

## **Περίληψη**

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν κυρίως η διερεύνηση νέων αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου συγκαταστολέα Ssn6-Tup1 και η απόδοση σε αυτό ενδεχόμενων νέων ρόλων. Μελετήθηκε η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη-μεσολαβητή Nmd3 της εξόδου της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας αλλά και ο ρόλος των Ssn6-Tup1 στην έξοδο της υπομονάδας από τον πυρήνα και στη φυσιολογική συναρμολόγηση ριβοσωμάτων. Η κατανομή του Tup1 στην πυρηνική περιφέρεια αποτελεί ένα νέο δεδομένο που μπορεί να αποτελέσει σημείο εκκίνησης για νέες μηχανιστικές υποθέσεις τόσο για την έξοδο των ριβοσωμικών υπομονάδων όσο και για τη στρατολόγηση γονιδιακών τόπων στην πυρηνική περιφέρεια. Τέλος περιγράφεται η δημιουργία καταρχήν μια βιβλιοθήκης αλληλουχιών πρόσδεσης του Ssn6 προκειμένου να χαρακτηρισθούν στο μέλλον νέοι τόποι όπου το σύμπλοκο δρα.

## **Abstract**

The main target of the current thesis was the verification and initial functional analysis of putative new interactants of the global transcriptional yeast co-repressor complex Ssn6-Tup1. The interaction with the 60S ribosomal subunit export adaptor Nmd3 as well as a rather unexpected 60S accumulation phenotype and irregular polysomal profile is demonstrated. Moreover exploring the Tup1 localization it's positioning on the nuclear periphery was revealed, possibly relating the co-repressor with events around the nuclear pore. Last, a mini library of putative Ssn6 chromatin binding sites was developed in order to explore in future time new promoter targets of the co-repressor.

## Εισαγωγή

Τα μόρια Tur1 και Ssn6 αναγνωρίστηκαν σε γενετικές σαρώσεις οι οποίες είχαν σχεδιαστεί για να μελετηθεί η γονιδιακή ρύθμιση στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η απαλοιφή καθενός από τα δύο γονίδια είναι βιώσιμη για το κύτταρο αλλά τα στελέχη αυτά εμφανίζουν μια σειρά από φαινότυπους: αργούς ρυθμούς ανάπτυξης, συναθροίσεις κυττάρων, απώλεια συζευξιμότητας των τύπου α στελεχών, χαμηλή σπορίωση κ.ά (Carlson, 1997).

Στα χρόνια που ακολούθησαν μια σειρά από εργασίες αποκάλυψε ότι τα μόρια αυτά δρουν σε συνεργασία και επιτελούν ως σύμπλοκο ρόλο μεταγραφικού συγκαταστολέα. Αυτό σημαίνει ότι το σύμπλοκο αυτό άμεσα (ενεργή καταστολή) και όχι με κάποιο μηχανισμό ρυθμικής της παρουσίας ή όχι ενεργοποιητών καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση. Ακόμη πιο πέρα το σύμπλοκο αυτό φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παίχτης στην γονιδιακή ρύθμιση στο ζυμομύκητα καθώς πάνω από 150 διαφορετικά γονίδια φαίνεται να ελέγχονται (Smith and Johnson, 2000).

Τα γονίδια αυτά μπορούν να διαιρεθούν σε κατηγορίες που αντιστοιχούν στις κυτταρικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται. Το αρχικό μοντέλο θέλει κάθε μια κατηγορία να ελέγχεται από ένα καταστολέα που συνδέεται άμεσα με το DNA και ο οποίος «στρατολογεί» στην περιοχή του υποκινητή το σύμπλοκο Ssn6-Tur1. Έτσι για παράδειγμα, η πρωτεΐνη Mig1 που ελέγχει γονίδια που καταστέλλονται παρουσία γλυκόζης, η πρωτεΐνη Crt1 που καταστέλλει γονίδια απόκρισης σε βλάβες του DNA, η πρωτεΐνη Rox1 που καταστέλλει γονίδια που ενεργοποιούνται σε συνθήκες υποξίας φαίνεται να μεσολαβούν στην παρουσία του συγκαταστολέα.

Κατά τη καταστολή το Tur1 φαίνεται να είναι ο ενεργός συγκαταστολέας ενώ το Ssn6 φαίνεται να παίζει ρόλο μεσολαβητή

του Tup1 με το συνδεδεμένο στο DNA καταστολέα. Αυτό το μοντέλο στηρίζεται στο γεγονός ότι το Tup1 διατηρεί τη κατασταλτική του δράση απόντος του Ssn6 (σε ένα LexA-Tup1 υβρίδιο) (Tzamarias and Struhl, 1994).

Ο τρόπος με τον οποίο δρα το σύμπλοκο δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Έχουν προταθεί βάσει πειραματικών παρατηρήσεων τρεις πιθανοί μηχανισμοί για να εξηγήσουν την κατασταλτική δράση: 1) η νουκλεοσωμική χωροθέτηση (nucleosome positioning) 2) η στρατολόγηση απακετυλασών των ιστονών 3) άμεση παρεμβολή στη βασική μεταγραφική μηχανή και στην ενεργοποίηση (Smith and Johnson, 2000) .

Χαρακτηριστικά, σε πρόσφατη εργασία (Zhang and Reese, 2004) μελετήθηκε εκτενώς ο τρόπος δράσης του συμπλόκου στα γονίδια RNR3 και HUG1 με χρήση διπλών και τριπλών μεταλλαγμάτων για γονίδια που εμπλέκονται στην χωροθέτηση νουκλεοσωμάτων, στη στρατολόγηση απακετυλασών και στη λειτουργία του Μεσολαβητή (Mediator), ενός συμπλόκου που εμπλέκεται στην έναρξη της μεταγραφής μεσολαβώντας ακριβώς στην δράση των ενεργοποιητών και των καταστολέων. Η ανάλυση που έγινε έδειξε ότι ακόμη και αν η δυνατότητα δημιουργίας νουκλεοσωμάτων στους συγκεκριμένους υποκινητές έχει απαλειφθεί (*Disw2*) το Tup1 εξακολουθεί να καταστέλλει τη μεταγραφή στρατολογώντας απακετυλάσες και παρεμβαλλόμενο στην δράση του μεσολαβητή. Το συμπέρασμα της εργασίας είναι ότι τουλάχιστον στα γονίδια-μοντέλα RNR3 και HUG1 το Tup1 δρα και με τους τρεις τρόπους που προαναφέρθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα. Ωστόσο, τα ίδια αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν και με άλλα γονίδια που είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται από το σύμπλοκο όπως τα SUC2 και FLO1. Κατά συνέπεια μέχρι στιγμής όσο και αν μελετηθούν οι τρόποι δράσης

του συμπλόκου σε γονίδια μοντέλα δεν μπορούμε ακόμη να γενικεύσουμε τον τρόπο δράσης στην καταστολή της μεταγραφής και είναι αρκετά πιθανό ότι κάτι τέτοιο δεν θα επιτευχθεί αν το σύμπλοκο δρα με ποικίλους τρόπους και παραλλαγές.

### **Δομή των Ssn6-Tup1**

Η πρωτεΐνη Ssn6 έχει μοριακό βάρος 107 kDa. Στη δευτεροταγή δομή της ξεχωρίζουν τα TPR motifs (Tetratricopeptide motifs). Πρόκειται για consensus αλληλουχίες τριαντατεσσάρων μικρών και μεγάλων υδρόφοβων αμινοξέων που μάλλον διπλώνουν σε όμοιες μεταξύ τους τριτοταγείς δομές. Τα πρότυπα αυτά υπάρχουν σε 30 περίπου πρωτεΐνες στο *S.cerevisiae* αλλά μόνο τέσσερις από αυτές φαίνεται να παίζουν ρόλο στη μεταγραφή. Το Ssn6 έχει δέκα τέτοια μοτίβα και απ' ό,τι φαίνεται μέσω αυτών των μοτίβων αλληλεπιδρά με διαφορετικούς παράγοντες και μεσολαβείται η στρατολόγηση του συμπλόκου στην περιοχή που βρίσκεται προσδεμένος ο καταστολέας. Επιπλέον είναι πιθανό σε κάθε τέτοια περίπτωση αλληλεπίδρασης να υπάρχει μια δυναμική της αλληλεπίδρασης διαφορετικών επαναλήψεων με διαφορετικές περιοχές το καταστολέα ή με άλλους παράγοντες κάτι που θα μπορούσε να ειπωθεί σαν μια «ευκαμψία» και προσαρμοστικότητα του Ssn6. Τα TPR1-TPR3 είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με το Tup1. Συνδυασμοί των TPR4-TPR10 μεσολαβούν στην πρόσδεση με τις διαφορετικές πρωτεΐνες-καταστολείς ειδικευμένες για κάθε οικογένεια γονιδίων που ρυθμίζεται από το Ssn6-Tup1. Κάθε μια από τις επαναλήξεις αυτές σύμφωνα με κρυσταλλογραφικά δεδομένα από την ανθρώπινη πρωτεϊνική φωσφατάση 5 (Pp5) που επίσης φέρει τέτοια μοτίβα, διπλώνει σε ένα ζευγάρι αντιπαράλληλων α-ελίκων. Έλικες από γειτονικά TPR διπλώνουν σε δεξιόστροφες (ύπερ)-ελικοειδείς δομές. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα

κανάλι όπου μάλλον εδράζονται οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα TPR (Gounalaki et al., 2000) .

Η πρωτεΐνη Turp1 είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 713 αμινοξέα μοριακού βάρους ~78 kDa. Η αμινοτελική περιοχή (1-91) μεσολαβεί στον τετραμερισμό του Turp1 και είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τα TPR μοτίβα του Ssn6. Η καρβόξυ-τελική περιοχή του Turp1 (334-713) αποτελείται από επτά αλληλουχίες WD40. Οι επαναλήψεις WD40 βρίσκονται σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μια πληθώρα λειτουργιών όπως η μεταβίβαση σήματος , η επεξεργασία του pre-mRNA και η συναρμολόγηση του κυτταροσκελετού. Τυπικά κάθε τέτοια αλληλουχία περιέχει ένα GH διπεπτίδιο 11-24 αμινοξέα μετά το N-τελικό άκρο της και το WD διπεπτίδιο στο καρβοξυτελικό ακρό της έχοντας ένα μήκος 40 καταλοίπων συνολικά. Μεταξύ των GH και WD βρίσκεται μια συντηρημένη δομή που εξυπηρετεί σαν πλατφόρμα στην οποία πρωτεΐνες μπορούν να προσδεθούν σταθερά ή αντιστρεπτά. Οι επαναλήψεις σχηματίζουν μια δομή προπέλας με αρκετές πτέρυγες (blades) όπου η κάθε πτέρυγα αποτελείται από ένα τετράπτυχο αντιπαράλληλο β-φύλλο. Κάθε αλληλουχία WD40 σχηματίζει τις τρεις πρώτες πτυχές μιας πτέρυγας και την τελευταία της επόμενης. Η τελευταία C-τελική επανάληψη συμπληρώνει την δομή της πρώτης πτέρυγας σχηματίζοντας έτσι τη χαρακτηριστική δακτυλιοειδή δομή προπέλας. Κατάλοιπα στην πάνω και κάτω επιφάνεια της προπέλας κατευθύνουν τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες ή συνδέτες. Το Turp1 όπως προαναφέρθηκε περιέχει επτά τέτοιες αλληλουχίες και με τις οποίες αλληλεπιδρά με τον καταστολέα Mata2 και το μέρος αυτό της πρωτεΐνης μπορεί να υποκαταστήσει την δράση του Turp1 ως καταστολέας (Sprague et al., 2000). Από την άλλη όταν το Turp1 φέρεται τεχνητά στην περιοχή ενός υποκινητή (LexA-fusion) για τη δράση του ως καταστολέας αρκούν δύο περιοχές του με ελάχιστη μεταξύ τους ομοιότητα ενώ τα

WD μοτίβα δεν φαίνεται να παίζουν ρόλο στην καταστολή (Tzamarias and Struhl, 1994) .

### **Η αλληλεπίδραση του Ssn6-Tup1 με τον υποκινητή του γονιδίου Gal1**

Μια κατηγορία γονιδίων που ελέγχεται από το Ssn6-Tup1 είναι και γονίδια που καταστέλλονται παρουσία γλυκόζης. Μια ομάδα τέτοιων γονιδίων κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στον καταβολισμό της γαλακτόζης και ρυθμίζονται από τον ενεργοποιητή Gal4 και τον καταστολέα Mig1, αποτελώντας έτσι το αποκαλούμενο Gal(actose) Regulon (τα γονίδια Gal1-10, Gal7 κ.α). Όπως έχει δειχθεί (Matallana et al., 1992) το Mig1 αλληλεπιδρά γενετικά αλλά και φυσικά (Paramichos-Chronakis et al., 2004) με το Ssn6. Το μέχρι πρόσφατα προτεινόμενο μοντέλο θέλει το Mig1 να εκκενώνει τον πυρήνα σε συνθήκες αποκαταστολής (φαίνεται να ευθύνεται η φωσφορυλίωση του Mig1 από την κινάση Snf1) με την μεσολάβηση της exportin Msn5 (De Vit et al., 1997) και με αυτόν τον τρόπο να αίρεται η δράση του συμπλόκου καταστολής και να αρχίζει η μεταγραφή από το γονίδια του Gal Regulon (δεδομένης και της ενεργοποίησης από τη γαλακτόζη και τον ενεργοποιητή Gal4) (Gancedo, 1998) .

### **Η Nmd3 και η Nic96: νέες αλληλεπιδράσεις του Ssn6;**

Το Ssn6 έχει βρεθεί σε διάφορες γενετικές ή βιοχημικές σαρώσεις να αλληλεπιδρά με ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών. Σε σάρωση Yeast Two Hybrid που έγινε στο εργαστήριο του Δ.Τζαμαρία αναγνωρίστηκαν μεταξύ πρωτεϊνών που εμπλέκονται με την μεταγραφή και δύο πρωτεΐνες που δεν είχαν καμιά λειτουργική σχέση με τη μεταγραφή και τη μέχρι τώρα γνωστή δράση του συμπλόκου. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι Nmd3 και Nic96.

### **Η Nmd3 και η έξοδος της 60S ριβωσωμικής υπομονάδας.**

Η βιογένεση των ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων επιτελείται κυρίως στον πυρηνίσκο και απαιτεί τη δράση ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων που δρουν *in trans* και οι οποίοι τροποποιούν και κατεργάζονται το αρχικό rRNA μετάγραφο και προωθούν τη συναρμολόγηση των ριβοσωμικών υπομονάδων (Tschochner and Hurt, 2003) .

Η ενεργός μεταφορά του RNA και των πρωτεϊνών από και προς τον πυρήνα μεσολαβείται από τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (Nuclear Pore Complexes, NPC) τα οποία στο *S.cerevisiae* υπολογίζονται σε περίπου 100-200 ανά απλοειδή πυρήνα (Gomez-Ospina et al., 2000). Η πλειονότητα των RNA και των RNP αλληλεπιδρούν άμεσα με πρωτεΐνες που παίζουν το ρόλο μεσολαβητή (adaptor) και παρέχουν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης με το φορτίο (cargo binding domain) και το σήμα εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal, NES) το οποίο αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη που μεσολαβεί στην διόδο μέσω του πυρηνικού πόρου (export receptor, exportin/importin). Μέλη της οικογένειας των β-importin όπως ο Crm1 συνδέονται στο φορτίο παρουσία του μεσολαβητή μόνο παρουσία μιας μικρής G-protein της Ran-GTP. Μετά την έξοδο, στο κυτταρόπλασμα, το GTP υδρολύεται σε GDP (Ran-GDP) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του φορτίου. Ο μεσολαβητής και ο υποδοχέας ανακυκλώνονται προς τον πυρήνα για να υποστηρίξουν έναν επόμενο κύκλο μεταφοράς (Reed and Hurt, 2002) (Lei and Silver, 2002) .

Επιστρέφοντας στην Nmd3, η πρωτεΐνη αυτή που είναι συντηρημένη σε Αρχαία και Ευκαρυώτες, βρέθηκε να είναι απαραίτητη για την έξοδο της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας στο *S.cerevisiae* (Ho and Johnson, 1999) . Αν και η ονομασία της (Nonsense Mediated Decay 3) παραπέμπει στο μονοπάτι που

ενεργοποιείται για την αποδόμηση mRNA που φέρει αναγνωρίσιμες μη-λειτουργικές αλληλουχίες ο ρόλος της σε αυτό το φαινόμενο είναι μάλλον έμμεσος και σίγουρα όχι τόσο προφανής όσο είναι στην έξοδο της υπομονάδας 60S (Ho and Johnson, 1999) (Karl et al., 1999) . Η Nmd3 είναι κυρίως κυτταροπλασματική και βρίσκεται συνδεδεμένη με ελεύθερες 60S υπομονάδες στο κυτταρόπλασμα αλλά παλινδρομεί μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Τόσο το NES όσο και το NLS (Nuclear Localization Signal) που χρειάζονται για την παλινδρόμηση βρίσκονται προς το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και λείπουν από την ομόλογη πρωτεΐνη των Αρχαίων. Στελέχη που φέρουν μεταλλαγμένο το NES είναι dominant-negative αναστολείς της κυτταρικής αύξησης μπλοκάροντας ένα από τα τελευταία στάδια της βιογένεσης των ριβοσωμάτων (Belk et al., 1999) . Στην περίπτωση της Nmd3 ρόλο μεταφορέα παίζει το Crm1 και απενεργοποίηση της λειτουργίας του οδηγεί στην συσσώρευση 60S υπομονάδων στον πυρήνα. Η Nmd3 αλληλεπιδρά με την ριβοσωμική Rpl10 και η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι ο κρίκος μεταξύ της Nmd3 και της 60S υπομονάδας. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο μοντέλο που θέλει την Nmd3 να συνδέεται με την 60S στον πυρήνα και να διευκολύνει την έξοδο προς το κυτταρόπλασμα μέσω του μονοπατιού Crm1 (Johnson et al., 2002) .

### **Η Nic96 και ο πυρηνικός πόρος.**

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό η γνώση μας γύρω από τη σύσταση του πυρηνικού πόρου και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που τον δομούν μεταξύ τους αλλά και με παράγοντες που εμπλέκονται στη μεταφορά από και προς τον πυρήνα (Damelin and Silver, 2002) (Allen et al., 2002).

Η Nic96 μαζί με την Nsp1 και άλλες νουκλεοπορίνες ( Nup57 και Nup49) δημιουργεί ένα υποσύμπλοκο στον πυρηνικό πόρο (Damelin and Silver, 2002). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το υποσύμπλοκο τοποθετείται τόσο προς την κυτταροπλασματική



όσο και προς την πυρηνοπλασματική πλευρά του πυρηνικού πόρου. Η Nic96 αποτελείται από τρεις περιοχές με επαναλήψεις επτάδας (heptad repeats) στην N-τελική περιοχή και με μη πολικά αμινοξέα στην κεντρική περιοχή. Απαλοιφή των heptad repeats και σημειακές μεταλλάξεις στην κεντρική περιοχή διακόπτουν την κυκλοφορία των πρωτεϊνών. Αντιθέτως δεν έχει παρατηρηθεί ελαττωματική μεταφορά του RNA στα αντίστοιχα μεταλλάγματα. Όπως και σε *nsp1* έτσι και σε μεταλλαγμένα στελέχη *nic96* στελέχη οι υπομονάδες 40S και 60S συσσωρεύονται στον πυρήνα.

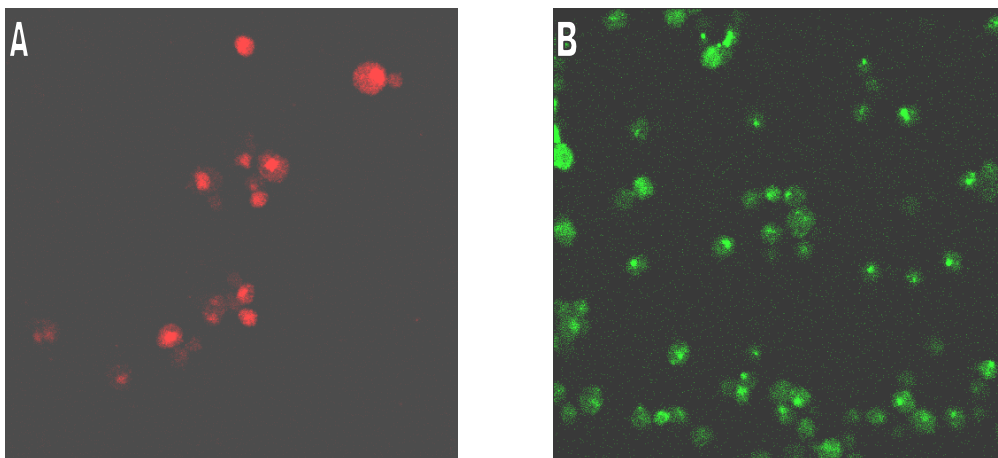
Η Nic96 σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης *in vivo* έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με την πρωτείνη Mlp2 (Kosova et al., 2000) . Η Mlp2 όπως και η ομόλογη της Mlp1 είναι τα πλησιέστερα ομόλογα μόρια με τις πρωτείνες Trp των ανώτερων ευκαρυωτών. Οι Trp είναι δομικά συστατικά των ινιδίων που συνδεόμενα με τον πυρηνικό πόρο εκτείνονται προς το εσωτερικό του πυρήνα. Απομονωμένη Nic96 συνδέεται με την Mlp2 *in vitro*. Τα παραπάνω υπονοούν ότι η Nic96 (ή ένα σύμπλοκο στο οποίο μετέχει στον καλούμενο τελικό δακτύλιο του πυρηνικού πόρου) συνδέει την Mlp2 με τον πυρηνικό πόρο (Kosova et al., 2000)

## Σκοπός

- Η εργασία αυτή ξεκίνησε με αφορμή την επιβεβαίωση του εντοπισμού του καταστολέα Mig1 σε συνθήκες αποκαταστολής και σε μεταλλαγμένα στελέχη προκειμένου να ολοκληρωθεί η εικόνα για την αλληλεπίδραση του Mig1 με το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 και την ρύθμιση του από την κινάση Snf1.
- Ο κύριος σκοπός της εργασίας ήταν η επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων του Ssn6 που χαρακτηρίστηκαν από το Y2H που προαναφέρθηκε. Ελέγχθηκαν οι αλληλεπιδράσεις με τις Nmd3 και Nic96 με επιπλέον σκοπό να αποδοθεί και να διερευνηθεί και η φυσιολογική σημασία των ενδεχόμενων αλληλεπιδράσεων.
- Επιπλέον, καθώς το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 παίζει ρόλο ενός καταστολέα της μεταγραφής σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων επιχειρήθηκε η δημιουργία καταρχήν μιας βιβλιοθήκης αλληλουχιών που να αποτελούν στόχους του Ssn6. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation) σε συνδυασμό με Ligation Mediated PCR.

## A. Εντοπισμός του Mig1

Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να επιβεβαιωθεί ότι το Mig1 παρουσία γλυκόζης και σε υπόβαθρο αγρίου τύπου βρίσκεται στον πυρήνα. Για το σκοπό αυτό σε στέλεχος αγρίου τύπου στο οποίο το γονίδιο του Mig1 έχει σημανθεί με ένα επίτοπο 9Myc έγινε ανίχνευση με τη χρήση της τεχνικής του έμμεσου (άνοσο)φθορισμού. Όπως φαίνεται και από την εικόνα το Mig1 δείχνει παρουσία γλυκόζης να βρίσκεται στο μεγαλύτερο ποσοστό του στον πυρήνα. Προκειμένου να ελεγχθεί ακόμη περισσότερο το προτεινόμενο μοντέλο το πείραμα επαναλήφθηκε σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης (πέρασμα των κυττάρων σε γλυκερόλη) αλλά σε στέλεχος *msn5Δ* όπου και πάλι το αναμενόμενο πρότυπο επαναλήφθηκε: το Mig1 όταν η Msn5 δεν υπάρχει δεν μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης (όπως συμβαίνει στο στέλεχος του αγρίου τύπου -έχει δειχτεί στο εργαστήριο του Δ.Τζαμαρία από τον Μ.Παπαμίχο) αλλά κατακρατείται στον πυρήνα. Η σημασία αυτών των πειραμάτων αλλά και η εναρμόνιση τους με πειράματα που ήδη είχαν γίνει στο εργαστήριο αναφέρονται στην συζήτηση.



**Εικόνα 1 :** A. Το Mig1 είναι πυρηνικό σε συνθήκες γλυκόζης B. Απουσία της exportin *Msn5* δεν μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες απουσίας γλυκόζης (γλυκερόλη)

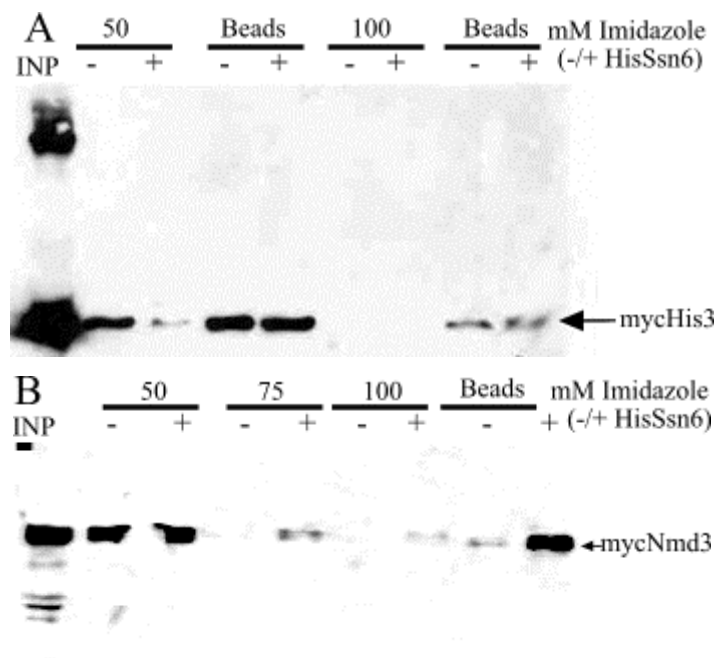
## **B.H αλληλεπίδραση του Ssn6 με την Nmd3 και την Nic96**

### **B1.*in vivo* αλληλεπίδραση Nmd3-Ssn6**

Προκειμένου να ελεγχθεί *in vivo* η αλληλεπίδραση του Nmd3 με το Ssn6, σε στέλεχος αγρίου τύπου που έφερε την Nmd3 σημασμένη με τον επίτοπο 9myc έγινε μετασχηματισμός με high copy πλασμίδιο (τύπου 2μ) που έφερε το γονίδιο του Ssn6 σημασμένο με τον επίτοπο 6xHis (pVTU260-6xHisSsn6). Το νέο στέλεχος ήταν δηλαδή διπλά σημασμένο για τις πρωτεΐνες η αλληλεπίδραση των οποίων επρόκειτο να εξεταστεί. Κατά την δοκιμή (NiNTA pull down) κυτταρόλυμα που προερχόταν από το στέλεχος αρχικά επώαστηκε με κολώνα νικελίου και στη συνέχεια με πλύσεις αυξανόμενης συγκέντρωσης σε ιμιδαζόλιο απομακρύνθηκε από την κολώνα μη ειδική δέσμευση του myc-Nmd3 (φαίνεται αρκετά έντονη μη ειδική δέσμευση στις γραμμές 2 και 3 της εικόνας). Στο τέλος απομακρύνθηκε από την κολώνα με βρασμό και υπό αποδιατακτικές συνθήκες η His-Ssn6 και ότι είχε ότι είχε κατακρημνιστεί μαζί της. Ως παράλληλο αρνητικό πείραμα έγινε ακριβώς το ίδιο πείραμα σε στέλεχος το οποίο δεν έφερε το πλασμίδιο που κωδικοποιούσε για το His-Ssn6 (-) και που φυσικά δεν πρέπει μετά τις πλύσεις να δίνει παρά ελάχιστο σήμα στην δοκιμασία της ECL (mock purification). Επιπλέον προκειμένου να βεβαιωθεί η αξιοπιστία της μεθόδου το πείραμα πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η μη-αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης His3 με την Ssn6. Χρησιμοποιήθηκε δηλ. στέλεχος που έφερε σημασμένη την πρωτεΐνη His3(9myc) ενδογενώς και το pVTU260-6xHisSsn6 καθώς και το αντίστοιχο στέλεχος που δεν έφερε το pVTU260-6xHisSsn6 ως αρνητικός μάρτυρας.

Πράγματι, όπως φαίνεται και από την εικόνα η Nmd3 αλληλεπιδρά *in vivo* με το Ssn6 και αυτή φαίνεται να είναι μια ισχυρή αλληλεπίδραση. Στο πείραμα αυτό φαίνεται ότι η ποσότητα myc-Nmd3 που κατακρημνίζεται μη ειδικά (όταν δεν υπάρχει το His-Ssn6 δηλ.) είναι ελάχιστη μπροστά στην ποσότητα που κατακρημνίζεται ειδικά λόγω της αλληλεπίδρασης με το Ssn6. Επίσης, το πείραμα που

ελέγχονταν η μη-αλληλεπίδραση His3-Ssn6 επιβεβαιώνεται καθώς όση (ελάχιστη) ποσότητα myc-His3 κατακρημνίζεται μη ειδικά απουσία His-Ssn6 τόση ποσότητα κατακρημνίζεται και όταν το his-Ssn6 υπάρχει και προσδένεται στην κολώνα νικελίου.



**Εικόνα 2** *A. Το Ssn6 δεν αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη His3 (αρνητικό κοντρόλ) B. Το Ssn6 αλληλεπιδρά με την Nmd3. Και στα δύο πειράματα έγιναν πλύσεις με ρυθ. δ/μα ιμιδαζολίου απομακρύνοντας μη ειδική δέσμευση στα σφαιρίδια, όπως φαίνεται και από τις εκλούσεις.*

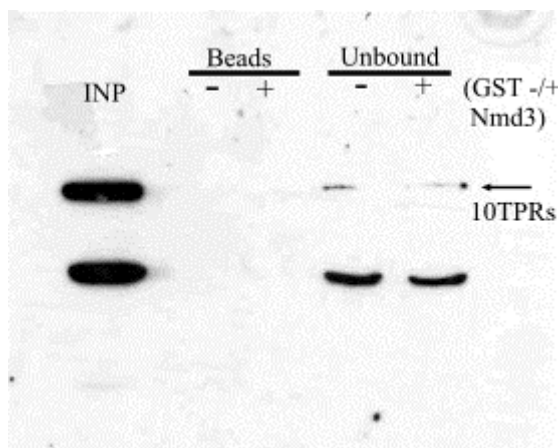
## B2. In vitro αλληλεπίδραση Nmd3-Ssn6

Το γεγονός ότι σε μια in vivo δοκιμασία κατακρήμνισης (pull down) η Nmd3 κατακρημνίζεται με το Ssn6 αποτελεί ένα στοιχείο πάνω στο οποίο μπορεί κανείς να ελέγξει υποθέσεις για τη φυσιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης μια πρωτεΐνης που είναι γνωστός καταστολέας της μεταγραφής ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων και της πρωτεΐνης μεσολαβητή της εξόδου της μεγάλης ριβοσωματικής υπομονάδας από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα.

Παρόλα αυτά αυτό που προείχε να μελετηθεί ήταν αν και κατά πόσο η αλληλεπίδραση Ssn6-Nmd3 είναι άμεση ή έμμεση. Η δοκιμασία in vivo βεβαιώνει ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, δεν βεβαιώνει όμως αν αυτό γίνεται άμεσα ή έμμεσα καθώς στο κυτταρόλυμα που χρησιμοποιείται για να γίνει η δοκιμασία μπορεί να ενυπάρχει κάποια πρωτεΐνη (ή ακόμη και περισσότερες από μία) που να μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση. Προκειμένου να διακριβωθεί η φύση της

αλληλεπίδρασης από τη σκοπιά αυτή, η αλληλεπίδραση μελετάται σε ένα *in vitro* σύστημα. Για το σκοπό αυτό το γονίδιο της Nmd3 κλωνοποιήθηκε σε φορέα που το έφερε *in frame* με την πρωτεΐνη GST (GST-Nmd3). Ο φορέας μετασχηματίστηκε σε κατάλληλα κύτταρα έκφρασης (DH5α ή/και BL21pLys) και κυτταρόλυμα επώαστηκε με κολώνα Glutathione-Sepharose. Με τον τρόπο αυτό συγκεντρώθηκε ποσότητα GST-Nmd3. Για να παραχθεί η απαραίτητη ποσότητα της Ssn6 για την αλληλεπίδραση, χρησιμοποιήθηκε κατασκευή που υπήρχε στο εργαστήριο (pRSETC-10TPRs, Μ. Παπαμίχος) που έφερε και τα δέκα TPR μοτίβα του Ssn6, τα οποία όπως προαναφέρθηκε μεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις του Ssn6. Η κατασκευή αυτή επιτρέπει την απομόνωση και καθαρισμό 3xHis-10TPR με χρήση κολώνας νικελίου (NiNTA). Ποσότητα από τον καθαρισμό αυτό επωάζεται με κολώνα που φέρει GST-Nmd3 και ως πείραμα ελέγχου έγινε παράλληλα και επώαση με κολώνα που έφερε GST.

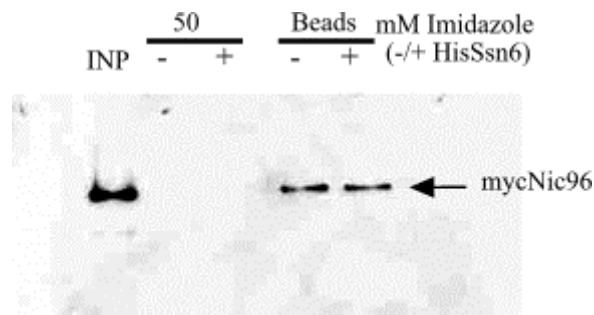
Όπως φαίνεται από την εικόνα το αποτέλεσμα του πειράματος ήταν αρνητικό. Δεν φαίνεται να κατακρημνίζεται Ssn6 (10TPR) με GST-Nmd3 *in vitro* κάτι που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση που διαφάνηκε *in vivo* πιθανώς να μεσολαβείται από κάποια άλλη πρωτεΐνη του *S.cerevisiae* η απουσία της οποίας στο *in vitro* σύστημα έχει ως αποτέλεσμα το αρνητικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας *in vitro*.



**Εικόνα 3** Το Ssn6 δεν αλληλεπιδρά *in vitro* με το Nmd3. Απομονωμένη ποσότητα 10TPRs πέραστηκε από κολώνα Glutathione Sepharose που έφερε δεσμευμένη είτε GST(κοντρόλ) είτε GST-Nmd3. Όπως φαίνεται εξακολουθεί να υπάρχει μη δεσμευμένη 10TPR μετά την επώαση(*unbound*)

### B3. Αλληλεπίδραση της Nic96 με το Ssn6

Ακριβώς με την ίδια λογική που αναφέρθηκε στο μέρος B1 δοκιμάστηκε να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση της Nic96 με το Ssn6. Έτσι, αρχικά σε στέλεχος αγρίου τύπου σημάνθηκε το γονίδιο της Nic96 με τον επίτοπο 9myc. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό κοντρόλ στο πείραμα. Αντίστοιχα, το ίδιο στέλεχος μετασχηματισμένο με το pVTU260-6xHisSsn6 χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση. Όπως φαίνεται και από την εικόνα το αποτέλεσμα του πειράματος είναι αρνητικό καθώς η ίδια ποσότητα myc-Nic96 φαίνεται να συγκατακρημνίζεται τόσο κατά το mock purification όσο και κατά το His-Ssn6 pull down. Ενδεχομένως εάν αυξανόταν η μοριακότητα του ιμιδαζολίου να μην εμφανιζόταν καθόλου σήμα υποβάθρου (background signal) της mycNmd3. Συμπεραίνεται ότι τουλάχιστον υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα η Nic96 δεν αλληλεπιδρά με την Ssn6.



**Εικόνα 4** Το Ssn6 δεν αλληλεπιδρά με την Nic96 (γλυκόζη). Μετά από 50 mM ιμιδαζολίου η ίδια ποσότητα mycNic96 βρέθηκε δεμένη στα σφαιρίδια ανεξαρτήτως αν υπήρχε δεσμευμένο HisSsn6 ή όχι σε αυτά

#### **B4.Οι πρωτείνες Tup1 και Ssn6 φαίνεται να είναι απαραίτητες για την έξοδο της 60S ριβοσωματικής υπομονάδας**

Έφ' όσον επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση της Nmd3 με το Ssn6 το ερώτημα που προέκυψε είναι αν η Nmd3 εμπλέκεται στη μεταγραφή ή αν το Ssn6 (ή/και το Tup1) παίζει κάποιο ρόλο στην έξοδο της 60S ριβοσωματικής υπομονάδας από τον πυρήνα. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που έγιναν δεν φαίνεται να δίνουν κάποια θετική απάντηση στην πρώτη υπόθεση. Η Nmd3 δεν φαίνεται να έρχεται σε επαφή με περιοχές του DNA όπου το Ssn6 έχει αναφερθεί να δρα.

Για να ελεγχθεί η δεύτερη υπόθεση έγιναν πειράματα εντοπισμού της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας σε στελέχη αγρίου τύπου, σε στελέχη που φέρουν την *nmd3-2* μεταλλαγμένη μορφή της Nmd3 και σε στελέχη  $\Delta$ *ssn6(ssn6)* και  $\Delta$ *tup1(tup1)*.

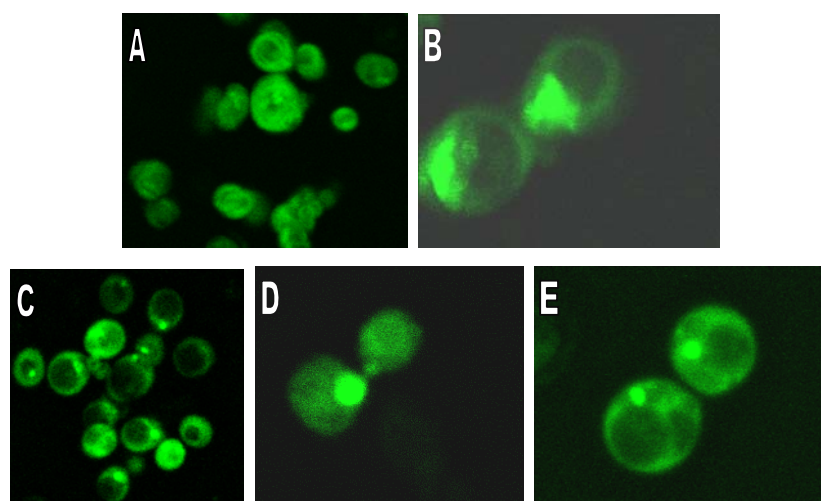
Πιο αναλυτικά: η απαλοιφή της Nmd3 από το γονιδίωμα είναι θνησιγόνος μεταλλαγή. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορεί να γίνει άμεσα πείραμα που να μελετάται ο φαινότυπος στελεχών απουσία Nmd3. Ωστόσο, στο *S.cerevisiae* (κι όχι μόνο) είναι δυνατόν να προσομοιαστεί η εικόνα που θα έδινε η απουσία μιας πρωτεΐνης με τη δημιουργία στελεχών που υπό συνθήκες ο φαινότυπος τους λόγω αλλαγών που έχουν προκληθεί στο γονίδιο που μελετάται προσομοιάζει ή και γίνεται ίδιος με τον θνησιγόνο φαινότυπο που προκύπτει με απαλοιφή του γονιδίου. Τα μεταλλάγματα αυτά καλούνται μεταλλάγματα υπό συνθήκες (*conditional mutants*) και πολύ συχνά η συνθήκη που είναι περιοριστική για την ανάπτυξη τους είναι η αύξηση της θερμοκρασίας καθώς είναι ένας εύκολος τρόπος να επιλεγούν τέτοιες μεταλλαγές. Για την Nmd3 υπάρχει ήδη τέτοιο στέλεχος το οποίο φέρει απαλοιφή στο ενδογενές γονίδιο αλλά φέρει πλασμιδιακό φορέα που κωδικοποιεί για την μεταλλαγμένη (θερμοευαίσθητη) *nmd3-2 in trans*. Σε θερμοκρασία δωματίου το



στέλεχος αυτό επιβιώνει. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία (η *nmd3-2* δυσλειτουργεί) στο στέλεχος αυτό η αύξηση είναι αργή και παρατηρείται συσσώρευση ριβοσωμικών υπομονάδων στον πυρήνα. Η συσσώρευση αυτή γίνεται ορατή αν μια ριβοσωμική πρωτεΐνη σημανθεί. Για το σκοπό αυτό έχει εδραιωθεί ως τέτοιος μάρτυρας εντοπισμού η ριβοσωμική Rpl25 σημασμένη με την φθορίζουσα GFP. Τόσο το στέλεχος *nmd3-2* όσο και ο φορέας που φέρει την Rpl25-eGFP με τα οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα εντοπισμού προσφέρθηκαν από το εργαστήριο του Prof. Dr. Ed Hurt (BZH, Heidelberg).

Έτσι, ο πλασμιδιακός φορέας που έφερε την Rpl25-eGFP μετασηματίστηκε σε στελέχη αγρίου τύπου και σε *tup1,ssn6* και *nmd3-2* στελέχη. Όπως φαίνεται και από την εικόνα η Rpl25 είναι διάχυτη σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα στο στέλεχος αγρίου τύπου. Στο *nmd3-2* στέλεχος μετά από πέρασμα σε θερμοκρασία 37°C για μία ώρα δείχνει μια πολύ χαρακτηριστική εικόνα συσσώρευσης στον πυρήνα. Στα στελέχη *ssn6* και *tup1* παρατηρήθηκε τόσο μειωμένος φθορισμός όσο και συσσώρευση στο πυρήνα (λόγω τεχνικής αδυναμίας δεν στάθηκε δυνατή η αποτύπωση του συνεντοπισμού ωστόσο μπορέσαμε να την εξακριβώσουμε βάφοντας τους πυρήνες με DAPI σε πείραμα που έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων) . Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι το *tup1* έδωσε μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων που να δίνουν την εικόνα αυτή (περίπου 80%) απ' ότι το *ssn6* που έδωσε μάλλον μικρό ποσοστό (περίπου 40-50%) αν και είναι αρκετά πιθανό το χαμηλό αυτό ποσοστό να οφείλεται στις συνθήκες του πειράματος. Επίσης, η συσσώρευση που δίνουν τα δύο αυτά στελέχη είναι περισσότερο εντοπισμένη. Φαίνεται ότι η Rpl25-eGFP είναι συσσωρευμένη σε ένα μέρος του πυρήνα και όχι σε όλο το χώρο του. Αν και δεν κατέστη δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός της περιοχής αυτής υποθέτουμε ότι πρόκειται μάλλον για τον πυρηνίσκο. Άλλωστε η επιλογή της Rpl25 ως μάρτυρα υποστηρίζει αυτή την υπόθεση, καθώς είναι γνωστό ότι συναρμολογείται από

πολύ νωρίς στη σχηματιζόμενη προ-ριβοσωμική 60S (pre-60S) από τα πρώτα δηλ. στάδια σχηματισμού της στον πυρήνισκο.



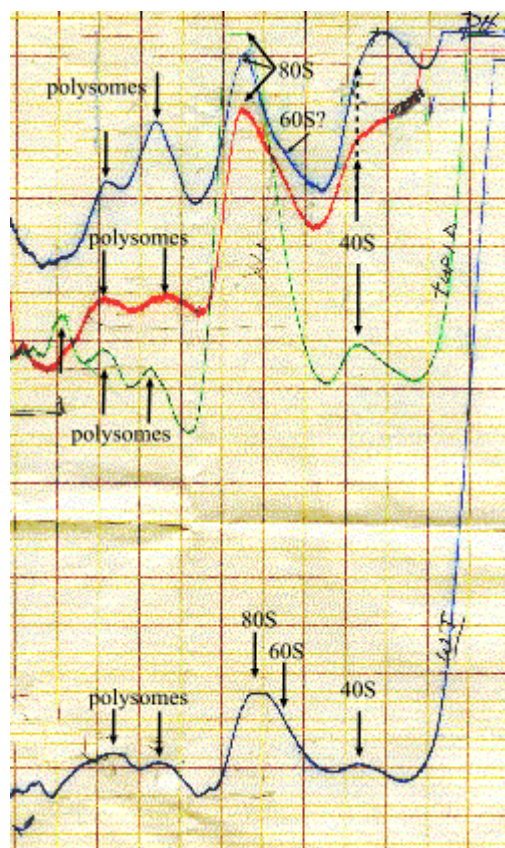
**Εικόνα 5** Η *Rpl25-eGFP* συσσωρεύεται στον πυρήνα των *Δtur1* και *Δssn6*. *A-E* στελέχη μετασχηματισμένα με το φορέα *pRS315-Rpl25-eGFP*. *A*. Αγρίου τύπου *B*. *nmd3-2* *C*. *Δtur1* *D-E*. *Δssn6*

### **B5. Τα στελέχη *tur1* και *ssn6* εμφανίζουν μη φυσιολογικά πολυσωμικά προφίλ**

Τα παραπάνω ευρήματα εμπλέκουν τις πρωτεΐνες *Ssn6* και *Tur1* στην έξοδο της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η *Ssn6* αλληλεπιδρά με την *Nmd3* τα ευρήματα αυτά συνηγορούν σε μια μάλλον άμεση εμπλοκή στην έξοδο των ριβοσωμάτων παρά σε μια έμμεση δράση λόγω του ρόλου τους στην μεταγραφή. Άλλωστε, το σύμπλοκο *Ssn6-Tur1* δεν εμπλέκεται στην καταστολή ριβοσωμικών πρωτεϊνών όπου τον κύριο ρόλο τον παίζει ο καταστολέας *Rap1*.

Εφ' όσον όταν λείπουν το *Tur1* και το *Ssn6* προκαλείται συσσώρευση *Rpl25* και κατά συνέπεια 60S υπομονάδων η βιογένεση των ριβοσωμάτων στα στελέχη αυτά πρέπει να είναι ελαττωματική. Για να μελετηθεί αυτή η υπόθεση προχωρήσαμε σε ανάλυση πολυσωμάτων (polysome profile) στα ίδια ακριβώς στελέχη που έγινε ο εντοπισμός της *Rpl25-eGFP*. Με τη μέθοδο αυτή είναι

δυνατόν να αναπαρασταθεί η αναλογία 40S και 60S υπομονάδων καθώς και μονοσωμάτων (δηλ. μεμονωμένων ριβοσωμάτων) αλλά και πολυσωμάτων. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται το προφίλ για στέλεχος αγρίου τύπου (σε 10 φορές μικρότερη κλίμακα, μπλέ χρώμα) και για στελέχη *nmd3-2*(κόκκινο),*tup1*(πράσινο) και *ssn6*(μπλε).



**Εικόνα 6** Τα στελέχη *Δtup1* και *Δssn6* εμφανίζουν μη φυσιολογικά πολυσωμικά προφίλ. Το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο στο *Δssn6* είναι τα πολύ χαμηλά επίπεδα 80S η συσσώρευση 40S και τα πολύ χαμηλά επίπεδα πολυσωμάτων (η καμπύλη είναι σχεδόν πανομοιότυπη με αυτήν του *nmd3-2*). Το *Δtup1* εμφανίζει περισσότερο φυσιολογικό προφίλ αλλά αναλογικά έχει μη διακρίσιμα επίπεδα ελεύθερης 60S αλλά και χαμηλά ποσοστά πολυσωμάτων. Η καμπύλη του στελέχους αγρίου τύπου είναι σε κλίμακα 1:10 προς ευκολία της απεικόνισης. Οι καμπύλες αντιστοιχούν σε απορρόφηση στα 254 nm.

Από το προφίλ γίνεται αντιληπτό ότι το στέλεχος *ssn6* έχει πολυσωμικό προφίλ σχεδόν ίδιο με το στέλεχος *nmd3-2*. Αναλύοντας το προφίλ των στελεχών καλύτερα, αυτό που είναι εμφανές είναι ότι τόσο στο *ssn6* όσο και στο *nmd3-2* φαίνεται να υπάρχει μια συσσώρευση 40S υπομονάδας ενώ τα επίπεδα της 60S

είναι πολύ χαμηλά και δυσδιάκριτα όπως πολύ χαμηλά είναι και τα επίπεδα των συναρμολογημένων μονοσωμάτων. Αντίθετα, το *tur1* φαίνεται να έχει ικανοποιητικό αριθμό μονοσωμάτων αλλά επίσης φαίνεται να πάσχει σε διαθέσιμες ελεύθερες 60S και 40S υπομονάδες.

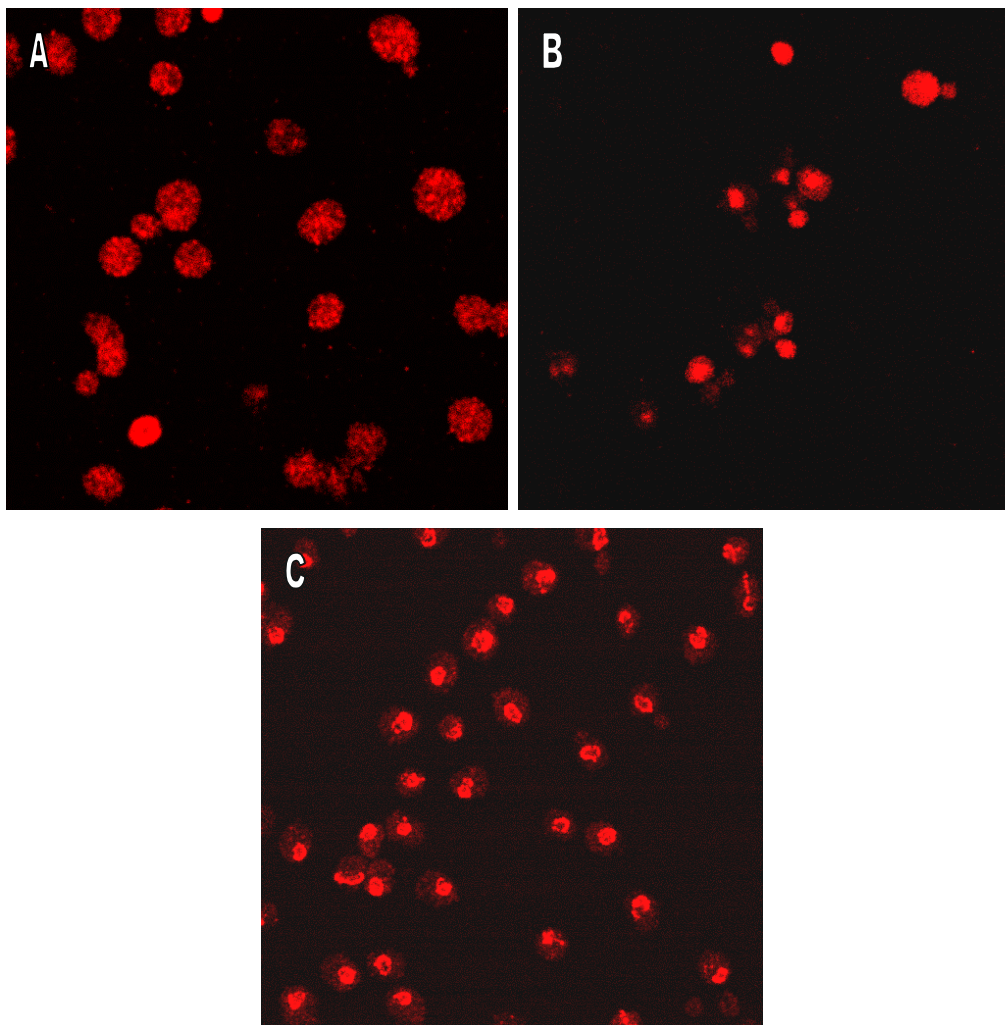
Ενδιαφέρον είναι ότι η εικόνα αυτή μάλλον αναστρέφεται όσον αφορά το σχηματισμό πολυσωμάτων. Έτσι, τόσο το *nmd3-2* όσο και το *ssn6* φαίνεται να έχουν χαμηλό ποσοστό πολυσωμάτων σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου αλλά ικανοποιητικό ποσοστό σε σχέση πάντα με τον αριθμό των μονοσωμάτων που διαθέτουν ενώ το *tur1* φαίνεται να έχει αναλογικά πάντα με τον αριθμό μονοσωμάτων μάλλον χαμηλό αριθμό πολυσωμάτων.

## **B6. Εντοπισμός του Tur1 στην πυρηνική περιφέρεια**

Τα παραπάνω στοιχεία ενισχύουν τη υπόθεση μιας ενεργούς συμμετοχής των Tur1 και Ssn6 στην έξοδο των ριβοσωμικών υπομονάδων και τη συναρμολόγηση των ριβοσωμάτων. Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι αν ο ρόλος αυτός ενισχύεται από συγκεκριμένο εντοπισμό του Ssn6 ή του Tur1 στον πυρήνα. Από την Yeast GFP Database τόσο το Ssn6 όσο και το Tur1 εμφανίζονται πυρηνικά. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατηγοριοποίηση του εντοπισμού του Tur1 ως αντι-πυρηνισκικού (anti-nucleolar). Αν κάτι τέτοιο ισχύει, ενισχύεται η θεωρία για συμμετοχή του Tur1 στην έξοδο ριβοσωμικών υπομονάδων από πολύ πρώιμα στάδια καθώς ο αποκλεισμός του από τον πυρηνίσκο σε φυσιολογικές συνθήκες μπορεί να αποτελεί σε συνθήκες απαλοιφής του εμπόδιο στην ομαλή πορεία της συναρμολόγησης από τον πυρηνίσκο προς το κυτταρόπλασμα.

Προκειμένου να ελεγχθεί ο εντοπισμός ένα νέο στέλεχος δημιουργήθηκε (*myc-Tur1*, Ν.Γουναλάκη) που έφερε τον επίτοπο

9myc στο C-τελικό άκρο του Tur1. Προς έκπληξη, ο εντοπισμός του Tur1 φαίνεται να είναι στην πυρηνική περιφέρεια, δίνοντας την πολύ χαρακτηριστική δομή ροζέτας που σχηματίζεται σε αυτές τις περιπτώσεις.



**Εικόνα 7** Το Tur1 κατανέμεται στην πυρηνική περιφέρεια. A. Κατανομή του mycGCD1 σε όλο το κύτταρο. B Κατανομή του mycMig1 στον πυρήνα. C. Κατανομή του mycTur1 στην πυρηνική περιφέρεια

Προκειμένου να ελεγχθεί η εγκυρότητα της μεθόδου στέλεχη που έφεραν μια bona fide κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (Gcd1) και μια πυρηνική πρωτεΐνη (Mig1) σημασμένες με τον ίδιο επίτοπο 9myc χρησιμοποιήθηκαν ως πειράματα μάρτυρες.

Όπως φαίνεται και από την εικόνα 7 το Gcd1 διαχέεται σε όλο το εύρος του κυττάρου ενώ το Mig1 όπως είχε δειχθεί ήδη σε συνθήκες καταστολής είναι πυρηνικό. Τα αποτελέσματα αυτά βεβαιώνουν ότι η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι αξιόπιστη. Το Tur1 φαίνεται να

είναι κατανεμημένο σχεδόν αποκλειστικά στην πυρηνική περιφέρεια. Η κατανομή αυτή έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τον ενδεχόμενο ρόλο του στην έξοδο των ριβοσωμικών υπομονάδων μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη μεσολαβητή Nmd3.

## **Γ. Δημιουργία βιβλιοθήκης αλληλουχιών στις οποίες προσδένεται το Ssn6**

Όπως αναφέρθηκε και στην σύζητηση σκόπος της διατριβής αυτής ήταν να ελεγχθούν αλλά και να αναζητηθούν πιθανοί νέοι ρόλοι του συμπλόκου καταστολέα Ssn6-Tup1. Στα μέρη Α και Β παρουσιάστηκε το τμήμα της εργασίας που σκοπό είχε να ελέγξει ενδεχόμενες νέες αλληλεπιδράσεις και να διερευνήσει την εμπλοκή του συμπλόκου Ssn6-Tup1 στη μεταγραφή αλλά και στην έξοδο των ριβοσωμάτων.

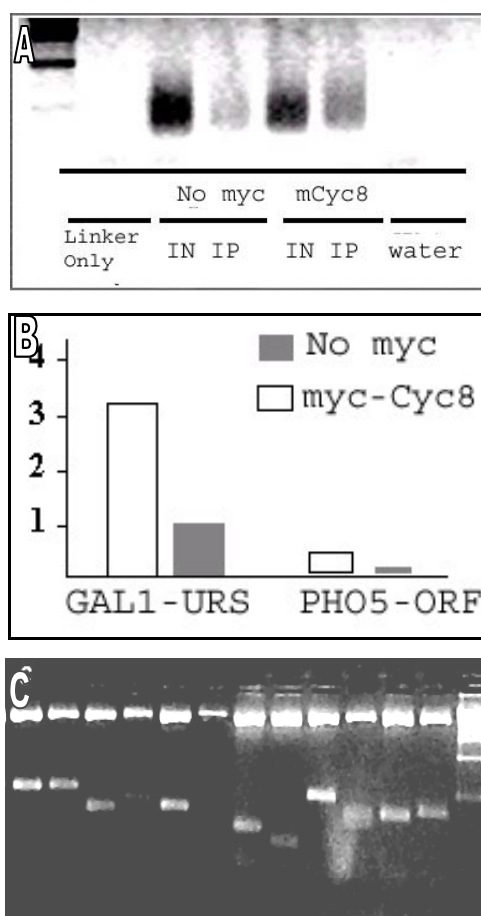
Στο μέρος Γ περιγράφεται η δημιουργία καταρχήν μιας βιβλιοθήκης αλληλουχιών πρόσδεσης του Ssn6. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε συμβατική μεθοδολογία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) σε συνδυασμό όμως με Ligation Mediated PCR (LM-PCR). Κατά την LM-PCR πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός του ανοσοκατακρημνισμένου DNA: αρχικά πραγματοποιείται σύνδεση ενός συνδέτη στα δύο άκρα των δίκλωνων τμημάτων DNA που έχουν κατακρημνιστεί. Η σύνδεση αυτή επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του υλικού με PCR καθώς ένα από τα ολιγονουκλεοτίδια που αποτελούν τον συνδέτη χρησιμοποιείται ως εκκινητής (primer) κατά την PCR.

Για το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε στέλεχος αγρίου τύπου στο οποίο το γονίδιο του Ssn6 (αναφέρεται εδώ και ως Cys8) φέρει τον επίτοπο *9myc*. Ως πείραμα αρνητικού ελέγχου πραγματοποιήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία χρησιμοποιώντας το αρχικό στέλεχος αγρίου τύπου.

Μέρος του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκε και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pGEM-T. Ακολούθησαν παρασκευές πλασμιδιακού DNA μικρής έκτασης (minipreps) και στη συνέχεια έγιναν πέψεις χρησιμοποιώντας το ένζυμο περιορισμού EcoRI το οποίο πέπτει σε περιοχές του pGEMT που περιβάλλουν το εκάστοτε ένθεμα.

Με τον τρόπο αυτό έχει σχηματιστεί μια mini-βιβλιοθήκη αλληλουχιών στις οποίες το Ssn6 φαίνεται να στρατολογείται στις

συνθήκες που έγινε το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης. Τα βήματα που πρέπει να γίνουν στη συνέχεια περιγράφονται στη σύζηση.



**Εικόνα 8** LM-PCR και κλωνοποίηση ανοσοκατακρημνισμένου υλικού. *A.* Μέρος του ανοσοκατακρημνισμένου υλικού που έχει πολλαπλασιαστεί με LM-PCR ηλεκτροφορείται. *B.* Με RealTime-PCR ελέγχεται η επιτυχία της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. *C.* Ενθέματα που έχουν κλωνοποιηθεί pGEM-T easy

## Συζήτηση

### A. Η exportin Msn5 μεσολαβεί στην έξοδο του Mig1.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το μέρος αυτό της εργασίας έρχεται να συμπληρώσει εργασία που έχει προηγηθεί στο εργαστήριο από τον Μ.Παπαμίχο. Το σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από την εργασία αυτή (Paramichos-Chronakis et al., 2004) είναι ότι η



αλληλεπίδραση Ssn6-Mig1 ενώ χάνεται σε συνθήκες αποκαταστολής (απουσία γλυκόζης) σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο παραμένει όταν απαλείφεται η κινάση Snf1 στις ίδιες συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό καθορίζεται οριστικά ότι η Snf1 είναι ο παράγοντας που πυροδοτεί την αποκαταστολή. Το εύρημα της παραμονής του Mig1 στον πυρήνα απουσία της Msn5 (Εικόνα 1B) αν και αναμενόμενο έρχεται να συμπληρώσει τα δεδομένα της ίδιας εργασίας που θέλουν το Mig1 να παραμένει στρατολογημένο στον υποκινητή ακόμα και σε συνθήκες αποκαταστολής. Όπως και σε τέτοιες συνθήκες έτσι και ελλείψει Msn5 αποκαταστολή επιτελείται. Το παράδοξο αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι δεν είναι τόσο η κατανομή του Mig1 (ακόμη παραπέρα, η στρατολόγηση του στον υποκινητή) που καθορίζει την δράση του ως καταστολέα, όσο η φωσφορυλίωση του από την Snf1 και η απώλεια αλληλεπίδρασης με το Ssn6.

## **B. Νέες αλληλεπιδράσεις και ενδεχόμενοι νέοι ρόλοι για το σύμπλοκο Ssn6-Tur1**

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας ελέγχθηκαν νέες αλληλεπιδράσεις του Ssn6. Η αλληλεπίδραση με την Nmd3 επιβεβαιώθηκε *in vivo* όχι όμως και αυτή με την Nic96. Από την άλλη τα *in vitro* πειράματα δείχνουν ότι μάλλον δεν είναι άμεση η αλληλεπίδραση Ssn6-Nmd3. Ακολούθησαν πειράματα που έγιναν για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση αυτή περαιτέρω, με προσανατολισμό περισσότερο προς εμπλοκή του Ssn6-Tur1 με την έξοδο των ριβοσωμικών υπομονάδων παρά προς την κατεύθυνση εμπλοκής της Nmd3 στη μεταγραφή, καθώς αρχικά πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης δεν υποστήριξαν την υπόθεση αυτή.

Τόσο σε  $\Delta$ ssn6 όσο και σε  $\Delta$ tur1 στελέχη παρατηρήθηκε συσσώρευση της πρωτεΐνης μάρτυρα Rpl25-eGFP στον πυρήνα του κυττάρου. Η συσσώρευση αυτή είναι περισσότερο εντοπισμένη απ' ότι στην περίπτωση του nmd3-2 στελέχους και η υπόθεση που

γίνεται είναι ότι η περιοχή αυτή του πυρήνα είναι το πιο πιθανόν ο πυρηνίσκος. Υπενθυμίζεται η μεταγραφή του rDNA και τα πρώτα στάδια της συναρμολόγησης των ριβοσωμικών υπομονάδων επιτελούνται στον πυρηνίσκο (για ανασκόπηση (Tschochner and Hurt, 2003))

Στο επόμενο βήμα διαπιστώθηκε ότι τα ίδια στελέχη παρουσιάζουν μη φυσιολογικά πολυσωμικά προφίλ. Ιδιαίτερα εμφανής είναι η ομοιότητα των προφίλ που δίνουν τα στελέχη *Δssn6* και *nmd3-2*. Τα προφίλ αυτά χαρακτηρίζονται από συσσώρευση ελεύθερης 40S, πολύ χαμηλά ποσοστά μονοσωμάτων (80S) και χαμηλά ποσοστά πολυσωμάτων σε σχέση με την εικόνα που δίνει το στέλεχος αγρίου τύπου με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Το *Δtur1* δίνει περισσότερο φυσιολογικό προφίλ όσον αφορά την παρουσία 80S κλάσματος αλλά το προφίλ τόσο της 60S όσο και της 40S δείχνει μειωμένα επίπεδα.

Το γεγονός ότι το *Tur1* ενδέχεται να κατανέμεται εκτός πυρηνίσκου (Yeast GFP Database) ώθησε να μελετήσουμε την κατανομή του με χρήση έμμεσου ανοσοφθορισμού. Το αποτέλεσμα, μάλλον αναπάντεχο, δείχνει το *Tur1* κατανεμημένο στην πυρηνική περιφέρεια και όχι σε όλο το εύρος του πυρήνα ή στον εκτός πυρηνίσκου χώρο.

Τα δεδομένα αυτά πιστεύουμε ότι στοιχειοθετούν σαφώς την εμπλοκή του συμπλόκου σε διεργασίες όχι άμεσα συνδεδεμένες με τον ρόλο τους ως συγκαταστολέα. Γεγονός είναι ότι η συγκέντρωση των δύο αυτών πρωτεϊνών στον πυρήνα όπως υπολογίζεται από την Yeast GFP Database (με τα όποια προβλήματα μεροληψίας που μπορεί να υπάρχουν) είναι τόσο υψηλή που ενδεχομένως δικαιολογεί και άλλες λειτουργίες πέρα από την στρατολόγηση τους σε μερικές εκατοντάδες υποκινητών.

Στα επόμενα βήματα προτεραιότητα έχει ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης *Tur1* και *Nmd3* *in vivo* και *in vitro*. Επιπλέον, πρέπει να μελετηθεί η κατανομή και του *Ssn6* στον πυρήνα

προκειμένου να διαπιστωθεί αν το Ssn6 βρίσκεται επίσης στην περιφέρεια. Τα αποτελέσματα αυτού πειράματος θα δώσει σημαντική πληροφορία και για τον καταμερισμό ρόλων των δύο πρωτεϊνών του συμπλόκου κατά την καταστολή της μεταγραφής.. Υπενθυμίζεται ότι τελευταία η σύνδεση μεταγραφής και πυρηνικών πόρων έχει εξακριβωθεί (ιδιαίτερα για τα γονίδια του Gal regulon, (Casolari et al., 2004)) και καθώς τα Ssn6 και Tur1 παραδόξως παραμένουν στον υποκινητή του Gal1 ακόμα και όταν υπάρχει αποκαταστολή και ενεργοποίηση της μεταγραφής (όπως και το Mig1, (Paramichos-Chronakis et al., 2004)) μια μεσολάβηση του συμπλόκου στη στρατολόγηση των Gal γονιδίων σε συνθήκες ενεργοποίησης στον πυρηνικό πόρο δεν αποκλείεται.

Το γεγονός ότι τα Ssn6 και Tur1 εμπλέκονται άμεσα στην συναρμολόγηση των υπομονάδων πρέπει να εξεταστεί με ένα πείραμα παρόμοιο με αυτό του πολυσωμικού προφίλ με τη διαφορά ότι τα κλάσματα που φωτομετρούνται θα κρατούνται και θα εξετάζεται η παρουσία των δύο πρωτεϊνών σε αυτά. Με τον τρόπο αυτό θα γίνει γνωστό αν τα δύο μόρια απομονώνονται μαζί αλλά και με ποιο ριβοσωμικό σχηματισμό, καθώς η σύνδεση με την Nmd3 αν και ενδεικτική δεν αποτελεί αναμφισβήτητο στοιχείο. Το πείραμα αυτό θα δώσει στην ουσία την κατεύθυνση για την περαιτέρω διερεύνηση. Πειράματα συνεντοπισμού με δομικά στοιχεία των υπομονάδων μπορούν επίσης να δώσουν καθοριστική πληροφορία για το ρόλο του συμπλόκου, καθώς το μονοπάτι συναρμολόγησης από τον πυρηνίσκο προς την πυρηνική μεμβράνη έχει χαρακτηριστεί και πρωτεΐνες μάρτυρες κάθε σταδίου έχουν εδραιωθεί. Πολύ πιθανώς η εμπλοκή του Ssn6-Tur1 να σχετίζεται με τη διέλευση του φορτίου από τον πυρηνικό πόρο. Στην περίπτωση αυτή η εμπλοκή του Crm1 αλλά και του RanGTPase(Gsp1) εξαρτώμενου μονοπατιού στο οποίο εμπλέκεται η Nmd3 είναι στόχος για την αποκάλυψη των μηχανιστικών λεπτομερειών.

## **Γ. Δημιουργία βιβλιοθήκης αλληλουχιών πρόσδεσης του Ssn6**

Το μέρος αυτό της διατριβής αποτελεί στην ουσία μια αρχική σάρωση για την εύρεση νέων περιοχών που το Ssn6 βρίσκεται προσδεμένο.

Τα ενθέματα που έχουν απομονωθεί θα αλληλουχηθούν και θα χαρακτηρισθούν ως τμήματα του γονιδιώματος του *S.cerevisiae*, καθώς σχεδόν ολόκληρο το γονιδίωμα του έχει αλληλουχηθεί. Το επόμενο βήμα θα είναι η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτών, καθώς ένα μέρος του κατακρημνισμένου υλικού μπορεί να προέρχεται από τυχαίες συνδέσεις του μορίου με τη χρωματίνη. Ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί φυσικά στη διερεύνηση κλωνοποιημένων υποκινητών.

Αλληλουχίες που θα χαρακτηρισθούν ως περισσότερο πιθανές να είναι αληθινοί στόχοι, θα επιβεβαιωθούν με τη χρήση συμβατικής ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και η παραπέρα μελέτη του ρόλου του συμπλόκου θα μελετηθεί.

## **Υλικά**

**Χημικά:** τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες SIGMA, MERCK και FMC Bioproducts.

**Ένζυμα:** Όλες οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και τα ένζυμα τροποποίησης του DNA προήλθαν από τις εταιρίες MINOTECH, NEW ENGLAND BIOLABS.

Η πρωτεΐνάση K που χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης είναι της MERCK.

Τα θερμοανθεκτικά ένζυμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις αλυσιδωτού πολυμερισμού (PCR) κατασκευάστηκαν από τις εταιρίες MINOTECH (MinoTaq) και ROCHE (AmpliTaq).

**Αντισώματα και υλικά ανοσοεντοπισμού:** τα αντισώματα (μονοκλωνικά και πολυκλωνικά) έναντι των επιτόπων HA και Myc προήλθαν από τη SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY.

Τα δευτερογενή αντισώματα anti-mouse και anti-rabbit συζευγμένα με HRP προήλθαν είτε από τη SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY είτε από την JACKSON IMMUNORESEARCH.

**Τα σφαιρίδια Protein-A Sepharose** προμηθεύτηκαν από την AMERSHAM-PHARMACIA.

**Μεμβράνες:** Η μεταφορά πρωτεϊνών έγινε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran (Schleicher and Schuell).

**Ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές (primers):** όλα τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ.

**Χρωστικές:** στις αντιδράσεις «πραγματικού χρόνου» (real time) χρησιμοποιήθηκε η χρωστική χρώσης του δίκλωνου DNA Sybr Green Nucleic Acid Gel Stain της FMC Bioproducts.

## Θρεπτικά μέσα

Τα θρεπτικά μέσα, υγρά και στερεά, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών (LB) αλλά και των στελεχών ζύμης (MIN, YEP, sporulation medium) καθώς και τα διαλύματα αντιβιοτικών (αμπικιλίνη, καναμυκίνη), κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγχειριδίων Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. 1999) και Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989).

Οι οδηγίες για την παρασκευή των διαλυμάτων αμινοξέων αναφέρονται στο Methods in Yeast Genetics (Kaiser et al. 1994).

Μη επαγωγικές συνθήκες ανάπτυξης: Οι φυσιολογικές (μη επαγωγικές) συνθήκες ανάπτυξης των καλλιεργειών ζύμης ήταν είτε πλούσιο θρεπτικό μέσο (YPD) είτε ελάχιστο θρεπτικό μέσο (MIN) συμπληρωμένο με τα απαιτούμενα αμινοξέα.

## Πλασμιδιακοί φορείς

Για την απευθείας κλωνοποίηση προϊόντων πολυμερισμού (PCR) χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός φορέας pGEM-T Easy (PROMEGA).

## Στελέχη

### A. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη της *Escherchia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν DH5a (GibcoBRL), και BL21pLysS. Ο γονότυπός τους αναφέρεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989).

### B. Στελέχη σακχαρομήκυτα

Τα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί. Όλα προέρχονται από το πατρικό στέλεχος FT5

όνομα	γονότυπος
1. FT5	MAT <sub>α</sub> <i>leu, ura, trp, his</i>
2. <i>nmd3-2</i>	MAT <sub>α</sub> <i>leu, ura, trp, his, nmd3::KanMX4</i> + [pRS313- <i>nmd3-2</i> ]
3. PH	
4. BSH	MAT <sub>α</sub> <i>leu, ura, trp, ssn6Δ::his3</i>

5. FT5-Rpl25eGFP	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, tup1Δ::his3</i>
6. nmd3-2-Rpl25eGFP	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, tup1Δ::his3</i> +[pRS315-RPL25eGFP(LEU2)]
7. PH-RPI25eGFP	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, ssn6Δ::his3</i> +[pRS315-RPL25eGFP(LEU2)]
8. BSH-Rpl25eGFP	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, tup1Δ::his3</i> +[pRS315-RPL25eGFP(LEU2)]
9. mycNMD3	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, his,Nmd3 9myc-TRP</i>
10. HisSsn6-mycNMD3	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, his,Nmd3 9myc-TRP</i> + [pVTU260-6HisSsn6)]
11. mycHIS3	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, his,His3 9myc-TRP</i>
12. HisSsn6-mycHIS3	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, his,His3 9myc-TRP</i> + [pVTU260-6HisSsn6)]
13. mycTup1	MAT <sub>a</sub> <i>leu, ura, trp, his,His3 9myc-TRP</i> + [pVTU260-6HisSsn6)]

## *Μέθοδοι*

### **A. Γενικές τεχνικές**

#### **Μέθοδοι τροποποίησης των μορίων DNA**

Στις γενικές μοριακές τεχνικές τροποποίησης των μορίων DNA περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, υδρόλυσης των 5' φωσφορικών ομάδων με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, πολυμερισμού των άκρων με το ένζυμο DNA polI (Klenow), σύνδεσης μορίων με το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Οι αντιδράσεις εφαρμόστηκαν όπως αυτές αναφέρονται από τους Sambrook et al. 1989

και σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και στους καταλόγους των αντίστοιχων εταιριών.

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

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, όπως αναφέρεται από τους Sambrook et al. 1989 και με σκοπό την ποσοτική εκτίμηση ή την εκτίμηση του μεγέθους της/των αναλυμένων ζωνών. Όπου ήταν απαραίτητος ο ακριβέστερος προσδιορισμός της ποσότητας του DNA μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 260nm ( $OD_{260}$ ). Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο μεγεθών DNA (DNA marker) το προϊόν της πέψης του γενωμικού DNA του φάγου λ με το περιοριστικό ένζυμο *StyI*.

Για την απομόνωση και καθαρισμό τμημάτων DNA μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους σε πήκτωμα αγαρόζης εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι, ανάλογα με την ποσότητα και το μέγεθος του προς καθαρισμό τμήματος. Μεγάλες ποσότητες απομονώθηκαν κυρίως με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης και σπανιότερα με τη χρήση πηκτώματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως, μέθοδοι που περιγράφονται από τους Sambrook et al. 1989.

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

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

Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα. Σε περιπτώσεις όπου ήταν απαραίτητη η απομόνωση υπερελικωμένου DNA υψηλής ποιότητας επιλέχθηκε η συνδυαστική χρήση της μεθόδου κατακρήμνισης με πολυαιθυλενγλυκόλη (PEG) 8000 (Sambrook et al. 1989).

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

Η αναλογία των μορίων του φορέα κλωνοποίησης προς τα μόρια του ενθέματος ήταν περίπου 1/5 και η συνολική ποσότητα του DNA, που



επωάστηκε σε κάθε αντίδραση ήταν ~200ng. Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου λιγάση ήταν 0.2 u/λ. Οι αντιδράσεις σύνδεσης τυφλών άκρων (bland) επωάζονταν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (~25<sup>0</sup> C), ενώ οι αντιδράσεις συμπληρωματικών άκρων επωάζονταν 4-16 ώρες στους 16<sup>0</sup> C. Το 1/10 της αντίδρασης χρησιμοποιούνταν για το μετασχηματισμό ηλεκτροδεκτικών κυττάρων, ενώ για το μετασχηματισμό χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιούνταν η μισή ποσότητα της αντίδρασης.

### **Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό (competent cells).**

Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο LB, στους 37<sup>0</sup> C μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων(OD<sub>600</sub>) να γίνει 0.45. Τα κύτταρα επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C και στις 3000 στροφές. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε διάλυμα 50 mM CaCl<sub>2</sub> και 10% γλυκερόλης όγκου ίσου με το μισό όγκο της αρχικής καλλιέργειας. Στην συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για τουλάχιστον μισή ώρα στον πάγο και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C και στις 2000 στροφές. Τελικά επαναδιαλύονται σε όγκο του παραπάνω διαλύματος ίσο με το 1/10 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας, μοιράζονται σε ποσότητες των 200μl (aliquots) και φυλάσσονται στους -80<sup>0</sup> C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### **Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων**

#### **Παρασκευή κυττάρων ικανών να μετασχηματίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electrocompetent cells : ηλεκτροδεκτικά κύτταρα).**

Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο LB, στους 37<sup>0</sup> C μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων(OD<sub>600</sub>) να γίνει 0.5-0.6. Στην συνέχεια, συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C και στις 3000 στροφές. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται με ήπιο τρόπο σε διάλυμα 10% γλυκερόλης ίσου όγκου με την αρχική καλλιέργεια και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα ξεπλένονται ακόμα μια

φορά με μισό όγκο γλυκερόλης 10% και τελικά επαναδιαλύονται σε όγκο γλυκερόλης ίσο με το 1/100 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας. Τα κύτταρα μοιράζονται σε μικρές ποσότητες των 100μl (aliquots) και φυλάσσονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Όλα τα υλικά και τα μέσα, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και όλοι οι χειρισμοί έγιναν στον πάγο.

### **Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electroporation).**

Τοποθετούμε για κάθε μετασχηματισμό, 100μl δεκτικών κυττάρων στον πάγο για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 1.5μl από την αντίδραση σύνδεσης και επωάζουμε στον πάγο για 1 λεπτό. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε ειδική κυψελίδα, την οποία τοποθετούμε στην κατάλληλη θέση του ειδικού μηχανήματος (electroporator) και διοχετεύουμε ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 1.65kV. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 1 ml θρεπτικού μέσου SOC και επωάζουμε για μια ώρα στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση. Τελικά συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα και τα επιστρώνουμε υπό στείρες συνθήκες σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιέχει κατάλληλη ποσότητα του αντιβιοτικού με το οποίο κάνουμε την επιλογή (π.χ αμπικιλίνη). Το πιάτο τοποθετείται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 16 ώρες τουλάχιστον, έτσι ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση πολυμερισμού ήταν 5-50 ng όταν το DNA ήταν πλασμιδιακό, ενώ 50-100ng όταν επρόκειτο για γενωμικό DNA. Οι αντιδράσεις ως επί τω πλείστον γίνονταν στα 25μl και είχαν την παρακάτω σύσταση: 10mM Tris-HCl, pH.9.0, 50mM KCl, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2mM από κάθε dNTP, 25-50 pmoles από κάθε εκκινητή και 0.5u Taq πολυμεράση.

Το πρόγραμμα που επιλέχθηκε ήταν ειδικό για κάθε περίπτωση, ανάλογα με το  $T_m$  του κάθε ανιχνευτή αλλά και το μέγεθος του προϊόντος. Το γενικό σχήμα των αντιδράσεων πολυμερισμού που εφαρμόστηκαν φαίνεται στη συνέχεια:

Αρχή: 5 λεπτά στους  $94^{\circ}\text{C}$  για αρχική αποδιάταξη

25-30 κύκλοι: 30 δευτερόλεπτα στους  $94^{\circ}\text{C}$  για αποδιάταξη

30 δευτερόλεπτα στην επιλεγμένη θερμοκρασία  
( $T_m - 4^{\circ}\text{C}$ ) για υβριδοποίηση των εκκινητών  
επιλεγμένο χρόνο στους  $72^{\circ}\text{C}$  για επιμήκυνση της  
αλυσίδας

Τέλος: 5 λεπτά στους  $72^{\circ}\text{C}$  για συμπλήρωση των μονόκλωνων  
άκρων

Για τον πολυμερισμό των τμημάτων DNA που προέκυπταν μετά από  
ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) η αντίδραση συνέβαινε παρουσία  
χρωστικής Sybr Green.

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

Οι συγκεκριμένες τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των  
κλώνων σακχαρομήκτα, που είχαν την πρωτεΐνη σημασμένη με τον  
έκαστοτε επίτοπο ή και για την εμφάνιση των

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε αποδιατακτικό  
πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (Sambrook et al. 1989).

Για τον ανοσοεντοπισμό των αναλυθέντων πρωτεϊνών έγινε  
ηλεκτροφορητική μεταφορά αυτών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε  
μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά και η διαδικασία εφαρμογής των  
πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων έγιναν όπως αναφέρονται  
στο CPMB (Ausubel et al. 1999) ενώ για τις ιδανικές αραιώσεις των  
αντισωμάτων λήφθηκαν υπόψιν οι οδηγίες των κατασκευαστών.  
Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του  
επιτόπου Myc. Ο ανοσοεντοπισμός έγινε ενζυματικά με τη δράση της  
υπεροξειδάσης (HRP), η οποία ήταν συζευγμένη με το δευτερογενές  
αντίσωμα (anti-rabbit ή anti-mouse-HRP conjugated), σε κατάλληλα  
υποστρώματα.

## **B. Τεχνικές ειδικές για το σακχαρομήκτα**

## **Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης**

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

## **Σήμανση ενδογενών γονιδίων της ζύμης με επιτόπους (epitope tagging)**

Με σκοπό την ανίχνευση πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης εισάγουμε ήδη γνωστούς επιτόπους, που αναγνωρίζονται από εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα, στα ενδογενή γονίδια που μας ενδιαφέρουν. Η μέθοδος βασίζεται στην δυνατότητα ομόλογου ανασυνδυασμού στη ζύμη και εφαρμόστηκε όπως ακριβώς περιγράφηκε από τους (Knop et al., 1999). Οι επίτοποι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 9 Myc και η εισαγωγή του επιτόπου συμβαίνει στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, με PCR παίρνουμε το τμήμα του DNA, που θέλουμε να ενθέσουμε στο γονιδίωμα. Το τμήμα αυτό έχει στα άκρα του αλληλουχία του ενδογενούς γονιδίου, έτσι ώστε να γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός στην επιθυμητή θέση, ενώ εσωτερικά περιέχει συγκεκριμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί σε σύντηξη με το ενδογενές γονίδιο, 9 Myc επιτόπους. Για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων περιέχεται κι ένα γονίδιο, που καταργεί την αυξοτροφία για τρυπτοφάνη. Όλη αυτή η πληροφορία περιέχεται σε μια πλασμιδιακή κατασκευή, που περιέχει όλες αυτές τις κωδικές περιοχές. Χρησιμοποιώντας αυτό ως μήτρα και με εκκινητές, που περιέχουν τόσο αλληλουχία του πλασμιδίου, όσο και του ενδογενούς γονιδίου, παίρνουμε με PCR το τμήμα του DNA, που θέλουμε να ενθέσουμε στο γονιδίωμα με ομόλογο ανασυνδυασμό (μεγέθους ~1500bp). Το κομμάτι αυτό καθαρίζεται από την περίσσεια των εκκινητών με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωσης της ζώνης μεγέθους ~1500bp.

Το στέλεχος του σακχαρομύκητα, που πρόκειται να μετασχηματιστεί, μεγαλώνει σε 5 ml πλούσιου θρεπτικού (YPD) στους 30°C κατά τη διάρκεια της νύχτας, την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται σε 20 ml YPD, έτσι ώστε  $OD_{600}=0.2$  και επωάζεται με ανάδευση στους 30°C μέχρι

$OD_{600}=0.5-0.7$ . Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές και στους  $4^{\circ}C$  για πέντε λεπτά, απομάκρυνση του θρεπτικού, και πλύσιμο της πελέτας με 10 ml αποστειρωμένο νερό υπό τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης. Η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 1 ml αποστειρωμένου νερού και φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για 30sec. Το υπερκείμενο αφαιρείται και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 100μl αποστειρωμένου νερού, τα οποία στην συνέχεια φυγοκεντρούνται, αφαιρείται το νερό και προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής :

240 μl PEG 3500 50% w/v

36 μl LiAc 1M

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

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

συνολικός όγκος αντίδρασης : 360 μl

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

### **Γρήγορη Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης**

Καλλιέργειες των 2ml αναπτύσσονται μέχρι  $OD_{550}=0.8-1$  και συλλέγονται με φυγοκέντρηση. Επαναδιαλύονται σε 50μl διαλύματος 1X SDS loading buffer (50mM Tris-HCl, pH=6.8, 2%SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 7mM β-ME, 1mM PMSF) και προστίθεται ίσος όγκος γυάλινων σφαιριδίων (glass beads). Η λύση των κυττάρων γίνεται με ισχυρή ανάδευση (vortex), για 4 φορές από 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες επώσεις στον πάγο. Ακολουθεί βρασμός στους  $100^{\circ}C$ , φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 1 λεπτό και το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

### **In vivo συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co-Immunoprecipitation)**

Εφαρμόστηκε επακριβώς η μέθοδος που περιγράφεται από τους (Fragiadakis et al., 2004)

#### **Απομόνωση πολυσωμάτων**

Εφαρμόστηκε επακριβώς η μέθοδος που περιγράφεται από τους (Tzamaras et al., 1989)

#### **Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)**

Εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφηκε από τους (Kuo and Allis, 1999) με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, κύτταρα ζύμης από καλλιέργειες των 50ml σε θρεπτικό μέσο επιλογής αναπτύσσονται μέχρι OD: 0.5-0.8 και επώζονται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά με 1% φορμαλδεΐδη ώστε να επιτευχθεί η ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-DNA. Η διαδικασία διακόπτεται με την προσθήκη γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 125mM και επώαση για 5 λεπτά. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 5 λεπτά και πλένονται 2 φορές με 10ml διαλύματος TBS (20mM Tris-HCl, pH:7.5, 200mM NaCl).

Ακολουθεί λύση των κυττάρων σε 400μl διαλύματος λύσης (50mM HEPES-KOH, pH:7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton, 0.1% sodium deoxycholate, 1mM PMSF) παρουσία ίσου όγκου προπλυμένων γυάλινων σφαιριδίων (glass beads) και με ισχυρή ανάδευση (vortex) για 40 λεπτά στους 4°C. Η υγρή φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm, 4°C για 5 λεπτά, αφαίρεση του υπερκείμενου (απομάκρυνση διαλυτών πρωτεϊνών) και επαναδιάλυση της πελέττας σε 400μl lysis buffer. Ακολουθεί ηχοβόλιση (sonication) στα 4-6 microns του ηχοβολητή (Soniprep 150, MSE) για 4 φορές από 12 δευτερόλεπτα. Με τον τρόπο αυτό η χρωματίνη σπάει σε κομμάτια DNA μεγέθους 200-800 ζευγών βάσεων. Το ολικό χρωματινικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 14000 rpm και στους 4°C και ακολούθως για άλλα 60 λεπτά στις ίδιες συνθήκες, οπότε η καθαρή χρωματίνη απομονώνεται στο υπερκείμενο.

Ποσότητα που να αντιστοιχεί περίπου στο 1/10 του ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος αραιώνεται σε 300μl διαλύματος λύσης και επώάζεται, με περιστροφική ανάδευση, για τουλάχιστον 12 ώρες και στους 4°C με 1.5γ

από το αντίσωμα έναντι του παράγοντα που ενδιαφέρει. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των επιτόπων HA και Myc.

Μετά την επώαση προστίθενται στο δείγμα 30μl σφαιριδίων Protein-A σεφαρόζης (από ένα 1:1 εναιώρημα των σφαιριδίων σε διάλυμα λύσης) και ακολουθεί επώαση για 1.5 ώρα στους 4<sup>0</sup>C υπό περιστροφική ανάδευση.

Τα σφαιρίδια συλλέγονται (13000rpm, 1 λεπτό) και πλένονται υπό περιστροφική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά με 1ml από τα παρακάτω διαλύματα, κατά σειρά διαδοχής: διάλυμα λύσης, διάλυμα λύσης με 500mM NaCl, διάλυμα III (10mM Tris-HCl, pH: 8.0, 250mM LiCl, 0.5% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM EDTA) και TE. Η έκλουση των ανοσοκατακρημνισμένων συμπλόκων γίνεται σε 250μl διαλύματος έκλουσης (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH: 7.5) με επώαση στους 65<sup>0</sup>C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αραιώνεται με 250μl TE και επωάζεται με 50μg πρωτεΐνάσης K στους 42<sup>0</sup>C και για 1 ώρα. Τελικά, οι ομοιοπολικοί δεσμοί που δημιουργήθηκαν αρχικά με την επώαση με φορμαλδεΐδη, σπάνε με επώαση του δείγματος στους 65<sup>0</sup>C για 5 ώρες.

Ποσότητα που να αντιστοιχεί περίπου στο 1/100 του αρχικού ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος (περίπου 1/10 του προς ανοσοκατακρήμνιση) λαμβάνεται ως δείγμα ποσοτικού και ποιοτικού ελέγχου της μη ανοσοκατακρημνισμένης αρχικής χρωματίνης (input). Αραιώνεται σε 500μl TE και επωάζεται ομοίως με το ανοσοκατακρημνισμένο δείγμα με πρωτεΐνάση K και ακολούθως στους 65<sup>0</sup>C προς αναστροφή των ομοιοπολικών δεσμών.

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

Τα δείγματα αφού επαναδιαλυθούν σε νερό (50μl για την ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη και 500μl για τα input) χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για την ανίχνευση των προϊόντων οι αντιδράσεις γίνονται παρουσία χρωστικής Sybr Green για ανάλυση "πραγματικού χρόνου" (real time). Στις real time αναλύσεις εφαρμόστηκαν ίδιες συνθήκες με μόνη διαφορά την προσθήκη της χρωστικής, σε ποσότητες 0.5-1.5 μl αρχικού αποθέματος χρωστικής οπτικής απορρόφησης OD<sub>495</sub>= 0.4.

## **Πολλαπλασιασμός του ανοσοκατακρημνισμένου DNA με LM-PCR**

Το DNA που κατακρημνίζεται με την τεχνική του ChIP είναι λίγης ποσότητας και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο κάποιο στάδιο πολλαπλασιασμού του. Ο πολλαπλασιασμός γίνεται με ligation mediated PCR, όπου εισάγονται δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια στα άκρα των ανοσοκατακρημνισμένων τμημάτων DNA και μετά με τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά ως εκκινητές γίνεται PCR για τον πολλαπλασιασμό τους. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής :

End filling των ανοσοκατακρημνισμένων τμημάτων

Η αντίδραση είναι η εξής :

55 μl ανοσοκατακρημνισμένου DNA

11 μl T4 DNA pol buffer 10x

0.1 μl BSA ( 10γ/ μl )

5 μl dNTPs (2mM το καθένα)

2 μl T4 DNA pol ( 0.3 units/μl )

110 μl συνολικά.

Τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά στους 12 ° C. Στην συνέχεια προστίθενται σε κάθε δείγμα 11.5 μl CH<sub>3</sub>COONa 3M pH : 5.2 και 0.5 μl γλυκογόνο ( 20 μg/ μl ), αναμιγνύονται καλά και ακολουθούν εκχυλίσες με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική (25:24:1), χλωροφόρμιο:ισοαμυλική κι έπειτα κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η πελέττα του DNA επαναδιαλύεται σε 25 μl νερό.

### **Σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων στο ανοσοκατακρημνισμένο DNA. (ligation).**

Επειδή δεν είναι γνωστή η αλληλουχία των τμημάτων DNA, που πήραμε με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης έτσι ώστε να μπορέσουμε να τα πολλαπλασιάσουμε, κολλήσαμε στα άκρα των ανοσοκατακρημνισμένων τμημάτων ολιγονουκλεοτίδια με γνωστή αλληλουχία, οι οποίοι στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.



Αφού αναμιχθούν οι παραπάνω ποσότητες των δύο ολιγονουκλεοτιδίων, το μίγμα τοποθετείται σε νερό που έχουμε βράσει και αφήνεται μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτόν πετυχαίνουμε την επαναδιάταξη των δύο ολιγονουκλεοτιδίων (annealing).

Έπειτα ακολουθεί η αντίδραση της σύνδεσης των annealed ολιγονουκλεοτιδίων :

25 μl DNA

5 μl ligation buffer 10x με ATP

6.7 μl annealed linkers 15 μM

0.8 μl T4 DNA ligase (10 Weiss U/ μl)

12.5 μl H<sub>2</sub>O

50 μl συνολικά

Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης όλη τη νύκτα στους 16<sup>0</sup>C.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται εκχυλίσες με φαινόλη/χλωροφόρμιο, για να απαλλαγούμε από τις πρωτεΐνες και τους εκκινητές, που δεν έχουν προσδεθεί στο DNA. Στα 50 μl κάθε αντίδρασης σύνδεσης προστίθενται 40 μl H<sub>2</sub>O και 10 μl οξικό νάτριο και πραγματοποιούνται εκχυλίσες με ίσο όγκο φαινόλη:χλωροφόρμιο: ισοαμυλική και μετά με χλωροφόρμιο:ισοαμυλική, οπότε και το DNA κατακρημνίζεται με γλυκογόνο και δύο όγκους αιθανόλης 100% και επαναδιαλύεται σε 25 μl νερό.

### **LM-PCR**

Για πολλαπλασιασμό χρησιμοποιείται το 1/5 του υλικού της ligation.

Η αντίδραση της PCR είναι η εξής :

5 μl DNA

5 μl Taq polymerase buffer με τελική συγκέντρωση MgCl<sub>2</sub> : 2.5 mM

5 μl dNTPs με τελική συγκέντρωση 2 mM το καθένα

4 μl LINK(25) 25 mM

1 μl Taq polymerase

30 μl H<sub>2</sub>O

Το πρόγραμμα της PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν :

55<sup>0</sup> C 4 min

72<sup>0</sup> C 5 min

95<sup>0</sup> C 2 min  
95<sup>0</sup> C 30 sec  
55<sup>0</sup> C 30 sec  
72<sup>0</sup> C 1.5 min  
go to step 4 35 times  
72<sup>0</sup> C 4 min

Στην συνέχεια το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως 1.3 %. Το αποτέλεσμα ήταν ένα smear ζωνών μεγέθους 200-1000 bp, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Από το gel αγαρόζης απομονώθηκε το smear κι έπειτα πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσες με ουδέτερη φαινόλη, φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική, χλωροφόρμιο-ισοαμυλική και το DNA αφού κατακρημνίστηκε με οξικό νάτριο και δύο όγκους αιθανόλης 100 %, επαναδιαλύθηκε σε 16 μl H<sub>2</sub>O.

### **Κλωνοποίηση του ανοσοκατακρημνισμένου DNA σε φορέα pGEM-T easy.**

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις πέψης του ανοσοκατακρημνισμένου DNA και του φορέα με το ένζυμο EcoRI, αποφωσφορυλίωση του φορέα με το ένζυμο CIP, έτσι ώστε να μην ξανακολλήσουν τα άκρα μεταξύ τους, εκχυλίσες με φαινόλη-χλωροφόρμιο, για να απομακρυνθούν τα ένζυμα πέψης και αποφωσφορυλλίωσης κι έπειτα έγινε η αντίδραση σύνδεσης (ligation) του φορέα με το ένθετο σε μοριακή αναλογία 1 : 5. Ακολούθησαν εκχυλίσες με φαινόλη-χλωροφόρμιο και μετασχηματισμός σε βακτηριακά κύτταρα με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα απλώθηκαν σε πιατάκια LB με Xgal.

### **Real time PCR**

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, έγινε real time PCR με ζευγάρι εκκινήτων που πολλαπλασιάζουν τμήμα της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου PHO5 και

άλλους που πολλαπλασιάζουν τον υποκινητή του γονιδίου GAL1. Οι αντιδράσεις έγιναν σε όγκο 25 μl και είχαν την εξής σύσταση :

10 μl template

2.5 μl 10x Taq polymerase buffer

2 μl dNTPs τελικής συγκέντρωσης 2.5 mM το καθένα

1 μl primer forward συγκέντρωσης 100ng/μl

1 μl primer reverse συγκέντρωσης 100ng/μl

0.2 μl Taq polymerase

1 μl Sybr Green

H<sub>2</sub>O μέχρι συνολικού όγκου 25 μl.

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής :

94<sup>0</sup> C : 5 min

94<sup>0</sup> C : 30 sec

56<sup>0</sup> C : 30 sec

72<sup>0</sup> C : 30 sec

plate read

81<sup>0</sup> C : 1 sec

plate read

82<sup>0</sup> C : 1 sec

plate read

83<sup>0</sup> C : 1 sec

plate read

84<sup>0</sup> C : 1 sec

plate read

go to step 2 for 35 times more

72<sup>0</sup> C : 2 min

perform melting curve from 60<sup>0</sup> C to 94<sup>0</sup> C. Read every 1<sup>0</sup> C, hold 1 sec between reads.

15<sup>0</sup> C : 5 min

end.

### **Ολιγονουκλεοτίδια**

A. Ολιγονουκλεοτίδια για σήμανση γονιδίου με επίτοπο (epitope tagging)

Τα ολιγονουκλεοτίδια που φαίνονται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση ενδογενών πρωτεϊνών της ζύμης με επίτοπους, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο κεφάλαιο «Μέθοδοι». Σε κάθε περίπτωση το S3 ολιγονουκλεοτίδιο αντιπροσωπεύει τις 45 βάσεις του εκάστοτε γονιδίου πριν το κωδικόνιο λήξης (πάνω αλυσίδα κατεύθυνση 5'-3') ενώ το S2 τις 45 βάσεις κάθε γονιδίου μετά το κωδικόνιο λήξης (κάτω αλυσίδα κατεύθυνση 5'-3'). Με έντονο χρώμα φαίνονται οι αλληλουχίες της κασέπτας που χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση.

**Β.Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις πολυμερισμού δειγμάτων μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)**

GAL1-UAS(1): ( - 370 με - 352 του GAL1 ORF)

5' TGA AAC GCA GAT GTG CCT 3'

GAL1-UAS(2): ( -169 με - 190 του GAL1 ORF)

5' CGC TTC GCT GAT TAA TTA CCC 3'

GAL1-ORF(1): (+ 1342 με + 1360 του GAL1 ORF)

5' TTG ACA AAA TTT GTT CCA 3'

GAL1-ORF(2): (+ 1558 με + 1540 του GAL1 ORF)

5' TGC TGG TTT AGA GAC GAT G 3'

PHO5-ORF(1): (+1017 με +1038 του PHO5 ORF)

5' CGA TAT CCT AAA CTT TTT GAC 3'

PHO5-ORF(2): (+ 1220 με + 1199 του PHO5 ORF)

5' GTT TCA ATT GGA ACA ACA GCA 3'

## Βιβλιογραφία

- Allen, N.P., Patel, S.S., Huang, L., Chalkley, R.J., Burlingame, A., Lutzmann, M., Hurt, E.C. and Rexach, M. (2002) Deciphering networks of protein interactions at the nuclear pore complex. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 930-946.
- Belk, J.P., He, F. and Jacobson, A. (1999) Overexpression of truncated Nmd3p inhibits protein synthesis in yeast. *Rna*, **5**, 1055-1070.
- Carlson, M. (1997) Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 1-23.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H. and Silver, P.A. (2004) Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell*, **117**, 427-439.
- Damelin, M. and Silver, P.A. (2002) In situ analysis of spatial relationships between proteins of the nuclear pore complex. *Biophys J*, **83**, 3626-3636.
- De Vit, M.J., Waddle, J.A. and Johnston, M. (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell*, **8**, 1603-1618.
- Fragiadakis, G.S., Tzamarias, D. and Alexandraki, D. (2004) Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for FRE2 transcriptional activation. *Embo J*, **23**, 333-342.
- Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 334-361.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Gomez-Ospina, N., Morgan, G., Giddings, T.H., Jr., Kosova, B., Hurt, E. and Winey, M. (2000) Yeast nuclear pore complex assembly defects determined by nuclear envelope reconstruction. *J Struct Biol*, **132**, 1-5.
- Gounalaki, N., Tzamarias, D. and Vlasi, M. (2000) Identification of residues in the TPR domain of Ssn6 responsible for interaction with the Tup1 protein. *FEBS Lett*, **473**, 37-41.
- Ho, J.H. and Johnson, A.W. (1999) NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 2389-2399.
- Johnson, A.W., Lund, E. and Dahlberg, J. (2002) Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci*, **27**, 580-585.
- Karl, T., Onder, K., Kodzius, R., Pichova, A., Wimmer, H., Th r, A., Hundsberger, H., Loffler, M., Klade, T., Beyer, A., Breitenbach, M. and Koller, L. (1999) GRC5 and NMD3 function in translational control of gene expression and interact genetically. *Curr Genet*, **34**, 419-429.

- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, **15**, 963-972.
- Kosova, B., Pante, N., Rollenhagen, C., Podtelejnikov, A., Mann, M., Aebi, U. and Hurt, E. (2000) Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p. *J Biol Chem*, **275**, 343-350.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1999) In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods*, **19**, 425-433.
- Lei, E.P. and Silver, P.A. (2002) Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell*, **2**, 261-272.
- Matallana, E., Franco, L. and Perez-Ortin, J.E. (1992) Chromatin structure of the yeast SUC2 promoter in regulatory mutants. *Mol Gen Genet*, **231**, 395-400.
- Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T. and Tzamarias, D. (2004) The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO Rep*, **5**, 368-372.
- Reed, R. and Hurt, E. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*, **108**, 523-531.
- Smith, R.L. and Johnson, A.D. (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, **25**, 325-330.
- Sprague, E.R., Redd, M.J., Johnson, A.D. and Wolberger, C. (2000) Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *Embo J*, **19**, 3016-3027.
- Tschochner, H. and Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, **13**, 255-263.
- Tzamarias, D., Roussou, I. and Thireos, G. (1989) Coupling of GCN4 mRNA translational activation with decreased rates of polypeptide chain initiation. *Cell*, **57**, 947-954.
- Tzamarias, D. and Struhl, K. (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, **369**, 758-761.
- Zhang, Z. and Reese, J.C. (2004) Redundant mechanisms are used by Ssn6-Tup1 in repressing chromosomal gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**, 39240-39250.