1	J-type chaperone protein, may be involved in assembly of mitochondrial iron-sulfur proteins
FIT1	Cell wall protein possibly involved in iron uptake
BCS1	Mitochondrial protein required for expression of functional Rieske iron-sulfur protein, member of the AAA family of ATPases
ISA1	Mitochondrial protein required for normal iron metabolism, involved in maturation of mitochondrial and cytosolic iron-sulfur proteins
YFH1	Mitochondrial protein involved in respiratory function, iron homeostasis, and maturation of mitochondrial iron-sulfur proteins, human homolog frataxin is defective in Friedreich's ataxia
ISA2	Mitochondrial protein required for iron metabolism
NFS1	Cysteine desulfurase, essential mitochondrial protein that may supply inorganic sulfur to iron-sulfur clusters, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution
ERV1	Flavin-linked sulfhydryl oxidase, mitochondrial protein required for the maturation of cytosolic iron-sulfur proteins and for iron homeostasis
FIT2	Protein possibly involved in iron uptake
MAC1	Transcription factor involved in induction of genes required for the reduction and utilization of iron and copper

FRE5	Protein with similarity to Fre2p, subject to regulation by iron
MMT1	Protein involved in mitochondrial iron accumulation
FTH1	Vacuolar iron transporter with similarity to Ftr1p
AFT2	Protein involved in iron-regulated transcription, has an overlapping function with Rcs1p and has similarity to Rcs1p
FRE4	Protein involved in the uptake of iron from siderophore rhodotorulic acid, subject to regulation by iron
FIT3	Protein possibly involved in iron uptake
NFU1	Protein involved in maturation of mitochondrial iron-sulfur proteins, shows similarity to Anabaena nitrogen fixing protein nifU
FRE1	Membrane-associated flavocytochrome with ferric and cupric reductase activities, acts on ferric iron chelates external to the cell to facilitate iron uptake
ENB1	Protein involved in iron uptake via a siderophore enterobactin, member of the yeast-specific putative multidrug-resistance family of the major facilitator superfamily (MFS)
FRE2	Ferric and cupric reductase, paralog of Fre1p subject to regulation by iron
MMT2	Protein involved in mitochondrial iron accumulation, member of a family of transition metal transporters
FRE3	Protein involved in the uptake of iron from siderophores rhodotorulic acid, triacetylfusarinine C, ferrichrome and ferrioximine B
FTR1	Iron permease that mediates high-affinity iron uptake
GEF1	Voltage-gated chloride channel, has effects on intracellular iron metabolism
FET3	Cell surface ferroxidase, required for high-affinity ferrous iron uptake
FET5	Multicopper oxidase involved in ferrous iron transport
RCS1	Transcription factor that regulates genes involved in iron uptake and control of cell size
CCC1	Protein involved in iron transport from cytosol to vacuole, overproduction suppresses the calcium-sensitive phenotype of <i>csg1</i> strains
HEM15	Ferrochelatase (protoheme ferrolyase), last step in heme biosynthesis pathway - catalyzes insertion of ferrous iron into protoporphyrin IX
ZRT2	Low-affinity zinc transport protein, member of the zinc-iron permease (ZIP) family of metal ion transporters

(Από Εικ. 18, Υπερέκφραση *RAD9* ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΜΕ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΧΑΛΚΟΥ)

CCS1	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p, involved in oxidative stress protection; Met-X-Cys-X2-Cys motif within the N-terminal portion is involved in insertion of copper into Sod1p under conditions of copper deprivation.
FET3	Ferro-O ₂ -oxidoreductase required for high-affinity iron uptake and involved in mediating resistance to copper ion toxicity, belongs to class of integral membrane multicopper oxidases.
FET5	Multicopper oxidase, integral membrane protein with similarity to Fet3p; may have a role in iron transport.
CTR2	Putative low-affinity copper transporter of the vacuolar membrane; mutation confers resistance to toxic copper concentrations, while overexpression confers resistance to copper starvation.
CTR1	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, mediates nearly all copper uptake under low copper conditions; transcriptionally induced at low copper levels and degraded at high copper levels.
FRE1	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bound iron and oxidized copper prior to uptake by transporters; expression induced by low copper and iron levels.
SLF1	RNA binding protein that associates with polysomes; proposed to be involved in regulating mRNA translation; involved in the copper-dependent mineralization of copper sulfide complexes on cell surface in cells cultured in copper salts.
COX17	Copper metallochaperone that transfers copper to Sco1p and Cox11p for eventual delivery to cytochrome c oxidase.

FRE8	Protein with sequence similarity to iron/copper reductases, involved in iron homeostasis; deletion mutant has iron deficiency/accumulation growth defects; expression increased in the absence of copper-responsive transcription factor Mac1p.
ATX1	Cytosolic copper metallochaperone that transports copper to the secretory vesicle copper transporter Ccc2p for eventual insertion into Fet3p, which is a multicopper oxidase required for high-affinity iron uptake.
FRE2	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bound iron and oxidized copper prior to uptake by transporters; expression induced by low iron levels but not by low copper levels.
SCO1	Copper-binding protein of the mitochondrial inner membrane, required for cytochrome c oxidase activity and respiration; may function to deliver copper to cytochrome c oxidase; has similarity to thioredoxins.
CCC2	Cu(+2)-transporting P-type ATPase, required for export of copper from the cytosol into an extracytosolic compartment; has similarity to human proteins involved in Menkes and Wilsons diseases.
COX23	Mitochondrial intermembrane space protein that functions in mitochondrial copper homeostasis, essential for functional cytochrome oxidase expression; homologous to Cox17p.
PCA1	P-type metal-transporting ATPase with a role in copper and iron homeostasis; R970G-substitution in the C-terminal region confers cadmium resistance.
ATX2	Golgi membrane protein involved in manganese homeostasis; overproduction suppresses the sod1 (copper, zinc superoxide dismutase) null mutation.
FRE7	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression induced by low copper levels.
CTR3	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, acts as a trimer; gene is disrupted by a Ty2 transposon insertion in many laboratory strains of <i>S. cerevisiae</i> .
YGL160W	Protein with sequence similarity to iron/copper reductases (FRE1-8), possibly involved in iron homeostasis.
COX19	Protein required for cytochrome c oxidase assembly, located in the cytosol and mitochondrial intermembrane space; putative copper metallochaperone that delivers copper to cytochrome c oxidase.
CUP2	Copper-binding transcription factor; activates transcription of the metallothionein genes CUP1-1 and CUP1-2 in response to elevated copper concentrations.
COX11	Mitochondrial inner membrane protein required for delivery of copper to the Cox1p subunit of cytochrome c oxidase; association with mitochondrial ribosomes suggests that copper delivery may occur during translation of Cox1p.
CUP5	Proteolipid subunit of the vacuolar H(+)-ATPase V0 sector (subunit c; dicyclohexylcarbodiimide binding subunit); required for vacuolar acidification and important for copper and iron metal ion homeostasis.
PCA1	P-type metal-transporting ATPase with a role in copper and iron homeostasis; R970G-substitution in the C-terminal region confers cadmium resistance.
CRS5	Copper-binding metallothionein, required for wild-type copper resistance.
SCO2	Protein anchored to the mitochondrial inner membrane, similar to Sco1p and may have a redundant function with Sco1p in delivery of copper to cytochrome c oxidase; interacts with Cox2p.
BSD2	Heavy metal ion homeostasis protein, facilitates trafficking of Smf1p and Smf2p metal transporters to the vacuole where they are degraded, controls metal ion transport, prevents metal hyperaccumulation, functions in copper detoxification.
MAC1	Copper-sensing transcription factor involved in regulation of genes required for high affinity copper transport.
SLF1	RNA binding protein that associates with polysomes; proposed to be involved in regulating mRNA translation; involved in the copper-dependent mineralization of copper sulfide complexes on cell surface in cells cultured in copper salts.
CUP1-1	Metallothionein, binds copper and mediates resistance to high concentrations of copper and cadmium; locus is variably amplified in different strains, with two copies, CUP1-1 and CUP1-2, in the genomic sequence reference strain S288C.

(Από Εικ. 18, Υπερέκφραση *RAD9* ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΜΕ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ)

<i>FIT1</i>	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, involved in the retention of siderophore-iron in the cell wall.
<i>FIT2</i>	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, involved in the retention of siderophore-iron in the cell wall.
<i>ARN2</i>	Transporter, member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; responsible for uptake of iron bound to the siderophore triacetylfusarinine C.
<i>FTR1</i>	High affinity iron permease involved in the transport of iron across the plasma membrane; forms complex with Fet3p; expression is regulated by iron.
<i>SIT1</i>	Ferrioxamine B transporter, member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; transcription is induced during iron deprivation and diauxic shift; potentially phosphorylated by Cdc28p.
<i>TIS11</i>	mRNA-binding protein expressed during iron starvation; binds to a sequence element in the 3-untranslated regions of specific mRNAs to mediate their degradation; involved in iron homeostasis.
<i>ISU2</i>	Conserved protein of the mitochondrial matrix, required for synthesis of mitochondrial and cytosolic iron-sulfur proteins, performs a scaffolding function in mitochondria during Fe/S cluster assembly; <i>isu1 isu2</i> double mutant is inviable.
<i>FET3</i>	Ferro-O ₂ -oxidoreductase required for high-affinity iron uptake and involved in mediating resistance to copper ion toxicity, belongs to class of integral membrane multicopper oxidases.
<i>ARN1</i>	Transporter, member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; responsible for uptake of iron bound to ferrirubin, ferrirhodin, and related siderophores.
<i>ENB1</i>	Endosomal ferric enterobactin transporter, expressed under conditions of iron deprivation; member of the major facilitator superfamily; expression is regulated by Rcs1p and affected by chloroquine treatment.
<i>VHT1</i>	High-affinity plasma membrane H ⁺ -biotin (vitamin H) symporter; mutation results in fatty acid auxotrophy; 12 transmembrane domain containing major facilitator subfamily member; mRNA levels negatively regulated by iron deprivation and biotin.
<i>FIT3</i>	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, involved in the retention of siderophore-iron in the cell wall.
<i>FET5</i>	Multicopper oxidase, integral membrane protein with similarity to Fet3p; may have a role in iron transport.
<i>TPI1</i>	Triose phosphate isomerase, abundant glycolytic enzyme; mRNA half-life is regulated by iron availability; transcription is controlled by activators Reb1p, Gcr1p, and Rap1p through binding sites in the 5 non-coding region.
<i>NFS1</i>	Cysteine desulfurase involved in iron-sulfur cluster (Fe/S) biogenesis; required for the post-transcriptional thio-modification of mitochondrial and cytoplasmic tRNAs; essential protein located predominantly in mitochondria.
<i>SMF3</i>	Putative divalent metal ion transporter involved in iron homeostasis; transcriptionally regulated by metal ions; member of the Nramp family of metal transport proteins.
<i>ISU1</i>	Conserved protein of the mitochondrial matrix, performs a scaffolding function during assembly of iron-sulfur clusters, interacts physically and functionally with yeast frataxin (Yfh1p); <i>isu1 isu2</i> double mutant is inviable.
<i>ERV1</i>	Flavin-linked sulfhydryl oxidase localized to the mitochondrial intermembrane space, has a role in the maturation of cytosolic iron-sulfur proteins; ortholog of human hepatopoietin (ALR).
<i>FTH1</i>	Putative high affinity iron transporter involved in transport of intravacuolar stores of iron; forms complex with Fet5p; expression is regulated by iron; proposed to play indirect role in endocytosis.
<i>FRE6</i>	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression induced by low iron levels.
<i>MSN1</i>	Transcriptional activator involved in regulation of invertase and glucoamylase expression, invasive growth and pseudohyphal differentiation, iron uptake, chromium accumulation, and response to osmotic stress; localizes to the nucleus.

FRE3	Ferric reductase, reduces siderophore-bound iron prior to uptake by transporters; expression induced by low iron levels.
FRE1	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bound iron and oxidized copper prior to uptake by transporters; expression induced by low copper and iron levels.
MRS4	Mitochondrial iron transporter of the mitochondrial carrier family (MCF), very similar to and functionally redundant with Mrs3p; functions under low-iron conditions; may transport other cations in addition to iron.
HEM15	Ferrochelatase, a mitochondrial inner membrane protein, catalyzes the insertion of ferrous iron into protoporphyrin IX, the eighth and final step in the heme biosynthetic pathway; Yfh1p mediates the use of iron by Hem15p.
MMT2	Putative metal transporter involved in mitochondrial iron accumulation; closely related to Mmt1p.
FRE4	Ferric reductase, reduces a specific subset of siderophore-bound iron prior to uptake by transporters; expression induced by low iron levels.
FRE8	Protein with sequence similarity to iron/copper reductases, involved in iron homeostasis; deletion mutant has iron deficiency/accumulation growth defects; expression increased in the absence of copper-responsive transcription factor Mac1p.
Oct-01	Mitochondrial intermediate peptidase, cleaves N-terminal residues of a subset of proteins upon import, after their cleavage by mitochondrial processing peptidase (Mas1p-Mas2p); may contribute to mitochondrial iron homeostasis.
ATX1	Cytosolic copper metallochaperone that transports copper to the secretory vesicle copper transporter Ccc2p for eventual insertion into Fet3p, which is a multicopper oxidase required for high-affinity iron uptake.
CIA1	Essential protein involved in assembly of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins.
FRE2	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bound iron and oxidized copper prior to uptake by transporters; expression induced by low iron levels but not by low copper levels.
NAR1	Nuclear architecture related protein; component of the cytosolic iron-sulfur (FeS) protein assembly machinery, required for maturation of cytosolic and nuclear FeS proteins; homologous to human Narf.
MRS3	Mitochondrial iron transporter of the mitochondrial carrier family (MCF), very similar to and functionally redundant with Mrs4p; functions under low-iron conditions; may transport other cations in addition to iron.
RCS1	Transcription factor involved in iron utilization and homeostasis; binds the consensus site PyPuCACCCPu and activates the expression of target genes in response to changes in iron availability.
PCA1	P-type metal-transporting ATPase with a role in copper and iron homeostasis; R970G-substitution in the C-terminal region confers cadmium resistance.
FRE5	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression induced by low iron levels.
YPL251W	Hypothetical protein; open reading frame overlaps 5' end of essential YAH1 gene required for iron-sulfur protein biogenesis.
ARH1	Oxidoreductase of the mitochondrial inner membrane, involved in cytoplasmic and mitochondrial iron homeostasis and required for activity of Fe-S cluster-containing enzymes; one of the few mitochondrial proteins essential for viability.
AFT2	Iron-regulated transcriptional activator, required for iron homeostasis and resistance to oxidative stress; similar to Aft1p.
GEF1	Chloride channel localized to late- or post-Golgi vesicles, involved in iron metabolism; highly homologous to voltage-gated chloride channels in vertebrates.
YGL160W	Protein with sequence similarity to iron/copper reductases (FRE1-8), possibly involved in iron homeostasis.
GGC1	Mitochondrial GTP/GDP transporter, essential for mitochondrial genome maintenance; has a role in mitochondrial iron transport; member of the mitochondrial carrier family; (putative) mitochondrial carrier protein.
SSQ1	Mitochondrial hsp70-type molecular chaperone, required for assembly of iron/sulfur clusters into proteins at a step after cluster synthesis, and for maturation of Yfh1p, which is a homolog of human frataxin implicated in Friedreich's ataxia.
ADH4	Alcohol dehydrogenase type IV, dimeric enzyme demonstrated to be zinc-dependent despite sequence similarity to iron-activated alcohol dehydrogenases; transcription is

	induced in response to zinc deficiency; alcohol dehydrogenase isoenzyme IV.
ATM1	Mitochondrial inner membrane transporter, exports mitochondrially synthesized precursors of iron-sulfur (Fe/S) clusters to the cytosol; member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family.
CFD1	Highly conserved, putative P-loop ATPase localized in the cytoplasm; has a potential role in assembly of iron-sulfur clusters in proteins.
GRX5	Hydroperoxide and superoxide-radical responsive glutathione-dependent oxidoreductase; mitochondrial matrix protein involved in the synthesis/assembly of iron-sulfur centers; monothiol glutaredoxin subfamily member along with Grx3p and Grx4p.
CUP5	Proteolipid subunit of the vacuolar H(+)-ATPase V0 sector (subunit c; dicyclohexylcarbodiimide binding subunit); required for vacuolar acidification and important for copper and iron metal ion homeostasis.
NFS1	Cysteine desulfurase involved in iron-sulfur cluster (Fe/S) biogenesis; required for the post-transcriptional thio-modification of mitochondrial and cytoplasmic tRNAs; essential protein located predominantly in mitochondria.
NFU1	Protein involved in iron metabolism in mitochondria; similar to NifU, which is a protein required for the maturation of the Fe/S clusters of nitrogenase in nitrogen-fixing bacteria.
CAD1	AP-1-like bZIP transcriptional activator involved in multiple stress responses, iron metabolism, and pleiotropic drug resistance; controls a set of genes involved in stabilizing proteins, binds consensus sequence TACTAA; 5' UTR contains uORFs.
MMT1	Putative metal transporter involved in mitochondrial iron accumulation; closely related to Mmt2p.
JAC1	Molecular chaperone involved, with partner Ssq1p, in assembly of Fe/S clusters and in mitochondrial iron metabolism; contains a J domain typical to J-type chaperones; localizes to the mitochondrial matrix.
RPB4	RNA polymerase II subunit B32; forms two subunit dissociable complex with Rpb7p; dispensable under some environmental conditions; involved in export of mRNA to cytoplasm under stress conditions.
CTH1	Member of the CCCH zinc finger family; has similarity to mammalian Tis11 protein, which activates transcription and also has a role in mRNA degradation; may function with Tis11p in iron homeostasis.
ERV1	Flavin-linked sulfhydryl oxidase localized to the mitochondrial intermembrane space, has a role in the maturation of cytosolic iron-sulfur proteins; ortholog of human hepatopoietin (ALR).
HEM15	Ferrochelatase, a mitochondrial inner membrane protein, catalyzes the insertion of ferrous iron into protoporphyrin IX, the eighth and final step in the heme biosynthetic pathway; Yfh1p mediates the use of iron by Hem15p.
DDR2	Multistress response protein, expression is activated by a variety of xenobiotic agents and environmental or physiological stresses.
BIO4	Dethiobiotin synthetase, catalyzes the third step in the biotin biosynthesis pathway; BIO4 is in a cluster of 3 genes (BIO3, BIO4, and BIO5) that mediate biotin synthesis; expression appears to be repressed at low iron levels.
SDH2	Iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase (Sdh1p, Sdh2p, Sdh3p, Sdh4p), which couples the oxidation of succinate to the transfer of electrons to ubiquinone.
YAH1	Ferredoxin of the mitochondrial matrix required for formation of cellular iron-sulfur proteins; involved in heme A biosynthesis; homologous to human adrenodoxin.
YFH1	Frataxin, regulates mitochondrial iron accumulation; interacts with Isu1p which promotes Fe-S cluster assembly; interacts with electron transport chain components and may influence respiration; human homolog involved in Friedreich's ataxia.
RLI1	Essential iron-sulfur protein required for ribosome biogenesis and translation initiation; facilitates binding of a multifactor complex (MFC) of translation initiation factors to the small ribosomal subunit; predicted ABC family ATPase.
ISA1	Mitochondrial matrix protein involved in biogenesis of the iron-sulfur (Fe/S) cluster of Fe/S proteins, isa1 deletion causes loss of mitochondrial DNA and respiratory deficiency; depletion reduces growth on nonfermentable carbon sources.
RIP1	Ubiquinol-cytochrome-c reductase, a Rieske iron-sulfur protein of the mitochondrial cytochrome bc1 complex; transfers electrons from ubiquinol to cytochrome c1 during respiration.

CCC1	Putative vacuolar Fe ²⁺ /Mn ²⁺ transporter; suppresses respiratory deficit of yfh1 mutants, which lack the ortholog of mammalian frataxin, by preventing mitochondrial iron accumulation.
-------------	---

Βιβλιογραφία

Aboussekhra A....Lowndes NF. (1996). A novel role for the budding yeast *RAD9* checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription. *The EMBO J.* 15: 3912-3922.

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases *Genes Dev.* 15 : 2177–2196.

Alic, N., Higgins, V. J. and Dawes, I. W. (2001). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Gene that Is Required for G1 Arrest in Response to the Lipid Oxidation Product Linoleic Acid Hydroperoxide. *Mol Biol Cell* 12: 1801-10.

Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe, and J. Kaplan. (1994). The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76:403–410.

Barbet NC.....Hall MN. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell*, 7: 25-42.

Blaiseau PL, Lesuisse E, Camadro JM. (2001). Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol. Chem.* 276:34221-6.

Butt, T. R., E. J. Sternberg, J. A. Gorman, P. Clark, D. Hamer, M. Rosenberg, and S. T. Crooke. (1984). Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3332–3336.

Care A.....Sudbery P.E. (2004). A synthetic lethal screen identifies a role for the cortical actin patch/endocytosis complex in the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 166: 707-719.

Casas, C., M. Aldea, C. Espinet, C. Gallego, R. Gil, and E. Herrero. (1997). The *AFT1* transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:621–637.

Courel M...Blaiseau. (2005). Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Molecular and Cellular Biology*. 25: 6760-6771.

Culotta, V. C., W. R. Howard, and X. F. Liu. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269:25295–252302.

Dancis, A., R. D. Klausner, A. G. Hinnebusch, and J. G. Barriocanal. (1990). Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:2294–2301.

Dancis, A., D. G. Roman, G. J. Anderson, A. G. Hinnebusch, and R. D. Klausner. (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3869–3873.

de Freitas J. et al., Vulpe C. (2003). Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals*. 16: 185-197.

de Freitas JM.....Vulpe C (2004). Exploratory and confirmatory gene expression profiling of *mac1Δ*. *J Biological Chemistry*. 279: 4450-4458.

Denu, J. M. and Dixon, J. E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol* 2: 633-41.

Dix, D. R., J. T. Bridgham, M. A. Broderius, C. A. Byersdorfer, and D. J. Eide. (1994). The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269:26092–26099.

Durocher, D. and Jackson, S.P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 225–231.

Elledge, S.J.. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. (1996) *Science* 274: 1664–1672.

Emili, A. (1998). MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Mol. Cell* 2: 183–189.

Flattery-O'Brien JA, Dawes IW. (1998). Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J Biol Chem.* 273:8564-71

Flick, J. S. and Thorner, J. (1998). An essential function of a phosphoinositide-specific phospholipase C is relieved by inhibition of a cyclin-dependent protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148: 33-47.

Flick, J.S. and Thorner, J. (1993) Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 13: 5861-5876.

Fogel, S., and J. W. Welch. (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5342–5346.

Georgatsou, E., and D. Alexandraki. (1994). Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14:3065–3073.

Georgatsou, E., and D. Alexandraki. (1999). Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes. *Yeast.* 15:573–584.

Georgatsou, E., L. A. Mavrogiannis, G. S. Fragiadakis, and D. Alexandraki. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* 272:13786–13792.

Gralla, E. B., D. J. Thiele, P. Silar, and J. S. Valentine. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8558–8562.

Gross C.....Winge DR. (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biological Chemistry*. 275: 32310-32316.

Gunjan A. and Verreault A. (2003). A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell*. 115: 537-49.

Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1264-300.

Heredia, J., M. Crooks, and Z. Zhu. (2001). Phosphorylation and Cu^+ coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J. Biol. Chem*. 276:8793–8797.

Jamison McDaniels, C. P., L. T. Jensen, C. Srinivasan, D. R. Winge, and T. D. Tullius. (1999). The yeast transcription factor Mac1 binds to DNA in a modular fashion. *J. Biol. Chem*. 274:26962–26967.

Joshi, A., M. Serpe, and D. J. Kosman. (1999). Evidence for (Mac1p)₂. DNA ternary complex formation in Mac1p-dependent transactivation at the CTR1 promoter. *J. Biol. Chem*. 274:218–226.

Kolmodin, K. and Aqvist, J. (2001). The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Lett* 498, 208-13.

Kushner DB.....Ahlquist P (2003). Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *PNAS*, 100: 15764-15769.

Labbe', S., Z. Zhu, and D. J. Thiele. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* 272:15951–15958.

Lee, T. I., N. J. Rinaldi, F. Robert, D. T. Odom, Z. Bar-Joseph, G. K. Gerber, N. M. Hannett, C. T. Harbison, C. M. Thompson, I. Simon, J. Zeitlinger, E. G. Jennings, H. L. Murray, D. B. Gordon, B. Ren, J. J. Wyrick, J. B. Tagne, T. L. Volkert, E. Fraenkel, D. K. Gifford, and R. A. Young. (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298:799–804.

Lesuisse, E., P. L. Blaiseau, A. Dancis, and J. M. Camadro. (2001). Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147:289–298.

Lin, H., Choi, J. H., Hasek, J., DeLillo, N., Lou, W. and Vancura, A. (2000). Phospholipase C is involved in kinetochore function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20: 3597-607.

Longhese, M.P., Paciotti, V., Fraschini, R., Zaccarini, R., Plevani, P. and Lucchini, G. (1997). The novel DNA damage checkpoint protein *ddc1* is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast *EMBO J.* 16: 5216–5226.

Lydall D and Whitehall S. (2005). Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair*, 4: 1195-1207

Martins, L. J., L. T. Jensen, J. R. Simon, G. L. Keller, D. R. Winge, and J. R. Simons. (1998). Metalloregulation of *FRE1* and *FRE2* homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:23716–23721.

Navas, T.A., Sanchez, Y. and Elledge, S.J. (1996). *RAD9* and DNA polymerase epsilon form parallel sensory branches for transducing the DNA damage checkpoint signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 10: 2632–2643.

Ojeda L.....Winge DR (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 17661-17669.

Paulovich, A.G. and Hartwell, L.H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage *Cell* 82: 841–847.

Paulovich, A.G., Margulies, R.U., Garvik, B.M. and Hartwell, L.H. (1997). RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage *Genetics* 145: 45–62.

Philpott CC.....Klausner RD. (1998). Cell-cycle arrest and inhibition of G1 cyclin translation by iron in *AFT-1^{up}* yeast. *The EMBO J.* 17: 5026-5036.

Puig, S., E. Askeland, and D. J. Thiele. (2005). Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* 120:99–110.

Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr, Micsik T, van Hummelen P. (2002). Production of bulk amounts of universal RNA for DNA microarrays. *Biotechniques*. 33:898-900, 902, 904.

Rhind, N. and Russell, P. (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *J. Cell Sci.* 113: 3889–3896.

Rosenzweig, B. A., Pine, P. S., Domon, O. E., Morris, S. M., Chen, J. J., & Sistare, F. D. (2004). Dye bias correction in dual-labeled cDNA microarray gene expression measurements. *Environmental health perspectives* 112: 480-487.

Rutherford J. C. and Bird AJ (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eucaryotic Cell*, 3: 1-13.

Rutherford J. C.Winge DR. (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Journ Biol. Chem.* 280: 10135-10140.

Rutherford, J. C., S. Jaron, E. Ray, P. O. Brown, and D. R. Winge. (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14322–14327.

Rutherford, J. C., S. Jaron, and D. R. Winge. (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J. Biol. Chem.* 278:27636–27643.

Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M. and Elledge, S.J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286: 1166–1171.

Sanchez, Y., Desany, B.A., Jones, W.J., Liu, Q., Wang, B. and Elledge, S.J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271: 357–360.

Schwartz, M.F., Duong, J.K., Sun, Z., Morrow, J.S., Pradhan, D. and Stern, D.F. (2002). Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* 9: 1055–1065.

Serpe, M., A. Joshi, and D. J. Kosman. (1999). Structure-function analysis of the protein-binding domains of Mac1p, a copper-dependent transcriptional activator of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274:29211–29219.

Shenton D.....Grant CM. (2002). Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem.* 277: 16853-16859.

Siede, W., Friedberg, A.S., Dianova, I. and Friedberg, E.C. (1994). Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents. *Genetics* 138: 271–281.

Siede, W., Friedberg, A.S. and Friedberg, E.C. (1993). RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7985–7989.

Soulier, J. and Lowndes, N.F. (1999). The BRCT domain of the *S. cerevisiae* checkpoint protein Rad9 mediates a Rad9-Rad9 interaction after DNA damage. *Curr. Biol.* 9: 551–554.

Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, and A. Dancis. (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science*. 271:1552–1557.

Sun, Z., Fay, D.S., Marini, F., Foiani, M. and Stern, D.F. (1996). Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev.* 10: 395–406.

Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D.S. and Stern, D.F. (1998). Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science* 281: 272–274.

Sweeney F. D.Durocher D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Current Biology* 15: 1364-1375.

Zhu Z, Labbe S, Pena MM, Thiele DJ. (1998). Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem.* 273: 1277-80.

Toh G.W.-L and Lowndes NF. (2003). Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein in sensing and responding to DNA damage. *Cellular stress responses and cancer.* 31:242-246.

Ueta, R., A. Fukunaka, and Y. Yamaguchi-Iwai. (2003). Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278:50120–50127.

Vialard, J.E., Gilbert, C.S., Green, C.M. and Lowndes, N.F. (1998). The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J.* 17: 5679–5688.

Voutsina A, Fragiadakis GS, Boutla A, Alexandraki D. (2001). The second cysteine-rich domain of Mac1p is a potent transactivator that modulates DNA binding efficiency and functionality of the protein. *FEBS Lett.* 494:38-43.

Weinert, T.A. and Hartwell, L.H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317–322.

Weinert, T.A. and Hartwell, L.H. (1990). *Mol. Cell. Biol.* Characterization of RAD9 of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. 10: 6554–6564.

Wigge, P. A. and Kilmartin, J. V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol* 152: 349-60.

Winge, D. R., K. B. Nielson, W. R. Gray, and D. H. Hamer. (1985). Yeast metallothionein: sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 260:14464–14470.

Wishart, M.J. and Dixon, J.E. (1998) Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends Biochem Sci.* 23: 301-306.

Wishart MJ.....Dixon JE. (1995). A single mutation converts a novel phosphotyrosine binding domain into a dual-specificity phosphatase. *J Biol Chem.* 270:26782-26785.

Yamaguchi-Iwai, Y., A. Dancis, and R. D. Klausner. (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14:1231–1239.

Yamaguchi-Iwai, Y., M. Serpe, D. Haile, W. Yang, D. J. Kosman, R. D. Klausner, and A. Dancis. (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J. Biol. Chem.* 272:17711–17718.

Yonkovich J....Zhu Z. (2002). Copper iron-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. *J. Biol. Chem.* 277:23981-23984.

Yuan, D. S., R. Stearman, A. Dancis, T. Dunn, T. Beeler, and R. D. Klausner. (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2632–2636.

Yun, C. W., M. Bauler, R. E. Moore, P. E. Klebba, and C. C. Philpott. (2001). The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276:10218–10223.

Yun, C. W., J. S. Tiedeman, R. E. Moore, and C. C. Philpott. (2000). Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.* 275:16354–16359.

Zhou, B.B. and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature (London)*. 408: 433–439