

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

Διερεύνηση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών Rpo21, Rad7 και Rad10 στη χρωματίνη του μεταρρυθμιζόμενου γονιδίου CTR1 στον Saccharomyces cerevisiae.



Μαρκοδημητράκη Κορίνα-Μαρία

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Δέσποινα Αλεξανδράκη

Ηράκλειο Κρήτης 2011-2012

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

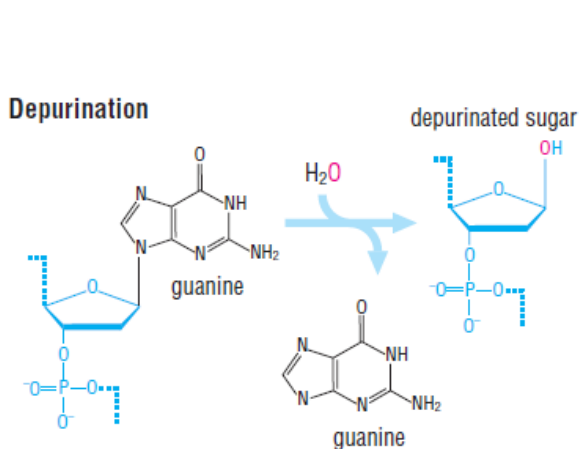
Λίγα λόγια για το εργαλείο των πειραμάτων μας, τον *Saccharomyces cerevisiae*.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* ή κοινώς σακχαρομύκητας είναι ένα είδος ζύμης και μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως σαν μοντέλο-σύστημα για βιολογικές μελέτες γιατί έχει πολλά πλεονεκτήματα: αναπαράγεται γρήγορα (διαίρεση κάθε 90 λεπτά), καλλιεργείται εύκολα σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο, το γονιδίωμά του έχει μελετηθεί και αλληλουχηθεί και είναι φθηνός στη χρήση του. Ακόμη, είναι μη-παθογόνος οπότε η χρήση του δεν είναι επικίνδυνη για τον άνθρωπο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ελάχιστες προφυλάξεις. [1]

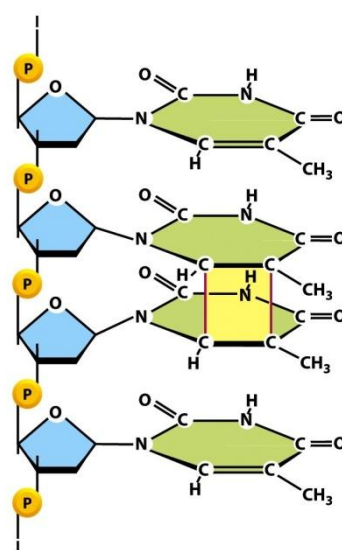
Το γονιδίωμα του σακχαρομύκητα αλληλουχήθηκε για πρώτη φορά το 1996 και αποτελείται από 12.052kb. Έχει 16 χρωμοσώματα και φέρει 6.275 γονίδια. Ο σακχαρομύκητας μπορεί να βρεθεί σε διπλοειδή (α, α) και απλοειδή (α ή α) μορφή και αυτό τον καθιστά άψογο εργαλείο πχ. επίδραση μιας μεταλλαγής στο φαινότυπο. Κάνει πολύ εύκολα ομόλογο ανασυνδιασμό, πράγμα το οποίο μας επιτρέπει να κάνουμε στοχευμένα εισαγωγή DNA (tags, knock-outs, γονίδια κτλ) στο γονιδίωμα. Πολλές από τις κυτταρικές διαδικασίες στο σακχαρομύκητα έχουν διατηρηθεί εξελικτικά, με αποτέλεσμα να μπορούμε να τις συσχετίσουμε ακόμα και με τον άνθρωπο. [1][2]

Λίγα λόγια για τη βλάβη στο DNA.

Μέσα στο κύτταρο συμβαίνουν συνεχώς βλάβες στο DNA. Αυτό μπορεί να προκληθεί λόγω αυθόρμητης αποπουρίνωσης και απαμίνωσης νουκλεοτιδίων (εικόνα 1). Ακόμη για τις βλάβες στο γενετικό υλικό οφείλονται παραπροϊόντα του μεταβολισμού που μπορούν να προκαλέσουν αλκυλίωση ή και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι η UV ακτινοβολία (που δημιουργεί διμερή θυμίνης, εικόνα 2) και οι χημικές ουσίες. Όλες αυτές οι αλλαγές γίνονται σε επίπεδο νουκλεοτιδίου αλλά υπάρχουν και βλάβες όπως το δίκλωνο σπάσιμο του DNA οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν και ανακατατάξεις στα χρωμοσώματα. [3][4]



Εικόνα 1: Αποπουρίνωση
πηγή: *The Cell Cycle Principles of Control by Morgan*



Εικόνα 2: Διμερή θυμίνης
πηγή: *Molecular Biology of the Cell by Alberts*

Λίγα λόγια για το μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες του DNA.

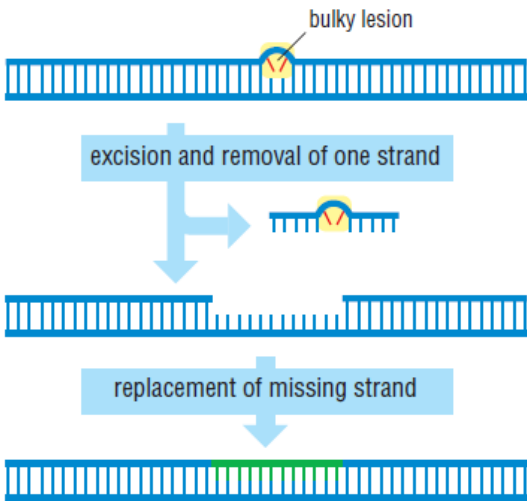
Η ύπαρξη βλάβης στο γενετικό υλικό πρέπει να μεταδοθεί σαν πληροφορία ώστε να μπορέσει να γίνει και η αντίστοιχη επιδιόρθωση. Υπάρχουν βλάβες όχι και τόσο σοβαρές οι οποίες επιδιορθώνονται γρήγορα από πρωτεΐνες που δουλεύουν τους είναι να σκανάρουν το γονιδίωμα για τυχόν βλάβες και να τις επιδιορθώνουν. Ωστόσο σε περίπτωση πιο βαριάς βλάβης όπως είναι η ύπαρξη μονόκλωνου DNA, ενός σταματημένου συμπλόκου αντιγραφής στη διχάλα αντιγραφής ή ενός δίκλωνου σπασίματος, αναλαμβάνει το μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες στο DNA. Στον *S. cerevisiae*, όντας μονοκύτταρος οργανισμός είναι πολύ σημαντικό να συνεχίσει να διαιρείται πάση θυσία. Αυτό σημαίνει ότι ακόμα και σε περίπτωση εκτενούς καταστροφής του DNA, το κύτταρο θα σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο αλλά μόνο προσωρινά, και θα πάρει ρίσκο συνεχίζοντας τον κυτταρικό κύκλο. Αυτό που συμβαίνει στον *S. cerevisiae* μετά την αναγνώριση της βλάβης στο DNA είναι η προσέλευση των κινασών Mec1 και Tel1 (που είναι ομόλογες με αυτές του ανθρώπου, ATR και ATM αντίστοιχα) στο σημείο της βλάβης. Η ATR ειδικεύεται σε πολλές μορφές βλαβών του DNA όπως τα δίκλινα σπασίματα, βλάβες σε νουκλεοτίδια και σταματημένες διχάλες αντιγραφής. Η ειδίκευσή της οφείλεται στην ικανότητά της να αναγνωρίζει μονόκλωνο DNA. Επειδή συχνά το μονόκλωνο DNA καλύπτεται από την πρωτεΐνη RPA, υπάρχει υποψία πως η ATR αλληλεπιδρά με τη RPA. Η ATM ειδικεύεται σε δίκλινα σπασίματα και αυτή η ειδίκευση υποβοηθείται από τις πρωτεΐνες Mre11, Rad50 και Nbs1 (στο σακχαρομύκητα λέγεται Xrs2). Οι Mec1 και Tel1 στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν τις κινάσες Chk1 και Rad53 (Chk2 στον *S. cerevisiae*) που στρατολογούνται στο σημείο βλάβης του DNA και αυτή η αλληλεπίδραση μεταφέρει το σήμα για τη βλάβη του DNA στους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου που καθυστερούν τον κυτταρικό κύκλο μέχρι να επιδιορθωθεί η βλάβη. Για να επιτευχθούν τα παραπάνω, χρειάζονται μόρια-αντάπτορες όπως είναι η Rad9 και το σύμπλοκο 9-1-1. Η Rad9 είναι checkpoint πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει της Chk1 και Chk2 στην ATR ή ATM για να φωσφορυλιωθούν. Επίσης είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της Chk1 μετά το DNA damage. Το σύμπλοκο 9-1-1 αποτελείται από την Rad17, Mec3 και Dcd1 και υπηρετεί σαν μεσολαβητής (mediator) για την απόκριση του ATR στη βλάβη.[3]

Λίγα λόγια για τους τρόπους επιδιόρθωσης του DNA.

Όλες οι βλάβες στο DNA πρέπει να διορθώνονται και για αυτό υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης. Το ότι το DNA έχει τη δομή διπλής έλικας διευκολύνει την επιδιόρθωση αφού ο ένας κλώνος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για να διορθωθεί ο συμπληρωματικός του. Για τις βλάβες σε επίπεδο νουκλεοτιδίων δρουν διαφορετικοί μηχανισμοί από ότι σε επίπεδο διπλής έλικας. Όσον αφορά σε επίπεδο νουκλεοτιδίου, έχουμε τους μηχανισμούς base and nucleotide excision repair (NER). Κατά τον μηχανισμό base excision repair, εντοπίζονται και επιδιορθώνονται αλλαγές στη δομή των βάσεων των νουκλεοτιδίων όπως είναι οι απαμινώσεις και οι μεθυλίσεις (εικόνα 3). Κατά τον μηχανισμό του NER εντοπίζονται αλλαγές που παραμορφώνουν την δομή της διπλής έλικας όπως είναι τα διμερή θυμίνης και οι αλκυλίωσεις και διορθώνονται από νουκλεάσες και ελικάσες (εικόνα 4).

Εικόνα 4: Base Excision Repair
πηγή: *The Cell Cycle Principles of Control by Morgan*

nucleotide excision repair

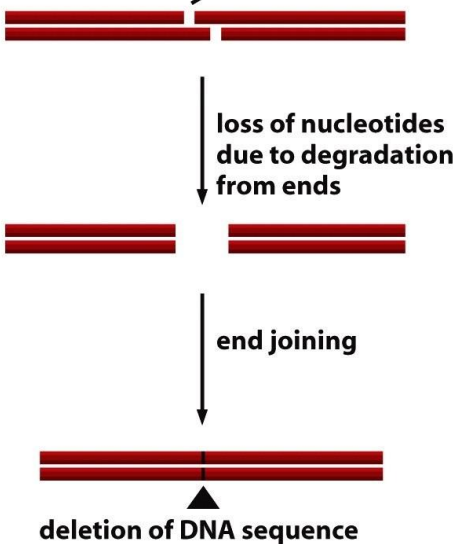


Εικόνα 5: Nucleotide Excision Repair
πηγή: The Cell Cycle Principles of Control by Morgan

Τα σπασίματα στην διπλή έλικα διορθώνονται με δύο μηχανισμούς, τον non-homologous end joining και τον ομόλογο ανασυνδιασμό. Κατά τον non-homologous end joining μηχανισμό τα δύο κομμάτια DNA ενώνονται με τη βοήθεια μιας λιγάσης, όμως αυτός ο τρόπος δεν προτιμάται καθώς χάνονται τα νουκλεοτίδια που εξέχουν (εικόνα 5). Πιο ακριβής αν και πιο δύσκολος είναι ο μηχανισμός του ομόλογου ανασυνδιασμού κατά τον οποίο το χαλασμένο κομμάτι DNA κάνει ανασυνδιασμό με την αδελφή χρωματίδα του με τη βοήθεια ρεκομπινασών, ώστε να μπορεί να διορθωθεί (εικόνα 6). [3][4]

NONHOMOLOGOUS END JOINING

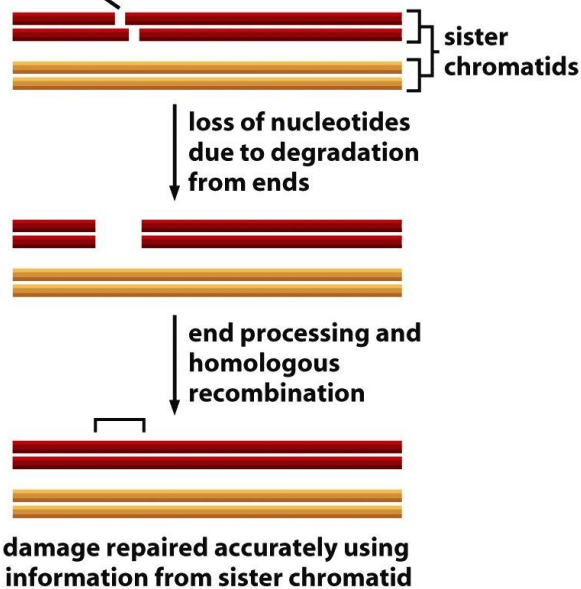
accidental double-strand break



Εικόνα 5: Non homologous end joining
πηγή: Molecular Biology of the Cell by Alberts

HOMOLOGOUS RECOMBINATION

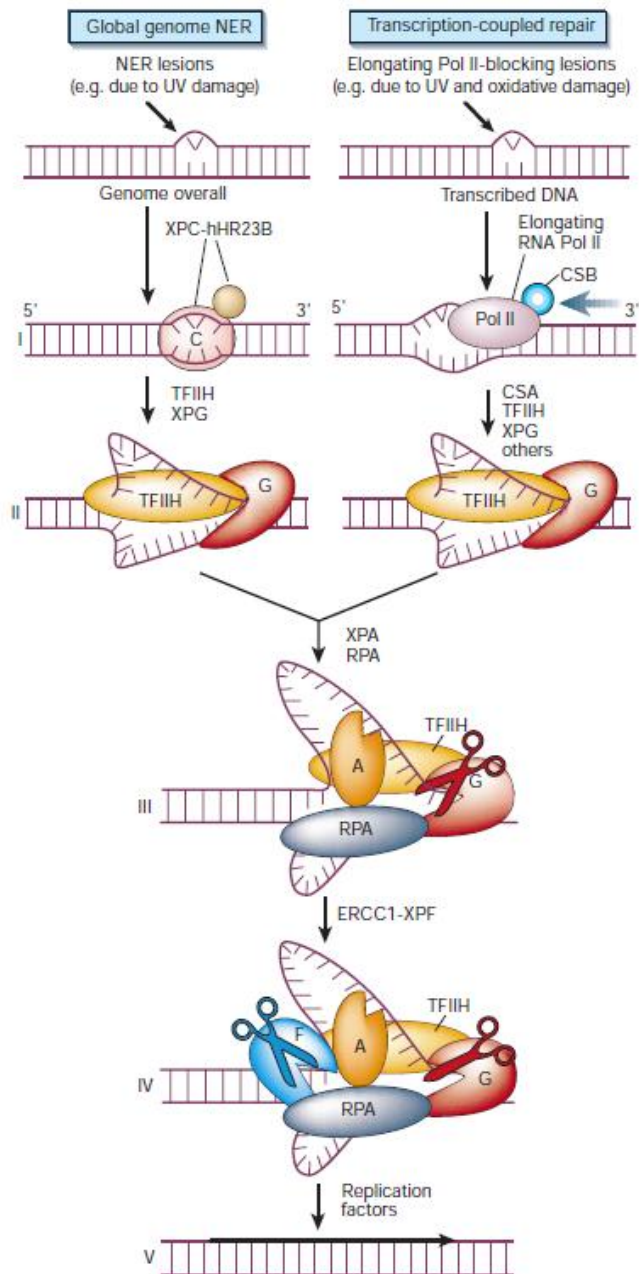
accidental double-strand break



Εικόνα 6: Homologous recombination
πηγή: Molecular Biology of the Cell by Alberts

Λίγα λόγια για το Nucleotide Excision Repair.

Το NER χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες: το Global Genome Repair και το Transcription-Coupled Repair. Το Global Genome Repair σχετίζεται με την επιδιόρθωση βλαβών σε μεταγραφόμενες και μη αλυσίδες του DNA ενώ το Transcription-Coupled repair αναγνωρίζει τη βλάβη κατά τη διάρκεια της μεταγραφής καθώς κινείται η πολυμεράση κατά μήκος του μεταγραφόμενου γονιδίου [5]. Η πρωτεΐνες Rad7 και Rad10 με τις οποίες ασχοληθήκαμε, ανήκουν στο μονοπάτι του Nucleotide Excision Repair. Η Rad7 μαζί με την Rad16 δημιουργεί ένα σύμπλοκο το οποίο αναγνωρίζει μια τοπικά ξεδιπλωμένη έλικα του DNA και προσδέεται σε αυτήν με τη βοήθεια ATP και ανήκουν στο μηχανισμό του Global Genome Repair [6]. Η Rad10 η οποία είναι ομόλογη της ανθρώπινης ERCC-1, σχηματίζει σύμπλοκο με την Rad1 και συμμετέχει στο NER, στον ομόλογο ανασυνδιασμό και σε μονοπάτι επιδιόρθωσης διπλών σπασισμάτων [2].



Εικόνα 7: Οι υποκατηγορίες του NER
πηγή: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer by Jan H.Hoeijmakers (2001)

Λίγα λόγια για τη Rad7.

Η Rad7 σχηματίζει σύμπλοκο με την Rad16 όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το οποίο λέγεται NEF4 (Nucleotide Excision Factor). Η ονομασία Rad- προέκυψε από το RADiation-sensitive φαινότυπο που έχουν κάποια στελέχη με μετάλλαγμα σε παράγοντα του NER. Η Rad7 έχει μέγεθος 65,777 Da, αποτελείται από 565 αμινοξέα και έχει συγκέντρωση 937 μόρια/κύτταρο [2]. Η Rad16 με την οποία συνδέεται φέρει μοτίβο Walker A και B που προσδένει νουκλεοτίδια και είναι μέλος της οικογένειας SWI/SNF η οποία σχετίζεται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά τη μεταγραφή ή κατά τη διόρθωση βλαβών στο DNA. Το σύμπλοκο Rad7/Rad16 δρα ως ATPάση και σκανάρει το DNA προς αναζήτηση κάποιας βλάβης. Όταν εντοπίσει βλάβη, ακινητοποιείται και ενεργοποιεί όλο το υπόλοιπο NER ώστε να γίνει η διόρθωση [7].

Λίγα λόγια για τη Rad10.

Η Rad10 έχει μέγεθος 24,311 Da, αποτελείται από 210 αμινοξέα και δε μπορεί να βρεθεί σαν μόριο, ούτε να έχει δική της δραστικότητα από μόνη της στο κύτταρο παρά μόνο σε σύμπλοκο με τη Rad1. Το σύμπλοκο αυτό το οποίο έχει δράση single-stranded DNA ενδονουκλεάσης εκτελεί σημαντικές λειτουργίες: την εκτομή κατά τη διόρθωση του DNA από το NER και τη διόρθωση δίκλωνων σπασισμάτων. Η ομόλογη πρωτεΐνη της Rad10 στα θηλαστικά είναι η Ercc1 η οποία ανήκει και αυτή στο NER σύστημα [2]. Σίγηση στο RAD10 γονίδιο δε θανατώνει το στέλεχος, παρά μόνο το κάνει ευαίσθητο σε ακτινοβολία (RAD-iation sensitive) [8]. Η απενεργοποίηση του ERCC1 γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα ασθενικούς φαινότυπους. Αυτό δείχθηκε ότι οφειλόταν στο ρόλο που παίζει η Ercc1 ενδονουκλεάση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όπου προσδένεται σε ενεργούς υποκινητές και επάγει τη μεταγραφή [9].

Λίγα λόγια για τα μεταλλορυθμιζόμενα γονίδια του *S. cerevisiae*.

Ο σίδηρος και ο χαλκός είναι δύο απαραίτητα μέταλλα για τον σακχαρομύκητα γιατί είναι συμπαραγοντες πολλών πρωτεϊνών, όμως αποδεικνύονται τοξικά όταν βρεθούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο κύτταρο. Για αυτό το λόγο, υπάρχουν γονίδια τα οποία ρυθμίζουν την κίνηση των μετάλλων αυτών στο κύτταρο.

Μερικά από τα γονίδια για τη ρύθμιση του χαλκού είναι το CTR1, CTR3, FRE1 και FRE2. Τα CTR1 και CTR3 γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες-μεταφορείς στην πλασματικής μεμβράνης που εισάγουν το χαλκό μέσα στο κύτταρο. Τα FRE1 (ρυθμίζει επίπεδα χαλκού και σιδήρου) και FRE2 (ρυθμίζει επίπεδα μόνο σιδήρου) γονίδια, κωδικοποιούν τα λεγόμενα flavocytochromes τα οποία μετατρέπουν το Cu^{+2} σε Cu^{+1} ώστε να μπορεί να προσληφθεί από το κύτταρο. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των χαλκορυθμιζόμενων γονιδίων είναι ο Mac1 και ο Ace1 (Cup2) [15]. Έχει βρεθεί ότι η Rad9 προσδένεται στον υποκινητή και στη κωδική περιοχή του CTR1 και ότι αλληλεπιδράει με τον Mac1 [11].

Όσον αφορά το σίδηρο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω μερικά από τα γονίδια που συμμετέχουν είναι τα γονίδια FRE1 και FRE2 τα οποία κωδικεύουν τα flavocytochromes που μετατρέπουν το Fe^{+3} σε Fe^{+2} ώστε να μπορεί να προσληφθεί από το κύτταρο. Ο μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τη μεταγραφή των σιδηρορυθμιζόμενων γονιδίων είναι ο Aft1. Το περίεργο είναι ότι ο Aft1 έχει βρεθεί να προσδένεται στον υποκινητή και τη κωδική περιοχή του CTR1 γονιδίου, το οποίο δεν ανήκει στο iron regulon [10].

Λίγα λόγια για τον Aft1.

Ο Aft1 μεταγραφικός παράγοντας είναι μια πρωτεΐνη 690 αμινοξέων με μοριακό βάρος 77,682 Da και βρίσκεται σε συγκέντρωση 2730 μορίων/κύτταρο [2]. Σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και μόλις παρατηρηθεί έλλειψη σιδήρου ενεργοποιείται και μπαίνει στον πυρήνα όπου μεταγράφει το iron regulon. Αυτή η μεταφορά καταλύεται από την καρυοφερίνη Pse1. Το iron regulon είναι γονίδια τα οποία ρυθμίζουν την είσοδο του σιδήρου στο κύτταρο, την αποθήκευσή του και προσαρμόζουν μονοπάτια μεταβολισμού του σιδήρου ανάλογα με το αν υπάρχει ή όχι σίδηρος στο κύτταρο. Εκτός από τον Aft1 υπάρχει και η paralogue πρωτεΐνη, ο Aft2 με τον οποίο έχουν ομοιότητα 39% και ο οποίος μπορεί μερικώς να καλύψει τη δράση του Aft1 σε περίπτωση που λείπει. Ο Aft1 δεν περιορίζεται μόνο στο να μεταγράφει τα γονίδια του iron regulon, αλλά κάνει και πολλές άλλες λειτουργίες. Φαίνεται πως αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κινητοχώρου όπως η Cdf1 και η Im13, και πως μεταλλάγματα όπου έχει γίνει διαγραφή του γονιδίου AFT1, υπάρχει αστάθεια στο διαχωρισμό των

χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης αλλά και καθυστέρηση στη φάση G1 κάτι που μπορεί να σημαίνει πως ο Aft1 έχει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ακόμη, ο Aft1 έχει συσχετιστεί με το RIM101 μονοπάτι απόκρισης στο pH, το DNA μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες του DNA, το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος, τη μιτοχονδριακή λειτουργία, τη χρωμοσωμική σταθερότητα και τη μεταφορά πρωτεϊνών. Πολλοί από τους επιπλέον ρόλους του Aft1 είναι ανεξάρτητοι από το σίδηρο. [12]

Κεφάλαιο 2: Αποτελέσματα

2.1: Στόχος της εργασίας

Ο γενικότερος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της ποσοτικής και ποιοτικής πρόσδεσης των πρωτεϊνών Rpo21, Rad7, Rad10 στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1. Οι λόγοι που μας ώθησαν να θέσουμε τον στόχο αυτόν, αναλύονται παρακάτω.

Η πρωτεΐνη Rad9 είναι μια σημαντική πρωτεΐνη για τα σημεία ελέγχου (checkpoint) του κυτταρικού κύκλου του *Saccharomyces cerevisiae* η οποία έχει ρόλο αντάπτορα ανάμεσα σε σημαντικές κινάσες της απόκρισης σε βλάβες DNA οι οποίες δρουν ανοδικά και καθοδικά. Αυτό σημαίνει ότι μεσολαβεί και βοηθάει στη φωσφορυλίωσή τους και στην μετάδοση του σήματος της βλάβης του γενετικού υλικού. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζει βλάβες στο DNA και δίνει το έναυσμα προς την απόκριση του κυττάρου σε αυτές (Naiki et al., 2004). Ο Mac1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τα επίπεδα του χαλκού στο *Saccharomyces cerevisiae*. Ενεργοποιείται όταν έχουμε συνθήκες έλλειψης χαλκού, ενεργοποιώντας το γονίδιο CTR1 που κωδικοποιεί μεμβρανική πρωτεΐνη που εισάγει χαλκό στο κύτταρο. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες, η Rad9 και ο Mac1 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν και μάλιστα μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης, η Rad9 προσδέεται στο CTR1 τόσο στη περιοχή του υποκινητή όσο και στην κωδική περιοχή του (Voutsina et al., unpublished). Τα ευρήματα αυτά είναι αξιοπερίεργα και θελήσαμε να εξετάσουμε αν η Rad9 έχει κάποιο ρόλο στη διαδικασία της μεταγραφής, από τη στιγμή που η Rad9 είναι μια checkpoint πρωτεΐνη που προσδέεται στο γονίδιο του CTR1, αλληλεπιδρώντας με τον μεταγραφικό παράγοντα Mac1. Για αυτό το λόγο, εξετάσαμε στην παρούσα εργασία την επίδραση που έχει η απουσία της Rad9 στην πρόσδεση του βασικού μέλους της μεταγραφικής μηχανής, της RNA πολυμεράσης II, στο γονίδιο του CTR1.

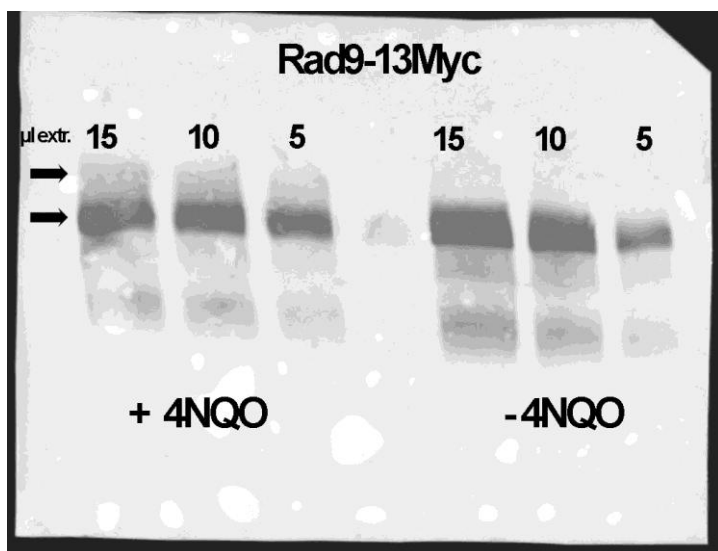
Η μεταγραφή έχει συσχετιστεί πολλές φορές με την διαδικασία της επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, και συγκεκριμένα με το NER. Ένα παράδειγμα είναι ο TFHII μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος έχει βρεθεί να συμμετέχει και στις δύο διαδικασίες, μέσα από μεταλλαγές που απάλειψαν σημαντικές υπομονάδες (XBD, XPD, TTDA). Οι μεταλλαγές αυτές προκαλούσαν ασθενικούς φαινοτύπους που εκδήλωναν ασθένειες όπως το σύνδρομο Cockayne (CS), trichothiodystrophy (TTD) και xeroderma pigmentosum (XP). Οι σοβαρές αυτές επιπτώσεις των μεταλλαγών σε υπομονάδες του TFHII ήταν η απόδειξη ότι ο παράγοντας αυτός συμμετέχει και στη μεταγραφή αλλά και στη διόρθωση βλαβών στο γενετικό υλικό (Egly et al., 2011). Ακόμη ένα παράδειγμα συσχέτισης μεταγραφής με το μονοπάτι επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA είναι η πρωτεΐνη Ercc-1 που συμμετέχει στο NER, η οποία είναι ομόλογη της Rad10 του σακχαρομύκητα (η οποία επίσης ανήκει στο NER), και η οποία βρέθηκε να προσδέεται σε ενεργούς υποκινητές και να επάγει τη μεταγραφή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στο ποντίκι (Kamileri et al., 2012). Άλλη μια απόδειξη ότι πρωτεΐνες του NER συμμετέχουν στη μεταγραφή έχει δοθεί από τους Frit et al., 2002, οι οποίοι βρήκαν ότι μεταγραφικοί ενεργοποιητές όπως ο Gal4—VP16 και ο RAR μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι NER. Τα παραπάνω ευρήματα συσχέτισης μεταγραφής με επιδιόρθωσης των βλαβών στο γενετικό υλικό, ταίριαζαν με δεδομένα που έχουμε για τον μεταγραφικό παράγοντα Aft1 ο οποίος είναι ρυθμιστής των σιδηρογονιδίων (iron regulon) στον σακχαρομύκητα και ο οποίος έχει βρεθεί να προσδέεται στην περιοχή του υποκινητή και την κωδική περιοχή του γονιδίου CTR1 που ρυθμίζεται από τον παράγοντα Mac1, ενώ το γονίδιο αυτό δεν υπάγεται στα σιδηρογονίδια. Αντίστροφα, και ο Mac1 έχει βρεθεί να προσδέεται στον υποκινητή και την κωδική περιοχή του FTR1 γονιδίου το οποίο ρυθμίζεται από τον Aft1 (PhD thesis, Andreadis 2012). Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με τη ραγδαία ανακάλυψη νέων ρόλων του Aft1 πέρα από την μεταγραφή όπως το RIM101 μονοπάτι απόκρισης στο pH, τη χρωμοσωμική

σταθερότητα και άλλα (Berthelet et al., 2010), μας έκανε να διερευνήσουμε το αν ο παράγοντας Aft1 μπορεί να συμμετέχει ταυτόχρονα και στη μεταγραφή αλλά και στην απόκριση σε βλάβες DNA. Για αυτό το λόγο, στη παρούσα εργασία μελετάμε την επίδραση της απουσίας του Aft1 στις πρωτεΐνες του NER Rad7 και Rad10 ως προς την πρόσδεση στο γονίδιο του CTR1. Επίσης, δεδομένου ότι και ο Aft2 έχει βρεθεί να συμμετέχει και αυτός (αν και όχι σε ίση έκταση) σε παρόμοιες διεργασίες με τον Aft1 (Berthelet et al., 2010), θελήσαμε να δούμε, αν η απουσία των Aft1, Aft2 ταυτόχρονα, είχε κάποια επίδραση στις πρωτεΐνες Rad7 και Rad10.

2.2: Έλεγχος ενεργοποίησης μονοπατιών απόκρισης σε βλάβες DNA με το φάρμακο 4NQO και επιρροής του φαρμάκου στην δομή του Aft1

Πριν ξεκινήσουμε οποιοδήποτε πείραμα, ήταν αναγκαίο να έχουμε στα χέρια μας ένα φάρμακο ικανό να προκαλέσει την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε βλάβες DNA. Το 4NQO με μοριακό τύπο $C_9H_6N_2O_3$, ήταν η πρώτη μας επιλογή γιατί μιμείται τη δράση του UV (UV mimetic). Στόχος μας ήταν να δούμε εάν η πρωτεΐνη Rad9 φωσφορυλιώνεται. Αυτό θα αποτελούσε ένδειξη ότι όντως προκαλείται βλάβη στο DNA, αρκετή για να ενεργοποιήσει το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες DNA, μιας και η πρωτεΐνη αυτή είναι μια σημαντική checkpoint πρωτεΐνη του μονοπατιού αυτού.

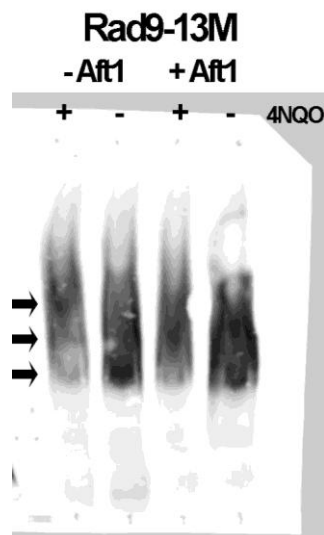
Για να ελέγξουμε εάν ενεργοποιείται το μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες DNA με προσθήκη φαρμάκου 4NQO, χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος FT5 Rad9-13Myc όπου προσθέσαμε 4NQO σε τελική συγκέντρωση 12,5μg/ml. Σαν control χρησιμοποιήσαμε μια καλλιέργεια του ίδιου στελέχους χωρίς φάρμακο. Στη συνέχεια ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο για protein extracts και κάναμε western blot, χρησιμοποιώντας την ακρυλαμίδα 80:1 για να φτιάξουμε ένα τζελ 5% και το αντίσωμα anti-Myc για 1^ο αντίσωμα. Το αποτέλεσμα που πήραμε στα 12 λεπτά εμφάνισης στο LAS 3000 ήταν το εξής:



Τα δείγματα από δεξιά προς τα αριστερά είναι σε OD=1, 2 και 3 αντίστοιχα για κάθε συνθήκη. Βλέπουμε ότι παρουσία φαρμάκου, η Rad9-13Myc φωσφορυλιώνεται και αυτό μπορούμε να το διαπιστώσουμε από την μπάντα που σχηματίζεται πάνω από τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή και η οποία επισημαίνεται με το βέλος. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το φάρμακο 4NQO επάγει το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες DNA και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τα πειράματά μας.

Επίσης μας ενδιέφερε να δούμε πώς επηρεάζεται η πρωτεΐνη Rad9 από το φάρμακο, παρουσία ή μη του Aft1 πχ αν φωσφορυλιώνεται. Αυτό θα μας έδινε να καταλάβουμε πώς αντιδρά το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες στο DNA όταν υπάρχει το φάρμακο αλλά όχι ο Aft1, μιας και η Rad9 είναι checkpoint πρωτεΐνη που συμμετέχει σε αυτό το μονοπάτι. Για να ελέγξουμε την επίδραση του Aft1 στην Rad9 παρουσία του φαρμάκου, χρησιμοποιήσαμε μια καλλιέργεια του στελέχους FT5 Rad9-13Myc όπου προσθέσαμε το φάρμακο 4NQO σε συγκέντρωση 50μg/ml και σαν αρνητικό control μια καλλιέργεια του ίδιου στελέχους χωρίς φάρμακο. Ακόμα, χρησιμοποιήσαμε μια καλλιέργεια του στελέχους FT5 aft1Δ Rad9-13Myc όπου

προσθέσαμε το φάρμακο 4NQO σε συγκέντρωση 50γ/ml και σαν αρνητικό control μια καλλιέργεια του ίδιου στελέχους χωρίς φάρμακο.



Στη συνέχεια ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο για protein extracts και κάναμε western blot, χρησιμοποιώντας την ακρυλαμίδα 80:1 για να φτιάξουμε ένα τζελ 5% και το αντίσωμα anti-Myc για 1^ο αντίσωμα. Το αποτέλεσμα που πήραμε στα 12 λεπτά εμφάνισης στο LAS 3000 απεικονίζεται στην εικόνα πάνω αριστερά.

Βλέπουμε πως η Rad9 φωσφορυλιώνεται σε συνθήκες 4NQO άρα αυτό σημαίνει ότι το φάρμακο επάγει το μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες του DNA. Ακόμη, βλέπω ότι απουσία του Aft1 παράγοντα, η φωσφορυλίωση της Rad9 είναι εντονότερη. Αυτό θα μπορούσε να διερευνηθεί παραπάνω.



Πριν ξεκινήσουμε τα πειράματα εντοπισμού των Rad7 και Rad10 στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1 χρειαζόταν να σιγουρευτούμε ότι το φάρμακο 4NQO με το οποίο θα προκαλούσαμε βλάβες στο DNA, δεν επηρέαζε κάπως την δομή του Aft1 (πχ να αποδομείται ο Aft1 και να ακολουθήσουν ψευδή αποτελέσματα λόγω της έλλειψής του) ακόμα κι αν βρισκόταν σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Για να γίνει ο έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες στελέχους FT5 Aft1-9Myc σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: απουσία φαρμάκου που ήταν το control (-), παρουσία φαρμάκου σε συγκέντρωση 25γ/ml (+) και παρουσία φαρμάκου σε συγκέντρωση 50γ/ml (++) . Στη συνέχεια ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο για protein extracts και κάναμε western blot, χρησιμοποιώντας την ακρυλαμίδα 80:1 για να φτιάξουμε ένα τζελ 5% και το αντίσωμα anti-Myc για 1^ο αντίσωμα. Το αποτέλεσμα που πήραμε στα 12 λεπτά εμφάνισης στο LAS 3000 φαίνεται στην

εικόνα αριστερά. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο Aft1 δεν επηρεάζεται ποσοτικά και ποιοτικά από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου.

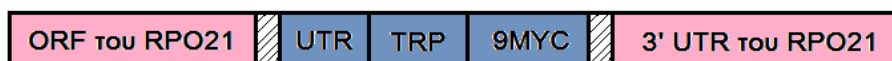
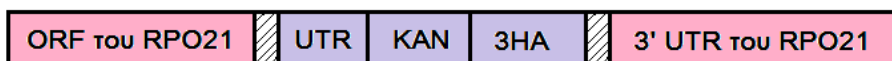
Έχοντας κάνει τους παραπάνω ελέγχους, ξεκινήσαμε τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.

2.3: Εντοπισμός της RNA πολυμεράσης II στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1 απουσία και παρουσία της Rad9, σε συνθήκες βλάβης του DNA.

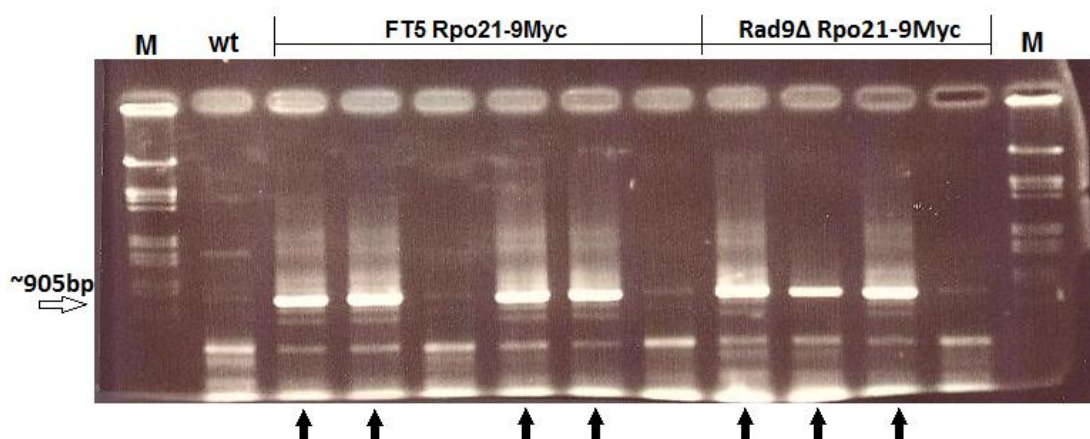
Για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε την RNA πολυμεράση II στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1, χωρίς μεγάλο κόστος, χρειάστηκε να κατασκευάσουμε στελέχη στα οποία η πολυμεράση και ένας κοινός επίτοπος θα εκφραζόντουσαν σαν χιμαιρική πρωτεΐνη ώστε να εντοπιστεί και να απομονωθεί η πολυμεράση με τη βοήθεια κοινού και φθηνού αντισώματος. Επιλέξαμε να ενθέσουμε τις γονιδιακές κασέτες των επίτοπων 9Myc και 3HA στο γονίδιο της υπομονάδας Rpo21 της RNA πολυμεράσης II.

2.3.α: Κατασκευή στελεχών ζύμης FT5 Rad9-13Myc, Rpo21-3HA , FT5 rad9Δ Rpo21-9Myc και FT5 Rpo21-9Myc

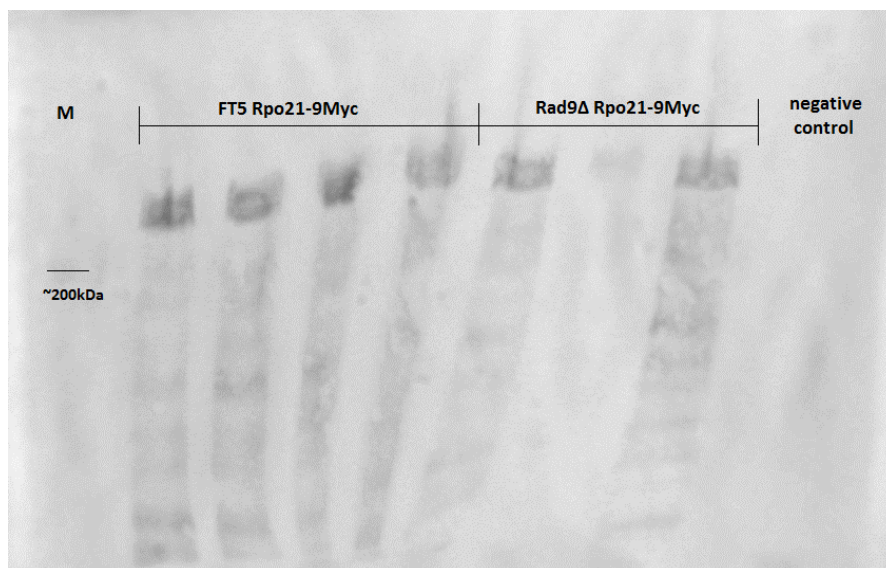
Τα στελέχη που επιλέξαμε να γίνει ο μετασχηματισμός ώστε να προκύψει tagged Rpo21, ήταν το FT5 Rad9-13Myc (στο οποίο θα βάζαμε την κασέτα 3HA-KAN), το FT5 rad9Δ (στο οποίο θα βάζαμε την κασέτα 9MYC-TRP) και το FT5 (στο οποίο θα βάζαμε την κασέτα 9MYC-TRP). Οι επίτοποι 9Myc και 3HA περιέχονται ο καθένας χωριστά σε μια γονιδιακή κασέτα. Η κασέτα του 9Myc περιέχει και ένα γονίδιο αυξοτροφίας στην τρυπτοφάνη (TRP) και η κασέτα του 3HA γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη (KAN). Τα γονίδια αυτά θα μας βοηθούσαν να κάνουμε την επιλογή των στελεχών που είχαν ενθέσει την κασέτα. Η κασέτα έπρεπε να μπει μετά το ORF και πριν την 3' UTR του γονιδίου RPO21, σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:



Ακολουθώντας το πρωτόκολλο μετασχηματισμού, προέκυψαν κύτταρα που είχαν ενθέσει τις κασέτες, και τα οποία επιλέχθηκαν με τη βοήθεια των δεικτών (TRP). Τα κύτταρα με την κασέτα 3HA-KAN δεν μεγάλωσαν ίσως λόγω κάποιου σφάλματος κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού. Αυτό όμως δεν μας εμπόδισε με το πείραμα, και συνεχίσαμε κανονικά μόνο με τα κύτταρα που ενέθεσαν την κασέτα 9MYC-TRP. Για να ελέγξουμε ότι η ένθεση είχε γίνει στο σωστό σημείο, απομονώσαμε το ολικό γενωμικό υλικό και κάναμε αντίδραση PCR, με τον forward primer να ξεκινάει μέσα από το ORF του RPO21 και τον reverse primer να ξεκινάει μέσα από την κασέτα 9MYC-TRP. Στη συνέχεια ηλεκτροφορήσαμε το προϊόν της PCR, το οποίο αναμενόταν να έχει μέγεθος περίπου 905bp. Τα στελέχη που επισημαίνονται με το βέλος είναι αυτά που ενέθεσαν την κασέτα.



Αφού πήραμε προϊόν στο επιθυμητό μέγεθος, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν εκφράζεται η tagged πρωτεΐνη και εάν αλλάζει κάτι στη δομή της (πχ είναι αποδομημένη). Για να το ελέγξουμε αυτό φτιάξαμε protein extracts σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο και τρέξαμε τις πρωτεΐνες σε acrylamide gel 6%. Η πρωτεΐνη Rpo21 μαζί με τον επίτοπο 9Myc, περιμένουμε να είναι ~206.610Da. Από την εικόνα φαίνεται πως η πρωτεΐνη μας είναι στο επιθυμητό μήκος και δεν είναι αποδομημένη οπότε εκφράζεται κανονικά.



Έχοντας τα νέα στελέχη στα χέρια μας, ξεκινήσαμε με τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για τον εντοπισμό της RNA πολυμεράσης II στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1.

2.3.β: Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για εντοπισμό της RNA πολυμεράσης II στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1

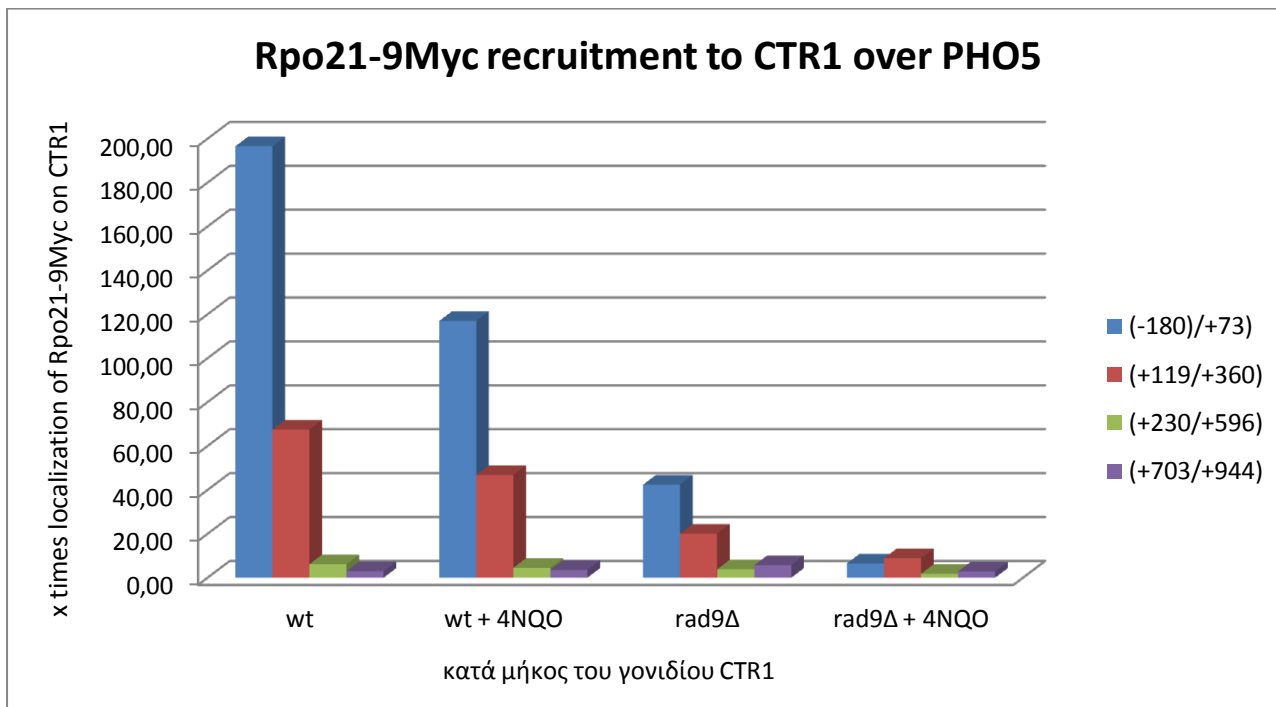
Οι συνθήκες για τον εντοπισμό της Rpo21 ήταν η απουσία της πρωτεΐνης Rad9 με ή χωρίς πρόκληση βλάβης στο DNA (με ή χωρίς το φάρμακο 4NQO). Εκτός από τις παραπάνω συνθήκες έπρεπε να εξασφαλίσουμε συνθήκες κατά τις οποίες το γονίδιο του CTR1 θα ήταν ενεργοποιημένο. Τέτοιες είναι οι συνθήκες απουσία Fe και Cu, τις οποίες πετυχαίνουμε, αραιώνοντας στις καλλιέργειές μας BCS και BPS chelators σε τελική συγκέντρωση 100μM. Το BCS δεσμεύει Fe^{+2} και Cu^{+2} και θέλει 6 ώρες για να δράσει πλήρως, ενώ το BPS δεσμεύει Cu^{+1} και θέλει 3 ώρες.

Το 1^ο πείραμα CHIP Rpo21-9Myc στο CTR1 (30.11.2011-07.12.2011):

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε ήταν το FT5 Rpo21-9Myc και το FT5 rad9Δ Rpo21-9Myc τα οποία αρχικά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες YPD-BPS (6 ώρες πριν το μάζεμα)-BCS (4 ώρες πριν το μάζεμα). Ακόμη, 1 ώρα πριν το μάζεμα των κυττάρων προσθέσαμε 4NQO με τελική συγκέντρωση 12,5μg/ml και μαζέψαμε τα κύτταρα όταν η OD_{600nm} ήταν ~1,5. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την RNA πολυμεράση II και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Το τελικό βήμα ήταν η πραγματοποίηση Real-Time PCR (54ο ,30'' extension time, 40 cycles, plate read at 78°C and 80°C). Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

- Primer set 1: -180/73
 - Primer set 2: 119/360
 - Primer set 3: 230/596
 - Primer set 4: 703/944
 - PHO5 primers: +1018/+1220
- } Primers για το CTR1

Διάγραμμα Rpo21 (1)

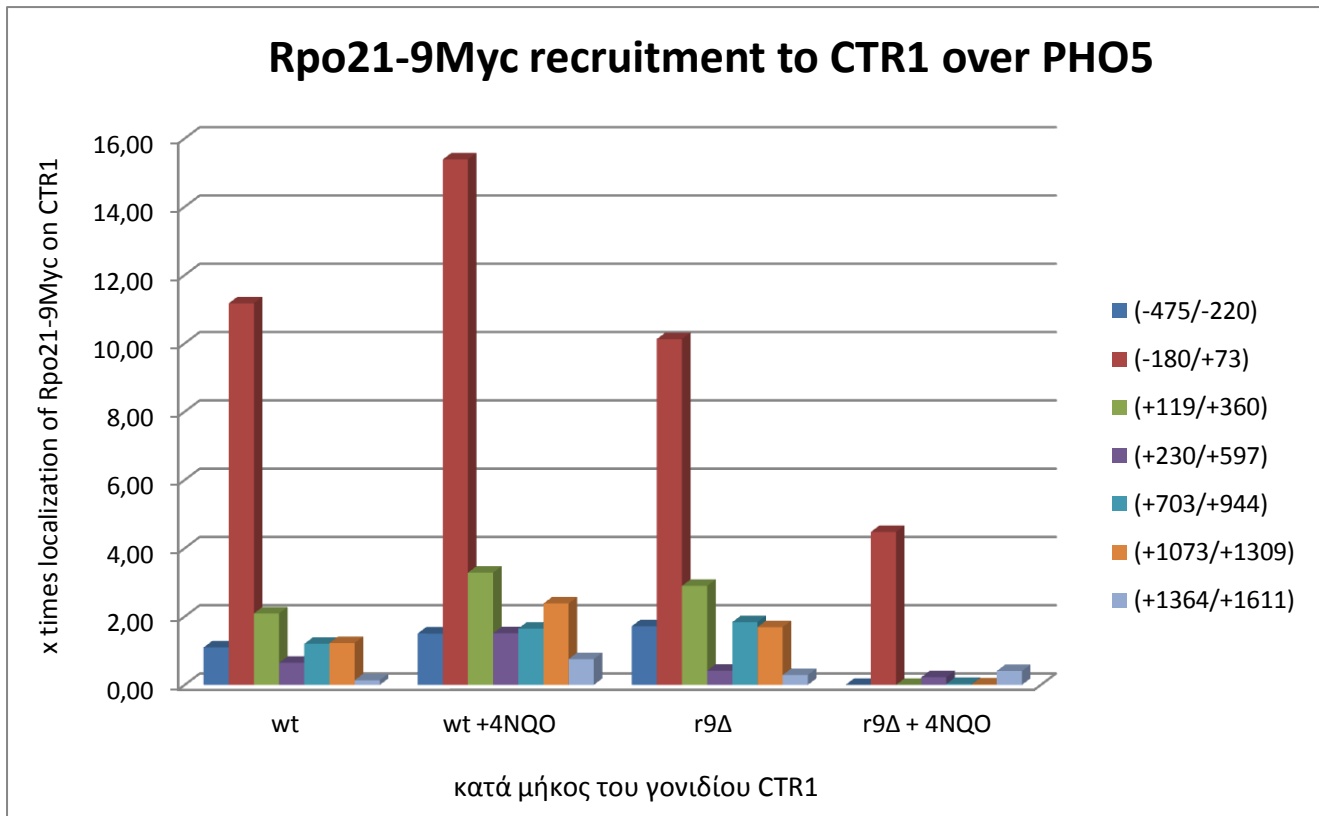


Για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο PHO5.

Το 2^ο πείραμα ChIP Rpo21-9Myc στο CTR1 (08.12.2011-13.12.2011):

Χρησιμοποιήθηκαν τα whole cell extracts του 1^{ου} πειράματος ChIP Rpo21-9Myc και ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με βάση το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης, με τη διαφορά ότι δεν κάναμε το βήμα του preclearing. Χρησιμοποιήσαμε το αντίσωμα anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την RNA πολυμεράση II και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Στη συνέχεια κάναμε Real-Time PCR (54ο ,30'' extension time, 40 cycles, plate read at 78°C and 80°C). Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

- Primer set 1: -475/-220
 - Primer set 2: -180/+73
 - Primer set 3: +119/+360
 - Primer set 4: +230/+597
 - Primer set 5: +703/+944
 - Primer set 6: +1073/+1309
 - Primer set 7: +1364/+1611
 - PHO5 primers: +1018/+1220
- } Primers για το CTR1



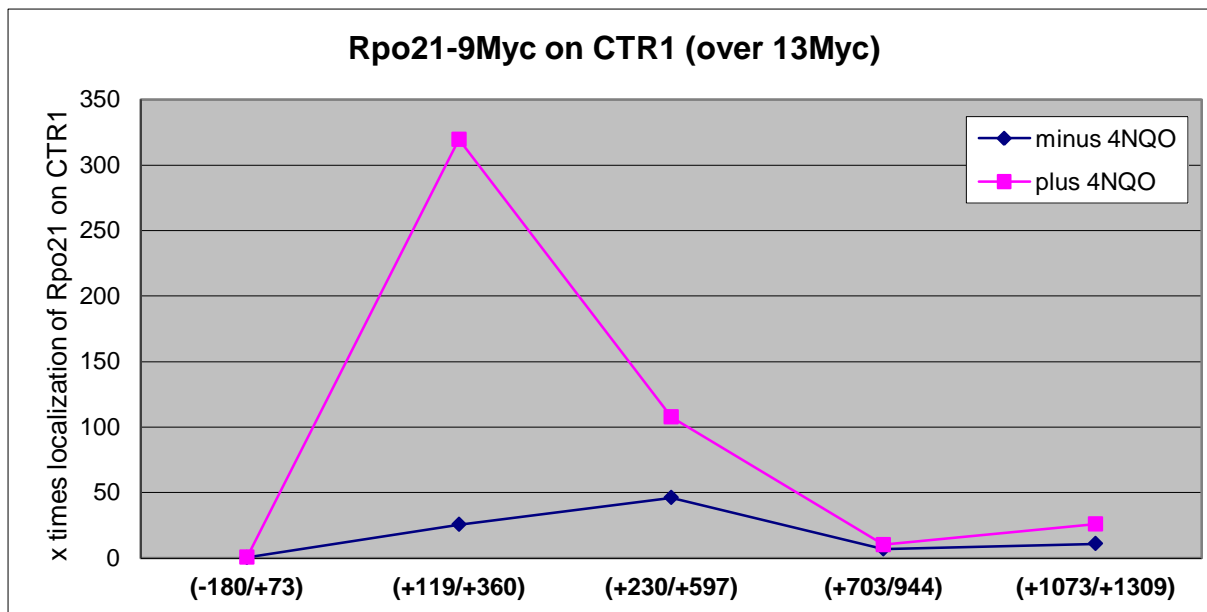
Το 3^ο πείραμα ChIP Rpo21-9Myc στο CTR1 (16.12.2011-22.12.2011):

Σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήσαμε τα στελέχη FT5 Rad9-9Myc, FT5 Rpo21-9Myc, FT5 rad9Δ Rpo21-9Myc και FT5 13Myc τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες YPD-BPS-BCS (3 ώρες και 20 λεπτά πριν το μάζεμα) μαζί με τα απαραίτητα αμινοξέα: λευκίνη, ουρακίλη, ισιδίνη για όλα τα στελέχη εκτός από το FT5 13Myc το οποίο χρειαζόταν λευκίνη, ουρακίλη, ισιδίνη και τρυπτοφάνη. Ακόμη, 1 ώρα πριν το μάζεμα των κυττάρων προσθέσαμε 4NQO με τελική συγκέντρωση 12,5μg/ml και μαζέψαμε τα κύτταρα όταν η OD_{600nm} ήταν ~3. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα το anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την RNA πολυμεράση II και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Το τελικό βήμα ήταν η πραγματοποίηση Real-Time PCR (54ο, 30'' extension time, 40 cycles, plate read at 79°C and 84°C). Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

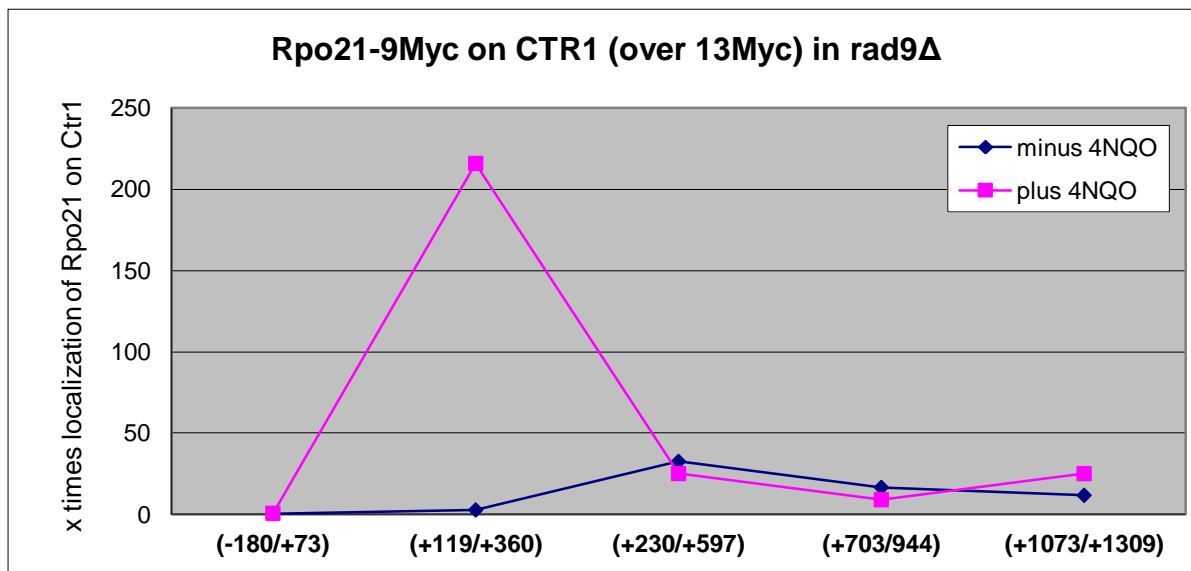
- Primer set 1: -180/+73
 - Primer set 2: +119/+360
 - Primer set 3: +230/+596
 - Primer set 4: +703/+944
 - Primer set 5: +1073/+1311
- } Primers για το CTR1

Κανονικοποιήσαμε ως προς FT5 13Myc. Στα παρακάτω διαγράμματα όπου αναγράφεται wt εννοούμε το FT5 Rpo21-9Myc στέλεχος και όπου Rad9Δ το FT5 rad9Δ Rpo21-9Myc στέλεχος.

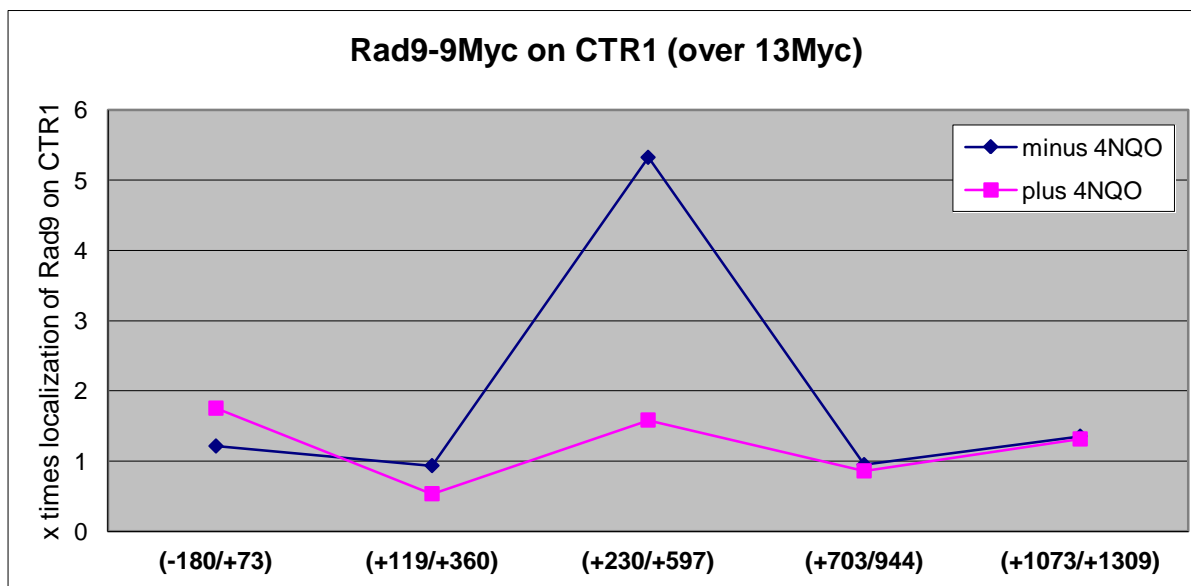
Διάγραμμα Rpo21 (3α)



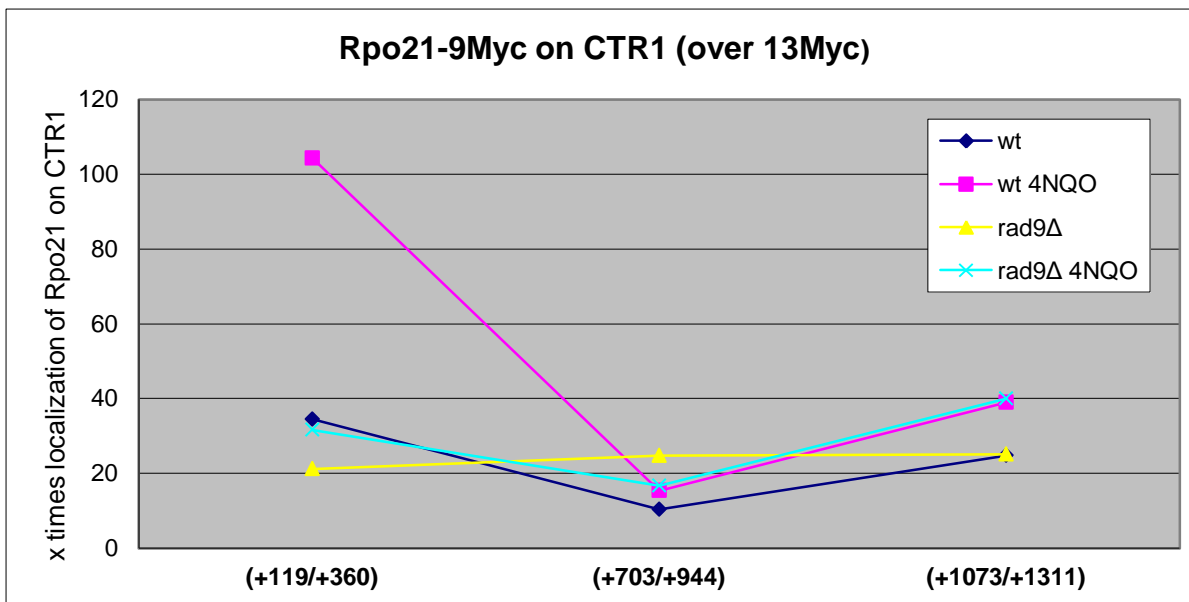
Διάγραμμα Rpo21 (3β)



Διάγραμμα Rpo21 (3γ)



Διάγραμμα Rpo21 (3δ)



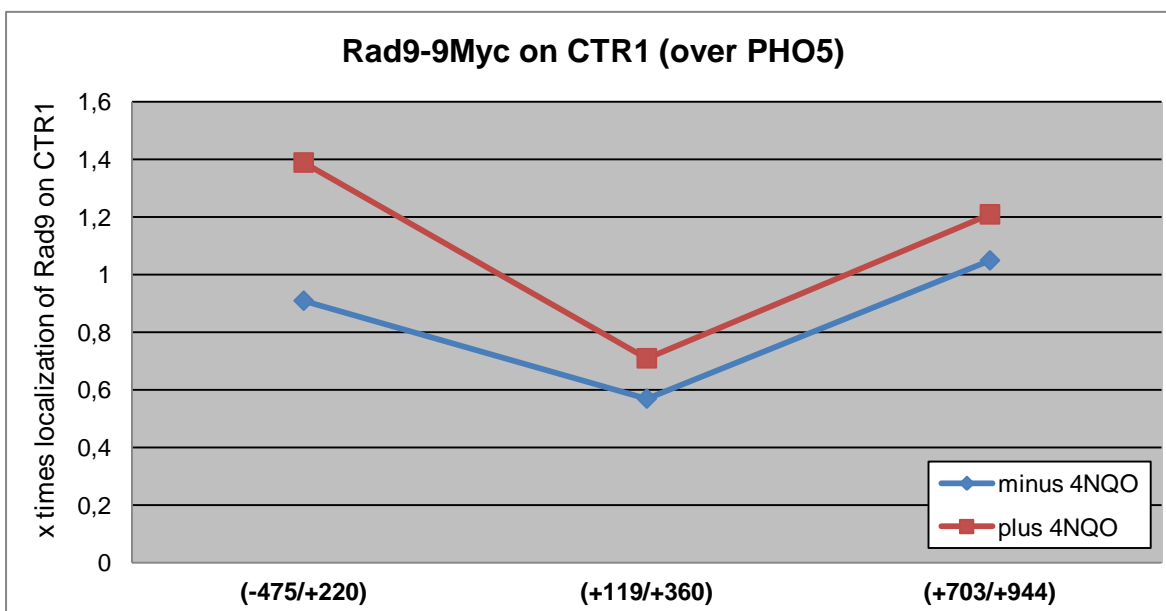
Το 4^ο πείραμα ChIP Rpo21-9Myc στο CTR1 (23.12.2011-28.12.2011):

Χρησιμοποιήσαμε τη χρωματίνη του 3^{ου} πειράματος ανοσοκατακρήμνισης δηλαδή τα στελέχη FT5 Rad9-9Myc, FT5 Rpo21-9Myc, FT5 rad9Δ Rpo21-9Myc και FT5 13Myc. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα το anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την RNA πολυμεράση II και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Το τελικό βήμα ήταν η πραγματοποίηση Real-Time PCR (54ο ,30'' extension time, 40 cycles, plate read at 78°C and 84°C). Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

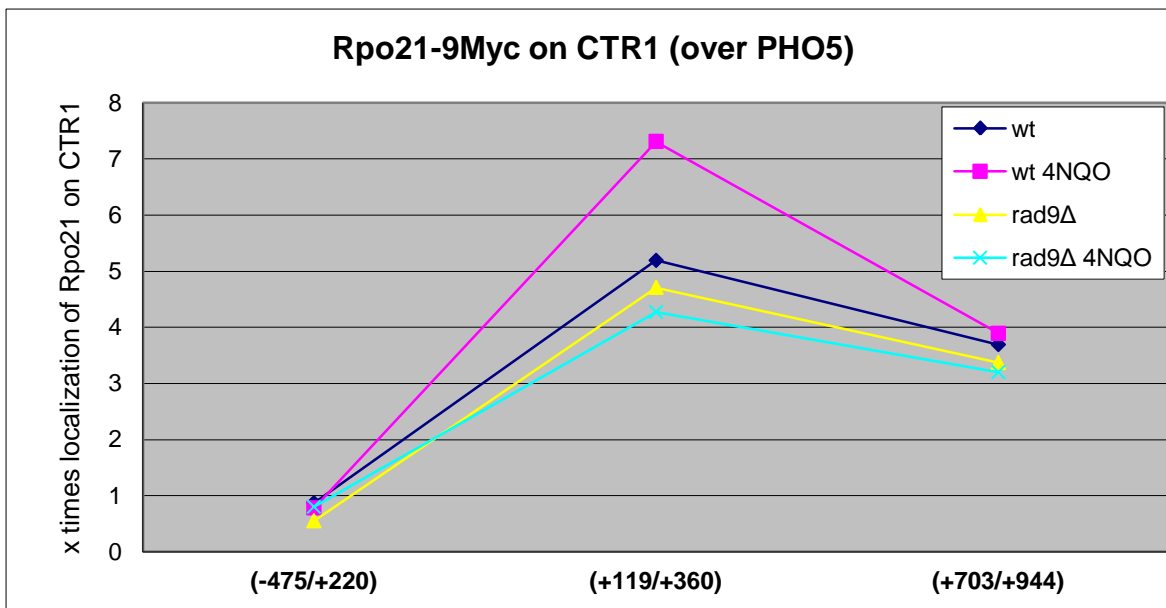
- Primer set 1: -475/-220
 - Primer set 2: -180/+73
 - Primer set 3: +119/+360
 - Primer set 4: +703/+944
 - PHO5 primers: +1018/+1220
- } Primers για το CTR1

Στα παρακάτω διαγράμματα όπου αναγράφεται wt εννοούμε το FT5 Rpo21-9Myc στέλεχος και όπου rad9Δ το FT5 rad9Δ Rpo21-9Myc στέλεχος.

Διάγραμμα Rpo21 (4α)



Διάγραμμα Rpo21 (46)

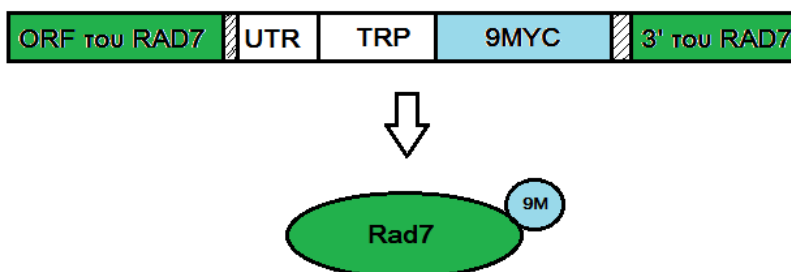


2.4: Εντοπισμός των Rad7 και Rad10 στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1 απουσία και παρουσία του Aft1, σε συνθήκες βλάβης του DNA.

Για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε τις πρωτεΐνες Rad7 και Rad10 στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1, χωρίς μεγάλο κόστος, χρειάστηκε να κατασκευάσουμε στελέχη στα οποία η κάθε πρωτεΐνη θα εκφραζόταν μαζί με έναν κοινό επίτοπο σαν χιμαιρική πρωτεΐνη ώστε να εντοπιστεί και να απομονωθεί με τη βοήθεια κοινού και φθηνού αντισώματος. Επιλέξαμε να ενθέσουμε τη γονιδιακή κασέτα του επίτοπου 9Myc στα γονίδια RAD7 και RAD10. Για τους λόγους που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 2.1, φτιάξαμε τα στελέχη FT5 aft1Δ Rad7-9Myc, FT5 aft1Δ Rad10-9Myc όπου έλειπε ο Aft1 και τα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη FT5 aft1,2Δ Rad7-9Myc και FT5 aft1,2Δ Rad10-9Myc όπου έλειπαν ο Aft1 και ο Aft2, με τη σκέψη ότι εάν βρίσκαμε κάποιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα στο aft1Δ μετάλλαγμα, θα μπορούσαμε να το μελετήσουμε σε μεγαλύτερο βάθος στο διπλό μετάλλαγμα.

2.4.α: Κατασκευή στελεχών ζύμης FT5 aft1Δ Rad7-9Myc, FT5 aft1Δ Rad10-9Myc, FT5 aft1,2Δ Rad7-9Myc και FT5 aft1,2Δ Rad10-9Myc.

Τα στελέχη που επιλέξαμε να μετασχηματίσουμε ήταν τα FT5 aft1Δ και FT5 aft1,2Δ, ώστε οι Rad7 και Rad10 να εκφράζονται αντίστοιχα απουσία του Aft1 και απουσία των Aft1 και Aft2. Η κασέτα 9MYC περιέχει το γονίδιο του επιτόπου 9Myc καθώς και το γονίδιο αυξοτροφίας για τρυπτοφάνη, ώστε να χρησιμεύσει ως δείκτης επιλογής των κυττάρων που έχουν ενθέσει την κασέτα και φαίνεται στη εικόνα. Ανάλογη και η κασέτα για την Rad10.



Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο μετασηματισμού για να γίνει η ένθεση της κασέτας μέσω ανασυνδιασμού, στο γονιδίωμα ενός FT5 aft1Δ στελέχους καθώς και σε ένα FT5 aft1Δ, aft2Δ στέλεχος.

Για να ελέγξουμε αν έγινε η ένθεση σωστά, απλώσαμε τα νέα στελέχη σε πιάτα SC των 25ml, με όλα τα αμινοξέα εκτός τρυπτοφάνης (URA, LEU, HIS σε τελική συγκέντρωση 1X, δηλαδή 250μl για κάθε αμινοξύ). Στη συνέχεια, για να δούμε εάν η κασέτα εντέθηκε και στο σωστό σημείο, κάναμε απομόνωση του ολικού γενωμικού υλικού για όλα τα στελέχη:

- FT5 aft1Δ Rad7-9Myc
- FT5 aft1Δ Rad10-9Myc
- FT5 aft1Δ, aft2Δ Rad7-9Myc
- FT5 aft1Δ, aft2Δ Rad10-9Myc

Πραγματοποιήσαμε PCR για τα μονά και διπλά μεταλλάγματα χρησιμοποιώντας primers: ο forward να ξεκινάει μέσα από το γονίδιο RAD7 ή RAD10, και ο reverse να ξεκινάει από το μέσο της κασέτας. Το προϊόν που αναμέναμε να δούμε εάν είχε γίνει σωστά η ένθεση θα είχε για το Rad7 μήκος ~2.000bp ενώ για το Rad10 ~2.500bp. Εάν δεν είχε γίνει η ένθεση, θα περιμέναμε για το Rad7 μήκος ~500bp ενώ για το Rad10 ~1.000bp. Για θετικό control βάλουμε στελέχη FT5 Rad7-9Myc και FT5 Rad10-9Myc που είχαν την κασέτα ενώ για αρνητικό βάλουμε στέλεχος FT5 χωρίς ένθεση κασέτας. Για την PCR βάλουμε extension time 1 min και 60 sec, με υβριδοποίηση primers στους 54°C για 33 κύκλους.

Transformation check for aft1Δ Rad7-9Myc and aft1Δ Rad10-9Myc

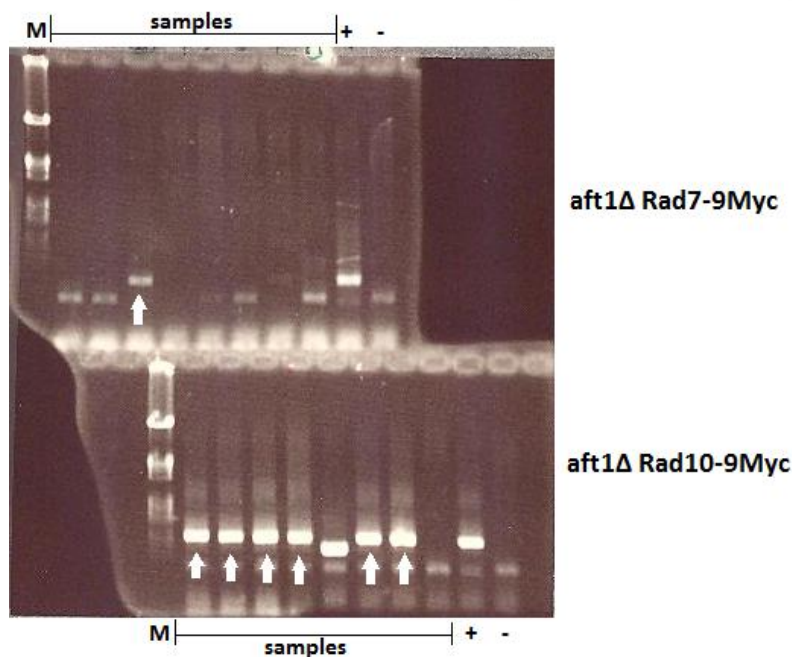
Primers

Rad7-9Myc: F +1511

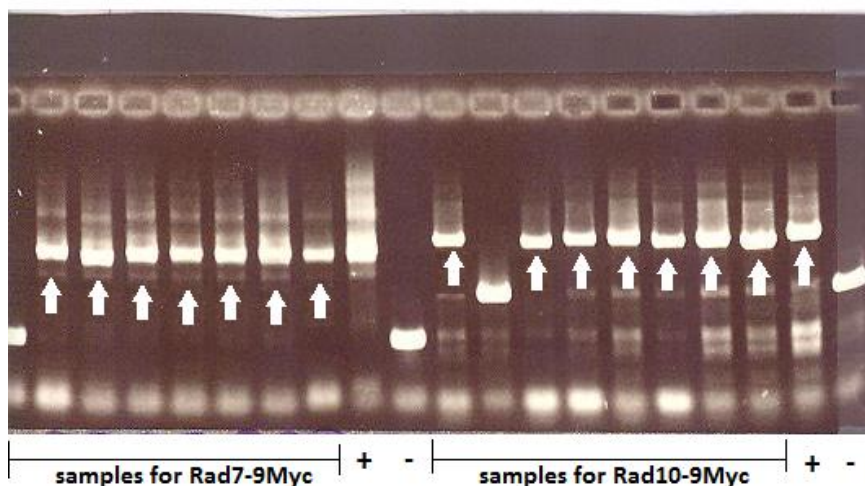
R +1987

Rad10-9Myc: F -291

R +712

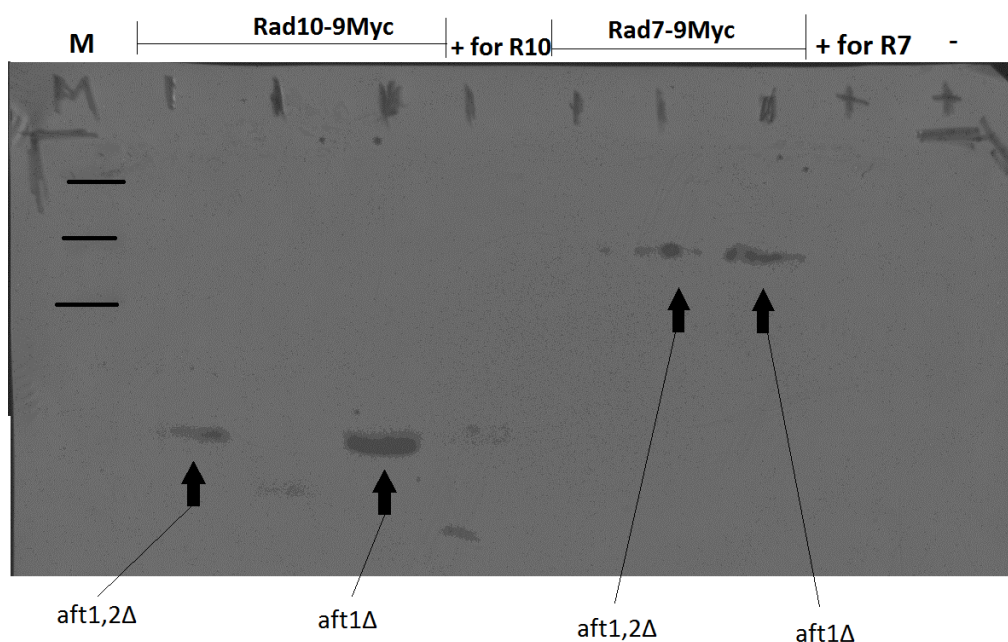


Transformation check for aft1,2Δ Rad7-9Myc and aft1,2Δ Rad1-9Myc



Αφού είδαμε ότι όντως έγινε η ένθεση και ξεχωρίσαμε τα μεταλλάγματα που εμφάνισαν μπάντα στο επιθυμητό μέγεθος, έπρεπε να ελέγξουμε εάν εκφράζονται οι tagged πρωτεΐνες και εάν αλλάζει κάτι στη δομή τους (πχ είναι αποδομημένες). Για να το ελέγξουμε αυτό φτιάξαμε protein extracts σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο και τρέξαμε τις πρωτεΐνες σε acrylamide gel. Το gel για την Rad7-9Myc ήταν 10% ενώ το gel για την Rad10-9Myc ήταν 12%. Το ποσοστό της ακρυλαμίδης στο κάθε gel ορίστηκε σύμφωνα με τα μεγέθη των πρωτεϊνών. Η Rad7-9Myc έχει μοριακό βάρος ~73.000 Da ενώ η Rad10-9Myc έχει μοριακό βάρος ~35.000 Da.

Transformation check for both *aft1Δ* and *aft1,2Δ* Rad7-9Myc and Rad10-9Myc



Έχοντας τα νέα στελέχη στα χέρια μας, ξεκινήσαμε με τα πειράματα εντοπισμού των Rad7 και Rad10 στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1.

2.4.β: Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για εντοπισμό της Rad7 στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1 απουσία και παρουσία του Aft1, σε συνθήκες βλάβης του DNA.

Οι συνθήκες για τον εντοπισμό των Rad7 και Rad10 ήταν η απουσία της πρωτεΐνης Aft1 αλλά και συνθήκες βλάβης στο DNA που προκλήθηκαν με το φάρμακο 4NQO. Εκτός από τις παραπάνω συνθήκες έπρεπε να εξασφαλίσουμε συνθήκες κατά τις οποίες το γονίδιο του CTR1 θα ήταν ενεργοποιημένο. Τέτοιες είναι οι συνθήκες απουσία Fe και Cu, τις οποίες πετυχαίνουμε, αραιώνοντας στις καλλιέργειές μας BCS και BPS chelators σε τελική συγκέντρωση 100μM. Το BCS δεσμεύει Fe⁺² και Cu⁺² και θέλει 6 ώρες για να δράσει πλήρως, ενώ το BPS δεσμεύει Cu⁺¹ και θέλει 3 ώρες.

Το 1^ο πείραμα ChIP Rad7-9Myc στο CTR1 (21.03.2012-09.04.2012):

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε ήταν το FT5 Rad7-9Myc (control) και το FT5 *aft1Δ* Rad7-9Myc. Επίσης χρησιμοποιήσαμε τις FT5 και FT5 13Myc. Ο λόγος που βάλουμε την FT5 13Myc ήταν για να εξετάσουμε εάν

η έκφραση ενός επιτόπου Myc στο κύτταρο επηρεάζει ή όχι τη λειτουργία του. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SC-BPS-BCS (4 ώρες πριν το μάζεμα των κυττάρων) μαζί με τα απαραίτητα αμινοξέα: στο FT5 Rad7-9Myc, FT5 και FT5 13Myc προσθέσαμε λευκίνη, ιστιδίνη, ουρακίλη και τρυπτοφάνη ενώ στο FT5 aft1Δ Rad7-9Myc προσθέσαμε λευκίνη, ιστιδίνη και τρυπτοφάνη. Ακόμη, 1 ώρα πριν το μάζεμα των κυττάρων προσθέσαμε 4NQO με τελική συγκέντρωση 37,5μg/ml και μαζέψαμε τα κύτταρα όταν η OD_{600nm} ήταν ~1,5. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την Rad7-9Myc και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Το τελικό βήμα ήταν η πραγματοποίηση Real-Time PCR (54^ο, 30'' extension time, 40 cycles, plate read at 78°C and 84°C). Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

- Primer set 1: -475/-220
 - Primer set 2: +119/+360
 - Primer set 3: +703/+944
 - Primer set 4: +1364/+1611
 - PHO5 primers: +1018/+1220
- } Primers για το CTR1

Στο πείραμα αυτό η ποιότητα της χρωματίνης δεν ήταν καλή με αποτέλεσμα να μη μπορέσουμε να απεικονίσουμε τα αποτελέσματα της Real-Time PCR σε διάγραμμα.

Το 2^ο πείραμα CHIP Rad7-9Myc στο CTR1 (03.05.2012-08.05.2012)

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε ήταν το FT5 13Myc, FT5 Rad7-9Myc (control) και το FT5 aft1Δ Rad7-9Myc τα οποία αναπτύχθηκαν αρχικά σε συνθήκες YPD ώστε τα κύτταρα να φτάσουν γρήγορα στην εκθετική φάση. Όταν οι καλλιέργειες είχαν φτάσει στα OD₅₅₀=1,5 το πολύ, καθαρίσαμε τις καλλιέργειες από το YPD κάνοντας φυγοκέντριση και αφαιρώντας το υπερκείμενο σε στείρες συνθήκες. Στη συνέχεια, διαλύσαμε τις πελέτες σε SC θρεπτικό, και βάλουμε τόσα ml από κάθε καλλιέργεια ώστε σε καινούριες φλάσκες με SC να είχαν τελική OD₅₅₀=0,25. Τα στελέχη συνέχισαν να αναπτύσσονται σε συνθήκες SC-BPS-BCS (4 ώρες πριν το μάζεμα των κυττάρων) παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων: στο FT5 Rad7-9Myc, και FT5 13Myc προσθέσαμε λευκίνη, ιστιδίνη, ουρακίλη και τρυπτοφάνη ενώ στο FT5 aft1Δ Rad7-9Myc προσθέσαμε λευκίνη, ιστιδίνη και τρυπτοφάνη. Ακόμη, 2 ώρες πριν το μάζεμα των κυττάρων προσθέσαμε 4NQO σε τελική συγκέντρωση 37,5μg/ml. Συλλέξαμε τα κύτταρα όταν είχαν φτάσει σε OD_{600nm}~2,5. Ακολουθήσαμε κανονικά το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την Rad7-9Myc και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Στο τελικό στάδιο, βάλουμε αντίδραση Real-Time PCR με τις εξής ιδιότητες: 54^ο, 30'' extension time, 40 cycles, plate read at 80°C and 84°C. Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

- Primer set 1: -475/-220
 - Primer set 2: +119/+360
 - Primer set 3: +703/+944
 - Primer set 4: +1364/+1611
 - PHO5 primers: +1018/+1220
- } Primers για το CTR1

Στο πείραμα αυτό η ποιότητα της χρωματίνης δεν ήταν καλή με αποτέλεσμα να μη μπορέσουμε να απεικονίσουμε τα αποτελέσματα της Real-Time PCR σε διάγραμμα.

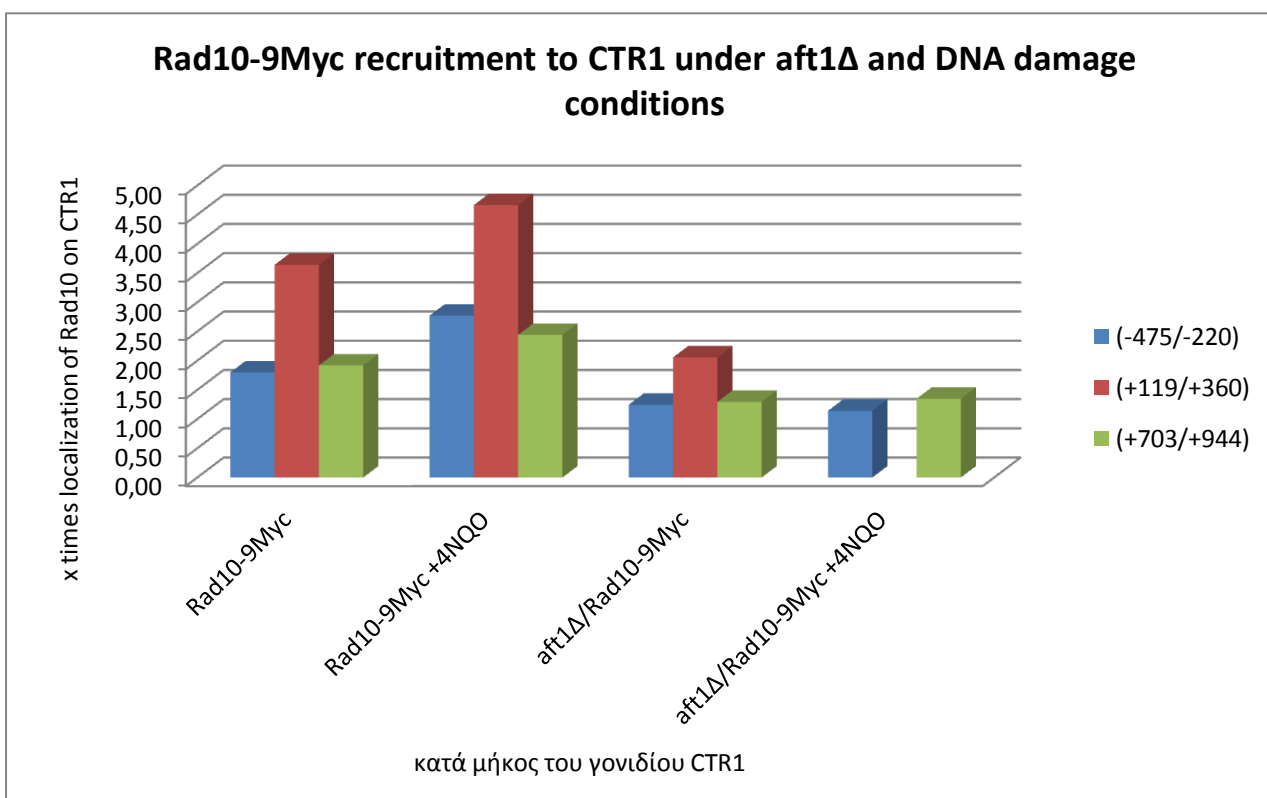
2.4.γ: Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για εντοπισμό της Rad10 στη χρωματίνη του γονιδίου CTR1 απουσία και παρουσία του Aft1, σε συνθήκες βλάβης του DNA.

Το 1^ο πείραμα CHIP Rad10-9Myc στο CTR1 (23.03.2012-19.04.2012)

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε ήταν το FT5 Rad10-9Myc (control) και το FT5 aft1Δ Rad10-9Myc. Επίσης για καλλιέργειες control χρησιμοποιήσαμε τα whole cell extracts FT5 και FT5 13Myc από το 1^ο πείραμα για το Rad7-9Myc. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SC-BPS-BCS (4 ώρες πριν το μάζεμα) παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων: για την FT5 Rad10-9Myc βάλουμε λευκίνη, ιστιδίνη, ουρακίλη και τρυπτοφάνη ενώ για την FT5 aft1Δ Rad10-9Myc βάλουμε λευκίνη, ιστιδίνη και τρυπτοφάνη. Ακόμη, 2 ώρες πριν το μάζεμα των κυττάρων προσθέσαμε 4NQO σε τελική συγκέντρωση 37,5μg/ml). Συλλέξαμε τα κύτταρα σε OD=1,5-2 σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Ακολουθήσαμε κανονικά το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την Rad10-9Myc και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Στο τελικό στάδιο, βάλουμε αντίδραση Real-Time PCR με τις εξής ιδιότητες: 54°, 30'' extension time, 40 cycles, plate read at 80°C and 84°C. Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

- Primer set 1: -475/-220
 - Primer set 2: 119/360
 - Primer set 3: 703/944
 - Primer set 4: 1364/1611
 - PHO5 primers: +1018/+1220
- } Primers για το CTR1

Διάγραμμα Rad10 (1)

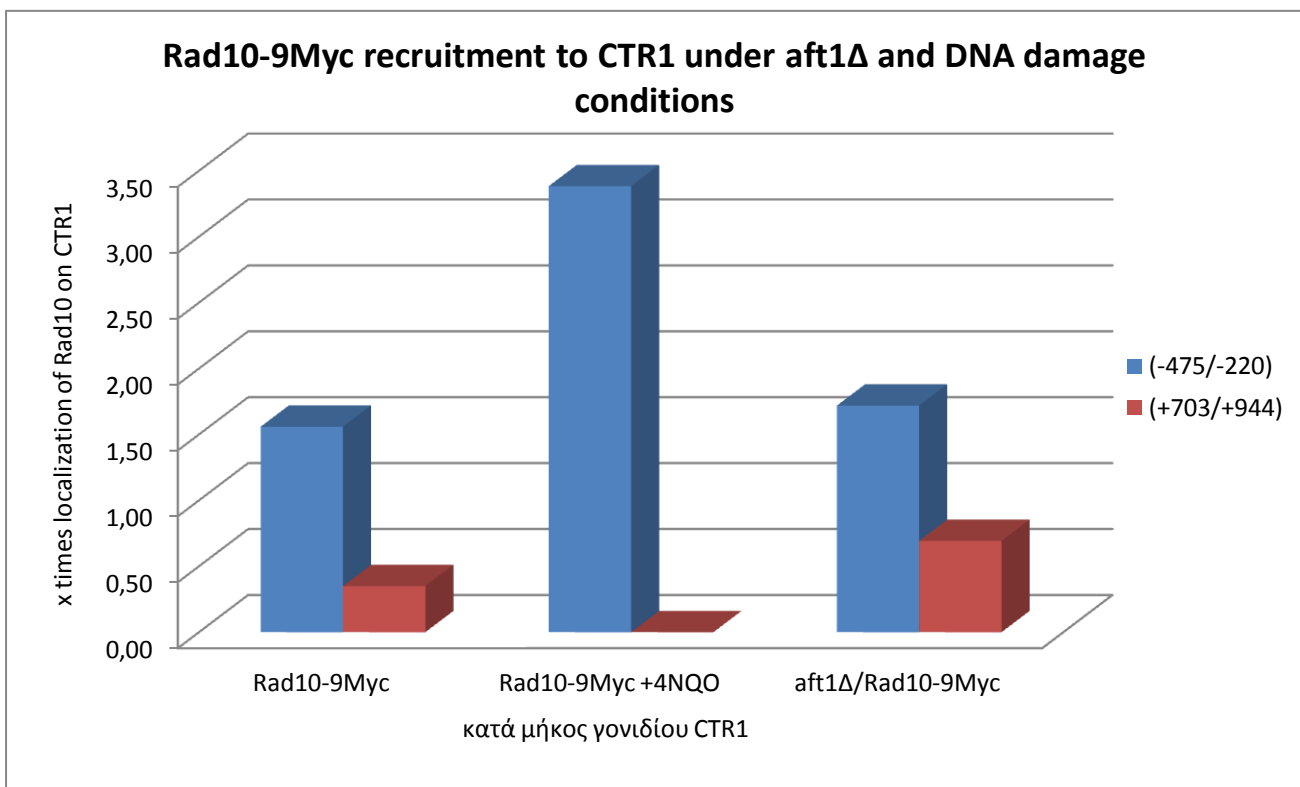


Το 2^ο πείραμα CHIP Rad10-9Myc στο CTR1 (10.05.2012-17.05.2012)

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε ήταν το FT5 Rad10-9Myc (control) και το FT5 aft1Δ Rad10-9Myc καθώς και το FT5 13Myc. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SC-BPS-BCS (4 ώρες πριν το μάζεμα) παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων: για την FT5 Rad10-9Myc και την FT5 13Myc βάλουμε λευκίνη, ιστιδίνη, ουρακίλη και τρυπτοφάνη ενώ για την FT5 aft1Δ Rad10-9Myc βάλουμε λευκίνη, ιστιδίνη και τρυπτοφάνη. Ακόμη, 2 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων προσθέσαμε 4NQO σε τελική συγκέντρωση 37,5μg/ml. Συλλέξαμε τα κύτταρα σε OD_{600nm} ~2, ενώ η καλλιέργεια με το στέλεχος FT5 aft1Δ Rad10-9Myc με 4NQO δεν αναπτύχθηκε. Ακολουθήσαμε κανονικά το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την Rad10-9Myc και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί. Στο τελικό στάδιο, βάλουμε αντίδραση Real-Time PCR με τις εξής ιδιότητες: 54°, 30'' extension time, 40 cycles, plate read at 80°C and 84°C. Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

- Primer set 1: -475/-220
 - Primer set 2: +119/+360
 - Primer set 3: +703/+944
 - Primer set 4: +1364/+1611
 - PHO5 primers: +1018/+1220
- } Primers για το CTR1

Διάγραμμα Rad10 (2)



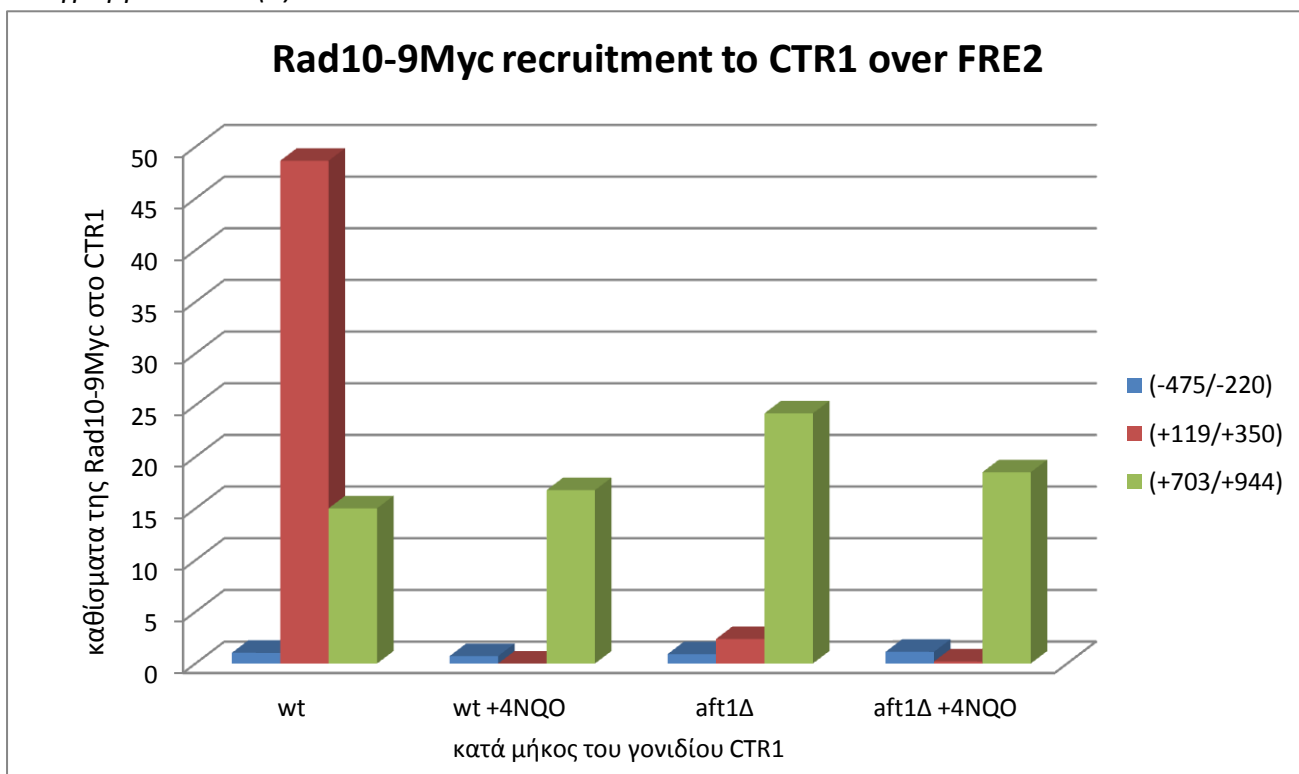
Το 3^ο πείραμα CHIP Rad10-9Myc στο CTR1 (21.05.2012-28.05.2012)

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε ήταν το FT5 Rad10-9Myc (control) και το FT5 aft1Δ Rad10-9Myc. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες SC-BPS-BCS (4 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων) παρουσία

των απαραίτητων αμινοξέων: για την FT5 Rad10-9Myc βάλουμε λευκίνη, ιστιδίνη, ουρακίλη και τρυπτοφάνη ενώ για την FT5 aft1Δ Rad10-9Myc βάλουμε λευκίνη, ιστιδίνη και τρυπτοφάνη. Ακόμη, 2 ώρες πριν το μάζεμα των κυττάρων προσθέσαμε 4NQO σε τελική συγκέντρωση 37,5μg/ml. Συλλέξαμε τα κύτταρα όταν είχαν φτάσει σε OD_{600nm}~2 και από κει και πέρα ακολουθήσαμε κανονικά το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Myc rabbit polyclonal της Santa Cruz για να απομονώσουμε την Rad10-9Myc και τη χρωματίνη στην οποία είχε προσδεθεί Στο τελικό στάδιο, βάλουμε αντίδραση Real-Time PCR με τις εξής ιδιότητες: 54°, 30'' extension time, 40 cycles, plate read at 80°C and 84°C. Χρησιμοποιήσαμε τους primers:

- Primer set 1: -475/-220
 - Primer set 2: 119/360
 - Primer set 3: 703/944
 - FRE2 primers: +1721/+1982
- } Primers για το CTR1

Διάγραμμα Rad10 (3)



Κεφάλαιο 3: Συζήτηση

3.1: Συμπεράσματα από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης Rpo21-9Myc

Όσον αφορά τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της RNA πολυμεράσης II, το 1^ο και το 2^ο πείραμα που είχαν κοινή αρχική χρωματίνη (χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια whole cell extracts), δεν έδωσαν κάποιο αξιόπιστο αποτέλεσμα για τον λόγο ότι η χρωματίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν κακής ποιότητας και στην αντίδραση της Real-Time PCR έδειξε μόνο προϊόν για το γονίδιο-control PHO5. Παρόλα αυτά μπορούμε να κάνουμε κάποιες παρατηρήσεις όσον αφορά το 1^ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Rpo21-9Myc και αυτές είναι ότι σε απουσία της Rad9 και κάτω από συνθήκες βλάβης στο DNA υπάρχει ισοκατανομή της RNA πολυμεράσης II στο CTR1. Επίσης βλέπουμε ότι στην περιοχή -180/+73 η RNA πολυμεράση II έχει προσδέεται συχνότερα, το οποίο είναι λογικό αφού εκεί γίνεται η εκκίνηση της μεταγραφής του γονιδίου CTR1.

Το 3^ο και 4^ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Rpo21-9Myc είχαν πολύ καλή ποιότητα χρωματίνης (χρησιμοποιήσαμε τα whole cell extracts από τις 30.11.2012) και αυτό μπορούμε να το δούμε από τα αποτελέσματα της Real-Time PCR. Συγκεκριμένα από το 3^ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Rpo21-9Myc μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρόσδεση της Rpo21-9Myc στο γονίδιο του CTR1 δεν αλλάζει ποιοτικά, όταν υπάρχει η Rad9 ή όχι, μόνο ποσοτικά, στο σημείο +119/+360 όπου παρατηρούμε μια αύξηση από 220 (radΔ) σε 320 folds (wt) όταν έχουμε συνθήκες επαγωγής βλάβης στο DNA. Από αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II εξαρτάται από τη Rad9. Επίσης, από το 4^ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Rpo21-9Myc μπορούμε να συμπεράνουμε όπως και στο 3^ο πείραμα, πως η πρόσδεσή της Rpo21-9Myc εξαρτάται από την παρουσία της Rad9 και ότι παρουσία φαρμάκου, στο wt στέλεχος, η πρόσδεση αυξάνεται σε σχέση με το radΔ στέλεχος. Μπορούμε να συγκρίνουμε τα δύο πειράματα μεταξύ τους από τη στιγμή που χρησιμοποιούμε το ίδιο γονίδιο-control, το OHO5, για την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Συνοψίζοντας, από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της RNA πολυμεράσης II είδαμε ότι η πρόσδεση της πολυμεράσης στο γονίδιο του CTR1 και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή +119/+360, αυξάνεται όταν έχουμε συνθήκες βλάβης στο DNA και ότι αυτή η πρόσδεση εξαρτάται από την παρουσία της Rad9. Δηλαδή όταν η Rad9 είναι παρούσα η πολυμεράση συσσωρεύεται στην 5' περιοχή του CTR1 ενώ όταν λείπει η Rad9 παρατηρούμε μια ισοκατανομή της πολυμεράσης. Τα παραπάνω συμφωνούν με τα πειράματα του Γιώργου Φραγκιαδάκη, ο οποίος παρατήρησε σε συνθήκες βλάβης του DNA μετά από επαγωγή με το φάρμακο zeocin, ότι η πρόσδεση της πολυμεράσης στο CTR1 εξαρτάται από την Rad9. Επίσης ένα πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα είναι ότι σε στελέχη όπου υπάρχει η Rad9, η πολυμεράση με την Rad9 δείχνουν να ανταγωνίζονται απουσία του φαρμάκου στην περιοχή +119/+360. Παρουσία του φαρμάκου και σε στελέχη όπου υπάρχει η Rad9, φαίνεται πως ποιοτικά, η πολυμεράση αυξάνεται στη περιοχή +119/+360 ενώ η Rad9 μειώνεται στη περιοχή +230/+597. Θα περίμενε κανείς, όπως μειώνεται η πρόσδεση της Rad9 σε συνθήκες φαρμάκου, να μειώνεται και η πρόσδεση της πολυμεράσης, αλλά αντί αυτού, αυξάνεται.

Παρόλα αυτά, πρέπει να αναφέρουμε ότι το αντίσωμά μας δε μπορεί να ξεχωρίσει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της πολυμεράσης από τη μη φωσφορυλιωμένη, και στην πραγματικότητα, τα folds που βλέπουμε είναι λιγότερα. Ακόμα και λαμβάνοντας όμως αυτό υπόψη, ποιοτικά τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενδιαφέροντα. Θα μπορούσαμε, σε μελλοντική έρευνα, να ελέγξουμε την πρόσδεση της πολυμεράσης με αντίσωμα που να ξεχωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή από τη μη φωσφορυλιωμένη ώστε να έχουμε μια πραγματική εικόνα του τι συμβαίνει.

3.2: Συμπεράσματα από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης Rad7-9Myc

Όσον αφορά τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της Rad7-9Myc μπορούμε να πούμε ότι γενικά, η ποιότητα των χρησιμοποιηθέντων χρωματινών δεν ήταν αρκετά καλή ώστε να βγάλουμε σίγουρα συμπεράσματα. Από το 1^ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Rad7-9Myc, παρατηρήσαμε παρόλα αυτά μια σταθερή στρατολόγηση κατά μήκος του γονιδίου CTR1 η οποία δεν επηρεάζεται από την προσθήκη φαρμάκου ή από την παρουσία του Aft1. Αυτό το συμπέρασμα όμως το βγάζουμε με επιφύλαξη, γιατί η ποιότητα της χρωματίνης δεν θα μπορούσε να μας δώσει αξιόπιστες πληροφορίες. Από το 2^ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Rad7-9Myc δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο σίγουρο συμπέρασμα για το λόγο ότι η ποιότητα της χρωματίνης δεν ήταν καλή και αδυνατίσαμε να απεικονίσουμε τα αποτελέσματα της Real-Time PCR σε διάγραμμα.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να βγάλουμε ένα επισφαλές συμπέρασμα ότι η πρόσδεση της Rad7 στη χρωματινική περιοχή του γονιδίου CTR1 δεν επηρεάζεται από τον Aft1 αλλά ούτε και από συνθήκες βλάβης του DNA. Σίγουρα θα χρειαστούν μελλοντικά κι άλλα παρόμοια πειράματα, ώστε να εξακριβωθεί ακριβώς η σχέση μεταξύ Aft1 και Rad7.

3.3: Συμπεράσματα από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης Rad10-9Myc

Όσον αφορά τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της Rad10-9Myc μπορούμε να πούμε ότι η ποιότητα των χρωματινών που χρησιμοποιήσαμε ήταν αρκετά καλές αν και δε μπορέσαμε να βγάλουμε συμπεράσματα για όλες τις περιοχές του γονιδίου CTR1 ίσως λόγω τεχνικού λάθους, ή απλά επειδή η Rad10 δεν δεσμευόταν σε αυτές τις περιοχές. Το 1^ο και το 2^ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Rad10-9Myc είναι συγκρίσιμα αφού χρησιμοποιούμε το ίδιο γονίδιο για κανονικοποίηση, το PHO5. Το 3^ο πείραμα δεν είναι συγκρίσιμο με τα άλλα δύο για το λόγο ότι χρησιμοποιούμε το FRE2 γονίδιο για την κανονικοποίηση.

Στο 1^ο πείραμα, παρατηρώ μια πρόσδεση της Rad10 και μέσα στη κωδική περιοχή του CTR1. Όμως η χρωματίνη δεν ήταν πολύ καλής ποιότητας με αποτέλεσμα και οι υπολογισμοί της Real-Time PCR να μην είναι πολύ αξιόπιστοι ώστε να είμαστε σίγουροι για το παραπάνω.

Στο 2^ο πείραμα, η ποιότητα της χρωματίνης ήταν αρκετά καλή με αποτέλεσμα οι υπολογισμοί της Real-Time PCR να είναι βάσιμοι, αλλά να παρατηρούμε τις καμπύλες των υπολογισμών αυτών να βρίσκονται κάτω από το «κατώφλι» (threshold) του υπολογισμού προϊόντος και άρα να συμπεραίνουμε ότι η Rad10 δεν προσδένεται μέσα στη κωδική περιοχή του γονιδίου. Παρόλα αυτά μπορούμε να καταλήξουμε με αρκετή σιγουριά στο συμπέρασμα ότι στον υποκινητή του CTR1 υπάρχει πρόσδεση (3x) της Rad10-9Myc η οποία σε aft1Δ συνθήκες μειώνεται (1x). Είδαμε ότι το PHO5 γονίδιο που χρησιμοποιήσαμε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μας έδειχνε την Rad10 να προσδένεται και με αυτό το σκεπτικό, στο 3^ο πείραμα, χρησιμοποιήσαμε το FRE2 σαν γονίδιο-control.

Στο 3^ο πείραμα για την Rad10, είδαμε να ανατρέπονται τα αποτελέσματα των δύο πρώτων πειραμάτων, αυτό όμως αποδίδεται στο διαφορετικό γονίδιο που χρησιμοποιήσαμε για την κανονικοποίηση. Το συμπέρασμα που βγάζουμε από αυτό το πείραμα είναι ότι η πρόσδεση της Rad10 δεν εξαρτάται από τον Aft1 αλλά δε μπορούμε να το συγκρίνουμε με τα πρώτα δύο πειράματα. Επίσης στο γονίδιο του FRE2 δε βλέπουμε να προσδένεται η Rad10 όπως προσδενόταν στο PHO5 γονίδιο στα δύο πρώτα πειράματα.

Συνοψίζοντας, μπορούμε από τα δύο πρώτα πειράματα να βγάλουμε το συμπέρασμα ότι η Rad10 προσδέεται στον υποκινητή και την 5' περιοχή του γονιδίου CTR1 με τρόπο ο οποίος εξαρτάται από το 4NQO, καθότι με την προσθήκη του φαρμάκου έχουμε μια μικρή αύξηση η οποία εξαρτάται από τον Aft1 ενώ όταν λείπει ο Aft1, η πρόσδεση αλλάζει ποσοτικά αλλά όχι ποιοτικά.

Μελλοντικά, θα μπορούσε να μελετηθεί κι άλλο η επίδραση του Aft1 σε πρόσδεση των NER παραγόντων, με διαφορετικά γονίδια-control και συνθήκες. Ακόμη, παρόλο που δε χρησιμοποιήσαμε τα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη FT5 aft1,2Δ για Rad7 και Rad10 που κατασκευάσαμε σε αυτή την εργασία, θα μπορούσαμε να μελετήσουμε τα ίδια ερωτήματα της παρούσας εργασίας για τους παράγοντες NER και στα διπλά μεταλλάγματα ώστε να δούμε και τον ρόλο που παίζει ο Aft2 στην όλη διαδικασία. Ακόμη, θα μπορούσε να μελετηθεί η φυσική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην Rad10 και τον Aft1, κάνοντας πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης.

- Θρεπτικά Μέσα

Για πλούσιο μέσο χρησιμοποιήθηκε YPD (Yeast Peptone Dextrose), ενώ για φτωχό μέσο SC (Synthetic Complete). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά YPD και SC στα οποία είχαν προστεθεί BCS (Bathocuproine Disulfonic acid- Na_2 salt: δεσμεύει Cu^{+2} και Cu^{+1}) και BPS (Bathophenanthroline Disulfonic acid- Na_2 salt: δεσμεύει Cu^{+2} , Cu^{+1} , Fe^{+2} , Fe^{+1}) 3 ώρες πριν μαζέψουμε τα κύτταρα, με σκοπό την επαγωγή χαλκοεξαρτώμενης μεταγραφής. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά YPD και SC στα οποία είχαν προστεθεί BCS και BPS 3 και 6 ώρες αντίστοιχα πριν μαζέψουμε τα κύτταρα. Σε όλες τις περιπτώσεις τα BCS και PBS προστέθηκαν ώστε τελική συγκέντρωση 100mM.

1. YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Για 1 λίτρο:

- ✓ 10 gr yeast extract
- ✓ 20 gr bactopectone (without amino acids)
- ✓ 20 gr dextrose (or glycose)
- ✓ 20 gr agar (το προσθέτουμε μόνο για να φτιάξουμε στερεό θρεπτικό μέσο σε πιάτα πετρί)

Προσθέτουμε όλα τα υλικά σε ογκομετρικό σωλήνα με μαγνητάκι που γυρίζει, και αν θέλουμε να φτιάξουμε στερεό θρεπτικό προσθέτουμε το άγαρ τελευταίο όταν τα υπόλοιπα έχουν ήδη διαλυθεί. Στη συνέχεια αποστειρώνουμε το διάλυμα για 20min στο αυτόκαυστο. Περιμένουμε να κρυώσει το διάλυμα. Αν προορίζεται για πιάτα πετρί, περιμένουμε να πάει 65°C και το μοιράζουμε 25ml σε κάθε πιάτο.

2. SC (Synthetic Complete)

Για 1 λίτρο:

- ✓ 6,7 gr Yeast Nitrogen Base without amino acids
- ✓ 20 gr dextrose (or glycose)
- ✓ 2gr amino acid mix
- ✓ 20 gr agar ((το προσθέτουμε μόνο για να φτιάξουμε στερεό θρεπτικό μέσο σε πιάτα πετρί)

Προσθέτουμε όλα τα υλικά σε ογκομετρικό σωλήνα με μαγνητάκι που γυρίζει, και αν θέλουμε να φτιάξουμε στερεό θρεπτικό προσθέτουμε το άγαρ τελευταίο όταν τα υπόλοιπα έχουν ήδη διαλυθεί. Στη συνέχεια αποστειρώνουμε το διάλυμα για 20min στο αυτόκαυστο. Περιμένουμε να κρυώσει το διάλυμα. Αν προορίζεται για πιάτα πετρί, περιμένουμε να πάει 65°C και το μοιράζουμε 25ml σε κάθε πιάτο.

- Απομόνωση πρωτεϊνών για Western Blot

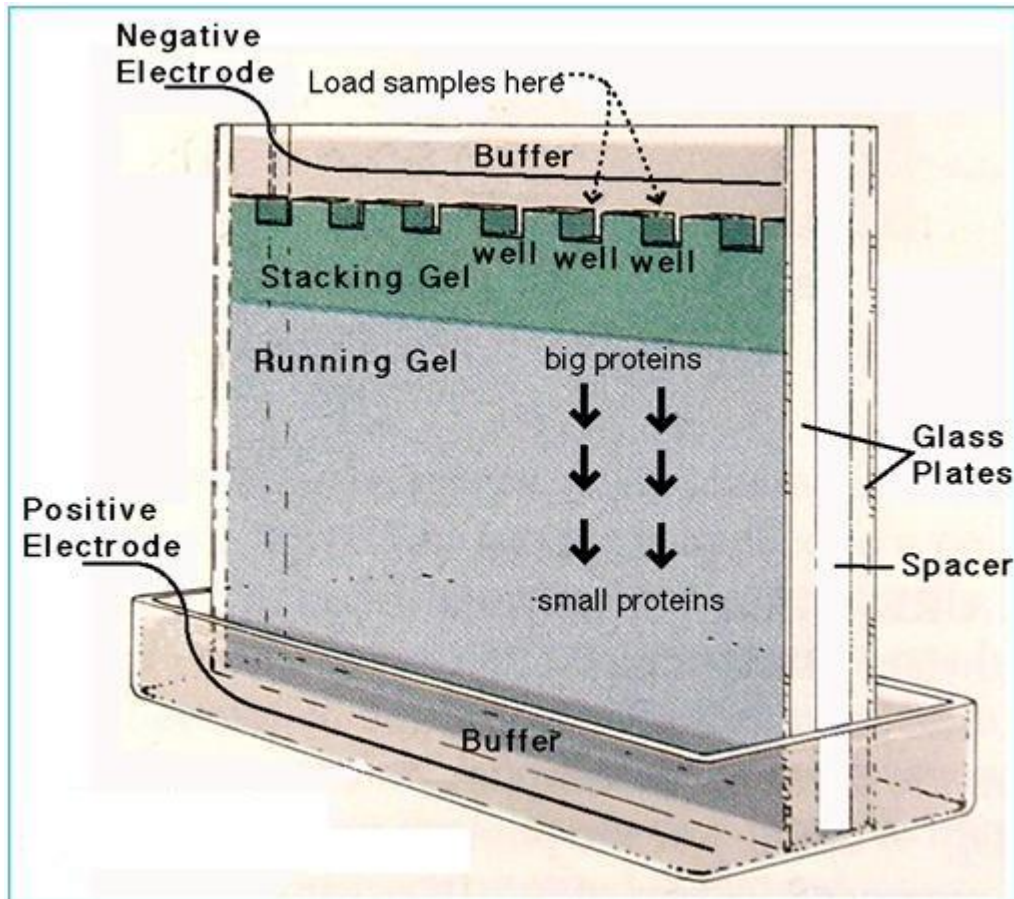
Για να τρέξουμε πρωτεΐνες χρειαζόμαστε για κάθε lane $2 \cdot 10^8$ κύτταρα. Η διαδικασία που ακολουθούμε για να καταλήξουμε σε ένα πρωτεϊνικό διάλυμα είναι η εξής:

1. Βάζουμε αρχική καλλιέργεια (5-10ml) και την αφήνουμε στους 30°C overnight.
2. Την επόμενη μέρα φωτομετρούμε στα 550nm και υπολογίζουμε πόση ποσότητα από την καλλιέργεια θα πάρουμε ώστε να καταλήξουμε με κύτταρα αρκετά για δύο πρωτεϊνικά gel, δηλαδή $5 \cdot 10^7$.
3. Βάζουμε την απαραίτητη ποσότητα καλλιέργειας σε errendorf και φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να πέσουν τα κύτταρα σαν πελέτες. Πετάμε το υπερκείμενο και κρατάμε τις πελέτες. Κρατάμε τα δείγματα στον πάγο καθ'όλη τη διάρκεια της απομόνωσης.
4. Επαναδιαλύουμε σε 500ml H_2O και ανακατεύουμε καλά κάνοντας vortex ώστε στην επόμενη φυγοκέντριση να απομακρυνθεί τελείως το θρεπτικό.
5. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Πετάμε το υπερκείμενο και κρατάμε την πελέτα.
6. Επαναδιαλύουμε σε 100ml H_2O και ανακατεύουμε να διαλυθεί η πελέτα.
7. Προσθέτουμε 100ml NaOH 0.2M και ανακατεύουμε με το χέρι. Αφήνουμε τα δείγματα για 5 min. Το NaOH χαλαρώνει τα κυτταρικό τοίχωμα και δημιουργεί τρύπες σε αυτό.
8. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πετάμε το υπερκείμενο και κρατάμε τις πελέτες.
9. Επαναδιαλύουμε σε 45ml Protein loading buffer για rapid prep 1X. Το protein loading buffer 1X περιέχει:
 - Tris/Cl 1M pH 6.8 (ρυθμίζει το pH)
 - glycerol (βαραίνει το δείγμα για να πέφτει στο πηγάδι του gel)
 - SDS 20% (φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες ώστε στο gel να τρέξουν προς τον θετικό πόλο)
 - β-mercaptoethanol (ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς ώστε να αναδιαταχθούν οι πρωτεΐνες και να τρέχουν εύκολα στο gel)
 - ίχνη bromophenol blue (για να βλέπουμε πόσο έχει τρέξει η πρωτεΐνη στο gel)
 - H_2O
10. Βάζουμε τα δείγματα στο water boiler για 5 min.
11. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Σε αυτό το σημείο μπορούμε να παγώσουμε τα δείγματα στους -20°C ή να φορτώσουμε τα δείγματα κατευθείαν στο πρωτεϊνικό gel, παίρνοντας με την πιπέτα από το υπερκείμενο του δείγματος.

- Western Blot

Στο Western Blot τρέχουμε πρωτεΐνες, με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος, σε gel ακρυλαμίδης. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο gel εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να τρέξουμε. Διαδικασία που ακολουθούμε για να φτιάξουμε το gel ακρυλαμίδης:

1. Συναρμολογούμε την συσκευή η οποία αποτελείται από μια κεραμική πλάκα και μια γυάλινη πλάκα ανάμεσα στις οποίες θα φτιαχτεί το gel. Η συσκευή απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα.



Source: <http://xoxymoronsx.wordpress.com/2009/01/23/sds-page>

2. Πρώτα φτιάχνουμε το Running gel το οποίο είναι το κομμάτι του gel στο οποίο τρέχουν οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι μεγάλες πρωτεΐνες τρέχουν πιο αργά από τις μικρές και με τον τρόπο αυτό διαχωρίζονται μεταξύ τους. Ανάλογα με το βάρος της πρωτεΐνης που θέλουμε να τρέξουμε, η επί τις εκατό σύσταση του gel σε ακρυλαμίδη αλλάζει. Γενικά, ισχύουν τα παρακάτω:
 - 12-43 kDA →15%
 - 16-68 kDA →10%
 - 36-94 kDA →7.5%
 - 57-212 kDA →5%
3. Φτιάχνουμε το Running gel. Το Running gel μπορεί να έχει διαφορετική επί τις εκατό περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη και επίσης μπορούμε να το φτιάξουμε σε διαφορετικές ποσότητες.
4. Κάνουμε sealing στο κάτω μέρος της συσκευής ώστε να μην τρέξει το gel, και στη συνέχεια βάζουμε το Running gel στη συσκευή ώστε να καλύπτει περίπου τα 2/3 της επιφάνειας της

- κεραμικής πλάκας της συσκευής. Από πάνω προσθέτουμε 1-2ml ισοπροπανόλη ώστε το Running gel να έχει ίσια επιφάνεια.
- Μόλις πήξει το Running gel χύνουμε την ισοπροπανόλη και φτιάχνουμε το Stacking gel και το βάζουμε πάνω από το Running. Το Stacking gel έχει σκοπό να φέρει τις πρωτεΐνες στην αρχή του Running ώστε να ξεκινήσουν ταυτόχρονα και από το ίδιο σημείο. Το Stacking gel έχει πάντα 5% περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα και μπορεί να φτιαχτεί σε διάφορες ποσότητες.
 - Βάζουμε από πάνω τα χτενάκια τα οποία θα σχηματίσουν τα πηγάδια μέσα στα οποία θα φορτώσουμε τις πρωτεΐνες.
 - Μόλις πήξει και το Stacking, βγάζουμε το gel από τη συσκευή όπως είναι ανάμεσα στην κεραμική και την γυάλινη πλάκα και το τοποθετούμε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πάνω από το gel καθώς και στο κάτω μέρος της συσκευής βάζουμε το Running buffer.
 - Φορτώνουμε σε κάθε πηγαδάκι το επιθυμητό ποσό δείγματος (όχι πάνω από 15μl) καθώς και 4μl πρωτεϊνικού και κλείνουμε το κύκλωμα ρεύματος ρυθμίζοντας την απαραίτητη ένταση.
 - Όταν δούμε ότι οι πρωτεΐνες έχουν τρέξει αρκετά και έχουν διαχωριστεί, σταματούμε τη διακοπή του ρεύματος και βγάζουμε το gel από τη συσκευή σημαίνοντας την μία γωνία ώστε να γνωρίζουμε τον σωστό προσανατολισμό.
 - Γεμίζουμε την συσκευή transfer με transfer buffer.
 - Τοποθετούμε στη συσκευή transfer το gel ώστε με προσανατολισμό από τον αρνητικό προς θετικό πόλο, να είναι τοποθετημένα: 2 (βρεγμένα με transfer buffer) χαρτιά Whattman κομμένα στο μέγεθος του gel, το gel, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ίδιο μέγεθος με το gel και μαρκαρισμένη στην ίδια γωνία με το gel ώστε να γνωρίζουμε το σωστό προσανατολισμό και άλλα 2 χαρτιά Whattman (βρεγμένα με transfer buffer). Κλείνουμε το κύκλωμα ρεύματος και ρυθμίζουμε την έντασή του.
 - Αφήνουμε να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel στη μεμβράνη στους 4°C στο cold room είτε κατά τη διάρκεια της νύχτας με ένταση ρεύματος 100mA είτε σε 1.5 ώρα με ένταση ρεύματος 220-250mA.
 - Όταν γίνει το transfer, αφαιρούμε την μεμβράνη από την συσκευή και για να δούμε εάν πέρασαν οι πρωτεΐνες πάνω, βάζουμε για 10-12sec με βαφή Ponceau. Εάν έχει γίνει η μεταφορά, παρατηρούμε ζώνες πρωτεϊνών.
 - Ξεπλένουμε την μεμβράνη με TBS-Tween.
 - Blocking μη ειδικών θέσεων με 25ml γάλα 5% (2,5gr γάλα σε σκόνη διαλυμένα σε 50ml TBS-Tween), για 1 ώρα στο shaker. Έτσι, το αντίσωμα θα προσδεθεί μόνο ειδικά.
 - Βάζω τη μεμβράνη σε ένα σακούλι χωρίς φουσκάλες αέρα που περιέχει 3-4ml γάλα 5% και το 1^ο αντίσωμα σε συγκέντρωση 1/1.000. Το αφήνω στο rotator για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Ξεπλένουμε 3 φορές με TBS-Tween για 10 λεπτά την κάθε φορά.
 - Βάζουμε το δεύτερο αντίσωμα που προσδέεται στο 1^ο αντίσωμα. Σε 20ml γάλα 1% βάζουμε 1μl αντίσωμα (συγκέντρωση 1/20.000) και το αφήνουμε στο shaker για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Ξεπλένουμε 3 φορές με TBS-Tween για 10 λεπτά την κάθε φορά.
 - Φτιάχνουμε ένα ισόποσο διάλυμα (για μια μεσαίου μεγέθους μεμβράνη, 1,5ml από το καθένα) με τις χρωστικές Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate και Thermo Scientific και ανακατεύουμε.

21. Απλώνουμε το διάλυμα πάνω στην μεμβράνη και στη συνέχεια τη σκεπάζουμε να μην εκτίθεται στο φως για 5min.
22. Στραγγίζουμε τη μεμβράνη και την τοποθετούμε στον δίσκο για να την εμφανίσουμε με το σύστημα LAS 3000.

Διαλύματα για το Western:

Running gel 6% (10ml)
H ₂ O → 5,3ml
acrylamide mix 30% → 2,0ml
Tris 1,5M pH 8,8 → 2,5ml
SDS 10% → 0,1ml
APS 10% → 0,1ml
TEMED → 0,008ml

Stacking gel 5% (3ml)
H ₂ O → 2,1ml
acrylamide mix 30% → 0,5ml
Tris 1,5M pH 6,8 → 0,38ml
SDS 10% → 0,03ml
APS 10% → 0,03ml
TEMED → 0,003ml

Running buffer (1L)
H ₂ O → 795ml
5X Tris glucine → 200ml
SDS 20% → 5ml

Transfer buffer (1L)
H ₂ O → 600ml
5X Tris glucine → 200ml
methanol → 200ml

TBS-Tween (1L)
H ₂ O → 944ml
Tris pH 8 → 20ml
NaCl 2,5M → 36ml
Tween → 500μl

- Απομόνωση γενωμικού DNA

Το πρωτόκολλο αυτό ακολουθείται εάν θέλουμε να απομονώσουμε συνολικό γενωμικό DNA από κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Βάζω αρχική καλλιέργεια 2ml και την αφήνω να μεγαλώσει overnight.
2. Βάζω 1,5ml από κάθε καλλιέργεια σε tubes και φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 1min.
3. Πετάω το υπερκείμενο και επαναδιαλύω σε 1ml H₂O και φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 1min.
4. Πετάω το υπερκείμενο και επαναδιαλύω σε 200μl lysis buffer for genomic extract.
5. Προσθέτω ίσο όγκο δηλαδή 200μl glass beads καθώς και μισό όγκο (100μl) φαινόλη και μισό όγκο (100μl) χλωροφόρμιο.
6. Σταθεροποιώ τα tubes και κάνω vortex για 4min ώστε να σπάσουν τα κύτταρα.
7. Προσθέτω 200μl H₂O και φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 5min.
8. Βάζω το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το DNA, σε νέα tubes, χωρίς να πάρω από την άσπρη μεσόφαση που δημιουργείται.
9. Προσθέτω 2,5 όγκους, δηλαδή 500μl αιθανόλη 100% για να γίνει η κατακρήμνιση του DNA και ανακατεύω ήπια με το χέρι ~10 φορές.
10. Φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 3min.
11. Πετάω το υπερκείμενο και τις βρωμιές στον πάτο. Το DNA έχει κολλήσει στα τοιχώματα του erpendorf.
12. Προσθέτω 200μl H₂O και 3μl RNase.
13. Ανακατεύω ήπια και τα βάζω στους 37°C για 15min.
14. Προσθέτω 2,5V, δηλαδή 500μl αιθανόλη 100% και ανακατεύω ήπια.
15. Φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 3min, και πετάω το υπερκείμενο.
16. Προσθέτω 2,5V, δηλαδή 500μl αιθανόλη 70% και ανακατεύω ήπια.
17. Φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 2min, και πετάω όσο πιο πολύ μπορώ από το υπερκείμενο.
18. Αφήνω πελέτες να στεγνώσουν στους 30°C (incubator) για μερικά λεπτά.
19. Επαναδιαλύω σε 30μl H₂O και βάζω στους 30°C με κλειστά τα καπάκια των tubes.

Lysis Buffer (τελική συγκέντρωση)
SDS → 1%
NaCl → 100mM
Tris pH 8 → 10mM
EDTA → 1mM
Triton → 2%

- Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP)

Το πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης μπορεί να απαντήσει σε πολλά διαφορετικά βιολογικά ερωτήματα όπως η εύρεση περιοχών DNA στις οποίες προσδένεται μια πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, αλλά και ανάποδα, η εύρεση των πρωτεϊνών που προσδένονται σε ένα κομμάτι DNA που μας ενδιαφέρει, όλα αυτά *in vivo*.

Ημέρα 1^η:

1. Αρχική καλλιέργεια 5-10ml overnight στους 30°C.

Ημέρα 2^η:

1. Φωτομετρούμε σε wavelength 500nm.
2. Αραιώνω τις αρχικές καλλιέργειες σε 50ml θρεπτικού την καθεμία ώστε τελική OD_{550nm}=0,2 και τις αφήνω να μεγαλώσουν έως ότου φτάσουν σε OD_{550nm}=0,9-1,0. Μαζεύω τις καλλιέργειες (45ml από την καθεμία) σε αποστειρωμένα falcon.
3. Κάνω cross-link των πρωτεϊνών πάνω στο DNA προσθέτοντας φορμαλδεΐδη 1,2ml (1% τελική συγκέντρωση) και αφήνω στο shaker για 20min.
4. Προσθέτω 2,3ml glycine (δεσμεύει την περίσσεια φορμαλδεΐδης) και αφήνω για 5min στο shaker.
5. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 3min στους 4°C.
6. Αφαιρώ υπερκείμενο και ξεπλένω 2 φορές με κρύο TBS buffer (1/2 του όγκου) δηλαδή 22,5ml και φυγοκεντρώ στις 2.500rpm για 2min στους 4°C.
7. Αφαιρώ το υπερκείμενο και φυγοκεντρώ στις 2.500rpm για 1min και αφαιρώ τελείως το υπερκείμενο με πιπέτα. Σε αυτό το σημείο μπορώ να φυλάξω τις πελέτες στους -80°C.

Ημέρα 3^η:

1. Επαναδιαλύω τις πελέτες σε 1ml FA 150mM και μεταφέρω το υγρό σε νέα tubes.
2. Κάνω ένα γρήγορο spin στις 13.000rpm για 1min.
3. Πετάω υπερκείμενο και επαναδιαλύω τις πελέτες σε τελικό όγκο (μαζί με τις πελέτες) 400μl FA 150mM.
4. Προσθέτω σε κάθε tube 400μl washed beads και 16μl proteinase inhibitor 25X EDTA-free. Κάνω vortex για 40min στους 4°C (cold room) ώστε να σπάσουν τα κύτταρα και να απελευθερωθεί η χρωματίνη. Από δω και στο εξής θα έχω τα δείγματα στον πάγο.
5. Παίρνω τα tubes και με μια βελόνα τρυπάω την κάτω μεριά και τοποθετώ κάθε ένα σε falcon 15άρι. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min στους 4°C έτσι ώστε να πάει το υγρό στο falcon και τα beads να μείνουν στο tube.
6. Μεταφέρω το υγρό σε νέα tubes και σπάω τη χρωματίνη με υπερήχους. Επεξεργάζομαι κάθε δείγμα 6 φορές για 12sec σε amplitude 40% της συνολικής ενέργειας. Αφήνω να περάσει ~1min ανάμεσα σε κάθε επανάληψη.
7. Φυγοκεντρώ 2 φορές στις 13.000rpm για 20min στους 4°C κρατώντας το υπερκείμενο σε νέα tubes κάθε φορά.
8. Μετρώ με την πιπέτα περίπου πόσα μl είναι το whole cell extract.
9. Κρατάω από τα whole cell extracts 6 μέρη: 5 για τα IP και 1 για τα INPUT. Κάθε μέρος πρέπει να περιέχει $6 \cdot 10^7$ cells. Άρα πρέπει σύνολο να πάρουμε από το whole cell extract $24 \cdot 10^7$ και υπολογίζουμε με τη μέθοδο των τριών σε πόσα ml αντιστοιχούν αυτά, και τα βάζουμε σε νέα tubes. Σε αυτά προσθέτουμε FA 150mM ανεβάζοντας τον όγκο στα 200μl. Σε αυτά προσθέτουμε protease inhibitor 25X EDTA-free.

10. Βάζω 40μl packed beads (20μl beads + 20μl buffer) στα tubes και τα αφήνω να γυρίζουν στη ρόδα στους 4°C για 2 ώρες.
11. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Κρατάω 6 μέρη από τα 200μl: 5 μέρη για το IP και 1 μέρος για το INPUT δηλαδή κάθε μέρος αντιστοιχεί σε 35μl. Βάζω 35μl στα INPUTS και τα φυλάω στους -20°C.
13. Στα IPs προσθέτω 33,5μl μέρος FA 150mM για να ξαναπάει ο όγκος στα 200μl καθώς και 2γ αντίσωμα (10μl) και 4μl protease inhibitor cocktail complete EDTA-free (stock 25X) και τα αφήνω να γυρίζουν στη ρόδα overnight στους 4°C. Τα beads θα προσδέσουν ειδικά το αντίσωμα το οποίο θα πιάσει την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει και θα βαρύνουν όλο το σύμπλοκο.

Ημέρα 4^η:

1. Βάζουμε τα IPs στον πάγο έως ότου εξισορροπήσουμε τα G sepharose (ή agarose) beads 3 φορές με FA 150mM.
2. Για κάθε δείγμα παίρνω από το stock των beads 20μl καθαρά beads και 20μl buffer (σύνολο 40μl) και τα βάζω σε ένα κοινό tube.
3. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 2min σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρώ το υπερκείμενο.
4. Προσθέτω 1ml FA 150mM και φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και πετάω υπερκείμενο. Επαναλαμβάνω άλλες 2 φορές.
5. Προσθέτω FA 150mM όσο ο όγκος των beads.
6. Φτιάχνω νέα tubes και τα κρατάω στον πάγο. Στο μεταξύ ανακατεύω με κομμένο tip τα beads με το buffer και παίρνω 40μl για κάθε δείγμα και τα βάζω στα καινούρια tubes.
7. Φυγοκεντρώ τα δείγματα 3.000rpm για 2min σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρω το υπερκείμενο στα tubes που ήδη έχουν τα beads.
8. Βάζω το carrier DNA για 2min στους 65°C και μετά για 5min στον πάγο. Προσθέτω 40γ σπέρμα σολομού (carrier DNA) το οποίο προλαμβάνει μη ειδική σύνδεση των beads πάνω στο DNA.
9. Βάζω τα δείγματα να γυρνούν στη ρόδα στους 4°C (cold room) για 2hrs.
10. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και πετάω το υπερκείμενο, κρατώντας τα beads.
11. Προσθέτω 1ml FA 150mM buffer και φρέσκο PMSF σε τελική συγκέντρωση 1mM και τα βάζω να γυρίζουν στη ρόδα σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών.
12. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και πετάω το υπερκείμενο, κρατώντας τα beads.
13. Επαναλαμβάνω τα βήματα 12-13.
14. Προσθέτω 1ml FA 500mM buffer και φρέσκο PMSF σε τελική συγκέντρωση 1mM και τα βάζω να γυρίζουν στη ρόδα σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
15. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και πετάω το υπερκείμενο, κρατώντας τα beads.
16. Επαναλαμβάνω τα βήματα 15-16 δύο φορές.
17. Προσθέτω 1ml WASH III buffer και τα βάζω να γυρίζουν στη ρόδα σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
18. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και πετάω το υπερκείμενο, κρατώντας τα beads.
19. Επαναλαμβάνω τα βήματα 18-19.

20. Προσθέτω 1ml TE buffer και τα βάζω να γυρίζουν στη ρόδα σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
21. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και πετάω το υπερκείμενο, κρατώντας τα beads.
22. Επαναλαμβάνω το βήμα 21.
23. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
24. Κρατάω 100μl συνολικά (beads + υπερκείμενο).
25. Στα INPUTS αυξάνω τον όγκο στα 100μl με TE buffer και προσθέτω 2μl RNase σε IPs και INPUTS.
26. Αφήνω τα δείγματα τους 37°C για 20min.
27. Βάζω τα INPUTS στον πάγο και έπειτα προσθέτω 1ml TE buffer στα IPs, ανακατεύω με το tip και φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
28. Πετάω το υπερκείμενο και κρατάω τα beads. Προσθέτω 250μl Elution buffer και βάζω τα δείγματα να γυρίζουν στη ρόδα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, κάνοντας κάθε 5 λεπτά vortex.
29. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min και μαζεύω το υπερκείμενο σε νέα tubes.
30. Κάνω back extraction: ξαναβάζω 250μl Elution buffer στα beads και βάζω τα δείγματα να γυρίζουν στη ρόδα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, κάνοντας κάθε 5 λεπτά vortex.
31. Φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 1min και προσθέτω το υπερκείμενο σε αυτό που υπάρχει ήδη στα tubes. Τώρα έχω συνολικά 500μl στα tubes.
32. Παίρνω τα INPUTs και τους προσθέτω 400μl Elution buffer ώστε να αυξηθεί ο όγκος τους στα 500μl.
33. Προσθέτω στα IPs και στα INPUTs 40μl NaCl, ανακατεύω λίγο στο χέρι και τα βάζω στους 65°C τουλάχιστον για 5hrs ή overnight. Με αυτό τον τρόπο θα γίνει το de-crosslinking.

Ημέρα 5^η:

1. Προσθέτω 1ml αιθανόλη 100% και τα βάζω στους -80°C για 2 ώρες ή overnight στους -20°C.
2. Φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 30min στους 4°C και πετάω το υπερκείμενο με μία κίνηση.
3. Πλένω την πελέτα με 600μl αιθανόλη 70%.
4. Φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 30min στους 4°C και πετάω το υπερκείμενο.
5. Στεγνώνω τις πελέτες στο Speed vac για μερικά λεπτά στους 30°C μέχρι να εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη.
6. Προσθέτω 200μl TE buffer και αφήνω τα δείγματα στον incubator στους 30°C για 10-15min να διαλυθεί το DNA στο υγρό.
7. Φτιάχνω ένα Proteinase K Mix το οποίο για κάθε δείγμα θα περιέχει:
22μl Proteinase K Buffer 10X
2μl Proteinase K (20μg/μl)
Ανακατεύω το mix καλά και σε κάθε δείγμα προσθέτω 24μl.
8. Βάζω τα δείγματα στο water bath στους 50°C για 30min.
9. Προσθέτω 100μl Φαινόλη και 100μl Χλωροφόρμιο.
10. Κάνω vortex για 10-12sec και φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Κρατάω το υπερκείμενο σε νέα tubes προσέχοντας να μην πάρω άσπρη βρωμιά της μεσόφασης και χωρίς να πετάξω τα παλιά, κάνω back extraction: προσθέτω στα παλιά 200μl TE buffer.
12. Κάνω vortex για 10-12sec και φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.

13. Κρατάω το υπερκείμενο μαζί με αυτό από το βήμα 11 στα νέα tubes. Πετάω τα παλιά tubes.
14. Προσθέτω 200μl Φαινόλη και 200μl Χλωροφόρμιο.
15. Κάνω vortex για 10-12sec και φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Κρατάω το υπερκείμενο σε νέα tubes προσέχοντας να μην πάρω άσπρη βρωμιά της μεσόφασης. Πετάω τα παλιά tubes.
17. Προσθέτω 400μl Χλωροφόρμιο και κάνω vortex για 10-12sec και φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Κρατάω το υπερκείμενο σε νέα tubes προσέχοντας να μην πάρω άσπρη βρωμιά της μεσόφασης. Πετάω τα παλιά tubes.
19. Προσθέτω 40μl οξικό νάτριο (NaAc) 3M pH 5,2 (1/10 του όγκου του δείγματος).
20. Προσθέτω 1μl γλυκογόνο και 1ml αιθανόλη 100% και ανακατεύω απαλά. Αφήνω στους -80°C overnight.

Ημέρα 6^η:

1. Φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 30min στους 4°C και αφαιρώ το υπερκείμενο.
2. Ξεπλένω τις πελέτες με 500μl αιθανόλη 70%.
3. Φυγοκεντρώ στις 13.000rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρώ το υπερκείμενο.
4. Στεγνώνω τις πελέτες στο speed vac μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.
5. Επαναδιαλύω τις πελέτες. Στα IPs βάζω 51μl H₂O, ενώ στα INPUTs βάζω 102μl H₂O (διπλάσια ποσότητα). Τα αφήνω στους 30°C (incubator) να διαλυθεί η πελέτα.
6. Μετρώ την ποσότητα DNA στο Nanodrop, μετρώντας 2μl από κάθε δείγμα.
7. Βάζω αντίδραση Real-Time PCR χρησιμοποιώντας:

Για αντίδραση 25μl	
Δείγμα	10μl
MgCl	2μl
dNTPs	0.5 μl
Primer Forward	0.2 μl
Primer Reverse	0.2 μl
Buffer Taq Pol	2.5 μl
Taq Pol	0.2 μl
Syber Green	1 μl
H ₂ O	8.4 μl

Διαλύματα για το CHIP:

TBS buffer (store at 4°C)
20mM Tris/HCl pH 7,5
200mM NaCl

Proteinase K buffer (store at 4°C)
0,01M Tris/HCl pH 7,8
0,005 EDTA pH 8,0
0,5% SDS

FA 150mM NaCl (store at 4°C)
50mM Hepes pH 7,5
150mM NaCl
1mM EDTA pH 8,0
1% Triton 100X
0,1% Sodium desoxycholat

FA 500mM NaCl (store at 4°C)
50mM Hepes pH 7,5
500mM NaCl
1mM EDTA pH 8,0
1% Triton 100X
0,1% Sodium desoxycholat

WASH III (store at 4°C)
10mM Tris/HCl pH 8,0
1mM EDTA pH 8,0
250mM LiCl
0,5% NP-40
0,5% Sodium desoxycholat

Elution buffer (store at 4°C)
50mM Tris/HCl pH 7,5
10mM EDTA pH 8,0
1% SDS

TE (store at 4°C)
10mM Tris/HCl pH 8,0
1mM EDTA pH 8,0

- Μετασχηματισμός κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*

Κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού γίνεται εισαγωγή DNA (συνήθως πλασμιδιακού) που φέρει κάποιες συγκεκριμένες ιδιότητες (για παράδειγμα, κάποιον επίτοπο όπως το 9Μyc).

1. Βάζω αρχική καλλιέργεια κυττάρων *S. cerevisiae* σε 5-10ml θρεπτικό YPD overnight στους 30°C.
2. Την επομένη, αραιώνω την αρχική καλλιέργεια σε 50ml YPD και περιμένω να πάει η OD₅₅₀ περίπου 0,6-0,8.
3. Μεταφέρω την καλλιέργεια σε αποστειρωμένο falcon παρουσία φλόγας και φυγοκεντρώ στις 3.000rpm για 5min στους 4°C.
4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο παρουσία φλόγας και προσθέτουμε 1/2V νερό και φυγοκεντρούμε στις 3.000rpm για 5min στους 4°C.
5. Αφαιρούμε το νερό και ξανακάνουμε ένα γρήγορα spin ώστε να το αφαιρέσουμε όλο με πιπέτα.
6. Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 1ml 100mM LiAc και μεταφέρουμε το διάλυμα σε erpendorf. Το LiAc δημιουργεί τρύπες στο κυτταρικό τοίχωμα και επειδή είναι 100mM προετοιμάζει τα κύτταρα για το LiAc 1mM.
7. Φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για 7sec (spin) για να αφαιρέσουμε το υπερκείμενο.
8. Για 1 μετασχηματισμό, προσθέτουμε αυστηρά με την παρακάτω σειρά τα εξής:
9. -240μl PEG 3350 50% (αποστειρωμένο). Το PEG αυξάνει την συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να γίνει πιο εύκολα ο μετασχηματισμός.
 - 36μl 1M LiAc
 - 5μl (10γ/λ) DNA carrier (σπέρμα σολομού)
 - 70μl H₂O και πλασμιδιακό DNA (0,1-10γ)
10. Κάνουμε vortex για επαναδιάλυση των κυττάρων.
11. Επωάζουμε για 30min στους 30°C.
12. Επωάζουμε στο waterbath για 30min στους 42°C ώστε να γίνει το heat shock των κυττάρων. Εάν πρόκειται για πλασμιδιακό που περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (KAN), μετά το waterbath το βάζουμε σε ~3ml YPD για 3hrs ώστε να επανακάμψουν τα κύτταρα.
13. Φυγοκεντρούμε στις 4.000rpm για 4min και αφαιρούμε το μίγμα μετασχηματισμού.
14. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 200μl SC ή H₂O και απλώνουμε σε πιάτο επιλογής SC (αφού το στεγνώσουμε στο UV με ανοιχτό τον εξαερισμό για 10min περίπου) που περιέχει τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυττάρων.

- Συμβατική PCR

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσουμε εκλεκτικά, με τη βοήθεια εκκινητών, κομμάτια DNA.

Σε μια αντίδραση των 25μl, τα συστατικά που βάζουμε είναι τα εξής:

1. Υπόστρωμα DNA → 5μl (3μl+2μl H₂O)
2. Taq polymerase 10X buffer → 2,5μl
3. Mg₂Cl 25mM → 2μl
4. dNTPs → 0,5μl
5. primer forward → 0,25μl (stock 1γ/μl)
6. primer reverse → 0,25μl (stock 1γ/μl)
7. Taq polymerase → 0,25μl
8. H₂O → 14,25μl

Ανάλογα με τα δείγματα για τα οποία θέλουμε να κάνουμε PCR, πολλαπλασιάζουμε τις παραπάνω ποσότητες. Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR συμβαίνουν με την εξής σειρά, τα παρακάτω:

1. Για 5min στους 90°C ώστε να διαχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA μεταξύ τους.
2. Για 30sec στους 90°C ώστε να διαχωρίζονται οι δύο αλυσίδες πριν από κάθε κύκλο αντίδρασης.
3. Για 30sec σε θερμοκρασία τέτοια ώστε να κολλήσουν οι primers στο DNA. Ανάλογα με τους primers, αυτή η θερμοκρασία διαφέρει και μπορεί να είναι από 52°C έως 62°C.
4. Στους 72°C γίνεται η επιμήκυνση των συντιθέμενων κλώνων DNA και η διάρκεια του βήματος αυτού αυξάνεται σε σχέση με το μήκος του κομματιού DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η Taq polymerase έχει ταχύτητα πολλαπλασιασμού 1kb/min.
5. Ανάλογα με την ποσότητα που θέλουμε να έχουμε, επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2-4. Συνήθως βάζουμε 30-35 κύκλους.
6. Για 15min στους 72°C γίνεται η επώαση ώστε να ολοκληρωθεί η επιμήκυνση των κομματιών.
7. Στους 16°C μένουν τα δείγματα όταν τελειώσει η PCR μέχρι να βγάλουμε τα δείγματα από το μηχάνημα.

- Real Time PCR (Q-PCR)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται, όπως και η συμβατική PCR, για να πολλαπλασιάσουμε επιλεκτικά κάποια κομμάτια DNA. Η διαφορά είναι ότι στην Real time PCR μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε κάποια δείγματα μεταξύ τους σε σχέση με την αρχική τους ποσότητα επακριβώς. Για μια αντίδραση Real time PCR των 25μl, τα συστατικά που βάζουμε είναι :

1. Υπόστρωμα DNA → 5μl (ανάλογα με τα γ/μl)
2. Taq polymerase 10X buffer → 2,5μl
3. Mg₂Cl 25mM → 2μl
4. dNTPs → 0,5μl
5. primer forward → 0,2μl
6. primer reverse → 0,2μl
7. Taq polymerase → 0,2μl
8. SYBR Green → 1μl
9. H₂O → 13,4μl

Ανάλογα με τα δείγματα για τα οποία θέλουμε να κάνουμε PCR, πολλαπλασιάζουμε τις παραπάνω ποσότητες. Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης Real Time PCR συμβαίνουν με την εξής σειρά, τα παρακάτω:

1. Επώαση στους 94°C για 2min.
2. Επώαση στους 94°C για 30sec.
3. Επώαση στους 54°C για 30sec. Η θερμοκρασία εξαρτάται από τους primers.
4. Επώαση στους 72°C για 30sec.
5. Επώαση στους 79°C για 1sec.
6. Plate read δηλαδή μετράται ο φθορισμός. Αυτό το στάδιο μπορεί να γίνει και σε πιο ψηλή/χαμηλή θερμοκρασία.
7. Επανάληψη των βημάτων 2-6 για 30-40 φορές, όσοι και οι κύκλοι πολλαπλασιασμού.
8. Επώαση στους 72°C για 2min ώστε να γίνει η τελική επιμήκυνση των τμημάτων.
9. Μέτρηση του προϊόντος από τους 60°C-94°C για 1sec και κάθε μισό βαθμό Κελσίου, ώστε να φτιαχτεί η καμπύλη.
10. Επώαση στους 15°C μέχρι να πάρουμε τα αποτελέσματα από τον υπολογιστή και να σταματήσουμε την αντίδραση.

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

1. F. Sherman, Getting started with yeast, *Methods Enzymol.* 350, 3-41 (2002)
2. www.yeastgenome.org
3. David O Morgan, *The Cell Cycle-Principles of Control*, Oxford University Press (2007)
4. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell* 5th Edition, Garland Science (2008)
5. Jan H. Hoeijmakers (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* vol.411 May 2001
6. Shirong Yu, Tom Owen-Hughes, Errol C. Friedberg, Raymond Waters, Simon H. Reed. (2004). The yeast Rad7/Rad16/Abf1 complex generates superhelical torsion in DNA that is required for nucleotide excision repair. *DNA Repair*. Vol 3, 277-287.
7. Sami N. Guzder, Patrick Sung, Louise Prakash and Satya Prakash. (1997). The DNA-dependent ATPase activity of Yeast Nucleotide Excision Repair Factor 4 and its role in DNA Damage recognition. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 273, 6292-6296.
8. Paul Reynolds, Louise Prakash, Dennis Dumais, Giuditta Perozzi and Satya Prakash (1985) Nucleotide sequence of the RAD10 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *The EMBO journal* vol.4 no.13A pp3549-1552.
9. Kamileri I, Karakasilioti I, Sideri A, Kosteas T, Tatarakis A, Talianidis I, Garinis GA. (2012) Defective transcription initiation causes postnatal growth failure in a mouse model of nucleotide excision repair (NER) progeria. *PNAS* Vol, 109 (8), 2995-3000
10. Christos Andreadis, PhD: Genome-wide localization and expression of *S. cerevisiae* Rad9 under non DNA-damage conditions and Role of Aft1 transcription factor (2012)
11. Gkousgkou et al, unpublished.
12. Sharon Berthelet, Jane Usher, Kristian Shulist, Akil Hamza, Nancy Maltez, Anne Johnston, Ying Fong, Linda J. Harris and Kristin Baetz. (2010). Functional Genomics Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Iron Responsive Transcription Factor Aft1 Reveals Iron-Independent Functions. *Genetics* 185, 1111-1128.
13. Egly, J. M., and Coin, F. (2011). A history of TFIIH: two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. *DNA Repair (Amst)* 10, 714-721.
14. Naiki, T., Wakayama, T., Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2004). Association of Rad9 with double-strand breaks through a Mec1-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 24, 3277-3285.
15. Bird, A. J. (2008) Metallosensors, the Ups and Down of Gene Regulation. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 5.

