

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

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

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της μεταλλορυθμιζόμενης μεταγραφής στον
Saccharomyces cerevisiae: Απομόνωση νέων πολυπρωτεϊνικών
συμπλόκων – Νέος ρόλος της πρωτεΐνης ελέγχου του κυτταρικού
κύκλου Rad9 στη Mac1-ρυθμιζόμενη μεταγραφή**

Καλλιόπη Γκούσκου

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

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

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

**INTERDEPARTMENTAL PROGRAM OF
MOLECULAR BIOLOGY AND BIOMEDICINE**

PhD THESIS

Study of metalloregulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: Purification of new polyprotein complexes – New role of Rad9 cell cycle checkpoint protein in Mac1-regulated transcription

Kalliopi Gkouskou

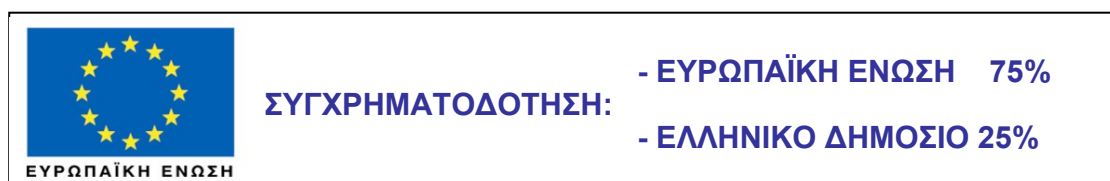
HERAKLION 2007

Τίτλος έργου:

Μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνικών μορίων ειδικού βιοτεχνολογικού και ιατρικού ενδιαφέροντος – σχεδιασμός και παραγωγή νέων βιολογικά δραστικών μορίων για βιοτεχνολογικές και κλινικές εφαρμογές

Υποέργο:

Μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταγραφικών και άλλων ρυθμιστικών παραγόντων που εμπλέκονται στην ομοιόσταση μετάλλων (χαλκού/ σιδήρου) για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση σοβαρών γενετικών ασθενειών και την προώθηση βιοτεχνολογικών εφαρμογών σε φυτά

ΕΡΓΟ : 01ΕΔ119**ΦΟΡΕΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ:****ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΤΕ**

την μνήμη του παππού μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα κάποιων ανθρώπων δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Δρ Δέσποινα Αλεξανδράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης όχι μόνο για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια αλλά κυρίως επειδή πίστεψε σε μένα και στις δυνατότητές μου σε εποχές που και εγώ η ίδια αμφισβητούσα τον εαυτό μου.

Επίσης ευχαριστώ τα άλλα δύο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Δρ Ι. Ταλιανίδη Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Φλέμινγκ και τον Δρ Ι. Παπαμαθθαίακη Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης αλλά και τον Δρ Γ. Θηραίο Ερευνητή Α΄ του IMBB των οποίων οι συμβουλές υπήρξαν πολύτιμες για την λογική ροή και την βέλτιστη δομή της διδακτορικής μου διατριβής.

Είμαι ευγνώμων και στα άλλα τέσσερα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας διατριβής, τους καθηγητές Α. Γραβάνη, Ν. Πανόπουλο, Γ. Χαλεπάκη και Κ. Τοκατλίδη.

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει στους φίλους και συνεργάτες μου Δρ Γ. Φραγκιαδάκη και στον υποψήφιο διδάκτορα Χ. Ανδρεάδη που μου παρείχαν πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές καθώς και ανιδιοτελή και ανυπολόγιστη υποστήριξη κατά την διάρκεια δύσκολων στιγμών.

Επίσης από τα βάθη της καρδιάς μου πολλά ευχαριστώ σε όλα τα «παιδιά» (ξέρω Ηλίακαι στα εγγόνια) που πέρασαν κατά την διάρκεια αυτών των χρόνων από το εργαστήριο και κυρίως στο Ναντινούλι, στη Νίκη, στο Βολουδάκιον και στο Γιαννάκι για την στενή συνεργασία, τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την πολύτιμη υποστήριξη σε ευχάριστες και δυσάρεστες στιγμές.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Α. Αργυροκαστρίτη και τον Ι. Καγιαμπάκη, δυο φίλους που δε βλέπω πια διότι.... για διαφορετικούς λόγους ο καθένας, μένουν αρκετά μακριά και έχουμε χαθεί εξ' ανάγκης. Οι άνθρωποι αυτοί χωρίς να το γνωρίζουν ή να το επιδιώκουν διαμόρφωσαν τον τρόπο σκέψης μου στο πέρασμα του χρόνου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Τάκη Μακατουνάκη, τη Νίκη Κρετσόβαλη, το Γιάννη Παπανικολάου, τη Φοίβη Σταυρίδη, το Θωμά Γληγόρη, το Γιάννη Ζαχαριουδάκη, τη Νίκη Γουναλάκη και τη Χρυσούλα Πιτσούλη για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές και συζητήσεις. Ευχαριστώ και την κα Ελένη που με έκανε να χαμογελάω ακόμα και τις μέρες που όλα μου φαίνονταν μαύρα.

Οφείλω ακόμα πολλές ευχαριστίες στην Dr Susana Rodriguez-Navarro καθώς και στα παιδιά του εργαστηρίου της Pau, Anna και Bernardo για την πολύτιμη επιστημονική συνεργασία και την φιλοξενία που μου παρείχαν στην Ισπανία.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου Ελπίδα, Ειρήνη, Άγγελο, Σοφία, Χαρούλα, Κέλλυ, Μελίνα, Μαρία και Δέσποινα που δεν μου γύρισαν ποτέ την πλάτη και μοιράστηκαν μαζί μου τους φόβους μου, τις ανησυχίες και τις χαρές μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Γιάννη μου, στο αδελφάκι μου, στους γονείς μου και κυρίως στη γιαγιά μου και στην αδελφή της για την ηθική και οικονομική στήριξη και να αφιερώσω το διδακτορικό μου στην μνήμη του παππού μου. Η ψυχική του δύναμη και η αισιοδοξία με την οποία αντιμετώπιζε τη ζωή θα αποτελούν πάντα πηγή έμπνευσης για μένα.

ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ

A) Περίληψη.....	2
B) Γενική Εισαγωγή.....	7
Γ) Κεφάλαιο 1: <i>Νέος ρόλος της πρωτεΐνης έλεγχου του κυτταρικού κύκλου Rad9, στη Mac1 ρυθμιζόμενη μεταγραφή</i>	39
Δ) Κεφάλαιο 2: <i>Νέος ενεργοποιητικός ρόλος της Hir1 στην έναρξη και επιμήκυνση της μεταγραφής του Mac1-εξαρτώμενου γονιδίου CTR1 μέσω συνεργασίας με διαφορετικού παράγοντες</i>	87
Ε) Κεφάλαιο 3: <i>Απομόνωση μεταλλορυθμιζόμενων δυναμικών πολυπρωτεϊνικών μεταγραφικών συμπλόκων και ταυτοποίηση πρωτεϊνών που συναντώνται σε αυτά</i>	113
ΣΤ) Συμπεράσματα.....	124
Z) Μελλοντικά Σχέδια.....	128
Η) Υλικά και μέθοδοι.....	131
Θ) Δημοσιεύσεις σε προετοιμασία / Συμμετοχές σε συνέδρια.....	159
I) Βιβλιογραφία.....	161

A) ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Mac1 αποτελεί χαλκορυθμιζόμενο, μεταγραφικό παράγοντα του *Saccharomyces cerevisiae*. Προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες DNA και ρυθμίζει γονίδια (π.χ. *CTR1*, *CTR3*, *FRE1*, *FRE7*), οι πρωτεΐνες των οποίων είναι υπεύθυνες για την είσοδο του χαλκού στο κύτταρο. Η λειτουργικότητα του Mac1 επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία ιόντων χαλκού και πιθανόν τροποποιείται μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Voutsina et al., 2001). Για ανεύρεση τέτοιων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν πειράματα σάρωσης γενωμικής βιβλιοθήκης με την τεχνολογία των δύο υβριδίων στη ζύμη (Bilsland et al., 2004; Voutsina et al., 2005). Μεταξύ των αλληλεπιδρώντων βρέθηκε η πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη Rad9 και η τσαπερόνη ιστονών Hir1.

Η Rad9 ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και είναι απαραίτητη στην μεταβίβαση σήματος για επιδιόρθωση, όταν το DNA υποστεί βλάβη (σπάσιμο της δίκλωνης αλυσίδας) από ακτινοβόληση με ακτίνες X. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η Rad9, εκτός από τον ρόλο της ως πρωτεΐνη ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoint protein), έχει ένα νέο ρόλο στην εξαρτώμενη από την RNA πολυμεράση II-μεταγραφή. Συγκεκριμένα, βρήκαμε ότι η Rad9 αλληλεπιδρά άμεσα μέσω της BRCT επικράτειάς της με τον χαλκορυθμιζόμενο μεταγραφικό παράγοντα Mac1 επιδρώντας αρνητικά τόσο στην δυνατότητα πρόσδεσης του στο DNA όσο και στην μεταγραφική του δυνατότητα. Επιπλέον βρήκαμε την Rad9 να στρατολογείται στα ρυθμιζόμενα από τον Mac1 γονίδια και μάλιστα η στρατολόγησή της να εξαρτάται από τον Mac1. Η στρατολόγηση της δε, δεν περιορίζεται μόνο στον υποκινητή των Mac1 ρυθμιζόμενων γονιδίων. Επεκτείνεται και κατά μήκος της κωδικής περιοχής του γονιδίου *CTR1*, ακολουθώντας μάλιστα το ιδιαίτερο πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II. Αποδείξαμε ότι αποκλειστικά υπεύθυνα για την στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή είναι στοιχεία του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής αφού πετύχαμε την στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή του γονιδίου *ACT1* (όπου φυσιολογικά δεν στρατολογείται) συγχωνεύοντας στο 5' άκρο του στο γονιδίωμα τον υποκινητή του γονιδίου *CTR1*. Μάλιστα δείξαμε ότι η στρατολόγηση

της στην κωδική περιοχή εν μέρει οφείλεται στην πρωτεΐνη Hir1 (τσαπερόνη ιστονών) η οποία εμπλέκεται τόσο στην έναρξη όσο και στην επιμήκυνση της μεταγραφής του *CTR1* (βλέπε παρακάτω). Αντίθετα, η διμεθυλίωση της ιστόνης H3 στην K79 γνωστή για την αναγνώρισή της από την Rad9 σε περίπτωση βλάβης στο DNA (Huyen et al., 2004), δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή του *CTR1*. Ταυτόχρονα βρήκαμε την Rad9 να αλληλεπιδρά φυσικά και γενετικά και με παράγοντες που εμπλέκονται στην έναρξη και επιμήκυνση της μεταγραφής του *CTR1* (όπως η Hir1) και παράλληλα να στρατολογεί στην κωδική περιοχή του *CTR1* και άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA (για παράδειγμα την κινάση Rad53). Τα δεδομένα μας, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το *CTR1* (και η «γειτονία» του *FRE1*) ανήκει σε μια ομάδα γονιδίων που χαρακτηρίζονται ως hotspot για μειωτικό ανασυνδυασμό (ο οποίος ξεκινά με σπάσιμο της δίκλωνης αλυσίδας του DNA), μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως η Rad9 έχει διαμεσολαβητικό ρόλο μεταξύ στοιχείων του συμπλόκου της μεταγραφικής μηχανής και του συμπλόκου επιδιόρθωσης του DNA κάτω από φυσιολογικές, χωρίς προκλήσεις συνθήκες. Συνεπώς στοιχεία της μεταγραφικής μηχανής (κυρίως χρωματινικοί αναδιαμορφωτές) είναι παρόντα στην περιοχή έναρξης του μειωτικού ανασυνδυασμού και διαθέσιμα να χρησιμοποιηθούν από τον επιδιορθωτικό μηχανισμό του DNA υπό την επίβλεψη του Rad9.

Παράλληλα διερευνήσαμε περαιτέρω τον ρόλο της Hir1, που όπως προαναφέρθηκε αλληλεπιδρά με την Rad9 αλλά και με τον Mac1 (δείχνονται *in vitro* και *in vivo* - Voutsina et al 2005). Ο Mac1 αποτελεί τον μοναδικό παράγοντα που προσδένεται στο DNA και αλληλεπιδρά με την Hir1 (Voutsina et al 2005). Γενετικά και βιοχημικά πειράματά μας, έδειξαν ότι η Hir1 παίζει ενεργοποιητικό ρόλο κατά την έναρξη της μεταγραφής σε συνθήκες επαγωγής (έλλειψης χαλκού) επηρεάζοντας άμεσα την στρατολόγηση του βασικού χρωματινικού αναδιαμορφωτή Snf2. Ταυτόχρονα βρήκαμε ότι και η Hir1 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1* ακολουθώντας το πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II. Επίσης η Hir1 δρα σε συνδυασμό με τον παράγοντα Spt16 (υπομονάδα του γFACT) επάγοντας την επιμήκυνση της μεταγραφής του *CTR1*. Ο αναδιαμορφωτής Snf2 ενώ εντοπίζεται στην κωδική περιοχή δεν ακολουθεί το πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II. Επομένως αποκαλύψαμε ένα νέο ρόλο για την Hir1 κατά τον οποίο εμπλέκεται τόσο στην έναρξη όσο και στην επιμήκυνση της

μεταγραφής μιας νέας ομάδας γονιδίων που επάγονται από την έλλειψη χαλκού, συνεργαζόμενη σε κάθε φάση του μεταγραφικού κύκλου με διαφορετικούς παράγοντες.

Υπό το φως των παραπάνω αποτελεσμάτων, ιδιαίτερη σημασία αποκτούν πειράματα ταυτοποίησης πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων με διαδοχική ανοσοκατακρήμιση και ανάλυση με φασματομετρία μάζας που πραγματοποιήσαμε πρόσφατα (σε συνεργασία με την Dr.Rodriguez–Navarro / Institute of Principe Philippe, Valencia, Spain) με στόχο να απομονώσουμε σύμπλοκα που φέρουν το σύνολο των παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τους μεταλλορυθμιζόμενους μεταγραφικούς παράγοντες σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας. Αναμένουμε η προσέγγιση αυτή να συμβάλλει τόσο στην περαιτέρω ανάλυση όσο και στην κατανόηση δράσης κομβικών πρωτεϊνών και μηχανισμών που ρυθμίζουν πλήθος περιβαλλοντικά επαγόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών.

ABSTRACT

In *Saccharomyces cerevisiae*, Mac1 is a copper-regulated. Mac1 recognizes and binds to specific DNA sequences and activates genes involved in copper uptake (*CTR1*, *CTR3*, *FRE1*, *FRE7*). Previous evidence suggested that, in addition to copper (copper ions negatively regulate Mac1), protein interactions could modulate Mac1 function (Voutsina et al., 2001). In order to identify such proteins, a genomic expression library was screened using the two yeast hybrid technology (Bilsland et al., 2004; Voutsina et al., 2005). Among the potentially Mac1-interacting proteins, the nuclear phosphoprotein Rad9 and the histone chaperone Hir1 were identified.

Rad9 is a prototype DNA-damage checkpoint protein required for the DNA checkpoint pathway when DNA damage occurs (double strand break) by X-ray irradiation through out the cell cycle. In this study, we present evidence indicating a new direct role of Rad9 in RNA polymerase II-dependent transcription that is independent of cell cycle checkpoint. We found Rad9 to associate directly with the copper-regulated transcriptional activator Mac1 and exert a negative effect on both its DNA binding and transactivation functions. We also found Rad9 to be recruited on Mac1-regulated genes in a Mac1-dependent manner. It was not only associated with *CTR1* promoter but also along the *CTR1* protein coding region. This Rad9 localization, coincided with transcriptional induction, correlated with the characteristic quantitative association pattern of RNA polymerase II and we also found that components of the Mac1-dependent transcriptional initiation complex were exclusively responsible for Rad9 localization in the coding region of *CTR1* since we were able to transfer Rad9 in the coding region of *ACT1* (where Rad9 is not normally localized) artificially fused downstream to the *CTR1* promoter in the genome. We also found that Rad9 localization in the coding region was partly dependent on the Hir1 histone chaperone which is involved in transcription initiation and elongation of *CTR1* (see below). On the contrary, histone H3 dimethylation of K79 known to be recognized by Rad9 under DNA damage conditions (Huyen et al., 2004) was irrelevant to Rad9 localization in the *CTR1* coding region. We also identified new genetic and physical associations of Rad9 with elongating factors (e.g. Hir1), Mac1 interacting proteins and Rad9 dependent localization of DNA damage effectors on *CTR1* gene (e.g.

Rad53 kinase). Our data, in combination with the fact that *CTRI* (and *FRE1* «neighborhood») belongs to a group of genes that are characterized as hotspots for meiotic recombination (which is initiated by the formation of DSB) point to a new role for Rad9 mediating a crosstalk between transcription and DNA repair under physiological unchallenged conditions. When meiotic recombination begins, components of the transcriptional machinery (mainly chromatin remodelers) are already present ready to be used by the DNA repair machinery under the surveillance of Rad9.

In parallel, we further investigated the role of Hir1 which as we mentioned before interacts with Rad9, on Mac1 regulated transcription. Our genetic and biochemical evidence suggests that Hir1 facilitates transcriptional activation of induced *CTRI* expression by affecting Snf2 recruitment since we demonstrated that Snf2 and Hir1 partially depend on each other for their localization on *CTRI* promoter and both associate with the protein coding region of *CTRI*. We also showed that Hir1 association follows that of the elongating RNA polymerase II but Snf2 does not. Moreover, we found that Hir1 acts in combination with the Spt16 (component of the yFACT complex) on the induced *CTRI* transcription. Thus we demonstrated a novel activating role for Hir1 protein on a new category of RNA polymerase II genes, those responding to copper depletion. Its role was revealed by distinct interacting partners in the Mac1-dependent *CTRI* transcriptional initiation and elongation.

In light of the above data we performed protein complex identification experiments by immunoprecipitation and mass spectrometry analysis (in cooperation with Dr. Rodriguez-Navarro / Institute of Principe Philippe, Valencia, Spain) and we expect them to reveal novel protein associations between regulators of transcription, metalloregulated transcription and DNA damage surveying and response pathways. We believe that this approach will help us in analysing and understanding the cross-talking mechanisms governing environmentally induced signalling pathways.

B) ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

E.1	Εισαγωγή στη Μεταγραφή.....	8
E.1α	Έναρξη της μεταγραφής.....	9
E.1β	Επιμήκυνση της μεταγραφής.....	13
E.1γ	Λήξη της μεταγραφής (Συνοπτική παρουσίαση μοντέλων).....	16
E.1δ	Τροποποιήσεις ιστονών	19
E.2	Εισαγωγή στο μοντέλο σύστημα μεταλλορυθμιζόμενης μεταγραφής.....	23
E.3	<i>MAC1</i>	27
E.3α	Δομική περιγραφή του μεταγραφικού παράγοντα Mac1.....	
E.3β	Λειτουργία και τρόποι ρύθμισης του Mac1.....	29
E.4	Εισαγωγή στο μοντέλο οργανισμό σχετικά με τις δυνατότητες γενετικής μοριακής και βιοχημικής ανάλυσης της μεταγραφικής ρύθμισης	31
E.5	Στοιχεία που οδήγησαν στην διερεύνηση ύπαρξης αλληλεπιδρώντων με τον Mac1 και πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με αυτόν.....	35

E.1 Εισαγωγή στη Μεταγραφή

Ο σχηματισμός, η ανάπτυξη, η προσαρμογή σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και η επιβίωση ενός οργανισμού (μονοκύτταρου ή πολυκύτταρου) εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την χρονικά, ποσοτικά και τοπικά εντοπισμένη και ρυθμιζόμενη έκφραση των γονιδίων (μεταγραφή). Ο εντοπισμός και η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνονται με την συμμετοχή στοιχείων του κυττάρου τα οποία μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα *cis* και τα *trans* στοιχεία. Με τον όρο *cis* χαρακτηρίζονται DNA αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα με το ρυθμιζόμενο γονίδιο όπως για παράδειγμα υποκινητές και ενισχυτές ενώ *trans* στοιχεία χαρακτηρίζονται κυρίως πρωτεΐνες ή RNA που στρατολογούνται στα μεταγραφόμενα γονίδια και εκφράζονται από γονίδια που βρίσκονται συνήθως σε άλλα χρωμοσώματα (Savarese and Grosschedl, 2006). Την τελευταία κυρίως δεκαετία μεγάλος όγκος πληροφορίας έχει συλλεχθεί σε σχέση με τον τρόπο με τον οποίο το DNA είναι πακεταρισμένο σε χρωματίνη, με τις τροποποιήσεις που μπορεί η χρωματίνη να υποστεί καθώς και με το πώς τα γεγονότα αυτά επηρεάζουν την γονιαδική έκφραση (Hampsey, 1998).

Οι αρχές που διέπουν το μηχανισμό της μεταγραφής του DNA είναι παρόμοιες σε όλους τους οργανισμούς προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς αν και η μεταγραφική μηχανή των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι αρκετά πολυπλοκότερη. Τα βήματα σε ένα τυπικό κύκλο της RNA πολυμεράσης περιλαμβάνουν αρχικά πρόσδεση του ενεργοποιητή (TFs) στον υποκινητή (αριστερά από το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής). Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στην στρατολόγηση συμπλοκών (SAGA και Mediator) που ως ρόλο έχουν την διευκόλυνση πρόσδεσης της γενικής μεταγραφικής μηχανής (GTFs). Η RNA πολυμεράση με ένα σύνολο άλλων παραγόντων (της TBP αρχικά όπως δείχνουν πειράματα *in vitro* και κατόπιν των TFIID, TFIIA και TFIIB (Lee and Young, 2000) συγκροτούν το σύμπλοκο προέναρξης της μεταγραφής (preinitiation complex- PIC). Εν συνεχεία το καρβοξυτελικό άκρο της πολυμεράσης (carboxy terminal domain-CTD) φωσφορυλιώνεται μέσω του TFIIH καθώς «κυλάει» στις πρώτες 30 βάσεις της μεταγραφόμενου γονιδίου χάνοντας ταυτόχρονα την επαφή της με τους GTFs. Εν τω μεταξύ η φωσφορυλιωμένη CTD στρατολογεί παράγοντες οι οποίοι είναι σημαντικοί για την επιμήκυνση και την επεξεργασία του mRNA (mRNA processing). Προφανώς οι

πρωτεΐνες που στρατολογούνται αλλά και η σειρά με την οποία καταφθάνουν διαφοροποιείται σημαντικά από υποκινητή σε υποκινητή (Lee and Young, 2000).

Πολυάριθμα πειράματα αποδεικνύουν ότι η δομή της χρωματίνης δεν είναι στατική αλλά αντίθετα ιδιαίτερα δυναμική. Η χρωματίνη έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει μια σειρά από διαδικασίες, οι οποίες χρησιμοποιούν το DNA ως υπόστρωμα, μεταξύ των οποίων και η μεταγραφή. Βασική υπομονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα (εικ.Ε.1).



Εικόνα Ε.1: Δομή νουκλεοσώματος www.cytographica.com/animations/index.html

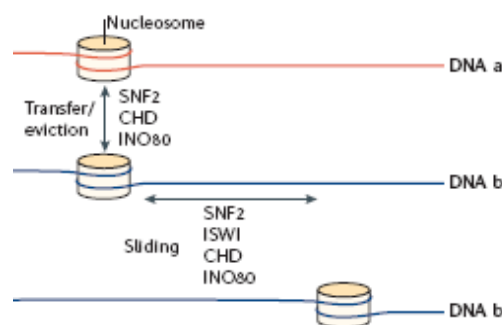
147 βάσεις DNA τυλίγονται 1.65 φορές γύρω από ένα οκταμερές σύμπλοκο ιστόνης. Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν 14 διαφορετικά σημεία επαφής μεταξύ ιστονών και DNA. Η πολλαπλή αυτή αλληλεπίδραση μεταξύ ιστονών και DNA καθιστά το σύμπλοκο αυτό ως ένα από τα πιο σταθερά υπό φυσιολογικές συνθήκες. Εξαιτίας όμως της δυναμικότητας του μπορεί να ρυθμίζεται και να τροποποιείται από πολλά πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Luger et al., 1997).

Ε.1α) Έναρξη της μεταγραφής

Αν και τα τελευταία χρόνια ο τρόπος με τον οποίο βλέπουμε την μεταγραφή έχει αλλάξει σημαντικά και πειράματα κυρίως της τελευταίας δεκαετίας μας δείχνουν πως η μεταγραφή ουσιαστικά είναι μια συνεχής διαδικασία της οποίας οι «υποδιαίρεσεις» είναι αλληλοεξαρτώμενες και αλληλοεπηρεαζόμενες ωστόσο για λόγους ευκολίας η μεταγραφή προσεγγίζεται σαν μια σειρά από γεγονότα όπου το κάθε γεγονός ολοκληρώνεται προκειμένου να ξεκινήσει το επόμενο.

Επομένως σε πρώτη φάση, επειδή όπως προαναφέρθηκε το DNA δεν είναι γυμνό, χρειάζεται αρχικά το DNA του υποκινητή να ξετυλιχθεί από τις ιστόνες ώστε να είναι ευκολότερη η προσβασιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων. Το ξετύλιγμα αυτό επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων που περιλαμβάνουν αναδιαμορφωτές χρωματίνης (chromatin remodelers) τα οποία προκειμένου να δράσουν υδrolύουν ATP.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ιστόνες κατά την έναρξη της μεταγραφής απομακρύνονται από τον υποκινητή (eviction)(Li et al., 2007; Schermer et al., 2005). Επίσης υπάρχουν περιπτώσεις όπου στην περιοχή του υποκινητή ανιχνεύονται εναλλακτικές μορφές ιστονών οι οποίες μπορούν πολύ πιο εύκολα να απομακρυνθούν κατά την έναρξη της μεταγραφής. Τέτοιου τύπου ιστόνη είναι η H2A.Z (Guillemette et al., 2005). Η απομάκρυνση αυτή επιτυγχάνεται μέσω πολλών δραστηριοτήτων που απαιτούν την συνεργασία μεταγραφικών παραγόντων, ATP εξαρτώμενων αναδιαμορφωτών (remodelers), όπως οι Swi/Snf (Bruno et al., 2003), Ino80 (Shen et al., 2000), Chd1 (Pray-Grant et al., 2005) και RSC (που απομακρύνει τις H2A και H2B και φαίνεται να έχει πάνω από 700 φυσιολογικούς στόχους) (Lorch et al., 2006), αλλά και η ενεργής RNA πολυμεράσης (εικ.Ε.2) Επιπλέον πρόσφατα βρέθηκε ότι σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ιστονών *in vivo* κατά την μεταγραφή έχουν και μια σειρά από τσαπερόνες ιστονών (Asf1, Nap1) (Adkins et al., 2004; Lorch et al., 2006).



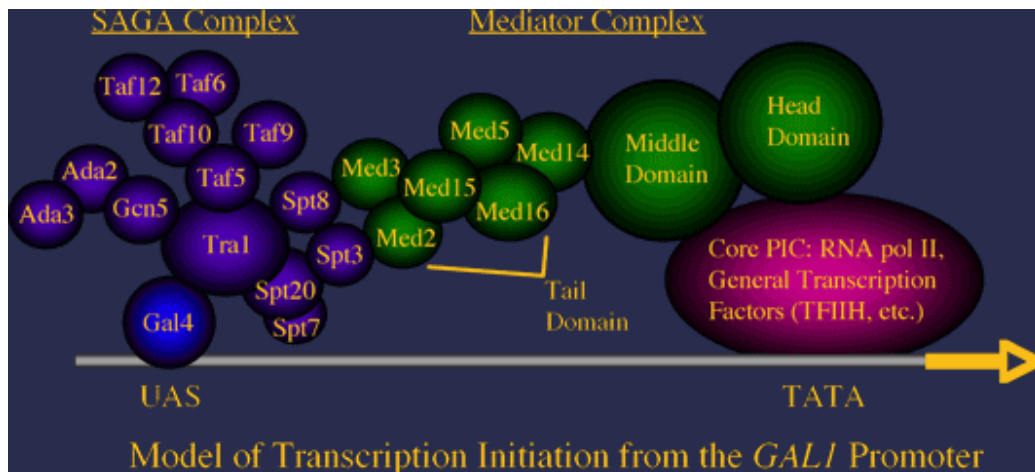
Εικόνα Ε.2: Οι τέσσερις κύριες οικογένειες ATP εξαρτώμενων αναδιαμορφωτών της χρωματίνης. Οι αναδιαμορφωτές αυτοί αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς παράγοντες και αναμορφώνουν την χρωματίνη μεταφέροντας τα νουκλεοσώματα σε άλλα μόρια DNA π.χ από το α στο b (trans) είτε αφήνοντας τα να «γλιστρήσουν» πιο κάτω στη χρωματίνη (cis) (Saunders et al., 2006)

Απαραίτητη προϋπόθεση για να ξεκινήσει η μεταγραφή αποτελεί η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων (TF-transcription factors) σε συγκεκριμένες θέσεις στην αλληλουχία του υποκινητή. Ωστόσο όταν οι αλληλουχίες αυτές είναι καλά κρυμμένες στη χρωματίνη τότε οι TF ακολουθούν ποικίλες στρατηγικές προκειμένου να επιτύχουν την πρόσδεση στον υποκινητή στις οποίες άλλοτε είναι απαραίτητο να προηγηθεί απομάκρυνση ιστονών, άλλοτε τροποποίηση αυτών και άλλοτε συνεργασία με άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα με *in vivo* μελέτες έχειδειχτεί ότι ο TF Pho4 μπορεί να δεσμευτεί στον υποκινητή του *PHO5* χωρίς να απομακρυνθούν οι ιστόνες (Adkins et al., 2007a; Adkins and Tyler, 2004). Αποδείχθηκε όμως πρόσφατα πως για να συμβεί αυτό πιθανότατα υπάρχουν μικρές μη ανιχνεύσιμες ποσότητες αναδιαμορφωτών για να διευκολύνουν την στρατολόγηση του Pho4 (Adkins et al., 2007a). Επίσης πολυάριθμα πειράματα έδειξαν ότι τα σύμπλοκα χρωματινικής αναδιαμόρφωσης (remodelers) μπορούν να επάγουν περαιτέρω την ποσοτική σύνδεση των TF στις νουκλεοσωμικές περιοχές (Adkins et al., 2007a).

Έχειδειχτεί ότι οι περιοχές πρόσδεσης των TF χαρτογραφούνται είτε σε περιοχές που δεν έχουν νουκλεοσώματα (ελεύθερη περιοχή) είτε πάνω σε έναν νουκλεόσωμα. Πάντως φαίνεται πως η νουκλεοσωμική πυκνότητα στις περιοχές υποκινητών είναι χαρακτηριστικά χαμηλότερη από αυτή σε κωδικές περιοχές (Bernstein et al., 2004). Η θέση της περιοχής πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα φαίνεται να παίζει ρόλο στο αν κάποιοι αναδιαμορφωτές (remodelers) θα έχουν η όχι καθοριστικό ρόλο στην στρατολόγηση του μεταγραφικού παράγοντα. Για παράδειγμα στον υποκινητή του *PHO5* η περιοχή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα βρίσκεται πάνω σε νουκλεόσωμα με αποτέλεσμα η έλλειψη του Snf2 να επηρεάζει δραματικά την στρατολόγηση του TF (Adkins et al., 2007b), αντίθετα στον υποκινητή του *PHO8* η περιοχή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα βρίσκεται σε περιοχή χωρίς νουκλεοσώματα με αποτέλεσμα η στρατολόγηση του TF να μην επηρεάζεται από την παρουσία του Snf2 (Gregory et al., 1999).

Μόλις δεσμευτούν οι ενεργοποιητές (TF) στον υποκινητή, στρατολογούνται μια σειρά από πρωτεϊνικά σύμπλοκα συνεργοποιητών (coactivators) (εικ.Ε.3). Οι συνεργοποιητές (π.χ. χρωματινικοί-αναδιαμορφωτές, ένζυμα τροποποίησης ιστονών και ο Mediator) όχι μόνο συμμετέχουν στην ισχυρότερη πρόσδεση των ενεργοποιητών στο DNA αλλά και

καθιστούν το DNA πιο προσιτό στη γενική μεταγραφική μηχανή. Πώς όμως ρυθμίζεται η δομή χρωματίνης για να αγκυροβοληθούν σωστά το ογκώδες PIC (Preinitiation complex) και οι βοηθητικοί παράγοντες του (GTFs-General Transcription FACTors);



Εικόνα E.3: Σύμπλοκα τα οποία στρατολογούνται στον υποκινητή με στόχο την έναρξη της μεταγραφής. Ο Mediator φαίνεται να παίζει το ρόλο γέφυρας μεταξύ των συγκεκριμένων για το γονίδιο ενεργοποιητών και του PIC. faculty.mercer.edu/aiello_dp/ResearchFocus.html

Ιστορικά, η αυξανόμενη ακετυλίωση των ιστονών στην περιοχή υποκινητών έχει συνδεθεί με την ενεργό μεταγραφή (Workman and Kingston, 1998). Πρόσφατα, χρησιμοποιώντας την υψηλής ευκρίνειας μικροσυστοιχία (DNA microarray) (Pokholok et al., 2005) έδειξαν ότι η ακετυλίωση ιστονών H3 και H4 αυξάνει αισθητά στους ενεργούς υποκινητές ζύμης. Το σύμπλοκο SAGA (Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase) στρατολογείται στον υποκινητή μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης της υπομονάδας του Tra1 και ενός συνδεδεμένου με τον υποκινητή ενεργοποιητή (Gross et al., 2000). Η στρατολόγηση του SAGA και ακολούθως η ακετυλίωση ιστονών εμφανίζονται πριν από το σχηματισμό PIC (Bhaumik and Green, 2001). Επιπλέον, προκειμένου να αυξηθεί η προσβασιμότητα του DNA, οι προσδεδεμένοι στον υποκινητή ενεργοποιητές επάγουν την στρατολόγηση χρωματικών-αναδιαμορφωτών όπως το σύμπλοκο Swi/Snf (Cosma et al., 1999; Neely et al., 2002).

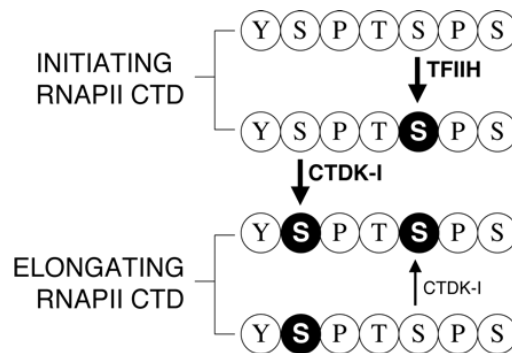
Η δομή του νουκλεόσωματος φαίνεται να θέτει ένα σημαντικό εμπόδιο στο σχηματισμό PIC (Kornberg and Lorch, 1999). Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ιστονών

έδειξαν ότι οι ιστόνες χάνονται σε μεγάλο ποσοστό στους υποκινητές *PHO5* και *HSP82* κατά την ενεργοποίηση της μεταγραφής των συγκεκριμένων γονιδίων και ότι τα νουκλεοσώματα επανασυναρμολογούνται όταν η μεταγραφή σταματά (Adkins and Tyler, 2004; Boeger et al., 2004; Reinke and Horz, 2003). Σε genome-wide ανάλυση βρέθηκε ότι σε πολλούς υποκινητές παρατηρείται μερική συγκρότηση του PIC. Σε αυτές τις περιπτώσεις ανιχνεύονται οι υπομονάδες TFIIA, TFIIID (ή /και του SAGA), TFIIIB, TFIIIE, και TFIIIF ενώ η RNA πολυμεράση II και ο TFIIH απουσιάζουν. Αξίζει να επισημανθεί ότι στην περίπτωση αυτή (όπου η RNA πολυμεράση II απουσιάζει), τα νουκλεοσώματα δεν μετατοπίζονται (Zanton and Pugh, 2006), γεγονός που υπονοεί ότι για να σπάσουν οι επαφές μεταξύ DNA –ιστονών απαραίτητη είναι η παρουσία της RNA πολυμεράσης II. Σε συμφωνία με το πιο πάνω γεγονός έρχεται η παρατήρηση όπου η RNA πολυμεράση χρειάζεται για τη χρωματινική αναδιαμόρφωση του υποκινητή *RNR3* (Sharma et al., 2003).

E.1β) Επιμήκυνση της μεταγραφής

Η μεταγραφική επιμήκυνση ξεκινά όταν η RNA πολυμεράση II απελευθερωθεί από τους GTF και αρχίζει να ταξιδεύει στην κωδική περιοχή. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί τη στρατολόγηση των μηχανής επιμήκυνσης, που περιλαμβάνει τους παράγοντες σχετικούς με, την σύνθεση, την επεξεργασία mRNA, την εξαγωγή mRNA, τον έλεγχο της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης και την τροποποίηση της χρωματίνης (Hahn, 2004) καθώς και παράγοντες που διευκολύνουν την διέλευση της RNA πολυμεράσης II μέσω απομάκρυνσης η τροποποιημένων των ιστονών (Kireeva et al., 2005; Kireeva et al., 2002). Από τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι τα κύτταρα εκμεταλλεύονται μια σειρά παραγόντων προκειμένου να διεκπεραιωθεί η διαδικασία της επιμήκυνσης. Πρέπει να επισημανθεί ότι τα γεγονότα και οι παράγοντες που απαιτούνται στην αρχή της κωδικής περιοχής του μεταγραφόμενου γονιδίου διαφέρουν σημαντικά από εκείνους που απαιτούνται στο τέλος. Με την συμμετοχή πολλών παραγόντων κατά την επιμήκυνση επιτυγχάνεται η αποδοτικότερη σύνθεση RNA και ταυτόχρονα εξασφαλίζεται η ακεραιότητα της δομής της χρωματίνης καθώς η πολυμεράση ταξιδεύει κατά μήκος του γονιδίου.

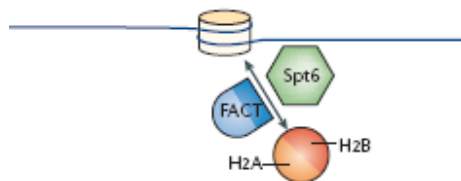
Αντίθετα από τους παράγοντες έναρξης μεταγραφής, που στρατολογούνται συνήθως στον υποκινητή μέσω των αλληλεπιδράσεων με ενεργοποιητές, οι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επιμήκυνση συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με την RNA πολυμεράση II (Buratowski, 2003). Η περιοχή CTD της RNA πολυμεράση II φωσφορυλιώνεται κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης. Συγκεκριμένα η Ser5 φωσφορυλιώνεται από την υπομονάδα της TFIIF όταν η RNA πολυμεράση II βρίσκεται στο 5' άκρο του ORF, και η Ser2 φωσφορυλιώνεται από την κινάση CTDK-I όταν η RNA πολυμεράση II βρίσκεται προς το 3' άκρο του ORF (Jones et al., 2004). Οι φωσφορυλιώσεις αυτές φαίνεται να ελέγχουν τις διαδικασίες επιμήκυνσης και να τις συνδέουν με τις αλλαγές στη δομή της χρωματίνης (Buratowski, 2003).



Εικόνα E.4: Μετά την έναρξη της μεταγραφής, η προσδεδεμένη στον TFIIF κινάση (Kin28p) φωσφορυλιώνει την CTD στη Ser5. Η CTD στη συνέχεια γίνεται καλύτερο υπόστρωμα για την φωσφορυλίωση από την CTDK-I στην Ser2 (Jones et al., 2004).

Από τα πιο καλά μελετημένα και εξελικτικά συντηρημένα σύμπλοκα που έχουν ρόλο στην επιμήκυνση της μεταγραφής είναι το PAF/RTF το οποίο αποτελείται από πολλές υπομονάδες (Ctr9, Cdc73, Leo1, και Rtf1) (Rosonina and Manley, 2005) Με τη βοήθεια Spt4/5 (Qiu et al., 2006) το PAF εμφανίζεται να φορτώνεται επάνω στη φωσφορυλιωμένη στη Ser5 CTD και άρα κατά κύριο λόγο εντοπίζεται στο 5' άκρο της μεταγραφόμενης περιοχής. Το PAF έχει έναν κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της σύνδεσης των περισσότερων πρωτεϊνών με την φωσφορυλιωμένη Ser5. Το PAF απαιτείται για τη στρατολόγηση των Rad6/Bre1 στη μεταγραφόμενη κωδική περιοχή και το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια την ουμπικουτινίωση της H2B κατά την επιμήκυνση (Wood et al.,

2003; Xiao et al., 2005). Το PAF συμμετέχει επίσης στη στρατολόγηση του συμπλόκου COMPASS το οποίο περιέχει την μεθυλοτρανσφεράση Set1. Η πρωτεΐνη αυτή επάγει την τριμεθυλίωση της H3K4 στο 5' άκρο του ORF. Άλλοι παράγοντες που στρατολογούνται από το Paf1 είναι ο Chd1 (Simic et al., 2003) καθώς και οι παράγοντες Spt6 και FACT (Facilitator of chromatin transactions) για αυτό και το συγκεκριμένο σύμπλοκο μπορεί να χαρακτηριστεί ως πλατφόρμα πρόσδεσης συμπλόκων κατά την επιμήκυνση (Adelman et al., 2006; Squazzo et al., 2002). Το FACT αποτελείται από δύο πρωτεΐνες στον άνθρωπο την p140 και την SSRP1. Οι αντίστοιχες ομόλογες στον σακχαρομύκητα είναι η Spt16 και η Pob3. Η SSRP1 περιέχει ένα μοτίβο HMGB το οποίο απουσιάζει από την ομόλογη Pob3. Στη θέση του μοτίβου αυτού υπάρχει μια μικρή πρωτεΐνη, η Nhr6 (Brewster et al., 2001). Η τελευταία συνδέεται ασθενώς με το σύμπλοκο Spt16-Pob3. Το Spt6 και το FACT παίζουν ρόλο στην διευκόλυνση της διέλευσης της πολυμεράση κατά την μεταγραφή. Ειδικά το FACT παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση των νουκλεοσωμάτων δίνοντας τους τέτοια στερεοδιαμόρφωση ώστε να διευκολύνεται η διέλευση της RNA πολυμεράσης II (Rhoades et al., 2004) (εικ.Ε.5). Οι Belotserkovskaya et al έδειξαν ότι το FACT διευκολύνει το πέρασμα της Pol II κατά την μεταγραφή αποσταθεροποιώντας την νουκλεοσωμική δομή έτσι ώστε τα διμερή ιστόνης H2A-H2B να απομακρύνονται κατά το πέρασμα του ενζύμου. Επίσης έδειξαν ότι το FACT μπορεί να επανατοποθετεί ιστόνες στο DNA (Belotserkovskaya et al., 2003) για αυτό και σε περίπτωση μεταλλαγής του επειδή το DNA μένει ελεύθερο εκτίθενται κρυπτικοί υποκινητές στους μεταγραφικούς παράγοντες και συντίθενται μετάγραφα που ξεκινούν από το εσωτερικό των γονιδίων (Kaplan et al., 2003; Mason and Struhl, 2003; Schwabish and Struhl, 2004).



Εικόνα Ε.5: Απομάκρυνση και επανατοποθέτηση των ιστονών H2A και H2B από την συνδυασμένη δράση των Spt6 και FACT με στόχο της διευκόλυνση της διέλευσης της RNA πολυμεράσης κατά την επιμήκυνση της μεταγραφής (Saunders et al., 2006)

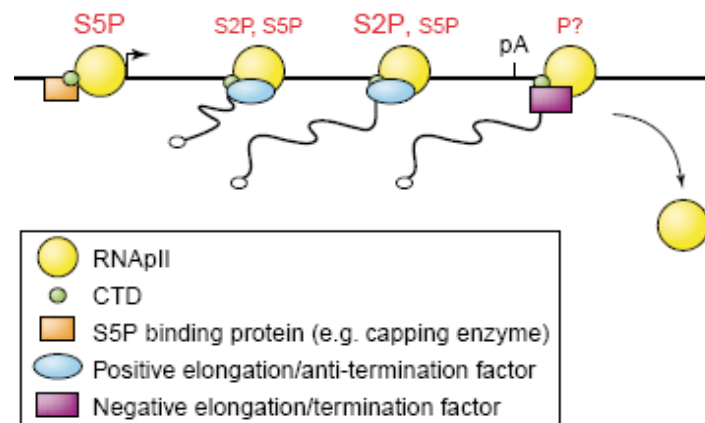
Αντίθετα, η μεθυλοτρανσφεράση Set2 φαίνεται να στρατολογείται από την φωσφορυλίωση Ser2 της περιοχής του CTD δηλαδή όταν η RNA πολυμεράση II βρίσκεται στο 3' άκρο. Επομένως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν στρατολογείται από το PAF1 και οι μεθυλιώσεις που επάγει εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο 3' άκρο του ORF (Krogan et al., 2003).

Αξίζει να επισημανθεί ότι σε κάποια σημεία της μεταγραφόμενης περιοχής κατά την διάρκεια της επιμήκυνσης παρατηρείται παύση της μεταγραφικής ενεργότητας της RNA πολυμεράσης II (RNA pol II pausing) και αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην δύναμη και την φύση των επαφών μεταξύ DNA και ιστονών. Αποτέλεσμα της παύσης αυτής είναι η οπισθοχώρηση (backtracking) της RNA pol II (Kireeva et al., 2005). Το σταμάτημα επίσης στην κίνηση της RNA pol II (stalled RNA pol II) μπορεί να οφείλεται σε ενδεχόμενη βλάβη που έχει υποστεί το μεταγραφόμενο DNA. Ένας ολόκληρος μηχανισμός επιδιόρθωσης επάγεται, γνωστός ως TCR (transcription coupled repair), με σκοπό να επιδιορθώσει το DNA. Η μεταγραφική μηχανή συγκρατείται από διάφορους παράγοντες προκειμένου να μπορέσει να εγκατασταθεί και να δράσει η επιδιορθωτική μηχανή. Μετά την επιδιόρθωση η πολυμεράση μπορεί να συνεχίσει και να ολοκληρώσει την σύνθεση του mRNA (Tornaletti et al., 1999).

Ε.1γ) Λήξη της μεταγραφής (Συνοπτική παρουσίαση μοντέλων)

Προκειμένου να σταματήσει η διαδικασία της μεταγραφής (Transcription termination) απαραίτητο είναι να συμβεί πολυαδενυλίωση. Η σύνδεση μεταξύ πολυαδενυλίωσης και

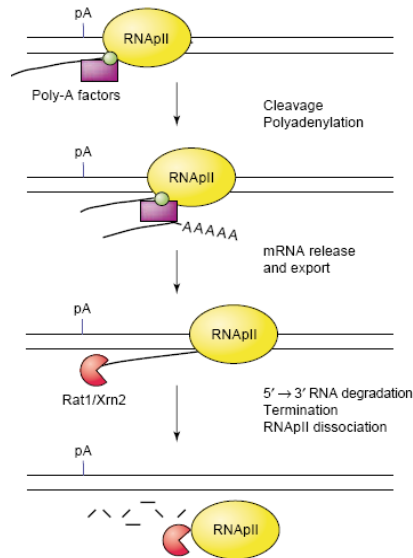
της λήξης της μεταγραφής καθιερώθηκε αρχικά με την ανακάλυψη ότι στα άκρα 30 γονιδίων που μελετήθηκαν και οι δύο διαδικασίες ήταν εξαρτώμενες από τις ίδιες αλληλουχίες DNA (Connelly and Manley, 1988). Αυτή η σύνδεση ενισχύθηκε περαιτέρω όταν διαπιστώθηκε ότι τουλάχιστον μερικοί από τους παράγοντες που απαιτούνται για την επεξεργασία του RNA (capping, splicing και πολυαδενυλίωση) απαιτούνται και για τη λήξη της μεταγραφής (Proudfoot, 2000; Proudfoot, 2004). Δύο γενικά μοντέλα έχουν προταθεί με σκοπό να συνδεθούν οι δύο διαδικασίες. Το πρώτο γνωστό και ως «terminator model» (εικ.Ε.6) προτείνει ότι η εμφάνιση της αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης στο RNA πυροδοτεί αλλαγή στους παράγοντες που συνδέονται με την πολυμεράση (Logan et al., 1987). Πιθανόν, η δέσμευση παραγόντων πολυαδενυλίωσης να μπορεί να μετατοπίσει έναν θετικό παράγοντα επιμήκυνσης ή/ και να στρατολογήσει έναν αρνητικό παράγοντα επιμήκυνσης. Συνεπώς λιγότερο ενεργή RNA πολυμεράση II (RNA pol II) θα οδηγούσε τελικά σε λήξη της μεταγραφής.



Current Opinion in Cell Biology

Εικόνα Ε.6: ‘Terminator’ μοντέλο: Η εμφάνιση του σήματος πολυαδενυλίωσης (pA) στο RNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των παραγόντων που έρχονται σε επαφή με την πολυμεράση. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν θετικά την επιμήκυνση της μεταγραφής (γαλάζιο οβάλ) πιθανόν απομακρύνονται ή/ και παράγοντες λήξης (μωβ ορθογώνιο) στρατολογούνται. Στην εικόνα επίσης παρουσιάζονται οι αλλαγές στο πρότυπο φωσφορυλίωσης της CTD στα διαφορετικά στάδια της μεταγραφής (μεγάλα γράμματα δείχνουν υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής) (Buratowski, 2005).

Στο δεύτερο μοντέλο, το οποίο συχνά αποκαλείται «torpedo model» (εικ.Ε.7), η πολυαδενυλίωση οδηγεί στη δημιουργία ενός νέου 5' άκρου (Connelly and Manley, 1988) στο οποίο (σε αντίθεση με το 5' capped άκρο του the pre-mRNA), θα μπορούσε πιθανόν να δράσει μιας άλλη πρωτεΐνη όπως κάποια ελικάση ή εξωνουκλεάση (π.χ η Rat1/Xrn2 νουκλεάση).



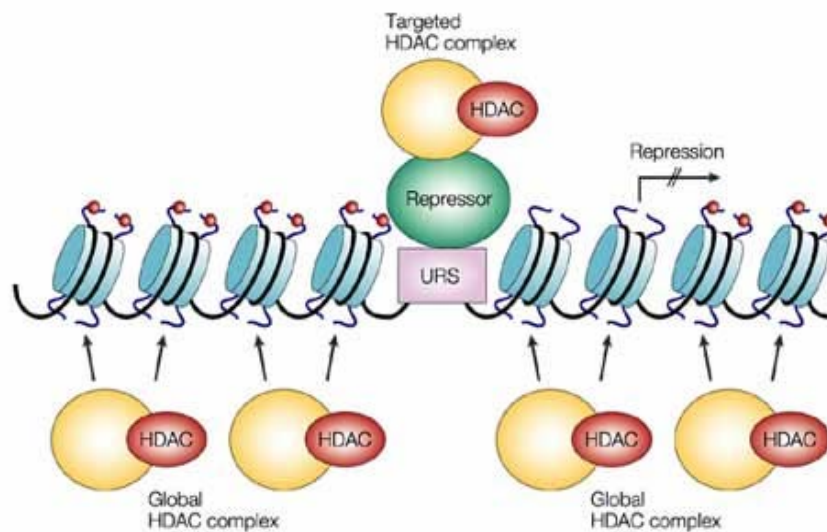
Εικόνα Ε.7: Το μοντέλο ‘torpedo’. Σε αυτό το μοντέλο η αποκοπή του μεταγράφου από την μηχανή πολυαδενυλίωσης (μωβ ορθογώνιο) δημιουργεί νέο uncapped 5' άκρο το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για την δράση της νουκλεάσης Rat1/Xrn2. Με αυτό το τρόπο όχι μόνο απομακρύνεται το ‘extra’ τμήμα mRNA, αλλά και με κάποιο τρόπο προκαλείται η μεταγραφική λήξη (Buratowski, 2005).

Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι το σταμάτημα της πολυμεράσης παρατηρείται λίγο πιο κάτω από το σημείο πολυαδενυλίωσης. Πιθανόν εκτός από την ανάγκη ύπαρξης μιας αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης για να πυροδοτηθεί η λήξη, να υπάρχει πιο κάτω και κάποια άλλη αλληλουχία η οποία επάγει το σταμάτημα αυτό «εισχύοντας» ακόμα περισσότερο την διαδικασία λήξης (Yonaha and Proudfoot, 1999). Το σταμάτημα αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA/RNA ή σε κάποιον παράγοντα που προσδένεται σε συγκεκριμένο σημείο της αλληλουχίας του DNA παρεμποδίζοντας την κίνηση της RNA pol II (η παρεμπόδιση αυτή συχνά καλείται ‘roadblock’). Εντούτοις, είναι σαφές πως δεν υπάρχει ομοφωνία (consensus)

αλληλουχιών για αυτή καθ' αυτήν την λήξη. Αντ' αυτού, η λήξη συμβαίνει προφανώς στοχαστικά λίγο πιο κάτω από το σημείο πολυαδενυλίωση (Tran et al., 2001)

E.1δ) Τροποποιήσεις ιστονών

Οι τροποποιήσεις των ιστονών δηλαδή οι ακετυλιώσεις, φωσφορυλιώσεις, οι ουμπικουτινιλιώσεις και οι μεθυλιώσεις, επηρεάζουν την διαδικασία της μεταγραφής τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά την επιμήκυνση. Οι τροποποιήσεις αυτές αλλάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της χρωματίνης γεγονός το οποίο κατά πρώτον τροποποιεί την δυνατότητα κάποιων παραγόντων να επηρεάζουν την χρωματίνη και κατά δεύτερον επηρεάζει την στρατολόγηση αρκετών παραγόντων στο μεταγραφόμενο γονίδιο *Ακετυλίωση-Απακετυλίωση*: Η ιστόνη H3 και H4 ακετυλιώνονται στα ενεργά γονίδια και τα επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης τείνουν να είναι υψηλότερα στην περιοχή του υποκινητή και προς στο 5' άκρο (Pokholok et al., 2005). Είναι πολύ πιθανόν βέβαια να μην ακολουθούν όλα τα γονίδια το ίδιο πρότυπο κατανομής αλλά το πρότυπο αυτό να είναι παρόμοιο σε γονίδια των οποίων τα μετάγραφα εμπλέκονται στην ίδια διαδικασία ή στο ίδιο μονοπάτι (Kurdistani et al., 2004). Ένας από τους πιθανούς υποψηφίους παράγοντες για την ακετυλίωση των ιστονών κατά την διάρκεια της επιμήκυνσης είναι ο επιμηκυντής (elongator) ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο απομονώθηκε μαζί με την υπερφωσφορυλιωμένη πολυμεράση και το οποίο έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (Wittschieben et al., 1999). Βέβαια ο elongator μπορεί να έχει και άλλη λειτουργικότητα μια και ανιχνεύεται σε υψηλά ποσοστά στο κυτταρόπλασμα (Pokholok et al., 2002; Svejstrup, 2007). Η απακετυλίωση των μεταγραφόμενων γονιδίων έχει συνδεθεί με την καταστολή της μεταγραφής, ωστόσο πρόσφατα πειράματα αποδεικνύουν ότι σε κάποιες περιπτώσεις η απακετυλίωση οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση (Kurdistani and Grunstein, 2003).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα E.8: Οι απακετυλάσες ιστόνης (HDAC) δημιουργούν μια περιοχή υψηλής απακετυλίωσης (απουσία κόκκινων κουκκίδων στην χρωματίνη) όταν προσδεθούν στην περιοχή του υποκινητή. Η στρατολόγηση τους γίνεται μέσω DNA προσδεόμενων καταστολέων της μεταγραφής. Οι απακετυλάσες επίσης στρατολογούνται και στην κωδική περιοχή χωρίς να διαμεσολαβεί κάποιος συγκεκριμένο καταστολέα (Kurdistani and Grunstein, 2003).

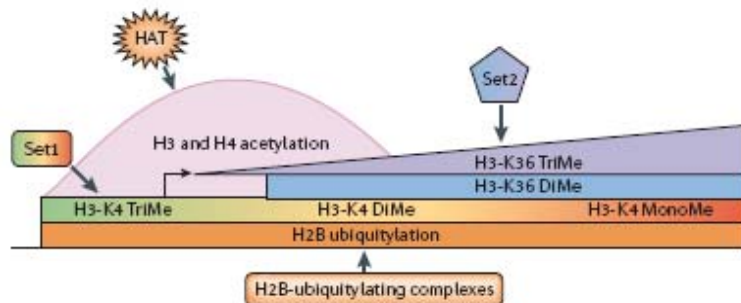
Μεθυλίωση: Η θέση αλλά και ο βαθμός μεθυλίωσης των ιστονών (μονομεθυλίωση, διμεθυλίωση, τριμεθυλίωση) συσχετίζεται άμεσα με την μεταγραφική απενεργοποίηση των γονιδίων (Kouzarides, 2002). Επιπλέον υπάρχει ένα συγκεκριμένο πρότυπο κατανομής των μεθυλιωμένων ιστονών το οποίο συναντάται σε πολλά γονίδια και οφείλεται στην στρατολόγηση συγκεκριμένων μεθυλτρασφερασών σε ενεργό γονίδιο με σκοπό την καταστολή της μεταγραφής. Όπως προαναφέρθηκε μέλη της Set1 μεθυλιώνουν την ιστόνη H3 στην K4 (H3-K4). Η τριμεθυλιωμένη H3-K4 τροποποίηση ανιχνεύεται κυρίως στο 5' άκρο, η διμεθυλιωμένη H3-K4 ανιχνεύεται στο μέσο του μεταγραφόμενου γονιδίου και η μονομεθυλιωμένη H3-K4 στο 3' άκρο του μεταγραφόμενου γονιδίου (Pokholok et al., 2005). Το πρότυπο αυτό κατανομής μπορεί να εξηγείται από το γεγονός ότι πρωτεΐνες της οικογένειας Set1 αλληλεπιδρούν με την πολυμεράση όταν αυτή είναι φωσφορυλιωμένη στην Ser5 και άρα το μεγαλύτερο

ποσοστό μεθυλίωσης παρατηρείται στο 5' άκρο του μεταγραφόμενου γονιδίου (τριμεθυλίωση) και το μικρότερο στο 3' άκρο (Pokholok et al., 2005). Σε αντίθεση με την H3-K4, η οποία ανιχνεύεται κυρίως στο 5' άκρο του γονιδίου, η τροποποίηση H3-K36 η οποία επάγεται από την Set2 εμφανίζεται σε όλη την κωδική περιοχή. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η Set2 αλληλεπιδρά με την υπεφωσφορυλιωμένη πολυμεράση της οποίας το καρβοξυτελικό άκρο (CTD) είναι φωσφορυλιωμένο τόσο στη Ser2 όσο και στη Ser5.

Η τροποποίηση H3-K79 η οποία επάγεται από την πρωτεΐνη Dot1 βρέθηκε σε αυξημένα ποσοστά μέσα στην περιοχή των γονιδίων στο σακχαρομύκητα, δεν φάνηκε όμως να συσχετίζεται με τα επίπεδα της μεταγραφής (Pokholok et al., 2005). Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι βασική διαφορά της ακετυλίωσης από την μεθυλίωση ιστονών ήταν ότι η μεν πρώτη ιστονική τροποποίηση είναι αντιστρέψιμη ενώ η δεύτερη όχι. Πρόσφατα πάντως βρέθηκε ότι οι ιστόνες απομεθυλιώνονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα απομεθυλάσης αποτελεί η Jhd1 (JmjC domain-containing protein) που ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών που καταλύουν την απομάκρυνση μονό- και διμεθυλομάδων από την K36 της ιστόνης H3 (Fang et al., 2007).

Ουμπικουτινίωση-Φωσφορυλίωση: Ενώ η πολύουμπικουτινίωση είναι σήμα για την αποδόμηση των πρωτεϊνών, οι μονοουμπικουτινιωμένες ιστόνες στο σακχαρομύκητα συναντώνται στον υποκινητή και στο 5' άκρο μεταγραφικά ενεργών γονιδίων (Kao et al., 2004). Συσχέτιση με την ενεργό μεταγραφή (μέσω στρατολόγησης TBP) φαίνεται να έχει και η φωσφορυλίωση των ιστονών σε κάποιους υποκινητές (Wittschieben et al., 1999).

Αξίζει να επισημανθεί στο σημείο αυτό ότι πολλές φορές για να συμβεί μια τροποποίηση πρέπει να έχει προηγηθεί κάποια άλλη. Για παράδειγμα προκειμένου να μεθυλωθεί η ιστόνη H3 στην K4 και στην K79 απαραίτητο είναι να έχει προηγηθεί η μονοουμπικουτινίωση της H2B (Dover et al., 2002) (εικ.Ε.9).



Εικόνα Ε.9: Κατανομή τροποποιήσεων των ιστονών κατά μήκος της μεταγραφόμενης περιοχής (Pokholok et al., 2005)

Όπως προαναφέρθηκε τα τελευταία χρόνια ο τρόπος με τον οποίο βλέπουμε την διαδικασία έκφρασης των γονιδίων άλλαξε σημαντικά. Τα διαδοχικά βήματα που συγκροτούν την διαδικασία της μεταγραφής αποδεικνύεται καθημερινά ότι είναι αλληλοεξαρτώμενα και αλληλοεπηρεαζόμενα.

Ένας μεγάλος αριθμός γενετικών και βιοχημικών πειραμάτων αποκάλυψαν ότι αρκετές πρωτεΐνες που μέχρι πρόσφατα εθεωρείτο ότι εμπλέκονται μόνο σε ένα βήμα της μεταγραφικής διαδικασίας, τελικά αποκαλύπτεται ότι εμπλέκονται σε περισσότερα. Για παράδειγμα οι Biswas *et. al.* έδειξαν ότι το yFACT (το οποίο ήταν γνωστό, όπως αναφέρθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επιμήκυνση της μεταγραφής) έχει άμεσο ρόλο στην έναρξη της μεταγραφής διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση του TBP με το TFIIA πάνω στο DNA (νουκλεοσωμικό DNA) (Biswas et al., 2005). Επιπλέον τον τελευταίο καιρό αποδείχθηκε ότι Swi/Snf (γνωστός νουκλεοσωμικός αναδιαμορφωτής που συμβάλλει σημαντικά στο σχηματισμό συμπλόκου προέναρξης της μεταγραφής) στρατολογείται στη κωδική περιοχή κατά την διάρκεια της μεταγραφής παίζοντας καταλυτικό ρόλο στην απομάκρυνση των ιστονών, με σκοπό να διευκολύνει την διέλευση της RNA πολυμεράσης. Στην απομάκρυνση των ιστονών από τους υποκινητές *PHO5* και *PHO8* σημαντικό ρόλο έχει η πρωτεΐνη Asf1 (Anti-silencing FACTor) (Adkins et al., 2007b). Το 2006 δείχθηκε από τους Schewabish *et. al* η Asf1, κατά την διάρκεια της επιμήκυνσης από την RNA πολυμεράση, επάγει την απομάκρυνση αλλά και

την επανατοποθέτηση ιστονών στη κωδική περιοχή. Ταυτόχρονα απέδειξαν ότι η AsfI εμποδίζει την έναρξη της μεταγραφής από κρυπτικούς υποκινητές συμβάλλοντας έτσι στην υψηλή πιστότητα της μεταγραφής (Schwabish and Struhl, 2006).

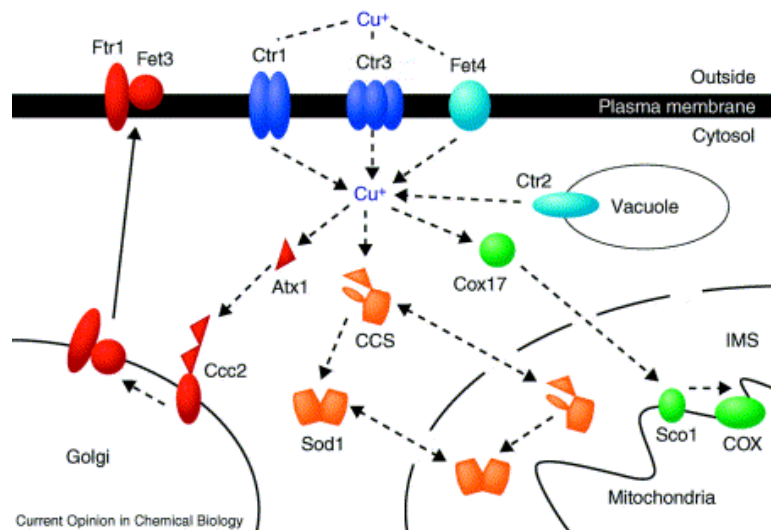
E.2 Εισαγωγή στο μοντέλο σύστημα μεταλλορυθμιζόμενης μεταγραφής

Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη ευαίσθητη και πολύπαραγοντική διαδικασία. Το κύτταρο έχει την δυνατότητα να εκφράζει κάθε φορά διαφορετικές ομάδες γονιδίων ανάλογα με τις ανάγκες του. Ειδικά η αναγνώριση των αλλαγών στις περιβαλλοντικές συνθήκες, και η δυνατότητα του κυττάρου να προσαρμόζεται σε αυτές τις αλλαγές, είναι ουσιαστική για τη βιωσιμότητα τους. Υπάρχουν πολυάριθμα καλά-χαρακτηρισμένα συστήματα από τα οποία η παρουσία ή η απουσία ενός μεμονωμένου μεταβολίτη μπορεί να αναγνωριστεί από ένα κύτταρο. Η αναγνώριση ενός μεταβολίτη είναι το πρώτο βήμα μιας διαδικασίας που τελικά, όπως προαναφέρθηκε, οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που απαιτούνται για να αποκριθούν σε εκείνο τον μεταβολίτη. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που μεσολαβεί από την αναγνώριση του μεταβολίτη μέχρι την ενεργοποίηση ή καταστολή ενός μεταγραφικού παράγοντα είναι συχνά σύνθετο. Ο μεταγραφικός παράγοντας συνήθως λειτουργεί ως γενετικός διακόπτης, που επιτρέπει την κατάλληλη έκφραση γονιδίων όταν ο μεταβολίτης είναι διαθέσιμος και τροποποιεί την έκφραση των γονιδίων αυτών όταν ο μεταβολίτης παύει πλέον να ανιχνεύεται.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό, του μονοπατιού που ρυθμίζει την είσοδο του χαλκού. Είναι γνωστό ότι η παρουσία του χαλκού μέσα στους ζωντανούς οργανισμούς είναι πολύ σημαντική διότι αποτελεί συμπαράγοντα πολλών πρωτεϊνών και ενζύμων τα οποία με τη σειρά τους είναι σημαντικά για την διεκπεραίωση πολλών βιολογικών λειτουργιών. Από την άλλη πλευρά βέβαια υπερβολικές ποσότητες τόσο του χαλκού όσο και του σιδήρου μπορούν να αποδειχθούν ιδιαίτερα τοξικές εξαιτίας της δημιουργίας ελεύθερων ριζών (ROS: reactive oxygen species) μέσω της αντίδρασης Fenton και Haber-Weiss (Liochev and Fridovich, 1994). Πιο αναλυτικά, οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από τις προαναφερθείσες αντιδράσεις προκαλούν σημαντικές βλάβες σε

πολλά κυτταρικά μακρομόρια όπως για παράδειγμα νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λίπη και μπορεί να οδηγήσουν σε απόπτωση. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η διατήρηση της ομοιόστασης των μετάλλων στα κύτταρα. Αυτή επιτυγχάνεται είτε μέσω συστημάτων μεταφοράς που αντιλαμβάνονται αλλαγές στις ενδομοριακές συγκεντρώσεις μεταλλικών ιόντων και τροποποιούν την ενδοκυτταρική κατανομή τους είτε μέσω συστημάτων που ενεργοποιούν την διαδικασία αποτοξίνωσης έτσι ώστε να αποβάλλεται η περίσσεια μετάλλου (Meneghini, 1997).

Στον σακχαρομύκητα μεταξύ των πρωτεϊνών που δεσμεύουν χαλκό και αλλάζει η λειτουργικότητά τους είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες Mac1 και Ace1 (Thiele, 1988), η υπεροξειδική δισμουτάση Cu/Zn Sod1, η οποία ως ρόλο έχει την αποτοξίνωση του κυττάρου από τις ελεύθερες ρίζες (Schmidt et al., 2000), οι μεταλλοθειονίνες, οι οποίες δεσμεύουν και απομακρύνουν της περίσσεια χαλκού από το κύτταρο, οι μοριακοί συνοδοί χαλκού (copper chaperones), που μεταφέρουν το χαλκό σε ένζυμα που τον χρειάζονται (Field et al., 2002).



Εικόνα E.10: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού εισόδου και διανομής χαλκού (Puig and Thiele, 2002)

Σε συνθήκες έλλειψης χαλκού, ο χαλκός μεταφέρεται στο κύτταρο μέσω των μεταφορέων υψηλής συγγένειας Ctr1 και Ctr3 (εικ.Ε.10)

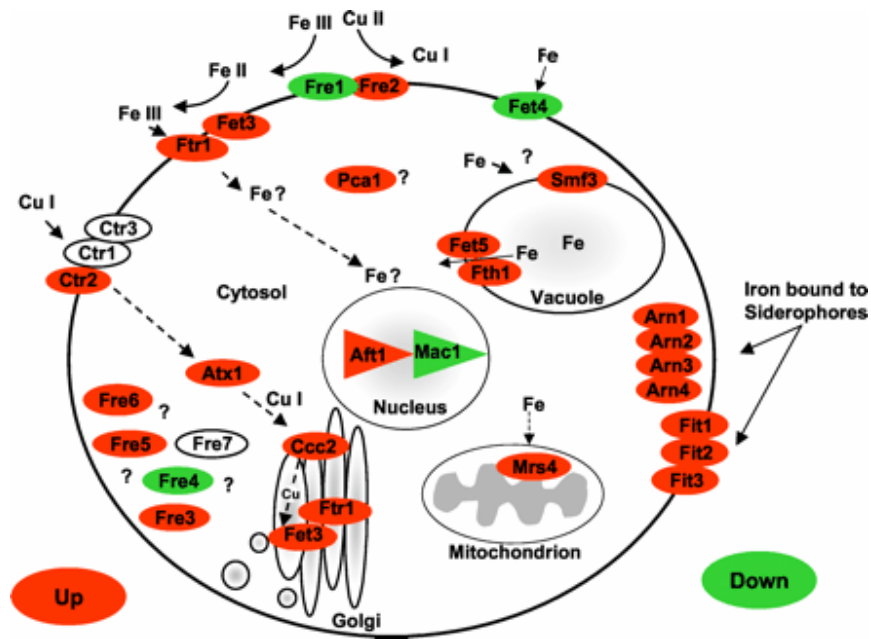
Τόσο ο χαλκός όσο και ο σίδηρος για να μεταφερθούν πρέπει να προηγουμένως να αναχθούν από μια ομάδα αναγωγασών οι οποίες βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη του σακχαρομύκητα και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *FRE1* έως *FRE4*. (Οι πρωτεΐνες των *FRE5-7* είναι ομόλογες με την Fge2 αποτελούν αναγωγάσες του σιδήρου και επάγονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σιδήρου). Μόλις ο χαλκός εισαχθεί στο κύτταρο, δρομολογείται σε ένα από τα τρία μονοπάτια μέσω των μοριακών συνοδών Cox17, Atx1, και Lys7 για να ενσωματωθεί τελικά στην οξειδάση του κυτοχρώματος C, στις πολυχαλκοοξειδάσες σιδήρου Fet3 και Fet5, και στην Cu/Zn Sod1 αντίστοιχα. Το κέντρο χαλκού της Fet3 σιδηροαναγωγάσης συναρμολογείται στο δίκτυο του Golgi στο οποίο μεταφέρεται χαλκός μέσω της ATPάση P-τύπου Ccc2. Η διαδικασία αυτή διευκολύνεται μέσω της Gef1p (κανάλι χλωρίου). Η Fet3 σχηματίζει μαζί με την Ftr1 (σύμπλοκο Fet3-Ftr1) έναν υψηλής συγκέντρωσης (Pena et al., 1999) μεταφορέα σιδήρου στη πλασματική μεμβράνη γεγονός που παρέχει ουσιαστικά σύνδεσμο μεταξύ του μεταβολισμού του σιδήρου και του χαλκού στον σακχαρομύκητα. Έχει δειχτεί ότι σε *mac1Δ* στελέχη ενισχύεται η μεταγραφή σιδηρογονιδίων γεγονός που επιβεβαιώνει ότι μια πρωτογενής αστία για χαλκό οδηγεί δευτερογενώς και σε πεινά για σίδηρο (De Freitas et al., 2004; Georgatsou et al., 1997).

Τα γονίδια των μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών μεταφορέων σιδήρου και χαλκού υψηλής συγγένειας ρυθμίζονται από τουλάχιστον τρεις μεταγραφικούς παράγοντες τον Mac1, τον Aft1 και τον Ace1. Οι παράγοντες αυτοί δρουν ανιχνεύοντας τις συγκεντρώσεις του χαλκού άμεσα και του σιδήρου έμμεσα μέσα στο κύτταρο (εικ.Ε.10) (Van Ho et al., 2002). Ιδιαίτερα για τον Mac1 έχει δειχτεί πειραματικά η αλλαγή της διαμόρφωσης του παρουσία ή απουσία χαλκού (Jensen and Winge, 1998). Αποδεικνύεται πάντως ότι ο χαλκός σε πρώτη φάση δρα μειώνοντας την μεταγραφική ενεργότητα του Mac1 (transactivation activity) και κατόπιν την ποσότητα της πρωτεΐνης (Keller et al., 2005; Pena et al., 1998; Zhu et al., 1998).

Οι μεταλλοθειονίνες ενεργοποιούνται σε συνθήκες περίσσειας χαλκού. Πρόκειται για μια ομάδα μικρών σε μέγεθος πρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε κυστεΐνες και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μέταλλα προστατεύοντας το κύτταρο από την τοξικότητα αυτών (έντονη αντιοξειδωτική δράση). Οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό

παράγοντα Ace1 (Thiele, 1988). Λεπτομερής περιγραφή του ρόλου των εμπλεκόμενων μορίων ομοιόστασης χαλκού και σιδήρου φαίνεται στην εικ.Ε.11.

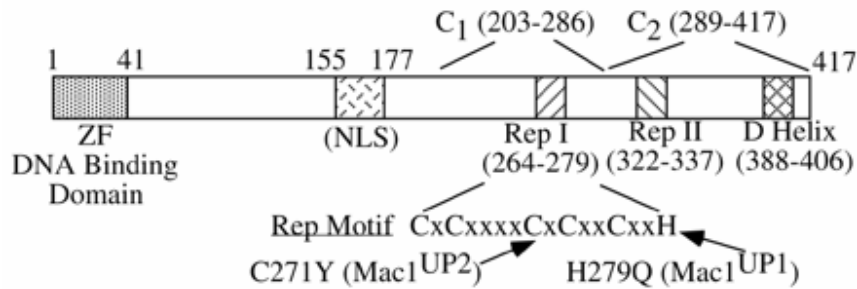
Αν και οι Ace1 και ο Mac1 «ανιχνεύουν» και οι δύο άμεσα Cu(I) δρώντας ουσιαστικά αντίθετα ωστόσο δεν φαίνεται οι δράσεις τους να είναι ανταγωνιστικές και εξαρτημένες (Keller et al., 2005)



Εικόνα Ε.11 : Μονοπάτι ρύθμισης εισόδου και κατανομής χαλκού και σιδήρου στο σακχαρομύκητα (van Bakel et al., 2005)

E.3 MAC1 (Συνώνυμα του γονιδίου: *YMR021C*, *CUA1*, *YM9711.11*)

E.3α) Δομική περιγραφή του μεταγραφικού παράγοντα Mac1

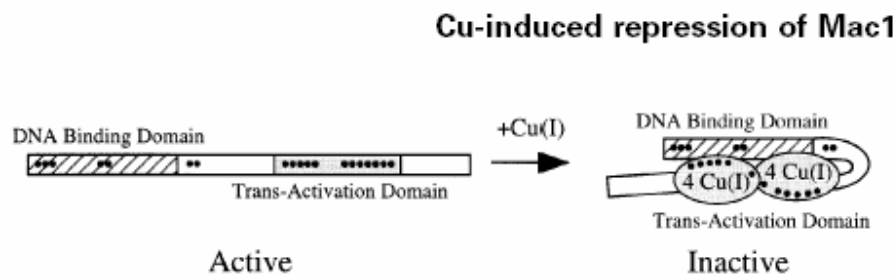


Εικόνα E.12: Περιγραφή του μεταγραφικού παράγοντα Mac1 (Serpe et al., 1999)

Ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1 αποτελείται από 417 αμινοξέα και συναντάται σε δύο τουλάχιστον μορφές την φωσφορυλιωμένη και την μη φωσφορυλιωμένη (Heredia et al., 2001). Το γονίδιο που τον κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα XIII και δεν περιέχει ιντρόνια. (Keller et al., 2000). Θεωρητικοί υπολογισμοί έδειξαν ότι, το καθαρό φορτίο της καρβοξυτελικής περιοχής του είναι -12 . Αντίθετα το φορτίο της αμινοτελικής περιοχής υπολογίστηκε $+10$. Η περιοχή αυτή περιέχει μια Cu-fist διαμόρφωση που προσδένει και Zn. Η βασικότητα του αμινοτελικού άκρου πιθανότατα βοηθάει τον μεταγραφικό παράγοντα να προσδένηται πάνω στο (αρνητικά φορτισμένο) DNA. Πιο αναλυτικά από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε, ότι οι βάσεις 1-41 αποτελούν το πρωτεύον τμήμα πρόσδεσης στο DNA χωρίς την παρουσία του οποίου ο μεταγραφικός παράγοντας δεν μπορεί να προσδεθεί στο DNA (Jensen and Winge, 1998).

Το καρβοξυτελικό τμήμα του Mac1 (159-417) περιέχει δύο επαναλαμβανόμενες περιοχές, πλούσιες σε κυστεΐνες (Cys-X-Cys-X₄-Cys-X-Cys-X₂-Cys-X₂-His) που πιθανόν έχουν την ικανότητα να προσδένουν χαλκό. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται REPI (264-279) και REPII (322-337) και είναι υπεύθυνες για την μεταγραφική ενεργοποίηση (Keller et al., 2005; Serpe et al., 1999; Voutsina et al., 2001). Κάθε ένα από τα μοτίβα αυτά περιεχει 5 συντηρημένες κυστεΐνες και μια ιστιδίνη (Jensen and Winge, 1998)

Πειράματα με ετερόλογη περιοχή πρόσδεση που έγιναν χρησιμοποιώντας τον Mac1, του οποίου του έλειπαν τα αμινοξέα 1-41 (zinc finger περιοχή) έδειξαν ότι μπορούσε να ενεργοποιήσει την μεταγραφή καλύτερα (20 φορές αυξημένη μεταγραφή) από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Η αφαίρεση ολόκληρης της αμινοτελικής περιοχής βελτίωσε ακόμη περισσότερο την ικανότητα του μεταγραφικού αυτού παράγοντα να ενεργοποιήσει την μεταγραφή (εικ.Ε.13) (Jensen and Winge, 1998) ενώ αφαίρεση της REPII βελτιώνει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Voutsina et al., 2001).



Εικόνα Ε.13: Μοντέλο απενεργοποίησης Mac1 από ιόντα χαλκού (Serpe et al., 1999)

Έχει προταθεί η θεωρία ότι περιοχές REPI και REPII, που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, όταν δεσμεύσουν χαλκό αλληλεπιδρούν με την περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης κλείνοντας έτσι τη δομή και απενεργοποιώντας τον Mac1 (Jensen and Winge, 1998). Πιθανότατα τα ιόντα του χαλκού να προσδένονται στον Mac1 χρησιμοποιώντας ως δεσμώτες (ligands) τις σουλφυδρυλομάδες των κυστεΐνων. Τα τμήματα REPI και REPII εμφανίζουν φορτία -5 και -4 αντίστοιχα. Στα REPI και REPII προσδένονται 8 ιόντα χαλκού και μάλιστα 4 σε κάθε μοτίβο με τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζεται ένα συσσωμάτωμα (cluster) χαλκού (Jensen and Winge, 1998). Θα περίμενε λοιπόν κανείς ότι μεταλλαγές σε οποιαδήποτε από τις κυστεΐνες θα οδηγούσε σε διάσπαση της ομάδας ιόντων (cluster) χαλκού. Όμως οι μεταλλαγές δεν δίνουν όλες τον ίδιο φαινότυπο, γεγονός το οποίο μας υποδηλώνει, ότι οι κυστεΐνες δεν είναι ισοδύναμες. Μάλιστα μεταλλαγές, στην ιστιδίνη (θέση his 279), η οποία περιέχει δακτύλιο μιδαζολίου, οδήγησαν σε συνεχώς ενεργό Mac1 (Mac1^{up}),

γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο αμινοξύ είναι κρίσιμο για την ρύθμιση του (Jungmann et al., 1993).

Η ιστιδίνη έχει την ικανότητα να εμφανίζεται φορτισμένη ή αφόρτιστη ανάλογα με το εξωτερικό περιβάλλον. Έτσι δεν είναι τυχαίο, ότι συχνά εμφανίζεται στο ενεργό κέντρο πολλών πρωτεϊνών, όπου ο δακτύλιος ιμιδαζολίου μπορεί γρήγορα να αλλάξει καταλύοντας την δημιουργία και την διάσπαση δεσμών. Πιθανότατα λοιπόν και η ίδια η ιστιδίνη να παίζει κρίσιμο ρόλο στη δέσμευση ιόντων χαλκού προκειμένου να ρυθμίσει τον Mac1 (Serpe et al., 1999).

Στο καρβοξυτελικό άκρο του Mac1 σχηματίζεται μια έλικα που έχει δειχθεί ότι παίζει ρόλο στο διμερισμό (dimerization helix) του Mac1. Μεταλλαγή αυτής δεν επιτρέπει στον Mac1 να διμεριστεί. Ωστόσο ο διμερισμός δεν είναι απαραίτητος για την λειτουργικότητα του Mac1 (Voutsina et al., 2001). Τέλος ο Mac1 περιέχει την αλληλουχία KKXRX₁₅ KKXK, η οποία ουσιαστικά αποτελεί το σήμα για την είσοδο του Mac1 στον πυρήνα (nuclear localization signal) όπου και εντοπίζεται (Serpe et al., 1999)

E.3β) Λειτουργία και τρόποι ρύθμισης του Mac1.

Ο Mac1 είναι όπως προαναφέρθηκε μεταλλορυθμιζόμενος μεταγραφικός παράγοντας. Κύτταρα τα οποία φέρουν μεταλλαγή αφαίρεσης του *MAC1* δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει αντί για γλυκόζη γλυκερόλη, διότι δεν λειτουργεί η οξειδάση του κυτοχρώματος C, η οποία είναι χαλκοπρωτεΐνη, και επομένως δεν γίνεται η διαδικασία της αναπνοής (μιτοχόνδρια). Ο Mac1 ρυθμίζει μεταγραφικά τα γονίδια *CTR1*, *FRE1*, *CTR3*, *FRE7*, *YFR055w* και *YJL217w*. Επικάθεται στην περιοχή CuRE (copper response element) του υποκινητή προκειμένου να μεταγραφεί το γονίδιο (Gross et al., 2000)

Η αλληλουχία του CuRE είναι 5'-TTTGC(T/G)C(A/G)-3' (Jamison McDaniels et al., 1999). Υπάρχει σε τουλάχιστον δύο αντίτυπα σε κάθε ένα από τους υποκινητές των γονιδίων που ενεργοποιεί ο Mac1 (με εξαίρεση τα *YFR055w* και *YJL217w*), γεγονός που συνηγορεί με τα δεδομένα διμερισμού του Mac1. Η απόσταση μεταξύ των δύο CuRE ποικίλλει και τροποποίηση αυτής έχει μικρές συνέπειες στην έκφραση των γονιδίων (Jensen et al., 1998). Το αν θα προσδεθεί ή όχι ο Mac1 στην CuRE, ρυθμίζεται από την

συγκέντρωση των ιόντων του χαλκού μέσα στο κύτταρο. Όταν ελαττωθεί η συγκέντρωση των ιόντων του χαλκού στο θρεπτικό μέσο, τότε ο Mac1 προσδένεται στον υποκινητή με αποτέλεσμα να μεταγράφονται τα γονίδια τα οποία ενεργοποιεί. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη του χαλκού και επομένως παύει να υπάρχει έλλειμμα του συγκεκριμένου μετάλλου. Αύξηση των ιόντων του χαλκού, έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του Mac1 από τον υποκινητή με συνέπεια το σταμάτημα της μεταγραφής των γονιδίων. Το γεγονός αυτό, αποδεικνύεται από πειράματα, *in vivo* footprinting όπου παρουσία CuSO_4 ο υποκινητής του *CTR3* γίνεται πιο προσβάσιμος σε παράγοντες μεθυλίωσης (εξαιτίας της απομάκρυνσης του Mac1) (Heredia et al., 2001). Στην περίπτωση κατά την οποία η ποσότητα των ιόντων χαλκού είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν που απαιτείται στα κύτταρα, τότε έχει παρατηρηθεί αποδόμηση της πρωτεΐνης Mac1 (Zhu et al., 1998). Έχει επίσηςδειχθεί ότι ο Mac1 παίζει ρόλο και στην αποδόμηση του μεμβρανικού μεταφορέα Ctr1 (η Ctr3p δεν αποικοδομείται) άμεσα ή επάγοντας μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στην Ctr1p. Το γεγονός αυτό πιθανόν να αποτελεί άλλον ένα τρόπο ελέγχου και περιορισμού της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης χαλκού (Yonkovich et al., 2002).

Τέλος έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι ο Mac1 υφίσταται μεταμεταφραστική φωσφορυλίωση. Σε συνθήκες έλλειψης χαλκού όπου ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1 είναι ενεργός βρίσκεται στην φωσφορυλιωμένη κατάσταση. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι ο μη φωσφορυλιωμένος Mac1 αποτυγχάνει να προσδεθεί στην περιοχή CuRe σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις χαλκού (Heredia et al., 2001). Επίσης, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA του Mac1, όταν ελεγχθεί απομονωμένη από το υπόλοιπο μόριο, έχει την ικανότητα να προσδεθεί στο DNA χωρίς να είναι φωσφορυλιωμένη. Οπότε μπορεί να εξαχθεί ως συμπέρασμα ότι η ενεργοποιητική περιοχή του Mac1 ρυθμίζει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA μέσω της φωσφορυλίωσης (Heredia et al., 2001).

Πρέπει ωστόσο να επισημανθεί ότι, αν και η φωσφορυλίωση παίζει κεντρικό ρόλο στη δυνατότητα πρόσδεσης του Mac1 στο DNA (σχηματισμός συμπλόκου), δεν ισχύει το ίδιο και για την διάσπαση του συμπλόκου. Με αλλά λόγια η αποφωσφορυλίωση δεν οδηγεί στην αποδέσμευση του Mac1 από το DNA (Heredia et al., 2001).

Ε.4 Εισαγωγή στο μοντέλο οργανισμό σχετικά με τις δυνατότητες γενετικής μοριακής και βιοχημικής ανάλυσης της μεταγραφικής ρύθμισης

Ο σακχαρομύκητας αποτελεί πρότυπο μελέτης φυσιολογίας, βιοχημείας, μηχανισμών κυτταρικής διαφοροποίησης, μεταγωγής σήματος, μοριακής γενετικής και συστηματικής γονιδιωματικής / πρωτεϊνωματικής έρευνας (Barr, 2003; Goffeau, 2000) εξαιτίας μιας σειράς μοναδικών χαρακτηριστικών του. Σημαντικότερα από αυτά είναι ο εύκολος και οικονομικός τρόπος ανάπτυξής του κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, η καλά χαρακτηρισμένη γενετική του και οι εύκολες τεχνικές που εφαρμόζονται για τους γενετικούς χειρισμούς του. Πολλά βασικά κυτταρικά μονοπάτια και βιοχημικές διαδικασίες αρχικά διαλευκάνθηκαν στον σακχαρομύκητα και επομένως πολλά στοιχεία για την βιοχημεία, την γενετική και φυσιολογία του είναι πλέον διαθέσιμα (Rose, 1987-1995).

Επιπλέον ο μονοκύτταρος σακχαρομύκητας αποτελεί τον πρώτο ευκαρυωτικό οργανισμό του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε. Η διαδικασία αλληλούχισης ολοκληρώθηκε το 1996 (Dujon, 1996) για να ανοίξει το δρόμο στην αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος που ολοκληρώθηκε το 2001 (Venter et al., 2001). Υπολογίζεται ότι ο αριθμός των *ORFs* του σακχαρομύκητα ανέρχεται περίπου στα 5600 (Feldmann, 2000).

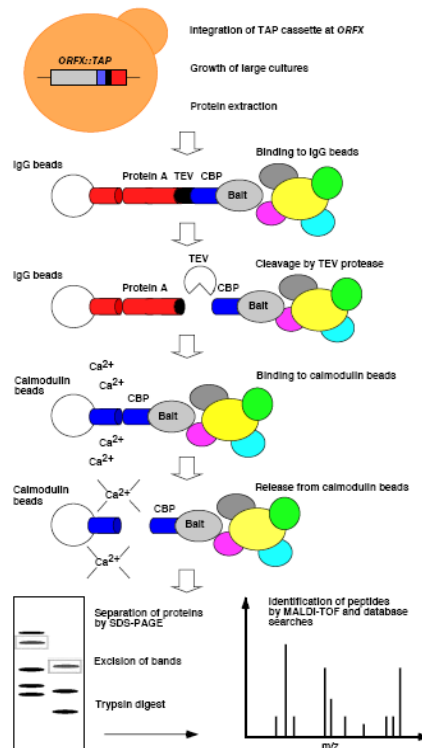
Συνεπώς ο *S. cerevisiae*, χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα ως οργανισμός μοντέλο στο παρελθόν για την διερεύνηση και την θεμελίωση της Βασικής Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας του ευκαρυωτικού κυττάρου. Σήμερα ο σακχαρομύκητας χρησιμοποιείται ως οργανισμός μοντέλο και σε μεταγονιδιωματικές μελέτες (postgenomic studies). Επιπλέον η πλειοψηφία των μεθόδων μεγάλης κλίμακας αξιολογούνται αρχικά στον σακχαρομύκητα με την χρήση καλά ελεγχόμενων και επαναλήψιμων συνθηκών. Τα βέλτιστα χαρακτηριστικά αυτού του οργανισμού και η αξιοποίηση του σε μεγάλης κλίμακας μελέτες σε όλα τα επίπεδα (genome, transcriptome, proteome and metabolome) τον καθιστά ίσως το καλύτερο μοντέλο οργανισμό για την εφαρμογή νέων προηγμένων στρατηγικών, τεχνολογιών και μεθοδολογιών. Ενδεικτικά αναφέρονται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα σε όλα τα επίπεδα έρευνας.

α) Σε επίπεδο γονιδιώματος (*genomic level*): Συστηματική κατασκευή μιας σχεδόν πλήρους συλλογής (περίπου το 96% των annotated ORFs) μεταλλαγμένων στελεχών γονιδιακής αφαίρεσης (gene-deletion mutants- <http://www.unifrankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/complete.html>) με σκοπό την λειτουργική ανάλυση όλων των γονιδίων του σακχαρομύκητα (Giaever et al., 2002; Ross-Macdonald et al., 1999; Winzeler et al., 1999a). Πρόσφατα δημοσιεύθηκε μεθοδολογία {Synthetic Genetic Array (SGA)} για την συστηματική κατασκευή συλλογής διπλών μεταλλαγμάτων με στόχο την ολοκληρωμένη ανάλυση όλων των συνθετικών γενετικών αλληλεπιδράσεων (synthetic lethal genetic interactions) (Tong and Boone, 2006; Tong et al., 2004) και ποσοτικοποίηση των φαινοτύπων (Collins et al., 2007a) Επιπλέον, ανάπτυξη μεθόδου με στόχο την κλωνοποίηση ανθρώπινου cDNA που λειτουργικά συμπληρώνει τα απαραίτητα γονίδια του σακχαρομύκητα, τεχνολογία που οδηγεί στην διαλεύκανση της λειτουργίας πολλών ανθρώπινων γονιδίων (Zhang et al., 2003).

β) Στο επίπεδο έκφρασης γονιδίων (*transcriptome level*): Εκτενής χρήση DNA μικροσυστοιχιών σακχαρομύκητα (Hayes et al., 2002; Lashkari et al., 1997; Spellman et al., 1998; Wodicka et al., 1997) με στόχο τη συστηματική μελέτη των μεταγραφικών αποκρίσεων και των προτύπων έκφρασης κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες ή ποικίλα γενετικά υπόβαθρα (Boer et al., 2003; Bono and Okazaki, 2002; Hayes et al., 2002; Lim et al., 2003).

γ) Στο επίπεδο πρωτεϊνωματικής (*proteome level*): Ανάπτυξη της πρώτης πλήρους μικροσυστοιχίας πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα (Michaud et al., 2003; Mitchell, 2002; Zhu et al., 2003; Zhu and Snyder, 2003) καθώς επίσης και ανάπτυξη στρατηγικών για την προετοιμασία πρωτεϊνικών συστοιχιών (proteins arrays) (Washburn, 2003). Επίσης στον σακχαρομύκητα πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες μελέτες υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών (proteome-wide scale) (Ghaemmaghami et al., 2003; Huh et al., 2003) και η πρώτη φωσφοπρωτεϊνωματική ανάλυση, δηλαδή ο εντοπισμός όλων των φωσφοπρωτεϊνών (Ficarro et al., 2002; Knight et al., 2003). Τέλος στο σακχαρομύκητα διαρκώς εφαρμόζονται νέες μεθοδολογίες με σκοπό να ταυτοποιηθούν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και επομένως να αποκαλυφθούν μονοπάτια και ρόλοι των διάφορων πρωτεϊνών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ανάλυσης των δύο υβριδίων (Fields and Song, 1989; Parrish et al., 2006) και *in vivo* συνανοσοκατακρήμνισης

(<http://www.yeastgenome.org/>). Τα τελευταία χρόνια επίσης επιτεύχθηκε και η απομόνωση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων μέσω του TAP (tandem affinity purification) και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του συμπλόκου με την βοήθεια της φασματομετρίας μάζας και της βάσης δεδομένων των ORFs του *S. cerevisiae* (εικ.Ε14) (protein-protein interaction maps) (Gavin et al., 2002). Τέλος στο σακχαρομύκητα πραγματοποιούνται μεγάλης κλίμακας πειράματα που ως στόχο έχουν την ταυτοποίηση φυσικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το DNA με σκοπό να αποκαλυφθεί το δίκτυο ρύθμισης των γονιδίων αλλά και ο τρόπος με τον οποίο συντηρείται το γονιδίωμα (Lee et al., 2002; Ren et al., 2000)



Εικόνα Ε.14: Σχηματική απεικόνιση του TAP (tandem affinity purification) (Suter et al., 2006)

δ) Σε μεταβολικό επίπεδο (*metabolome level*). Νέες μέθοδοι {(electrospray mass spectrometry (ES-MS))} εφαρμόζονται για την ολοκληρωμένη ανάλυση των μεταβολιτών του σακχαρομύκητα (Castrillo et al., 2003; Castrillo et al., 2007) και ακολουθούνται νέες στρατηγικές (που βασίζονται στην ποσοτικοποίηση μεταβολιτών) με στόχο να αποδοθούν λειτουργίες σε γονίδια των οποίων οι πρωτεΐνες πιθανόν να εμπλέκονται στην

ρύθμιση του μεταβολισμού και τον οποίο η απαλοιφή δεν δίνει κάποιο φαινότυπο (Raamsdonk et al., 2001; Wu et al., 2005). Τέλος ταξινόμηση των μεταλλαγμάτων του σακχαρομύκητα πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας metabolic footprinting (Allen et al., 2003; Pope et al., 2007; Villas-Boas et al., 2005).

ε) Στο επίπεδο Βιοπληροφορικής: Ανάπτυξη νέων μαθηματικών μοντέλων και αλγόριθμων που πρωτοεφαρμόστηκαν στο σακχαρομύκητα (Cornell et al., 2003; Garrels et al., 1997) για την ανάλυση δεδομένων του transcriptome, proteome and metabolome (Cakir et al., 2006; Galbraith et al., 2006; Shen et al., 2006; Wang and Hatzimanikatis, 2006; Xing and van der Laan, 2005).

Επιπλέον σήμερα ο σακχαρομύκητας χρησιμοποιείται ως πρότυπος οργανισμός για τη μελέτη μηχανισμών και μονοπατιών όπως ο μηχανισμός διεκπεραίωσης του κυτταρικού κύκλου (de Lichtenberg et al., 2005; Mimura et al., 2004; Spellman et al., 1998); της μείωσης (Borde et al., 2000; Kitajima et al., 2004; Riedel et al., 2006) της κυτταρικής πολικότητας (Chang and Peter, 2003) των μηχανισμών της εξέλιξης και της ειδογένεσης (Delneri et al., 2003; Kellis et al., 2004; Liti et al., 2006); της γήρανσης και της επέκτασης της ζωής (Anderson et al., 2003; Howitz et al., 2003; Vijg and Suh, 2006);. Επίσης στο σακχαρομύκητα μελετώνται οι μηχανισμοί μόλυνσης και διάδοσης των prions (Collinge and Clarke, 2007; Fernandez-Bellot and Cullin, 2001; Fernandez-Bellot et al., 2002), και ταυτόχρονα ο σακχαρομύκητας χρησιμοποιείται ως πρότυπο για να αποκτήσουμε γνώση στη μοριακή παθολογία νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Outeiro and Lindquist, 2003; Volles and Lansbury, 2007; Willingham et al., 2003)

Με βάση τα πιο πάνω ο σακχαρομύκητας αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στην εποχή μεταγονιδιωματικής έρευνας και βιολογίας συστημάτων Υπολογίζεται ότι μέσα στην επόμενη δεκαετία ο σακχαρομύκητας θα αποτελέσει τον πρώτο ευκαρυωτικό οργανισμό από τον οποίο θα συλλεχθούν πληροφορίες για όλες τις μοριακές αλληλεπιδράσεις, αλλά και για τα μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού σε διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες. Ταυτόχρονα από τον σακχαρομύκητα συλλέγονται πληροφορίες για την δράση των anti-sense RNA τα οποία ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και διαφέρουν από τα μετάγραφα που παράγονται από τα γονίδια που έχουν σχολιαστεί (annotated genes) (David et al., 2006). Οι πληροφορίες αυτές θα βοηθήσουν και στην ανάλυση άλλων

ευκαρυωτικών συστημάτων συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (π.χ ENCODE project: ENCYclopedia Of DNA Elements. <http://www.genome.gov/10005107>).

E.5 Στοιχεία που οδήγησαν στην διερεύνηση ύπαρξης αλληλεπιδρώντων με τον Mac1 και πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με αυτόν.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1 έχει ιδιαίτερη σημασία για την είσοδο του χαλκού στο κύτταρο του σακχαρομύκητα. Μελετώντας τον κάποιος διαπιστώνει ότι υπάρχει μια σειρά από στοιχεία που οδηγούν στην υπόθεση ότι η ενεργότητα του δεν διαμορφώνεται μόνον από την απουσία ή παρουσία ιόντων χαλκού. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί στο εργαστήριο μας ότι ο Mac1 εκφραζόμενος από τον δικό του ή ετερόλογο υποκινητή ενεργοποιεί την μεταγραφή του *CTR1* ακόμα και σε θρεπτικό μέσο με 0.25μM CuSO₄ (SC medium) (Voutsina et al., 2001). Δεύτερον μεγάλης κλίμακας πειράματα επιβεβαίωσαν ότι ο Mac1 προσδένεται τόσο στον υποκινητή *CTR1* όσο και στον *FRE1* σε κύτταρα τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (μεταξύ άλλων πλούσιο και σε ιόντα χαλκού) (Lee et al., 2002). Πρόσφατα επίσης προτάθηκε ότι η αναστολή της ενεργότητας του Mac1 είναι ισχυρότερη και προηγείται της εξασθένησης της δυνατότητας πρόσδεσης του στο DNA σε συνθήκες περίσσειας χαλκού (Keller et al., 2005). Τρίτον σε πειράματα *in vitro* η φωσφορυλιωση του Mac1 φαίνεται να είναι απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί πρόσδεση του στο DNA (Heredia et al., 2001). Τέλος το REPI μοτίβο το οποίο βρίσκεται στην περιοχή ενεργοποίησης του Mac1 εμπλέκεται στο copper switch (Keller et al., 2000), ενώ το REPII (το οποίο αν και δεν χρειάζεται για πλήρως ενεργό χαλκορυθμιζόμενο μόριο *in vivo*), παίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση και επηρεάζει την δυνατότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA *in vitro* (Voutsina et al., 2001). Επιπλέον είναι σαφές ότι ο χαλκός μάλλον είναι απίθανο να κυκλοφορεί ελεύθερος μέσα στον πυρήνα. Πιθανόν να είναι δεσμευμένος σε διάφορους πρωτεϊνικούς παράγοντες με τους οποίους ο Mac1 χρειάζεται να έρθει σε επαφή προκειμένου να τροποποιήσει κατά περίπτωση την ενεργότητά του. Τα ευρήματα και οι υποθέσεις αυτές υποδεικνύουν ότι εκτός από το χαλκό θα πρέπει να υπάρχουν και μια σειρά από πρωτεϊνικούς συρρυθμιστές που συντονίζουν την Mac1-εξαρτώμενη μεταγραφή αλληλεπιδρώντας με τον Mac1.

Προκειμένου να βρεθούν πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανόν αλληλεπιδρά ο Mac1 έγινε σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης ειδικής για αλληλεπίδραση δύο υβριδίων (η βιβλιοθήκη είχε κατασκευαστεί σε φορείς έκφρασης για δοκιμασία δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα) (Bilsland et al., 2004). Στη σάρωση δύο υβριδίων μεταξύ άλλων βρεθηκε και ο Mac1 που όπως προαναφέρθηκε ομοδιμερίζεται προκειμένου να είναι λειτουργικός (Georgakopoulos et al., 2001) (Α. Βουτσινά αδημοσίευτα αποτελέσματα). Καμία από τις αλληλεπιδράσεις εκτός αυτής του Mac1, δεν βρεθηκε στα πειράματα μεγάλης κλίμακας που εμφανίζονται στην SGD (Saccharomyces Genome Database). Επιπλέον μεταξύ των αλληλεπιδρώντων βρέθηκε και η πρωτεΐνη Rad9 (1309 αα). Ο αριθμός των διαφορετικών κλώνων που βρέθηκαν να έχουν το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης ήταν 2 και οι αριθμοί των πρώτων νουκλεοτιδίων που είχαν κλωνοποιηθεί στους κλώνους της βιβλιοθήκης βάσει του ολικού πλαισίου ανάγνωσης ήταν 1954 και 1972 αντίστοιχα. Οι περιοχές αυτές βρέθηκε ότι ειδικότερα αλληλεπιδρούν με την αμινοτελική περιοχή του Mac1 (Α. Βουτσινά αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επιπλέον όπως φαίνεται από τον πίνακα στα αλληλεπιδρώντα βρέθηκε μεταξύ και η πρωτεΐνη Hir1 η οποία θα συζητηθεί παρακάτω.

ORF	Αριθμός κλώνων που βρέθηκαν στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης	Αριθμός διαφορετικών κλώνων που βρέθηκαν στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης	Αριθμός του πρώτου νουκλεοτιδίου που είχε στη βιβλιοθήκη	Μέγεθος ORF
Mac1	16	5	722, 814, 868, 876, 892	1254
Hir1	9	1	1179	2523
Rad9	3	2	1954, 1972	3930

Πίνακας Ε.1: Αλληλεπίδραση δύο υβριδίων (Α. Βουτσινά αδημοσίευτα αποτελέσματα)

Στα επόμενα κεφάλαια περιγράφεται η λειτουργική ανάλυση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Rad9 και Hir1 με τον Mac1 από τις οποίες καταδεικνύονται και νέοι ρόλοι για τις εν λόγω πρωτεΐνες. Επίσης περιγράφεται η διαδικασία απομόνωσης και χαρακτηρισμού πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που συναπομονώθηκαν με τον Mac1 και η προοπτική της ανάλυσής τους.

Γ) ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Νέος ρόλος της πρωτεΐνης ελέγχου του κυτταρικού κύκλου Rad9 στην Mac1 ρυθμιζόμενη μεταγραφή.

1.1.	<u>Εισαγωγή</u>	40
1.1.1	Βλάβη και επιδιόρθωση του DNA	40
1.1.2	Πρωτεΐνη Rad9	45
1.1.2α)	Περιγραφή λειτουργικού-βιοχημικού ρόλου.....	45
1.1.2β)	Περιγραφή δομής της Rad9.....	45
1.1.3	Τροποποιήσεις ιστονών κατά την διάρκεια βλάβης DNA.	49
1.1.4	Ρόλος του μηχανισμού επιδιόρθωσης κατά την μείωση	52
1.2	<u>Αποτελέσματα</u>	55
1.2.1	Ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1 αλληλεπιδρά με την φωσφοπρωτεΐνη Rad9 <i>in vivo</i>	55
1.2.2	Ο Mac1 αλληλεπιδρά άμεσα με την περιοχή BRCT της Rad9 <i>in vitro</i>	55
1.2.3	Η Rad9 στρατολογείται στους υποκινητές <i>CTR1</i> και <i>FRE1</i> σε συνθήκες επαγωγής και η στρατολόγηση αυτή εξαρτάται από την παρουσία του Mac1	59
1.2.4	Η πρωτεΐνη Rad9 έχει αρνητική δράση τόσο στην δυνατότητα πρόσδεσης του Mac1 στο DNA όσο και στην μεταγραφική του ενεργότητα	61
1.2.5	Η Rad9 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του γονιδίου <i>CTR1</i> ακολουθώντας το πρότυπο στρατολόγησης της RNA	63

	πολυμεράσης Π.....	
1.2.6	Το χαρακτηριστικό πρότυπο κατανομής της πολυμεράσης δεν επηρεάζεται από την απουσία της Rad9.....	67
1.2.7	Ποιος στρατολογεί την Rad9 στην κωδική περιοχή;	68
1.2.7α)	Η στρατολόγηση της Rad9 στον υποκινητή και στην κωδική	68
1.2.7β)	περιοχή του <i>CTR1</i> εν μέρει οφείλεται στην Hir1.....	
	Η Rad9 και η διμεθυλίωση στην λυσίνη 79 (K79) της ιστόνης	70
1.2.7γ)	H3 συνεντοπίζονται στην κωδική περιοχή του <i>CTR1</i>	
	Στοιχεία του υποκινητή και όχι επιγενετικά σημάδια είναι	72
1.2.8	υπεύθυνα για τον εντοπισμό του Rad9 στην κωδική περιοχή του <i>CTR1</i>	
	Η Rad53 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του <i>CTR1</i>	75
1.2.9	(αλλά είναι μη ανιχνεύσιμη στον υποκινητή του).	
	Η Rad9 δεν φαίνεται να έχει συνθετικό φαινότυπο με τις	77
1.2.10	υπομονάδες του γFACT στις συνθήκες που ελέγχθηκαν.....	
1.3	Η πρωτεΐνη Asf1 δεν φαίνεται να επηρεάζει την	79
1.3.α	μεταγραφή του <i>CTR1</i>.....	
1.3.β	<u>Συζήτηση</u>.....	80
	Εμπλέκεται η Rad9 στην μεταγραφική επιμήκυνση;.....	83
	Μοντέλο στο οποίο η Rad9 αποτελεί κόμβο μεταξύ της	83
	μεταγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA σε φυσιολογικές (unchallenged) συνθήκες.....	

1.1. Εισαγωγή

1.1.1 Βλάβη και επιδιόρθωση του DNA

Αν και το DNA είναι εξαιρετικά σταθερό μόριο ωστόσο κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να υποστεί βλάβες. Επομένως είναι απαραίτητη η ύπαρξη συστημάτων που να ανιχνεύουν τυχόν βλάβες, να σταματούν τον κυτταρικό κύκλο αν απαιτείται (σε εκτεταμένα προβλήματα) και τελικά να τις επιδιορθώνουν. Αν τελικά δεν επιτευχθεί η επιδιόρθωση τότε κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση. Τα σημεία ελέγχου (checkpoints) είναι εξαιρετικά συντηρημένα μονοπάτια επιτήρησης και σηματοδότησης, που ως στόχο έχουν να συντονίζουν την αντιγραφή του DNA με άλλες διαδικασίες όπως με την επιδιόρθωση του DNA, τον ανασυνδυασμό, την συνοχή των αδελφών χρωματίδων και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Melo and Toczyski, 2002). Οι πρωτεΐνες των σημείων ελέγχου (checkpoint proteins) προσδιορίστηκαν αρχικά επειδή η απώλεια λειτουργίας τους οδηγούσε σε προβληματική διεκπεραίωση του κυτταρικού κύκλου σε συνθήκες επαγόμενης βλάβης του DNA ή του διπλασιασμού του DNA. Προβλήματα στα σημεία ελέγχου οδηγούν στην μειωμένη αντίσταση των κυττάρων σε παράγοντες που προκαλούν stress (genotoxic stress) ή σταμάτημα της αντιγραφής, γεγονός τα οποία τελικά μπορούν να οδηγήσουν σε αστάθεια και αναδιοργανώσεις του γονιδιώματος και τελικά σε θάνατο (Kolodner et al., 2002).

Οι πρωτεΐνες ελέγχου στον *Saccharomyces cerevisiae*, παρουσιάζουν δομικές ή/ και λειτουργικές ομολογίες με πρωτεΐνες που συναντάμε σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (πίνακας 1.1.1) (Melo and Toczyski, 2002). Όταν το DNA υποστεί βλάβη τότε επάγεται ένας καταρράκτης μεταγωγής σήματος της βλάβης (checkpoint response). Αρχικά οι πρωτεΐνες αισθητήρες (sensor proteins) ανιχνεύουν την βλάβη στο DNA και ενεργοποιούν τους μετατροπείς (transducers) που συνήθως είναι πρωτεϊνικές κίνεσες και οι οποίες με την σειρά τους ενισχύουν και διαβιβάζουν το σήμα στους δέκτες (receivers ή effectors). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι τελικοί στόχοι του μονοπατιού και περιλαμβάνουν τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA καθώς και τις κυκλοεξαρτώμενες κίνεσες που θα

τροποποιήσουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στη ζημία που υπέστη το DNA.

	Budding yeast	Fission yeast	Human
PIKK	Mec1	Rad3	ATR
PIKK	Tel1	Tel1	ATM
Adaptor	Rad9	Crb2	53BP1, MDC1, BRCA1?
Rfc1 homolog	Rad24	Rad17	Rad17
9-1-1 clamp	Rad17	Rad9	Rad9
	Mec3	Hus1	Hus1
	Ddc1	Rad1	Rad1
MRX complex	Mre11	Mre11	Mre11
	Rad50	Rad50	Rad50
	Xrs2	Nbs1	Nbs1
BRCT domain adaptor?	Dpb11	Rad4/Ct5	TopBP1
Signaling kinase	Rad53	Cds1	Chk2
Signaling kinase	Chk1	Chk1	Chk1
Polo kinase	Cdc5	Plp1	Plk1
Securin	Pds1	Cut2	Securin
Separase	Esp1	Cut1	Separase
APC-targeting subunit	Cdc20	Slp1	p53 ^{CDC} /CDC20

Πίνακας 1.1.1: Ομόλογες πρωτεΐνες μεταξύ ευκαρυωτικών οργανισμών στο μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες στο DNA.

Αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα η υπεριώδης ακτινοβολία, μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην νουκλεοτιδική δομή επηρεάζοντας συνήθως μόνο την μια από τις δύο αλυσίδες του DNA. Σε τέτοιες περιπτώσεις που το πρόβλημα εντοπίζεται σε επίπεδο νουκλεοτιδίου τότε επάγονται κυρίως δύο συστήματα επιδιόρθωσης. Το ένα είναι το *Σύστημα Απομάκρυνσης Βάσης* (Base excision repair) το οποίο ανιχνεύει και επιδιορθώνει μικρές τροποποιήσεις, όπως για παράδειγμα μεθυλιώσεις στο DNA, απομακρύνοντας ουσιαστικά μόνο το νουκλεοτίδιο που φέρει την προβληματική βάση και το άλλο είναι το *Σύστημα Απομάκρυνσης Νουκλεοτιδίων* (Nucleotide excision repair), που ανιχνεύει μεγαλύτερης έκτασης βλάβες (πχ διμερή τα οποία έχουν προκύψει από έκθεση σε UV και 6-4 φωτοπαράγωγα) και τις διορθώνει απομακρύνοντας ένα μικρό τμήμα μονόκλωνου DNA (helix distorting lesion) το οποίο μεταξύ άλλων περιέχει και τα νουκλεοτίδια που φέρουν την βλάβη (van den Boom et al., 2002).

Δεν είναι όμως λίγες οι περιπτώσεις όπου μπορεί να σπάσουν και οι δύο αλυσίδες (double strand break-DSB) κυρίως εξαιτίας ακτινοβολίας X (ionizing radiation) ή διάφορων χημικών (π.χ μπλεομυκίνης). Ένας τρόπος για να επιδιορθωθούν προβλήματα

τέτοιου τύπου στη φάση G1 είναι μέσω της *Μη ομόλογης ένωσης άκρων* (Non homologous end joining) όπου τα άκρα που εκτίθενται απλά ενώνονται με την βοήθεια λιγάσης. Ο τρόπος αυτός βέβαια δεν είναι ο ιδανικός μια και συχνά νουκλεοτίδια χάνονται στο σημείο επιδιόρθωσης. Πιο ακριβής και αποτελεσματικός τρόπος επιδιόρθωσης μπορεί να επιτευχθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ του σπασμένου χρωμοσώματος και της αδελφής χρωματίδας (φάση G2) ή μεταξύ του σπασμένου χρωμοσώματος και του ομολόγου του (μειωτική πρόφαση).

Στο ερώτημα ποια είναι τα αρχικά χρωμοσωμικά σήματα που "αναγνωρίζονται" σε περίπτωση προβληματικής δομής του DNA η μη-αναδιπλασιασμένου DNA, διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί. Το πιο πιθανόν είναι ότι, κάποιες πρωτεΐνες ενεργοποιούνται και στρατολογούνται στις προβληματικές περιοχές από πρωτεϊνικά συγκροτήματα τα οποία παρουσιάζουν συνάφεια με μη φυσιολογικές δομές DNA. Πιθανόν καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του κυττάρου ένας μεγάλος αριθμός από πρωτεΐνες σαρώνει το γονιδίωμα με εξαιρετική ευαισθησία και ταχύτητα. Σε περίπτωση που έχουμε μια εκτεταμένη βλάβη στο DNA και χρειάζεται να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος τότε ενεργοποιείται ειδικός μηχανισμός απόκρισης που περιλαμβάνει την στρατολόγηση των κινασών ATM και /ή ATR οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν ποικίλες πρωτεΐνες και τις συγκεντρώνουν στην περιοχή βλάβης. Η ATR χρειάζεται για την απόκριση σε εκτεταμένη νουκλεοτιδική βλάβη σε σταματημένες διχάλες αντιγραφής, και σε DSB ενώ η ATM μόνο σε DSB (Abraham, 2001).

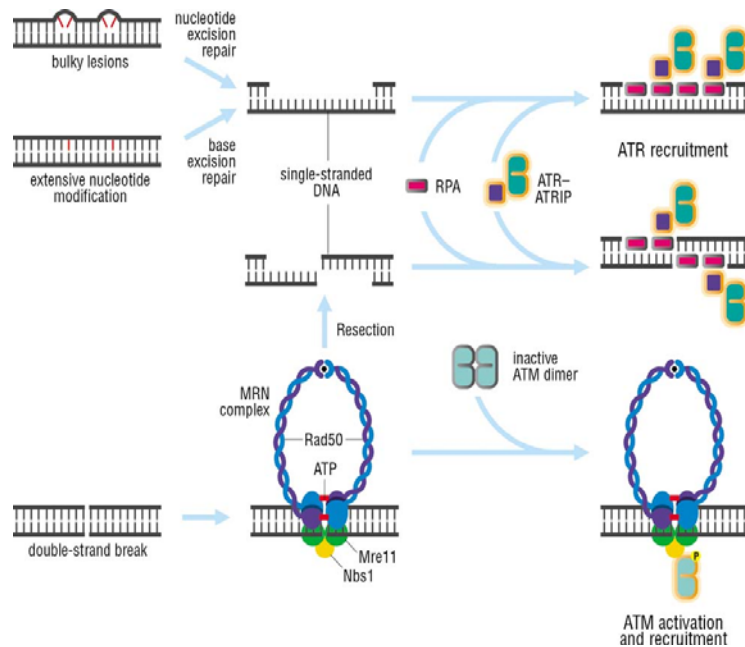
ATR έχει την δυνατότητα να αναγνωρίζει μονόκλωνο DNA. Το μονόκλωνο DNA μπορεί να προκύψει κατά την διάρκεια του NER (nucleotide excision repair), BER (Base excision repair), έκθεσης σε UV (υπεριώδης ακτινοβολία), αντιγραφής, γεγονός το οποίο εξηγεί γιατί έχει την δυνατότητα να αναγνωρίζει τόσες πολλές διαφορετικές μορφές βλαβών. Το πιο πιθανόν είναι ότι η ATR στρατολογείται στο σημείο της βλάβης μέσω της αλληλεπίδρασης της με την RPA (replication protein A) (Zou and Elledge, 2003). Η RPA είναι ένα τριμερές σύμπλοκο με πρωταρχικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA. Νημάτια RPA (RPA filaments) έχουν την ικανότητα να «σκεπάζουν» (coat) μονόκλωνες περιοχές DNA (ss-DNA). Με τον τρόπο αυτό συμβάλλουν στη δημιουργία δομών DNA-πρωτεΐνης που λειτουργούν ως πομποί σημάτων για την στρατολόγηση της μηχανής επιδιόρθωσης του DNA (Branzei and Foiani, 2005).

Τα κύτταρα είναι γενικά πιο ευαίσθητα σε βλάβες κατά την φάση S και όχι κατά την G1. Μικροπροβλήματα στην δομή του DNA που συμβαίνουν κατά την G1 δεν επάγουν την στρατολόγηση της ATR πιθανόν γιατί μέχρι να ξεκινήσει η αντιγραφή έχουν διορθωθεί. Αντίθετα η ATR οπωσδήποτε στρατολογείται σε περίπτωση βλάβης κατά την φάση S όπου παρατηρείται εκτεταμένος σχηματισμός μονόκλωνου DNA διότι καθλώνονται οι διχάλες επιδιόρθωσης του DNA.

Η ATR κατά την φάση S έχει την δυνατότητα να αναγνωρίζει και DSB. Συγκεκριμένα αρχικά στο σημείο βλάβης στρατολογείται το σύμπλοκο Mre11–Rad50–Xrs2 (MRX στο σακχαρομύκητα ή MRN: Mre11–Rad50–Nbs1 στα θηλαστικά) το οποίο αναγνωρίζει και συγκρατεί τα δύο άκρα του σπασίματος. Επειδή στη φάση αυτή τα επίπεδα της Cdk (φάση S και μίτωση) είναι υψηλά το σύμπλοκο αυτό κάνει επανακοπή (resection) του DNA σχηματίζοντας μονόκλωνες περιοχές μέσω της υπομονάδας του Mre11. Κατόπιν ο μηχανισμός επιδιόρθωσης χρησιμοποιεί ως μήτρα την αδελφή χρωματίδα για την ακριβή επιδιόρθωση (όταν τα επίπεδα της Cdk είναι χαμηλά δηλαδή στην φάση G1, το σύμπλοκο συμπεριφέρεται διαφορετικά όπως θα δούμε παρακάτω) Από τα νημάτια RPA, ανεξάρτητα από την ATR, στρατολογείται και το σύμπλοκο Rad24-RFC (replication FACTor C-like complex with Rad24). Το σύμπλοκο αυτό με τη σειρά του στρατολογεί το ετεροτριμερές σύμπλοκο σημείων έλεγχου Rad17/3/1 (Rad17, Mec3, και Ddc1 ή αλλιώς PCNA –like με ομόλογο στον άνθρωπο το σύμπλοκο 9-1-1) το οποίο σχηματίζει ένα δακτύλιο γύρω από την προβληματική περιοχή (Majka et al., 2006). Γι αυτό και κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις στο RFC δεν έχουν την δυνατότητα να επιβραδύνουν την διαδικασία του διπλασιασμού (φάση S) σε περίπτωση βλάβης του DNA (Sugimoto et al., 1997).

Η κινάση ATM (στο σακχαρομύκητα Tel1) όπως προαναφέρθηκε στρατολογείται μόνο στην περίπτωση DSB. Για να στρατολογηθεί η ATM απαιτείται να αναγνωρίσει το τριμερές σύμπλοκο MRX το οποίο έχει προηγουμένως στρατολογηθεί στο DSB. Στη συνέχεια λόγω της αλληλεπίδρασης με την υπομονάδα Xrs2 από μονομερές μετατρέπεται σε διμερές και αφού αυτοφωσφορυλιωθεί, φωσφορυλιώνει μια σειρά από άλλες πρωτεΐνες ξεκινώντας την απόκριση στη βλάβη (Lee and Paull, 2005). Στην φάση G1 η Cdk βρίσκεται σε χαμηλά ποσοστά οπότε η resection δράση του συμπλόκου MRX έχει κατασταλεί και επομένως το συγκεκριμένο σύμπλοκο μαζί με άλλες πρωτεΐνες

επιδιορθώνει απευθείας τα DSB με μη ομόλογη σύνδεση ακρών (non homologous end joining) (εικ.1.1.1) (Knop et al., 1999).



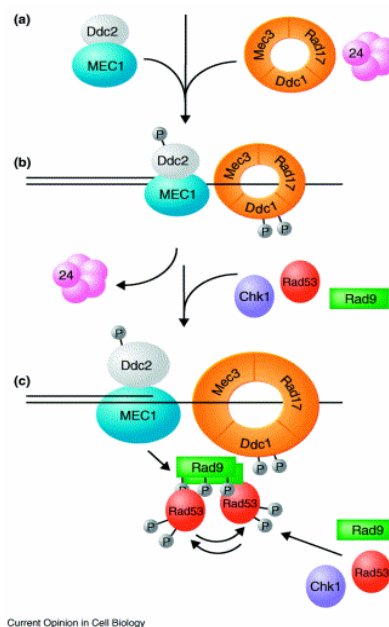
Εικόνα 1.1.1: Απόκριση σε βλάβη DSB. Το σύμπλοκο MRN του οποίου κεντρική υπομονάδα είναι η Rad50, στρατολογείται στην περιοχή βλάβης. Η Nbs1 (αποτελεί άλλη υπομονάδα του MRN) στρατολογεί την κινάση ATM. Η ATM μετατρέπεται από ανενεργό διμερές σε αυτοφωσφορυλιωμένο ενεργό μονομερές και αρχίζει την απόκριση στη βλάβη. Στη φάση S αλλά και κατά την μίτωση (όχι στην φάση G1) η Cdk διευκολύνει την Mre11 (αποτελεί υπομονάδα του MRN) να ενεργοποιήσει την επανακοπή (resection) του DNA οδηγώντας σε ενεργοποίηση της ATR και των RPA. Στην περίπτωση αυτή η επιδιόρθωση επιτυγχάνεται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Morgan, 2006).

Οι πρωτεΐνες ATR και ATM εκτός από ότι στρατολογούν μια σειρά από πρωτεΐνες με σκοπό να επιδιορθωθεί το DNA, ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης και πρωτεΐνες όπως οι κινάσες Chk1 και η Rad53 (Chk2 στα θηλαστικά) οι οποίες μεταφέρουν το σήμα βλάβης σε πρωτεΐνες του συστήματος ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Pelliccioli and Foiani, 2005). Σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση των κινασών αυτών στο σημείο βλάβης έχουν μια σειρά από πρωτεΐνες που καλούνται διαμεσολαβητές (mediator proteins) ή προσαρμοστές (adaptor proteins). Μια από τις πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες adaptor στο σακχαρομύκητα είναι η Rad9.

1.1.2 Πρωτεΐνη Rad9

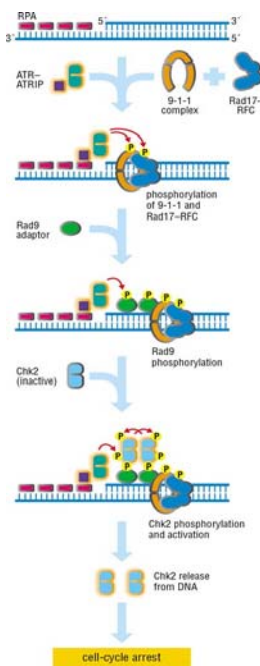
1.1.2α) Περιγραφή λειτουργικού-βιοχημικού ρόλου

Μετά την πρόσδεση των συμπλόκων Rad17/3/1 και Rad24-RFC στρατολογείται στην περιοχή της βλάβης και η Rad9 (πιθανή ομόλογη της Rad9 στον άνθρωπο είναι η 53BP1). Η πρωτεΐνη που την στρατολογεί δεν είναι γνωστή. Πιθανόν να στρατολογείται μέσω αλληλεπίδρασης της με την ATR καθώς και μέσω της αλληλεπίδρασης της και με άλλες τοπικές χρωματινικές πρωτεΐνες (Naiki et al., 2004). Μετά την πρόσδεση της στην προβληματική περιοχή η Rad9 υπερφωσφορυλιώνεται από την ATR ή ATM (η Rad9 πρωτεΐνη είναι υποφωσφορυλιωμένη όταν το DNA δεν έχει υποστεί βλάβη) (Emili, 1998; Vialard et al., 1998). Η υπερφωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε στρατολόγηση της Rad53 (checkpoint κινάση) από την Rad9 (εικ.1.1.2) (Blankley and Lydall, 2004). Η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων των περιοχών FHA (fork head-associated) της Rad53 και των φωσφορυλιωμένων περιοχών της Rad9 (εικ.1.1.3) (Schwartz et al., 2002).



Εικόνα 1.1.2: Μοντέλο στρατολόγησης πρωτεϊνών σε περίπτωση βλάβης του DNA

Μέσω στοχευμένης μεταλλαξογενεσης (site directed mutagenesis), βρέθηκαν πολλές περιοχές της Rad9 που φωσφορυλιώνονται όταν το DNA υποστεί βλάβη και οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της Rad53 (εικ.1.1.3). Τόσο η Rad53 όσο και η Rad9, εκτός από την ικανότητα που έχουν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, έχουν την ικανότητα να κάνουν και ομότυπες αλληλεπιδράσεις (αλληλεπίδραση με τον εαυτό τους) (Ma et al., 2006; Soulier and Lowndes, 1999). Οι πιο πάνω αλληλεπιδράσεις πιθανόν να έχουν ως στόχο την συσσώρευση πολλών checkpoint πρωτεϊνών έτσι ώστε να ενισχύεται το σήμα βλάβης (Sweeney et al., 2005).

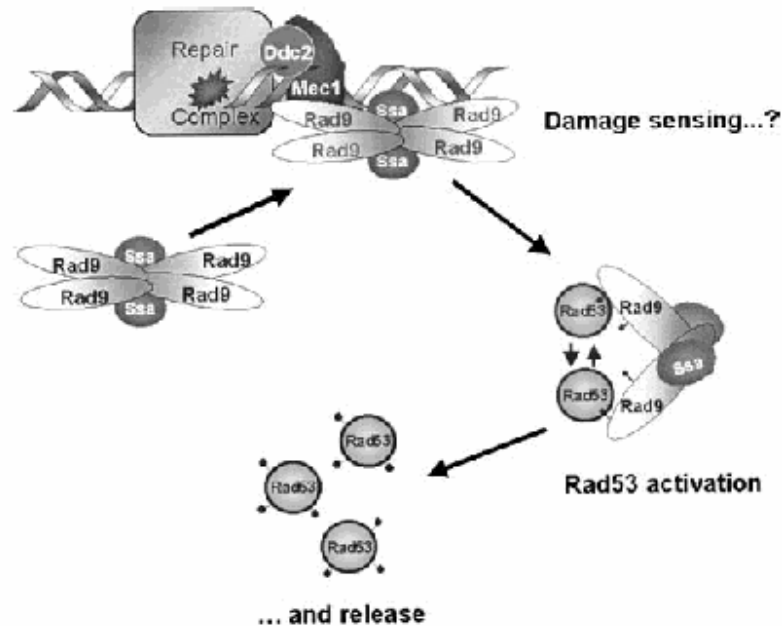


Εικόνα1.1.3: Απόκριση κινασών μετά από βλάβη στο DNA. Αρχικά στρατολογούνται ανεξάρτητα η ATR από τις RPA στην περιοχή μονόκλωνου DNA, καθώς και το σύμπλοκο Ddc1-Mec3-Rad17 (9-1-1 στον *S.pombe*) σε περιοχή κοντά στο σημείο βλάβης. Στη συνέχεια η ATR φωσφορυλιώνει υπομονάδες του συμπλόκου Ddc1-Mec3-Rad17. Κατόπιν στρατολογείται η Rad9 πιθανόν μέσω αλληλεπιδράσεων είτε με την ATR είτε με το φωσφορυλιωμένο σύμπλοκο Ddc1-Mec3-Rad17 και ολιγομερίζεται. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε στρατολόγηση της Rad53. Η Rad53 φωσφορυλιώνεται από την ATR και ταυτόχρονα αυτοφωσφορυλιώνεται. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται και αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο προκειμένου να επάγει το μονοπάτι επιδιόρθωσης (Morgan, 2006).

Για την βιοχημικό ρόλο της Rad9 μέχρι πρόσφατα ελάχιστα ήταν γνωστά. Το 2001 απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από τους Gilbert et al., δύο διαφορεικά σύμπλοκα Rad9 (Venter et al., 2001). Το ένα απομονώθηκε από κύτταρα που δεν είχαν υποστεί ακτινοβόληση με UV και το δεύτερο από κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί ακτινοβόληση με UV. Το μεν πρώτο ήταν μεγάλο περίπου 850kDa (τα στοιχεία δεν είναι γνωστά και πιθανόν να περιέχει Rad53) και υποφωσφορυλιωμένο ενώ το άλλο ήταν μικρότερο περίπου 560kDa, υπερφωσφορυλιωμένο και περιείχε και Rad53. Στο μεν πρώτο δεν έχει ακόμα αποδοθεί κάποια βιοχημική ενεργότητα. Δεν έχει συμβεί όμως το ίδιο με το δεύτερο σύμπλοκο. Στην εικόνα 1.1.4 παρουσιάζεται ένα βιοχημικό μοντέλο της δράσης του μικρού συμπλόκου Rad9.

Πιο αναλυτικά η βλάβη του DNA επάγει μέσω των Mec1/Tel1, φωσφορυλίωση του μεγάλου συμπλόκου (850kDa). Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια την αναδιαμόρφωση του συμπλόκου στην υπερφωσφορυλιωμένη μορφή (560kDa). Η αναδιαμόρφωση εμπλέκει διάσπαση των ιοντοευαίσθητων Rad9-Rad9 αλληλεπιδράσεων και σχηματισμό ανθεκτικών αλληλεπιδράσεων στην περιοχή BRCT της Rad9 (van den Bosch and Lowndes, 2004). Πιθανόν στην διαδικασία αυτή να εμπλέκονται και μοριακοί συνοδοί όπως η Ssa1 και η Ssa2 (Toh and Lowndes, 2003).

Κατόπιν ακολουθεί η αγκυροβόληση της Rad53 στο υπερφωσφορυλιωμένη Rad9 γεγονός το οποίο αυξάνει την τοπική συγκέντρωση της Rad53 σε τέτοιο επίπεδο ώστε να επιτρέπεται η trans αυτοφωσφορυλίωση της. Η φωσφορυλίωση της Rad53 συνεπάγεται την απελευθέρωση της από το υπερφωσφορυλιωμένο σύμπλοκο της Rad9. Κατόπιν η ενεργοποιημένη Rad53 στοχεύει υποστρώματα τα οποία χρειάζονται για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και την έκφραση γονιδίων τα οποία χρειάζονται για την επιδιόρθωση του DNA (εικ.1.1.4) (Schwartz et al., 2002).

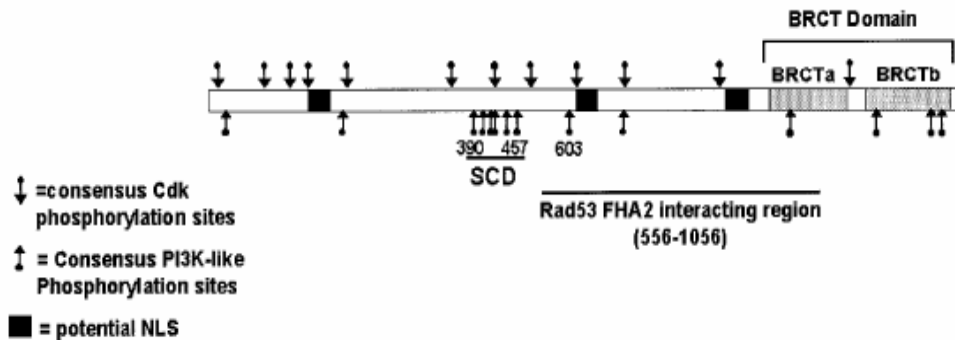


Εικόνα 1.1.4: Βιοχημικό μοντέλο δράσης της Rad9 (Toh and Lowndes, 2003).

1.1.2β) Περιγραφή δομής της Rad9

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Rad9 βρίσκεται στο χρωμόσωμα IV και η κωδικεύουσα περιοχή έχει μέγεθος 3930bp. Η πρωτεΐνη που προκύπτει αποτελείται από 1309 αα και εντοπίζεται στον πυρήνα. Η προβλεπόμενη μοριακή της μάζα υπολογίζεται στα 148.4 kDa. Η Rad9 περιέχει δύο διαδοχικές επαναλήψεις της επικράτειας BRCT στην καρβοξυτελική της περιοχή. Η περιοχή BRCT παρουσιάζει ομολογία με την καρβοξυτελική περιοχή της BRCA 1 (breast cancer associated 1) η οποία συναντάται στα θηλαστικά και ανήκει σε πρωτεΐνες της κατηγορίας των ογκοκατασταλέων (π.χ p53). Οι επικράτειες BRCT παίζουν ρόλο στον ολιγομερισμό της Rad9 που συμβαίνει όταν το DNA υποστεί βλάβη (Toh and Lowndes, 2003). Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη Rad9 συναντάται τόσο σε υποφωσφορυλιωμένη όσο και σε υπερφωσφορυλιωμένη μορφή. Θέσεις που αποτελούν πιθανούς στόχους διαφόρων κινασών προκειμένου να φωσφορυλιωθεί η πρωτεΐνη φαίνονται στην (εικ.1.1.5). Συγκεκριμένα η Rad9 περιέχει 12 πιθανούς στόχους για φωσφορυλίωση από την Cdc28 και 14 πιθανούς στόχους για φωσφορυλίωση από τις PIKKs (Mec1/Tel1), έξι από τους οποίους περιέχονται στην S/T-

Cluster Domain -περιοχή (SCD). Επιπλέον η Rad9, παρουσιάζει θέσεις σήματος NLS (nuclear localization signal), μέσω των οποίων οδηγείται στον πυρήνα. Στην καρβοξυτελικό της άκρο εντοπίζεται επίσης και η περιοχή μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με την Rad53 η οποία όπως προαναφέρθηκε αποτελεί βασικό μόριο στον καταρράκτη που ενεργοποιείται όταν το DNA υποστεί βλάβη (εικ. 1.1.5) (Toh and Lowndes, 2003).



Εικόνα1.1.5: Περιγραφή δομής της Rad9 (Toh and Lowndes, 2003)

Στην Rad9 τέλος συναντάται μια επικράτεια η οποία καλείται tudor και δομικά μοιάζει με περιοχή που εντοπίζεται τόσο στην 53BP1 (άνθρωπος) όσο και στο Ctb2 (fission yeast). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 754 και 947 και είναι σημαντική για την επιβίωση του *Saccharomyces cerevisiae* σε διάφορες συνθήκες stress. (Grenon et al., 2007; Hammet et al., 2007; Lancelot et al., 2007).

1.1.3 Τροποποιήσεις ιστονών κατά την διάρκεια βλάβης DNA.

Όταν το DNA υποστεί βλάβη, εκτός από την σηματοδότηση και την ενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνών παρατηρούνται και τροποποιήσεις ιστονών στη συγκεκριμένη περιοχή. Μια από τις τροποποιήσεις αυτές είναι η φωσφορυλίωση της σερίνης 129 της ιστόνης H2AX (histone variant). Η φωσφορυλιωμένη H2AX (γ -H2AX), μπορεί να ανιχνευτεί σύντομα από τη στιγμή που το DNA θα υποστεί βλάβη. Η συγκεκριμένη τροποποίηση ανιχνεύεται σε μεγάλη περιοχή γύρω από το σημείο που έχει DSB περίπου 1 Mb σε θηλαστικά κύτταρα και 50–100 kb στον ζυμομύκητα (Rogakou et al., 1999). Έχει δειχτεί ότι η γ -H2AX συνεισφέρει στην επιδιόρθωση του DNA και η ύπαρξη της

συγκεκριμένης μορφής ιστόνης παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων όταν αυτά έρθουν σε επαφή με παράγοντες επιβλαβείς για το DNA (Downs et al., 2000).

Σημαντικό ρόλο επίσης φαίνεται να παίζει η γ -H2AX στη στρατολόγηση τόσο της πρωτεϊνης ελεγχου του κυτταρικού κυκλου Rad9 όσο και αναδιαμορφωτών χρωματίνης, όπως Ino80, Rvb1, NuA4 και Swr1 στην περιοχή που φέρει το DSB (Downs et al., 2004; Hammet et al., 2007; Morrison et al., 2004).

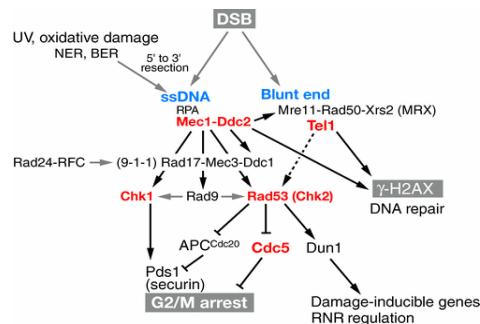
Πάντως φαίνεται πως η συγκεκριμένη ιστονική τροποποίηση έχει σημαντικό ρόλο κατά την επιδιόρθωση DSB μέσω των αδελφών χρωματίδων (Strom et al., 2004). Κύτταρα τα οποία εκφράζουν μη φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2A-S129A επιδιορθώνουν φυσιολογικά DSB που προκύπτουν κατά την μείωση και κατά τον επαγόμενο από την ενδονουκλεάση HO ανασυνδυασμό.


Επίσης στην περιοχή της βλάβης εντοπίζεται και φωσφορυλίωση της σερίνης 1 της ιστόνης H4 στο σακχαρομύκητα (Ross-Macdonald et al., 1999). Η τροποποίηση αυτή εμφανίζεται κάπως αργότερα και εξαρτάται από την κινάση II κασεΐνη (CKII). Το πώς η CKII ενεργοποιείται από την βλάβη του DNA δεν είναι ακόμα γνωστό και επίσης δεν είναι γνωστό αν η συγκεκριμένη τροποποιημένη ιστόνη συνεισφέρει στην επιδιόρθωση της βλάβης ή στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (Ross-Macdonald et al., 1999). Άλλες τροποποιήσεις που φαίνεται να έχουν ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (checkpoint function) είναι η μεθυλίωση της H3 στη λυσίνη 79 (H3-K79Me). Την συγκεκριμένη τροποποίηση φαίνεται να αναγνωρίζει η περιοχή Tudor της πρωτεΐνης Rad9. Η συγκεκριμένη τροποποίηση συνεισφέρει στο να στρατολογηθεί η Rad9 στο σημείο βλάβης DSB (Huyen et al., 2004; Winzeler et al., 1999b). Υπεύθυνη για την τροποποίηση αυτή είναι η μεθυλοτρανσφεράση Dot1. Αφαίρεση της Dot1 οδηγεί σε απαλοιφή της τροποποίησης H3-K79Me και το γεγονός αυτό οδηγεί σε προβληματικό έλεγχο σε διάφορα σημεία (defects in several checkpoints), πιθανόν λόγω προβληματικής στρατολόγησης της Rad9 (Giannattasio et al., 2005; Winzeler et al., 1999b). Πάντως πρόσφατα δημοσιευτήκαν πειράματα *in vitro* στα οποία αμφισβητείται η ικανότητα της Rad9 να αλληλεπιδρά με διμεθυλιωμένη στην ιστόνη H3 λυσίνη K79.μεσω της επικράτειας της tudor (Lancelot et al., 2007).

Στον *S. pombe* η μεθυλίωση της λυσίνης 20 της ιστόνης H4 (H4-K20Me) επίσης συμβάλλει στην στρατολόγηση της Ctrb2 (ομόλογη της *S.c* Rad9) στην περιοχή βλάβης

DNA (Sanders et al., 2004). Ωστόσο, ούτε η H4-K20Me στον *S. pombe* ούτε η H3-K79Me στον *S. cerevisiae* επάγονται από την βλάβη του DNA. Αντίθετα υπάρχουν σε βασικά επίπεδα στη φυσιολογική χρωματίνη (Sanders et al., 2004; van Leeuwen et al., 2002; Winzeler et al., 1999b). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η στρατολόγηση της Rad9 στη συγκεκριμένη περιοχή απαιτεί τοπική αποσυμπύκνωση της χρωματίνης έτσι ώστε να εκτεθεί η συγκεκριμένη τροποποίηση (Sanders et al., 2004). Η ακετυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 56 (H3-K56Ac) μπορεί να επάγει την προσβασιμότητα των πρωτεϊνών στη χρωματίνη. Ωστόσο η τροποποίηση φαίνεται να αναγνωρίζεται μόνο από πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και όχι από πρωτεΐνες ελέγχου (Masumoto et al., 2005).

Πολύ πρόσφατα δείχθηκε στα θηλαστικά ότι η γ -H2AX αναγνωρίζεται από την MDC1, η οποία επίσης είναι πρωτεΐνη adaptor και περιέχει μια BRCT επικράτεια (domain). Πιθανόν η πρωτεΐνη αυτή να λειτουργεί ανάλογα με την Rad9 (Lou et al., 2006; Stucki et al., 2005). Συνεπώς πολλές διαφορετικές χρωματινικές τροποποιήσεις φαίνεται να έχουν ρόλο στην στρατολόγηση πρωτεϊνών για την επιδιόρθωση της βλάβης αλλά και για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (εικ.1.1.6).



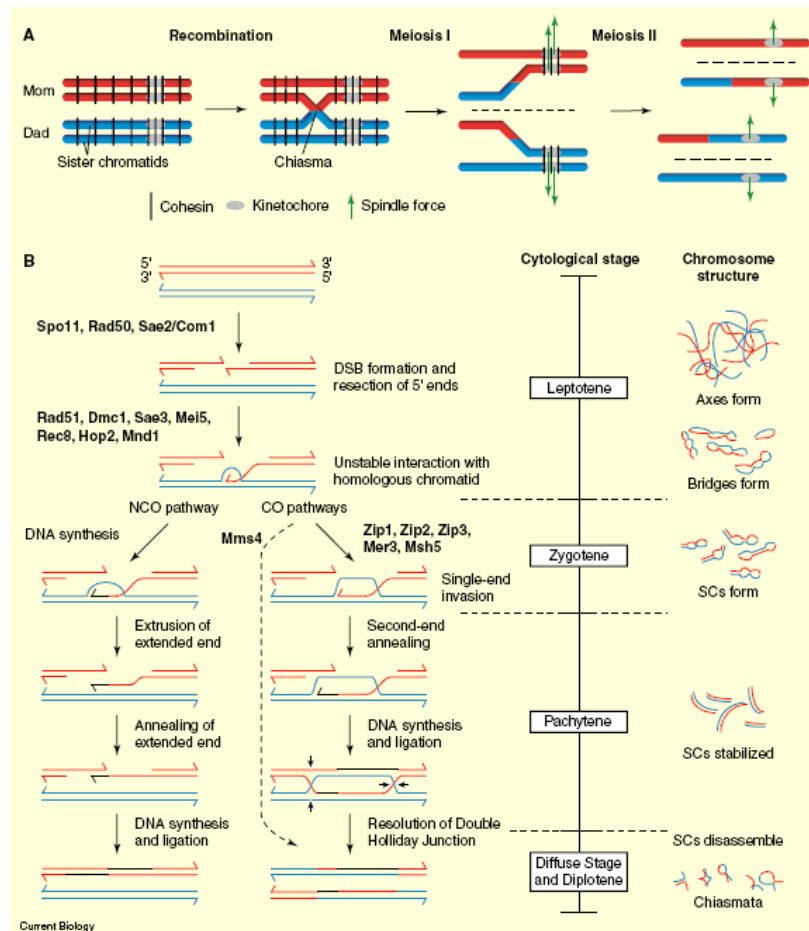
 Harrison JC, Haber JE. 2006. Annu. Rev. Genet. 40:209–35

Εικόνα 1.1.6: Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού που επάγεται σε περίπτωση δίκλωνου σπασίματος DNA (Harrison and Haber, 2006)

1.1.4 Ρόλος του (μειωτικού) μηχανισμού επιδιόρθωσης κατά την μείωση

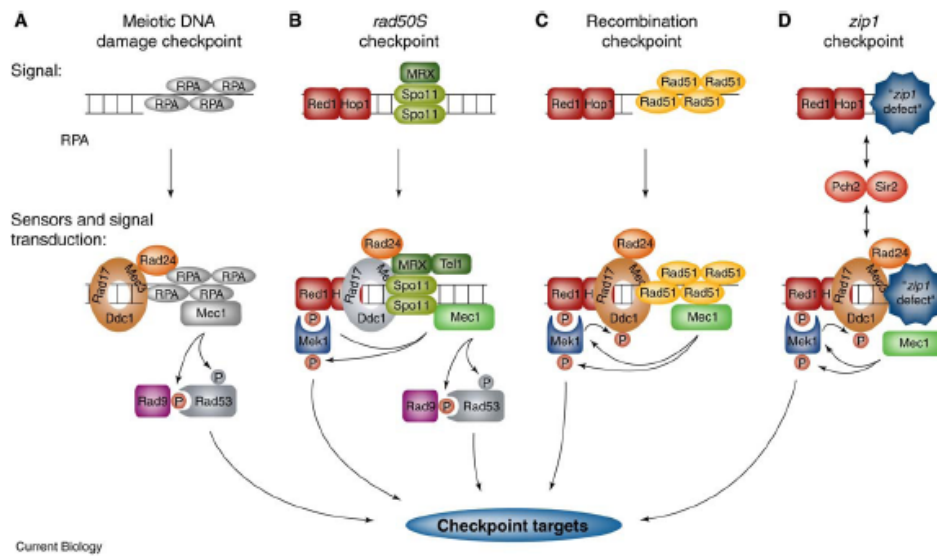
Ο ανασυνδυασμός είναι ένα σημαντικό και απαραίτητο χαρακτηριστικό των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Διασφαλίζει τον σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την μείωση I με το να παρέχει φυσικούς συνδέσμους μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων. Επίσης ο ανασυνδυασμός έχει ως αποτέλεσμα την ανταλλαγή και την επαναταξινόμηση της πληροφορίας κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (Hawley *et al* 1989). Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται ο μειωτικός ανασυνδυασμός ήταν και είναι αντικείμενο μελέτης.

Απαραίτητο για να μπορέσουν να συνδεθούν τα ομόλογα χρωμοσώματα και να παραταχθούν σωστά κατά την μετάφαση I είναι να συμβούν στο γονιδίωμα DSB. Ο μειωτικός ανασυνδυασμός ξεκινάει από το ένζυμο Spo11 (topoisomerase-like enzyme) το οποίο εισάγει DSB στο DNA. Κατόπιν ακολουθεί επανακοπή (resection) έτσι ώστε να δημιουργηθεί μονόκλωνο DNA (ssDNA) (Keeney, 2001). Ακολούθως άλλες πρωτεΐνες όπως η Rad51 και η Dmc1 επιδιορθώνουν την βλάβη χρησιμοποιώντας ως μήτρα ομόλογη περιοχή που συνήθως προέρχεται από ομόλογο χρωμόσωμα και όχι από αδελφή χρωματίδα (Schwacha and Kleckner, 1997). Σημαντικό ρόλο στο να επιλεγθεί ως μήτρα επιδιόρθωσης το ομόλογο χρωμόσωμα φαίνεται να παίζει η κινάση Mek1, η οποία εμποδίζει την χρησιμοποίηση της αδελφής χρωματίδας ως μήτρα (Niu *et al.*, 2005). Καθώς γίνεται επεξεργασία του DSB δημιουργείται κατά μήκος των μειωτικών χρωμοσωμάτων μια πρωτεϊνική δομή (meiosis specific proteinaceous structure) που καλείται συναπτονημικό σύμπλοκο (synaptonemal complex -SC). Το SC, στοιχεία του οποίου αποτελούν οι πρωτεΐνες Zip1, Zip2, Zip3, Mer3 και Msh3, συναρμολογείται μεταξύ ζευγών ομόλογων χρωμοσωμάτων φέρνοντας απέναντι τις ομόλογες περιοχές (εικ.1.1.7) (Page and Hawley, 2004).



Εικόνα1.1.7: Σχηματική απεικόνιση του ομόλογου ανασυνδυασμού κατά την μείωση (Hochwagen and Amon, 2006)

Ωστόσο επειδή τα DSB που συμβαίνουν κατά τον μειωτικό ανασυνδυασμό εμπλεκούν υψηλή πιθανότητα κινδύνου (π.χ. απώλεια χρωμοσωμικού βραχίονα) απαραίτητη είναι η στρατολόγηση μηχανισμών επιτήρησης στις συγκεκριμένες περιοχές καθώς και πρωτεϊνών που ως στόχο έχουν το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου σε περίπτωση που η χρωμοσωμική ανταλλαγή δεν επιτελείται σωστά (εικ.1.1.7) (Borner, 2006).



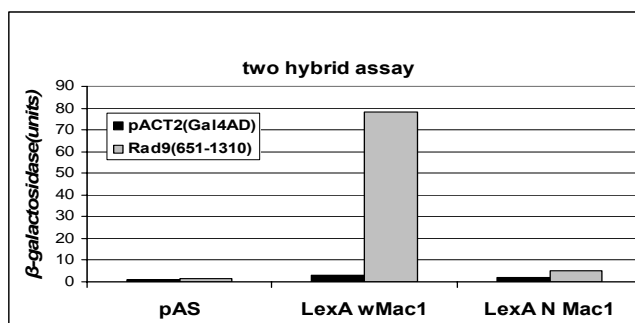
Εικόνα1.1.8: Μηχανισμοί επιτήρησης του ομόλογου ανασυνδυασμού κατά την μείωση (Hochwagen and Amon, 2006)

Υπάρχουν πειραματικά στοιχεία που δείχνουν ότι, ο μηχανισμός επιτήρησης του μειωτικού ανασυνδυασμού, επιδιόρθωσης τυχόν προβλημάτων και, σε περίπτωση ανάγκης σταματήματος του κυτταρικού κύκλου είναι αντίστοιχος με αυτόν του μιτωτικού κύκλου. Υπάρχουν όμως και πρωτεΐνες του επιδιορθωτικού μηχανισμού όπως για παράδειγμα η Rad17 και η Rad24 που έχουν σημαντικό ρόλο στην διεκπεραίωση του «χωρίς προκλήσεις» (unchallenged) μειωτικού ανασυνδυασμού (Shinohara et al., 2003). Το ίδιο βρέθηκε πρόσφατα μέσω γενετικών πειραμάτων και για την κινάση Mec1 η οποία φαίνεται να παίζει ένα μη αναμενόμενο θετικό ρόλο κατά την διεκπεραίωση της φυσιολογικής μείωσης (Carballo and Cha, 2007). Η Rad9 φαίνεται να δρα σε περίπτωση προβληματικού μειωτικού ανασυνδυασμού επάγοντας το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου προκειμένου να διορθωθεί η βλάβη.

1.2 Αποτελέσματα

1.2.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας Mac1 αλληλεπιδρά με την φωσφοπρωτεΐνη Rad9 *in vivo*

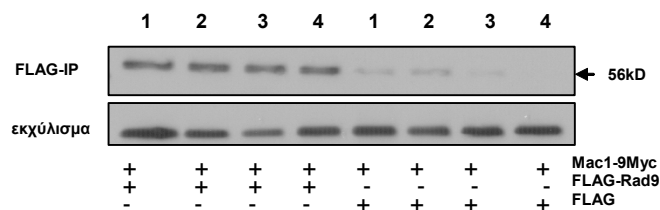
Η αρχική διερεύνηση της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ των Mac1 και Rad9 που έγινε *in vivo*, με το σύστημα των δύο υβριδίων μέσω προσδιορισμού της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης, έδωσε θετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα ανιχνεύσαμε αλληλεπίδραση μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της Rad9 (αμινοξέα 651-1310) το οποίο ήταν κλωνοποιημένο έτσι ώστε να εκφράζει υβριδική πρωτεΐνη με την περιοχή ενεργοποίησης της Gal4 (Gal4AD C-Rad9) και του Mac1 ο οποίος ήταν κλωνοποιημένος έτσι ώστε να σχηματίζει υβριδική πρωτεΐνη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (LexADBD-Mac1) (Α. Βουτσινά). Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στην εικόνα 1.2.1.



Εικόνα 1.2.1: *In vivo* αλληλεπίδραση της Rad9 με τον Mac1 με το σύστημα δύο υβριδίων. Οι έλεγχοι των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο SCBCS με μέτρηση της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης υγρών καλλιιεργειών μετασχηματισμένων κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν τα δύο υποψήφια αλληλεπιδρώντα πεπτίδια. Η εκτίμηση για την ύπαρξη ή όχι αλληλεπίδρασης, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, βασίστηκε στη σύγκριση της ενεργότητας κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν και τα δύο πεπτίδια με την αντίστοιχη κυττάρων στα οποία εκφράστηκε μόνο το προσδεδεμένο στο DNA. Το γονίδιο αναφοράς *LacZ* στο πλασμίδιο pJK103, περιέχει υποκινητή με τέσσερα αλληλεπικαλυπτόμενα σημεία πρόσδεσης της πρωτεΐνης LexA αριστερά του *CUCI* TATA ($\text{box}4 \times \text{LexAop-CYCI}_{2 \times \text{UAS} + \text{TATA}}\text{-LacZ}$)

Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήσαμε πειράματα συγκατακρήμνισης *in vivo* σε εκχύλισμα κύτταρων *rad9Δ* στα οποία εκφραζόταν η ενδογενής πρωτεΐνη Mac1 με επίτοπο 9Myc και η πρωτεΐνη Flag-Rad9 σε πλασμίδιο πολλών αντιγράφων (multi-copy). Το συγκεκριμένο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες [SC, (0.25μM CuSO₄), συνθήκες έλλειψης χαλκού (SCBCS) όπου ο Mac1 είναι ενεργός, συνθήκες έλλειψης χαλκού (BCS) σε συνδυασμό με συνθήκες stress (0.3mM H₂O₂) όπου η φωσφορυλιωμένη Rad9 είναι απαραίτητη, καθώς και συνθήκες περίσσειας χαλκού όπου ο Mac1 παύει να είναι ενεργός (εικ.1.2.2).

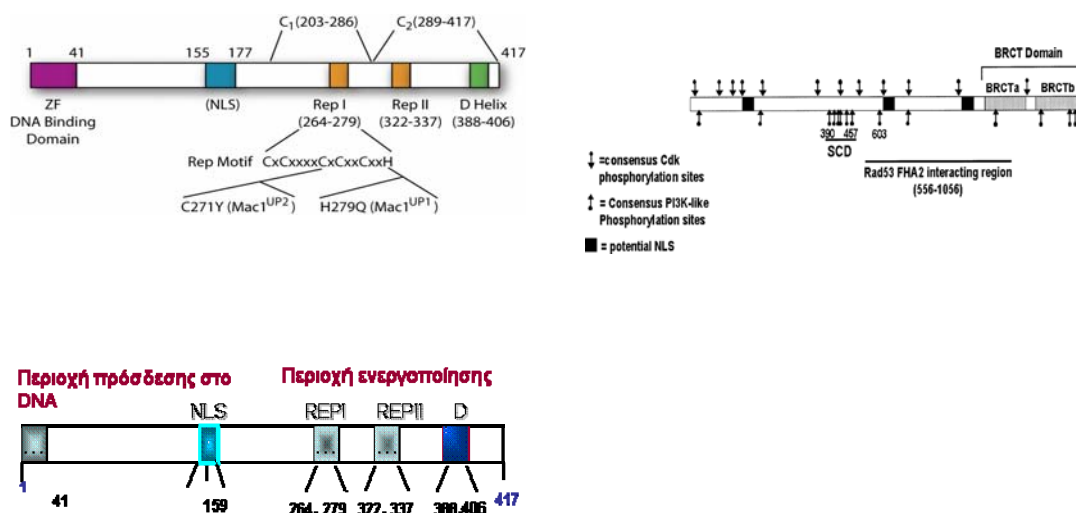
Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Mac1-Rad9 και στις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες πιθανόν εξαιτίας της υπερέκφρασης της Flag-Rad9. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από στελέχη *rad9Δ* στα οποία εκφραζόταν η ενδογενής πρωτεΐνη Rad53 με επίτοπο 9Myc και η πρωτεΐνη Flag-Rad9 σε πλασμίδιο πολλών αντιγράφων (Sun et al., 1998). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν πρώτον εκχύλισμα από στελέχη *rad9Δ* στα οποία εκφραζόταν η ενδογενής πρωτεΐνη Mac1 με 9Myc και ο επίτοπος Flag σε πλασμίδιο πολλών αντιγράφων με σκοπό την επιβεβαίωση μη αλληλεπίδρασης μεταξύ Flag και Mac1-9Myc και δεύτερον εκχύλισμα από στελέχη *rad9Δ* στα οποία εκφραζόταν η ενδογενής πρωτεΐνη His3 με επίτοπο 9Myc και η πρωτεΐνη Flag-Rad9 σε πλασμίδιο πολλών αντιγράφων όπου και επιβεβαιώθηκε έμμεσα η μη αλληλεπίδραση της Rad9 με τον επίτοπο 9Myc (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται).



Εικόνα 1.2.2: *In vivo* αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Mac1-9Myc και Flag-Rad9 σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες. Κυτταρικά εκχυλίσματα από στέλεχος *rad9Δ* που αναπτύχθηκε σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες (1:SC, 2:SCBCS, 3:SCBCSH₂O₂, 4:SCCu), και στο οποίο συνεκφράστηκαν οι Flag-Rad9 ή η Flag επισωμικά και Mac1-9Myc χρωμοσωμικά, επώαστηκαν με αντίσωμα anti-flag και σφαιρίδια σεφαρόζης. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια αναλύθηκαν με SDS-PAGE και η Mac1-9Myc ανοσοανιχνεύτηκε με το αντίσωμα anti-Myc.

1.2.2 Ο Mac1 αλληλεπιδρά άμεσα με την περιοχή BRCT της Rad9 *in vitro*

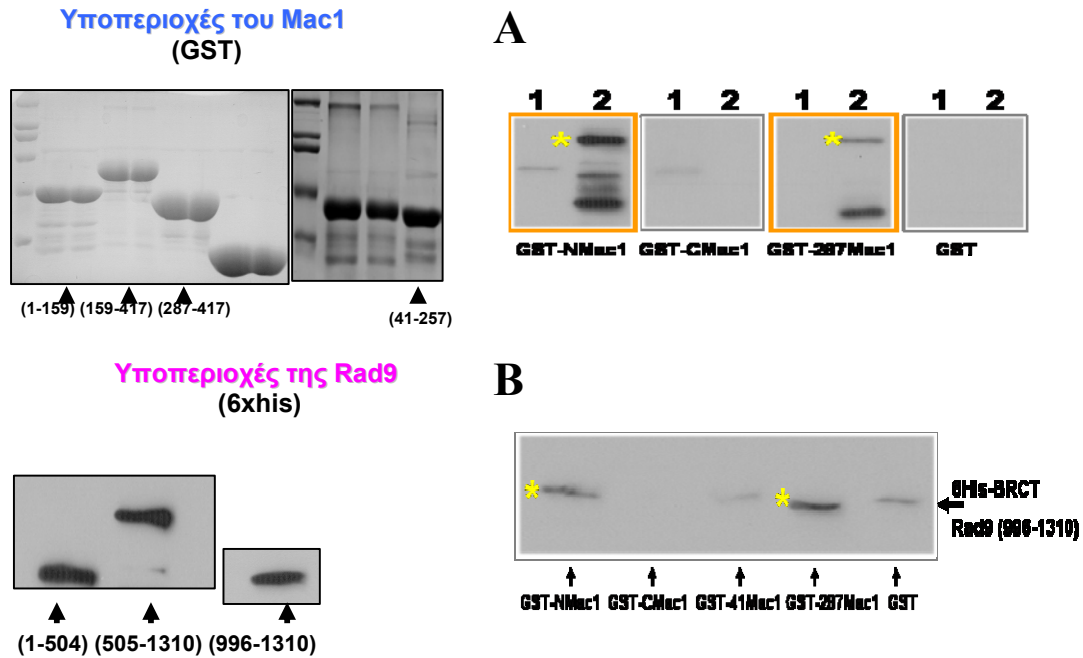
Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στη διερεύνηση του κατά πόσο οι *in vivo* αλληλεπιδράσεις που περιγράφηκαν παραπάνω, αντανακλούν άμεση επαφή μεταξύ των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε αν οι «καθαρές» πρωτεΐνες GST-N-Mac1 και GST-CMac1, GST-Mac1 (287-417aa) και GST-Mac1 (40-257aa) που παράχθηκαν σε βακτήρια, μπορούν να αλληλεπιδράσουν *in vitro* χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία άλλων πρωτεϊνών της ζύμης, με τις επίσης «καθαρές» βακτηριακής προέλευσης 6xHis-Rad9, 6xHis-N-Rad9, 6xHis-C-Rad9 και 6xHis-Rad9-BCT (εικ. 1.2.4).



Εικόνα 1.2.3: Διαγραμματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του Mac1 (αριστερά) (Γ.Βολουδάκης, Δ. Αλεξανδράκη) και της Rad9 (δεξιά) (Toh and Lowndes, 2003).

Ολόκληρη η πρωτεΐνη Mac1 δεν κατέστη δυνατό να παραχθεί σε βακτήρια.. Όπως φαίνεται από τη εικόνα 1.2.4A η καρβοξυτελική περιοχή της Rad9 (6xHis-CRad9) καθώς και η BRCT περιοχή η οποία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της Rad9 (6xHis-Rad9-BRCT) αλληλεπιδρούν με τον Mac1 και όχι η αμινοτελική περιοχή της Rad9 (6xHis-NRad9). Από την εικόνα 1.2.4B φαίνεται ότι η BRCT αλληλεπιδρά τόσο με το

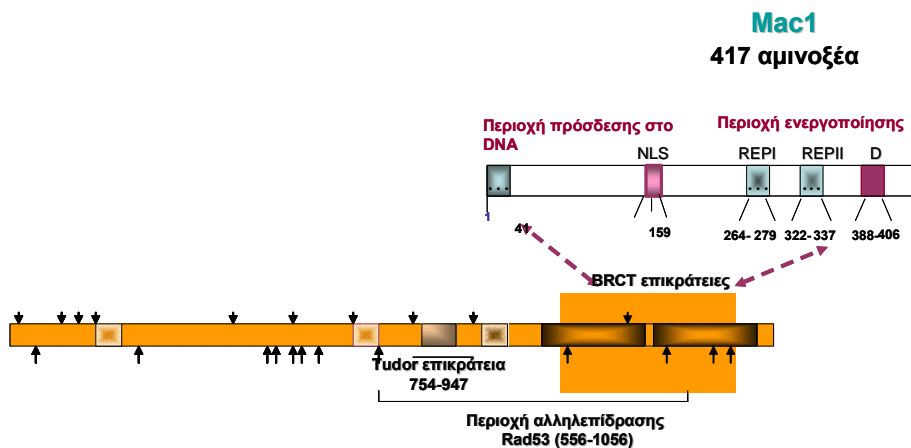
GST-NMac1 όσο και με το GST-Mac1 (287-417αα) και όχι με το GST-CMac1 ή το GST-Mac1 (140-257αα).



Εικόνα 1.2.4: Αλληλεπίδραση της Rad9 με τον Mac1 *in vitro*: Πεπτίδια GST ή GST-Mac1(1-159) ή GST-Mac1(159-417) ή GST-Mac1(287-417) ή GST-Mac1(41-257) δεσμευμένα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης επώαστηκαν με καθαρισμένα, συγχωνευμένα με 6xHis, παράγωγα της Rad9 και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με χρήση του αντισώματος anti-His. Η στήλη input περιέχει 20% του συνολικού ποσού του κάθε συντηγμένου με 6xHis πεπτιδίου. Οι πολλαπλές ζώνες στην εικόνα A κάτω από τις ζώνες που έχουν σημειωθεί με αστερίσκους αντιστοιχούν σε προϊόντα αποικοδόμησης της Rad9. Αριστερά πάνω, φαίνεται το ηλεκτροφόρημα των GST πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν (χρησιμοποιήθηκε υποδεκαπλάσια ποσότητα). Αριστερά κάτω, φαίνεται το ηλεκτροφόρημα των συντηγμένων με 6xHis πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Όπως είναι αναμενόμενο τα παράγωγα της πρωτεΐνης Rad9 σε σύντηξη με τον επίτοπο 6xHis δεν αλληλεπιδρούν με τον επίτοπο GST (αρνητικό control). Τα πιο πάνω πειράματα υποδηλώνουν άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των πλούσιων σε κυστεΐνες περιοχών του Mac1 και της BRCT περιοχής του Rad9. Η αλληλεπίδραση της Rad9 τόσο με την καρβοξυτελική όσο και με την αμινοτελική περιοχή του Mac1 υπονοεί αρνητική δράση της Rad9 στον Mac1 (εικ. 1.2.5). Τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων

πειραμάτων επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση Rad9-Mac1 και ταυτόχρονα αποτέλεσαν βάση για περαιτέρω διερεύνηση πιθανού ρόλου της στην μεταγραφή των Mac1 ρυθμιζόμενων γονιδίων.

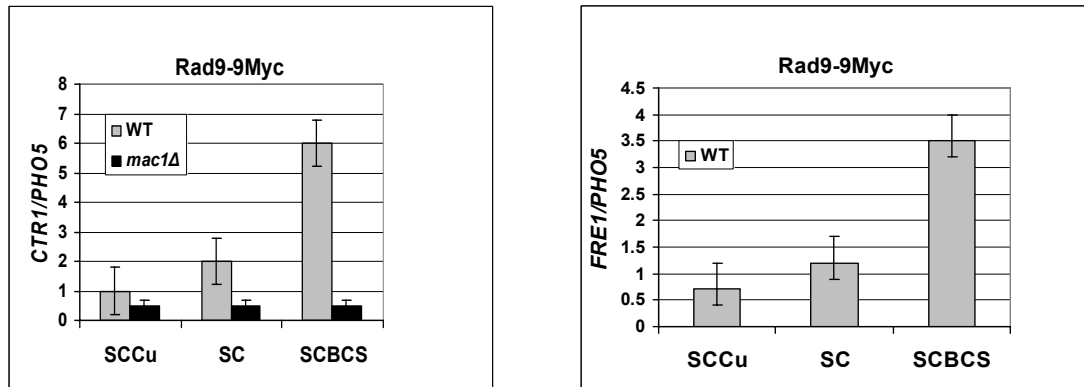


Εικόνα 1.2.5: Μοντέλο αλληλεπίδρασης της Rad9 με τον Mac1 με βάση τις *in vitro* αλληλεπιδράσεις: Διαγραμματική απεικόνιση της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ των πλούσιων σε κυστεΐνες περιοχών του Mac1 και της περιοχής BRCT της Rad9 (Δ. Αλεξανδράκη)

1.2.3 Η Rad9 στρατολογείται στους υποκινητές *CTR1* και *FRE1* σε συνθήκες επαγωγής και η στρατολόγηση αυτή εξαρτάται από την παρουσία του Mac1.

Η αποκάλυψη και επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των Mac1-Rad9 μας ώθησε να διερευνήσουμε αν η Rad9 παίζει κάποιο ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων τα οποία ελέγχονται από τον Mac1. Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή πραγματοποιήθηκε πείραμα συνανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) σε κύτταρα τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε φυσιολογικές συνθήκες (SC 0.25 μ M CuSO₄), σε επαγωγικές συνθήκες (SC 100 μ M BCS) και σε συνθήκες καταστολής της μεταγραφής (SC 10 μ M CuSO₄). Παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη Rad9-9Myc στρατολογείται τόσο στον υποκινητή του *CTR1* όσο και του *FRE1* και μάλιστα η στρατολόγηση αυτή εξαρτάται από την παρουσία του Mac1 μια και σε στελέχη *mac1*Δ η πρωτεΐνη Rad9-9Myc δεν

ανιχνεύεται στους Mac1 ρυθμιζόμενους υποκινητές σε καμία από τις προαναφερθείσες συνθήκες (εικ. 1.2.6).



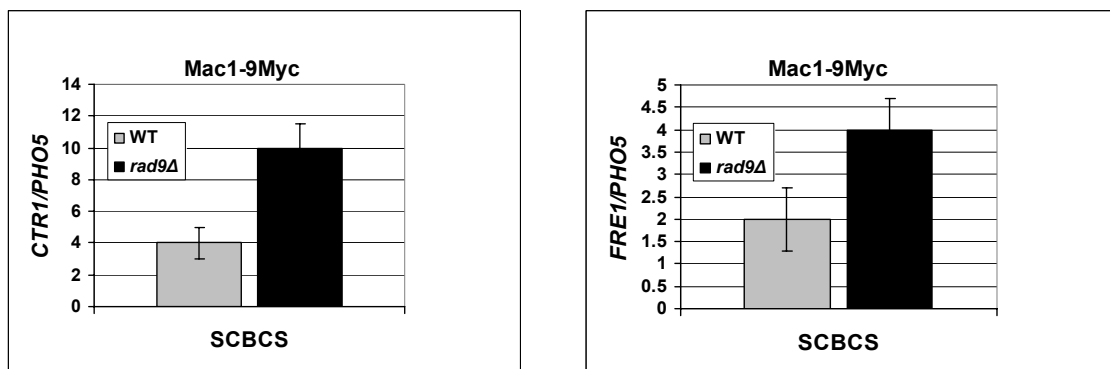
Εικόνα 1.2.6: Στρατολόγηση της Rad9-9Myc στους υποκινητές *CTR1* και *FRE1*. Κύτταρα αγρίου τύπου και *mac1Δ*, που συνεκφράζουν την Rad9-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SCCu, SC και SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR, με την χρήση ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές *CTR1*, *FRE1* και την κωδική περιοχή του *PHO5*. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input του *CTR1* ή *FRE1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο στις ελεγχόμενες συνθήκες). Κανονικοποιήσεις έγιναν επίσης με κωδικές περιοχές των *ACT1* και *TRP3* (διαρκώς μεταγραφόμενα γονίδια) στις οποίες δεν στρατολογείται η Rad9 και ελήφθησαν αντίστοιχα αποτελέσματα (δεν δείχνονται).

Επιπλέον διαπιστώσαμε ότι η στρατολόγηση της Rad9-9Myc αυξανόταν ποσοτικά σε συνθήκες επαγωγής (SCBCS) ακολουθώντας το ποσό εντοπισμένου Mac1 (εικ. 1.2.6). Επίσης διαπιστώσαμε ότι, η Rad9 εντοπίζεται στον υποκινητή του *CTR1* όταν το γονίδιο ρυθμίζεται από την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Mac1^{up} (μεταλλαγή που οδηγεί σε διαρκώς μεταγραφόμενο *CTR1*-τα αποτελέσματα δεν δείχνονται).

Επομένως από τα παραπάνω αποκαλύπτουμε μια νέα ιδιότητα της Rad9, τον εντοπισμό της σε ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια που ρυθμίζονται από συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα.

1.2.4 Η πρωτεΐνη Rad9 έχει αρνητική δράση τόσο στην δυνατότητα πρόσδεσης του Mac1 στο DNA όσο και στην μεταγραφική του ενεργότητα.

Έχοντας ως στόχο να αναλύσουμε λειτουργικά την στρατολόγηση της Rad9 στους Mac1 ρυθμιζόμενους υποκινητές, πραγματοποιήσαμε το αντίστροφο πείραμα συνανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη (ChIP), δηλαδή εξετάσαμε αν η στρατολόγηση της Mac1-9Myc επηρεάζεται όταν απουσιάζει η Rad9. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε στελέχη *rad9Δ* η στρατολόγηση του Mac1-9Myc σε συνθήκες επαγωγής είναι αυξημένη στους υποκινητές των *CTR1* και *FRE1* (εικ.1.2.7)

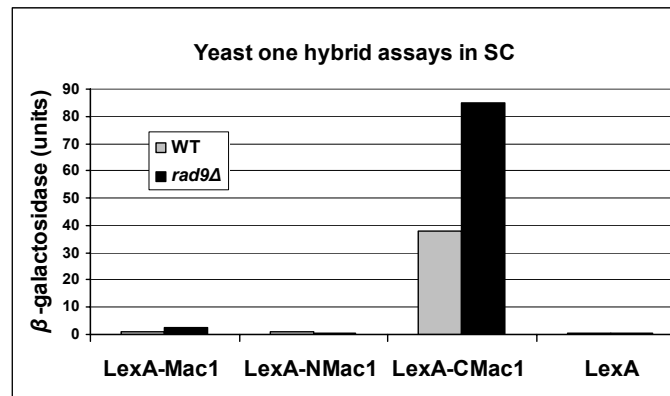


Εικόνα 1.2.7: Στρατολόγηση του Mac1-9Myc στους υποκινητές *CTR1* και *FRE1* απουσία Rad9.

Κύτταρα αγρίου τύπου (WT) και *rad9Δ*, που συνεκφράζουν την Mac1-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινήτων για τους υποκινητές *CTR1*, *FRE1* και της κωδικής περιοχής του *PHO5*. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input του *CTR1* ή *FRE1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους για το *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

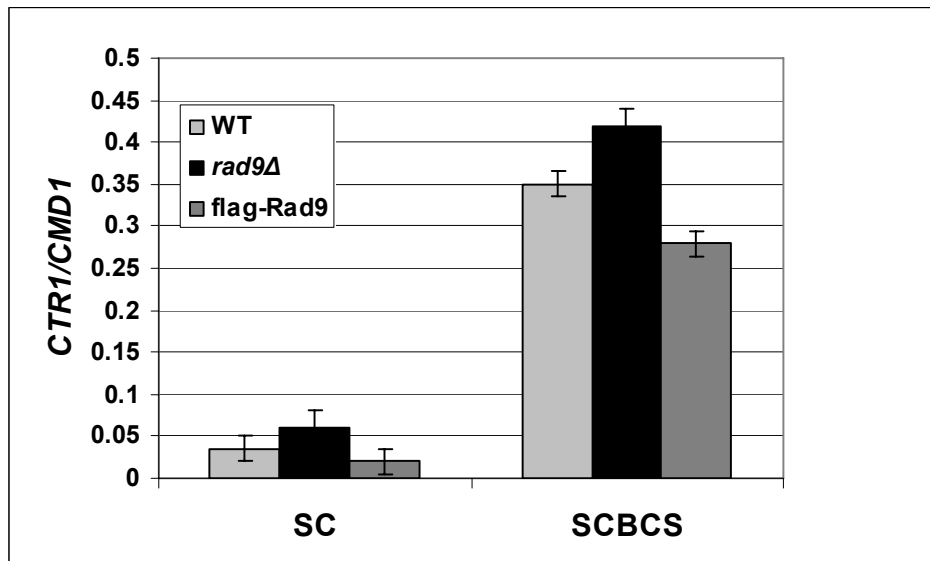
Εξαιτίας του παραπάνω αποτελέσματος υποθέτουμε ότι η Rad9 ρυθμίζει αρνητικά τον Mac1 με μείωση την πρόσδεση του στο DNA. Στη συνέχεια εξετάσαμε αν η μεταγραφική ενεργότητα του Mac1 επηρεάζεται από την απουσία της Rad9. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ενός υβριδίου (one-hybrid) (LexAMac1) με τη μέθοδο ανίχνευσης μάρτυρα με δοκιμασία ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σε υγρή καλλιέργεια. Ο Mac1 και ο C-Mac1 (που περιέχει την περιοχή με την δυνατότητα

ενεργοποίησης της μεταγραφής) παρουσίασαν υψηλότερη μεταγραφική ενεργότητα σε στελέχη *rad9Δ* σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου. Αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη Rad9 δρα ανασταλτικά στη μεταγραφική ενεργότητα του Mac1 (εικ.1.2.8).



Εικόνα 1.2.8: Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του Mac1 απουσία της Rad9. Ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης σε στέλεχος αγρίου τύπου και σε στέλεχος *rad9Δ* τα οποία μετασηματίστηκαν ταυτόχρονα με πλασμίδιο που φέρει το υβριδικό γονίδιο αναφοράς *4xLexAop-CYC1_{2xUAS+TATA}-LacZ* (pJK103) και με πλασμίδιο έκφρασης LexA-Mac1 ή LexA-NMac1 ή LexA-CMac1 ή LexA και αναπτύχθηκαν σε SC.

Προκειμένου να ενισχυθούν περαιτέρω τα παραπάνω ευρήματα μετρήσαμε τα επίπεδα του ολικού RNA των *CTR1* και *FRE1* σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες επαγωγής σε στελέχη αγρίου τύπου σε στελέχη με έλλειψη του *RAD9* (*rad9Δ*) και σε στελέχη όπου η Rad9 υπερεκφραζόταν (επισωμικό Flag-Rad9). Παρατηρήσαμε ότι η μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων σε συνθήκες επαγωγής και ελαφρώς αυξημένη όταν απουσίαζε η Rad9 και ελαφρώς μειωμένη όταν η Rad9 υπερεκφραζόταν (εικ. 1.2.9).



Εικόνα 1.2.9: Επίδραση της Rad9 στη μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνυόμενα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με επάρκεια μετάλλων (SC) ή έλλειψη χαλκού (SCBCS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). Οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν στον PhosphorImager με χρήση του κατάλληλου λογισμικού (Image-Quant). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους λόγους έντασης των αντίστοιχων ζωνών (κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA).

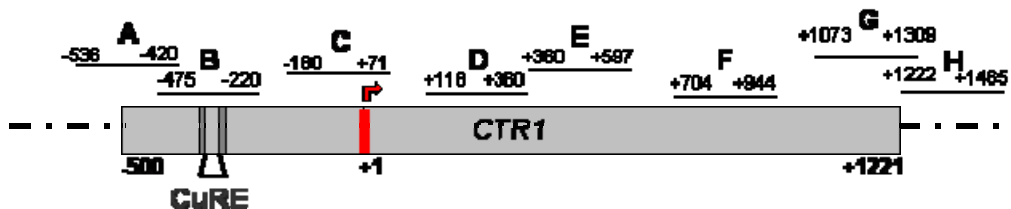
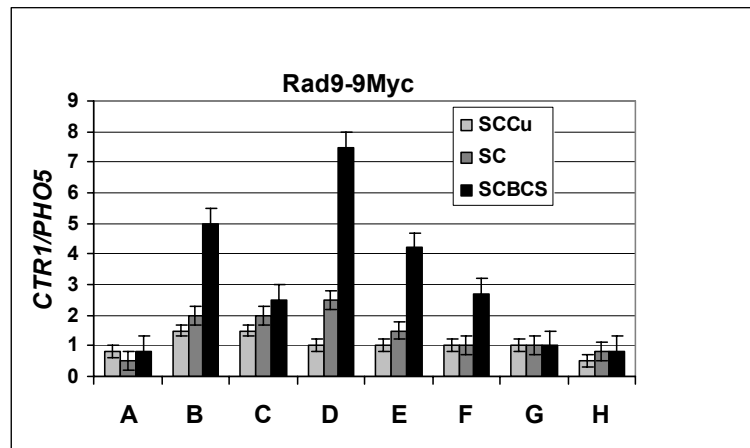
Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η επίδραση της Rad9 στην Mac1 ρυθμιζόμενη μεταγραφή δεν είναι μεγάλη ωστόσο ενισχύουν τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων πειραμάτων που αποκαλύπτουν ότι η Rad9 έχει αρνητική δράση τόσο στην δυνατότητα πρόσδεσης όσο και στην μεταγραφική ενεργότητα του Mac1.

1.2.5 Η Rad9 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του γονιδίου *CTR1* ακολουθώντας το πρότυπο στρατολόγησης της RNA πολυμεράσης II.

Προκειμένου να διερευνήσουμε ακόμα περισσότερο το ρόλο που μπορεί να έχει μια πρωτεΐνη όπως η Rad9 στην μεταγραφή του *CTR1* ελέγξαμε την προσβασιμότητα της στην κωδική περιοχή του γονιδίου αυτού. Κίνητρο για τα συγκεκριμένα πειράματα αποτέλεσε το γεγονός ότι πρωτεΐνες όπως η Asf1 η οποία αλληλεπιδρά τόσο με την

Rad53 (Emili et al., 2001) όσο και με την Hir1 (Sharp et al., 2001) και μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστός ο ρόλος της στην επιδιόρθωση του DNA (Qin and Parthun, 2002), στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην μεταγραφή των ιστονών (Sutton et al., 2001) αποκαλύφθηκε ότι έχει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφή αρκετών γονιδίων (Korber et al., 2006; Rufiange et al., 2007) και ότι στρατολογείται στον υποκινητή αλλά και στην κωδική περιοχή των γονιδίων αυτών (Schwabish and Struhl, 2006).

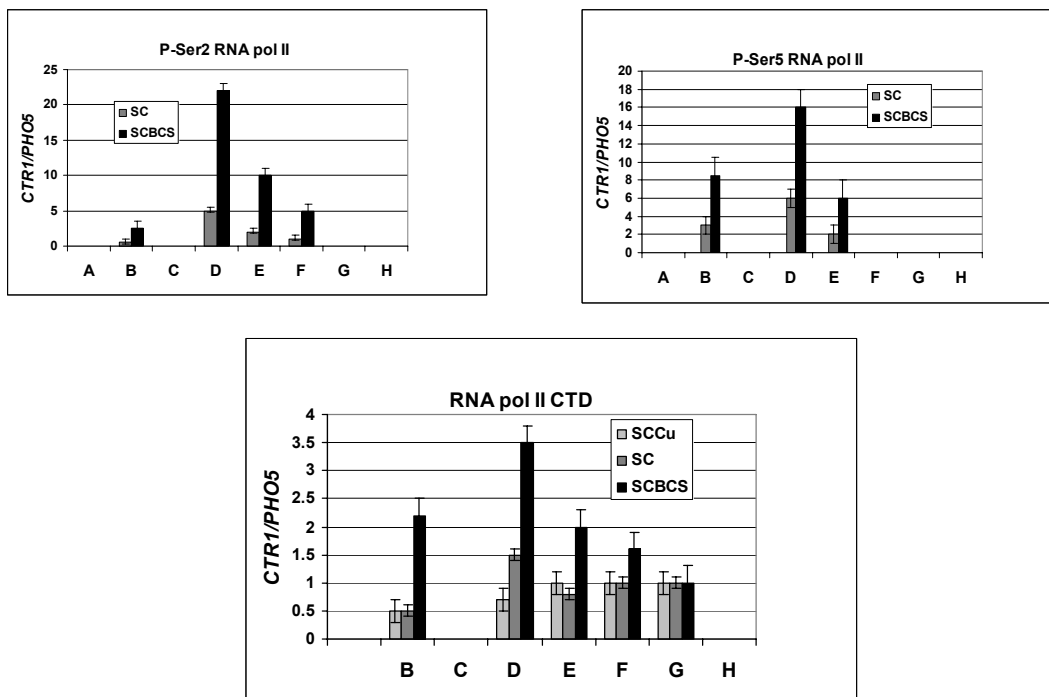
Αναλύθηκε επομένως με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης η πρόσδεση της Rad9 σε αρκετές περιοχές της κωδικής περιοχής του *CTRI*. Παρατηρήσαμε ότι η Rad9 εντοπίζεται όχι μόνο στον υποκινητή του *CTRI* (όπου ως γνωστόν ανιχνεύεται και ο Mac1) αλλά και σε ολόκληρη την κωδική περιοχή *CTRI* (όπου ο Mac1 δεν είναι ανιχνεύσιμος-τα αποτελέσματα δεν δείχνονται) και μάλιστα σε συνθήκες επαγωγής (εικ. 1.2.10). Επίσης διαπιστώσαμε ότι, η Rad9 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *CTRI* και και στην περίπτωση που το γονίδιο ρυθμίζεται από την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Mac1^{up} (διαρκώς μεταγραφόμενο *CTRI*-τα αποτελέσματα δεν δείχνονται).



Εικόνα 1.2.10: Η Rad9 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής. (επάνω) Κύτταρα αγρίου τύπου στα οποία έχει εντεθεί επίτοπος 9Myc στην ενδογενή Rad9 και τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SC, SCBCS ή SCCu υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινήτων για τον υποκινητή του *CTR1* για περιοχές που εντοπίζονται σε όλο το μήκος της κωδικής περιοχής του *CTR1* για περιοχές που εκτείνονται 5' του CuRe και περιοχή που εκτείνεται 3' του *CTR1* ORF (η κωδική περιοχή του *PHO5* χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control). Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input των διάφορων περιοχών *CTR1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

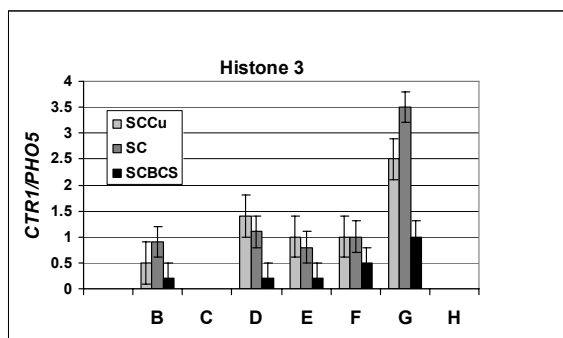
(κάτω) Διαγραμματική απεικόνιση των περιοχών που αναλύθηκαν για την στρατολόγηση της Rad9 στο γονίδιο του *CTR1*.

Η Rad9 δεν ανιχνεύτηκε σε συνθήκες καταστολής της μεταγραφής (παρουσία περίσσειας χαλκού) αλλά ούτε και σε περιοχές 5' του CuRe και 3' του *CTR1* ORF σε συνθήκες επαγωγής. Επιπλέον, τα επίπεδα στα οποία ανιχνεύεται η Rad9 είναι υψηλότερα στην κωδική περιοχή από ότι στον υποκινητή και μάλιστα η εντοπισμός και η ποσοτική κατανομή της πρωτεΐνης φαίνεται να ακολουθεί το ποσοτικό πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II στο γονίδιο *CTR1* (εικ. 1.2.11)



Εικόνα 1.2.11: Το πρότυπο στρατολόγησης της RNA πολυμεράσης II ταυτίζεται με το πρότυπο στρατολόγησης της Rad9 στην κωδική περιοχή του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής. Κύτταρα αγρίου τύπου αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SCCu, SC ή SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με τρία διαφορετικά αντισώματα που ανοσοκατακρημνίζουν την RNA πολυμεράση. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή του *CTR1* για περιοχές που εντοπίζονται σε όλο το μήκος της κωδικής περιοχής του *CTR1* για περιοχές που εκτείνονται 5' του CuRe και περιοχές που εκτείνονται 3' του *CTR1* ORF (βλέπε εικόνα 1.2.10). Εκκινητές για την κωδική περιοχή του *PHO5* χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input των διάφορων περιοχών *CTR1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

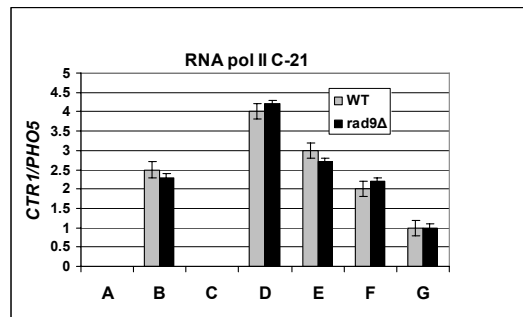
Το πρότυπο εντοπισμού της RNA πολυμεράσης II και της Rad9 διέφερε σημαντικά από το πρότυπο εντοπισμού της ιστόνης H3 η οποία εντοπιζόταν σε μεγαλύτερο ποσοστό στο 3'ακρο της κωδικής περιοχής του γονιδίου σε συνθήκες επαγωγής (εικ. 1.2.12) δείχνοντας μας ότι κατά την μεταγραφή οι ιστόνες σπρώχνονται πίσω σε μεγάλο ποσοστό έτσι ώστε να είναι δυνατή η διέλευση του μεταγραφικού συμπλόκου.



Εικόνα 1.2.12: Οι ιστόνες απομακρύνονται σε μεγάλο ποσοστό από την μεταγραφόμενη περιοχή. Κύτταρα αγρίου τύπου τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SCCu, SC ή SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-H3. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή του *CTRI* για περιοχές που εντοπίζονται στον υποκινητή και σε όλο το μήκος της κωδικής περιοχής του *CTRI*, (βλέπε εικόνα 1.2.10). Εκκινητές για την κωδική περιοχή του *PHO5* χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input των διάφορων περιοχών *CTRI* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

1.2.6 Το χαρακτηριστικό πρότυπο κατανομής της πολυμεράσης δεν επηρεάζεται από την απουσία της Rad9.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνεντοπισμού της Rad9 και της RNA πολυμεράσης II θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο. Για ο λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης *in vivo* στα οποία όπως δεν ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση της Rad9 με την RPB3 υπομονάδα της πολυμεράσης (δεν δείχνεται). Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της RNA πολυμεράσης II με σκοπό να αποκαλυφθεί αν το χαρακτηριστικό πρότυπο κατανομής της πολυμεράσης (η μέγιστη δηλαδή στρατολόγηση στο 5' άκρο η οποία φθίνει προς το 3') τροποποιείται όταν απουσιάζει η Rad9. Αυτό που διαπιστώσαμε είναι ότι δεν υπήρχε καμία μεταβολή στην ποσότητα αλλά ούτε και στον τρόπο στρατολόγησης της πολυμεράσης απουσία της Rad9 (εικ. 1.2.13)



Εικόνα 1.2.13: Το πρότυπο κατανομής της πολυμεράσης δεν επηρεάζεται από την απουσία της Rad9. Κύτταρα αγρίου τύπου τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα C-21. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή του *CTR1* για περιοχές που εντοπίζονται στον υποκινητή και σε όλο το μήκος της κωδικής περιοχής του *CTR1*, (βλέπε εικόνα 1.2.10). Εκκινητές για την κωδική περιοχή του *PHO5* χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input των διάφορων περιοχών *CTR1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

Επομένως η Rad9 δεν παίζει ρόλο καθοριστικό στην τοποθέτηση ή την κίνηση της RNA πολυμεράσης II κατά την μεταγραφή του *CTR1*.

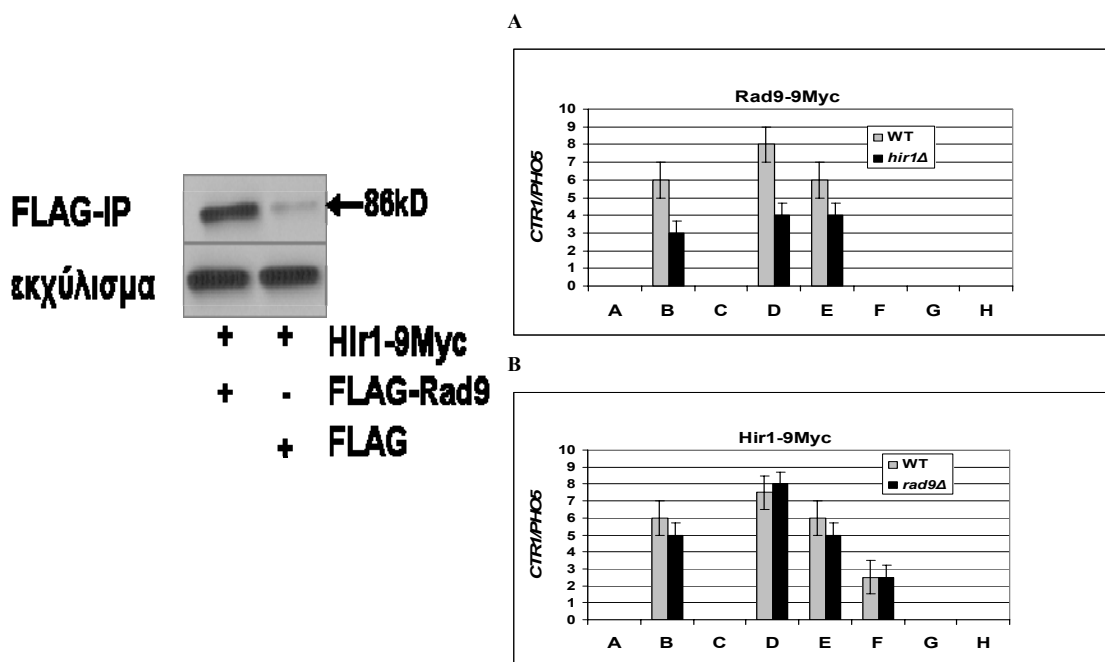
1.2.7 Ποιος στρατολογεί την Rad9 στην κωδική περιοχή;

Τα πιο πάνω αποτελέσματα μας ώθησαν να διερευνήσουμε περαιτέρω πώς η Rad9 στρατολογείται στην κωδική περιοχή μια και όπως φάνηκε ούτε ο Mac1 (που δεν εντοπίζεται στην κωδική περιοχή) ούτε η RNA πολυμεράση II (που δεν αλληλεπιδρά με την Rad9) είναι υπεύθυνοι για την στρατολόγηση αυτή. Πιο κάτω παρουσιάζονται μια σειρά από προσεγγίσεις προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αυτό.

1.2.7 α) Η στρατολόγηση της Rad9 στον υποκινητή και στην κωδική περιοχή του *CTR1* εν μέρει οφείλεται στη Hir1

Στο εργαστήριο μας έχει δείχθει ότι η πρωτεΐνη Hir1 αλληλεπιδρά με τον Mac1 και στρατολογείται τόσο στον υποκινητή όσο και στην κωδική περιοχή του *CTR1* παίζοντας

ρόλο στην επιμήκυνση της μεταγραφής (Voutsina et al). Αρχικά πραγματοποιήσαμε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης προκειμένου να εντοπίσουμε αν οι δύο πρωτεΐνες Rad9 και Hir1 αλληλεπιδρούν (εικ. 1.2.14 αριστερά). Μια προκαταρκτική διερεύνηση της ύπαρξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων αυτών (Gal4AD-Rad9 και LexA-C-Hir1) έγινε με τη μέθοδο των δύο υβριδίων και έδειξε πιθανή αλληλεπίδραση (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται). Παρά το γεγονός ότι εντοπίσαμε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών η διπλή απαλοιφή των δύο γονιδίων *RAD9* και *HIR1* δεν έδωσε συνθετικό φαινότυπο αφήνοντας την μεταγραφή του *CTR1* στα ίδια επίπεδα με αυτά που παρατηρούμε σε στελέχη *rad9Δ* (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται). Παρά όλα αυτά σε ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματινής σε κύτταρα τα οποία μεγάλωσαν σε συνθήκες επαγωγής η στρατολόγηση της Rad9 τόσο στον υποκινητή όσο και στην κωδική περιοχή μειώθηκε σημαντικά (>50%) απουσία της Hir1 (εικ.1.2.14A, δεξιά). Όταν ελέγξαμε το αντίστροφο δηλαδή αν η στρατολόγηση της Hir1 επηρεάζεται από την απουσία της Rad9 παρατηρήσαμε ότι έμενε ανεπηρέαστη (εικ.1.2.14B, δεξιά).



Εικόνα 1.2.14: Η Rad9 αλληλεπιδρά με την Hir1 *in vivo* και η στρατολόγηση της επηρεάζεται από την απουσία της Hir1 αλλά όχι το αντίστροφο.(αριστερά) Κυτταρικά εκχυλίσματα από στέλεχος *rad9Δ* που αναπτύχθηκε σε SC και SCBCS και στο οποίο συνεκφράστηκαν οι Flag-Rad9 ή η Flag επισωμικά και

Hir1-9Myc χρωμοσωμικά, επώαστηκε με αντίσωμα anti-flag και σφαιρίδια σεφαρόζης G. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια αναλύθηκαν με SDS-PAGE και η Hir1-9Myc ανοσοανιχνεύτηκε με το αντίσωμα anti-Myc.

A) Κύτταρα αγρίου τύπου και *hir1Δ* τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SCBCS και τα οποία εκφράζουν Rad9-9Myc χρωμοσωμικά υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το συνολικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή του *CTRI*, για περιοχές που εντοπίζονται στον υποκινητή και σε όλο το μήκος της κωδικής περιοχής του *CTRI* (βλέπε εικόνα 1.2.10). Εκκινητές για την κωδική περιοχή του *PHO5* χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input των διαφόρων περιοχών *CTRI* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο). B) Η ίδια τεχνική ακολουθήθηκε και για κύτταρα αγρίου τύπου και *rad9Δ* τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SCBCS και τα οποία εκφράζουν χρωμοσωμικά Hir1-9Myc.

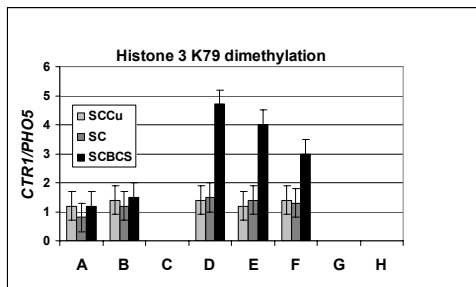
Επομένως η Rad9 μεταφέρεται στην κωδική περιοχή από πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ακολουθεί την πολυμεράση μέσω αλληλεπίδρασης με την Hir1 και άλλων παραγόντων.

1.2.7β) Η Rad9 και η διμεθυλίωση στην λυσίνη 79 (K79) της ιστόνης H3 συνεντοπίζονται στην κωδική περιοχή του *CTRI*

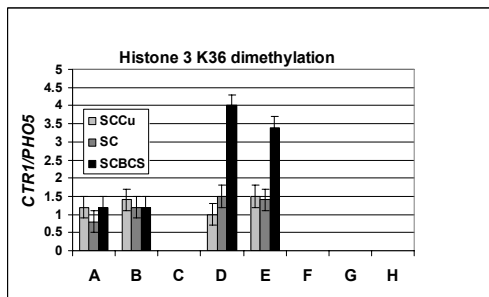
Σχετικά πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι σε περίπτωση βλάβης του DNA η πρωτεΐνη Rad9 έχει την ικανότητα μέσω της περιοχή της tudor να αναγνωρίζει τροποποιημένη ιστόνη (H3-K79Me). Η τροποποίηση αυτή αποκαλύπτεται λόγω βλάβης και συνεισφέρει στο να στρατολογηθεί η Rad9 στο σημείο αυτό (Huyen et al., 2004; Winzeler et al., 1999b)(βλέπε εισαγωγή).

Με σκοπό να διερευνήσουμε την υπόθεση ότι η Rad9 αναγνωρίζει διμεθυλίωση στην λυσίνη 79 (K79) της ιστόνης H3 η οποία αποκαλύπτεται κατά την μεταγραφή χρησιμοποιήσαμε συγκεκριμένα αντισώματα για να δούμε εάν αυτή η ιδιαίτερη τροποποίηση ήταν ανιχνεύσιμη στην κωδική περιοχή του *CTRI*. Τελικά μας αποκαλύφθηκε ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση ανιχνεύεται σε όλη την κωδική περιοχή του *CTRI* (και όχι στον υποκινητή) σε συνθήκες επαγωγής (εικόνα 1.2.15A)

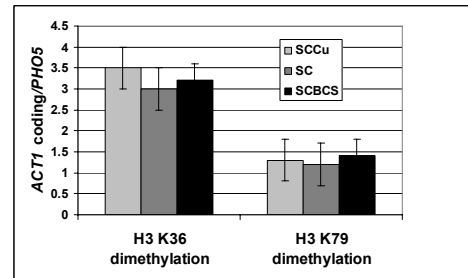
A



B



Γ



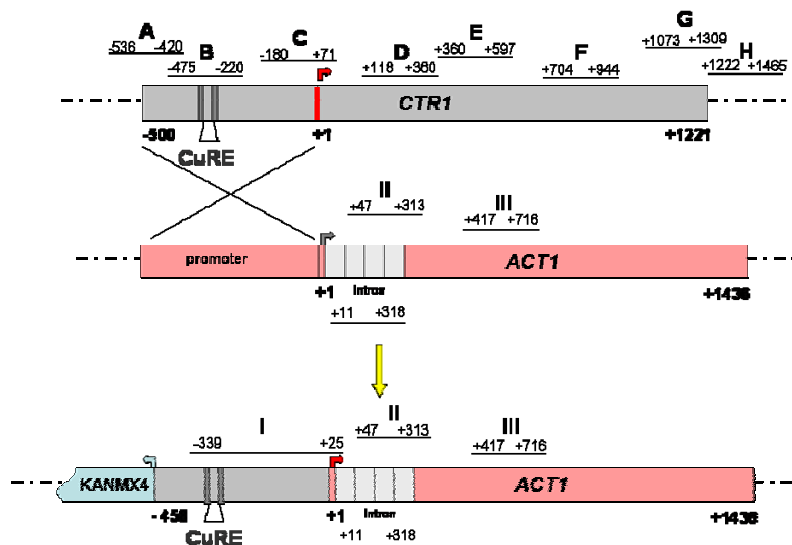
Εικόνα 1.2.15: Το πρότυπο κατανομής των τροποποιήσεων H3-K79Me και H3-K36Me ταυτίζεται στην κωδική περιοχή του *CTR1* ενώ διαφοροποιείται στην κωδική περιοχή της *ACT1*. Κύτταρα αγρίου τύπου τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti- H3-K79Me (εικόνα Α, Γ) και anti- H3-K36Me (εικόνα Β, Γ). Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή του *CTR1* για περιοχές που εντοπίζονται στον υποκινητή και κατά μήκος της κωδικής περιοχής του *CTR1* (βλέπε εικόνα 1.2.10). Εκκινητές για την κωδική περιοχή του *PHO5* χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input των διάφορων περιοχών *CTR1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

Ταυτόχρονα ελέγχθηκε και το πρότυπο κατανομής της διπλής μεθυλίωσης της λυσίνης 36 της ιστόνης 3 η οποία είναι γνωστό ότι ανοσοανιχνεύεται σε όλα τα μεταγραφόμενα γονίδια από την RNA πολυμεράση II και παίζει σημαντικό στη μεταγραφική επιμήκυνση (Kizer et al., 2005). Όπως φαίνεται από την εικόνας 1.2.15A και 1.2.15B και οι δύο τροποποιήσεις ανιχνεύτηκαν σε αντίστοιχα επίπεδα. Εντούτοις, τα επίπεδα αυτά ήταν εντελώς διαφορετικά στην κωδική περιοχή του γονιδίου *ACT1* (διαρκώς μεταγραφόμενο γονίδιο). Ενώ η διπλή μεθυλίωση της λυσίνης 36 της ιστόνης ανιχνευόταν στην κωδική περιοχή του *ACT1* σε αντίστοιχα επίπεδα με αυτά του *CTR1*, η διπλή μεθυλίωσης της

λυσίνης 79 της ιστόνης 3 ήταν μη ανιχνεύσιμη στην κωδική περιοχή του *ACT1* (εικ. 1.2.15Γ).

1.2.7γ) Στοιχεία του υποκινητή και όχι επιγενετικά σημάδια είναι υπεύθυνα για τον εντοπισμό του Rad9 στην κωδική περιοχή του *CTR1*.

Προκειμένου να ερευνήσουμε περαιτέρω εάν υπεύθυνα για την δυνατότητα του Rad9 να «ταξιδεύει» κατά μήκος της κωδικής περιοχής είναι τα στοιχεία που συνδέονται με τον υποκινητή του *CTR1* ή αν είναι επιγενετικά σημάδια κατά μήκος του γονιδίου, ανταλλάξαμε τον υποκινητή του *ACT1* με αυτόν του *CTR1*, δημιουργώντας μια υβριδική γενωμική περιοχή όπου το γονίδιο *ACT1* βρισκόταν υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *CTR1*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η Rad9 δεν στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *ACT1*.

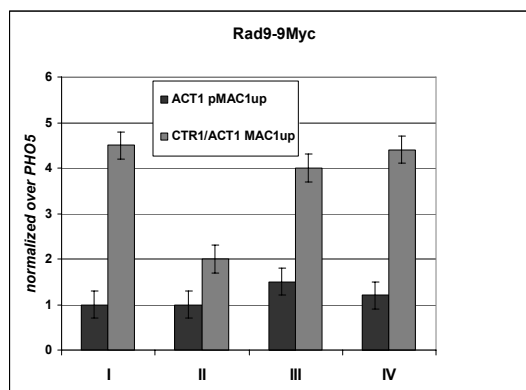


Εικόνα 1.2.16: Διαγραμματική αναπαράσταση της ένθεσης του υποκινητή *CTR1* στη θέση του υποκινητή *ACT1* μπροστά από το γονίδιο *ACT1*.

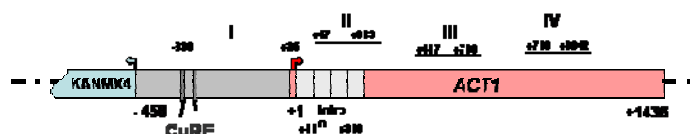
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε στελέχη που είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδιο έτσι ώστε να εκφράζουν την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Mac1^{up} (Jungmann et al., 1993) (βλέπε εισαγωγή) για να

επιτυγχάνεται η συνεχής μεταγραφή του *ACT1*, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων. Διαπιστώσαμε ότι, η Rad9 στρατολογήθηκε τόσο στον υποκινητή *CTR1* (γεγονός αναμενόμενο) όσο και στην κωδική περιοχή του γονιδίου της *ACT1* καθοδικά προς αυτόν (εικ.1.2.17).

A



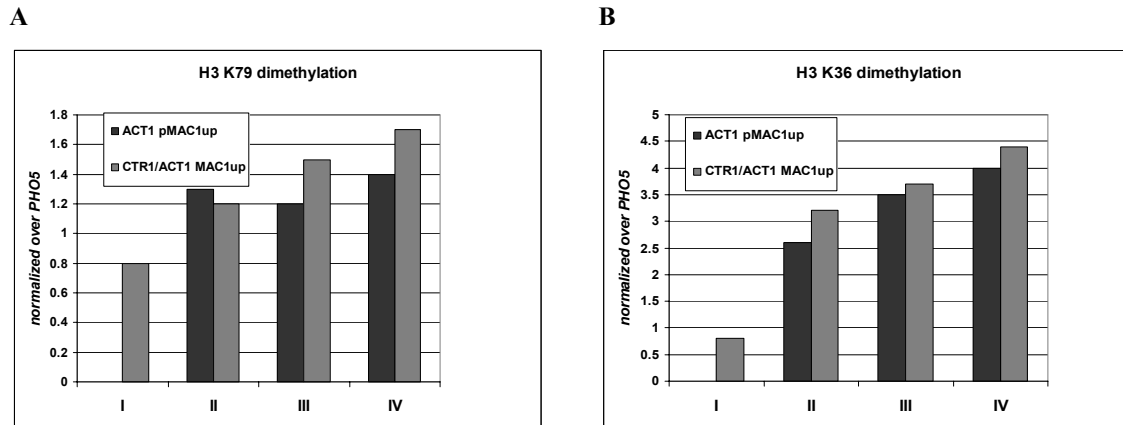
B



Εικόνα 1.2.17: Η Rad9 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του γονιδίου *ACT1* όταν αυτό βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *CTR1*. Κύτταρα που μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο το οποίο εκφράζει Mac1^{up} και αναπτύχθηκαν σε SC εκφράζουν χρωμοσωμικά την Rad9-9Myc και στα οποία το *ACT1* ρυθμιζόταν είτε από τον δικό του υποκινητή (*ACT1pMac1^{up}*) είτε από τον υποκινητή *CTR1* (*CTR1/ACT1pMac1^{up}*). Κατόπιν υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή *CTR1* που βρίσκεται έμπροσθεν του *ACT1* (σχήμα B), την κωδική περιοχή του *ACT1* (σχήμα B) και την κωδική περιοχή *PHO5*. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input των I, II, III, IV κάθε στελέχους, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

Παρόλα αυτά όταν πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με σκοπό να διαπιστώσουμε αν είχε τροποποιηθεί και το προφίλ των επιγενετικών σημαδιών του *ACT1* τώρα που εκφραζόταν υπό τον έλεγχο νέου υποκινητή, διαπιστώσαμε ότι αυτό δεν συνέβη. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι το πρότυπο κατανομής των υπό μελέτη τροποποιήσεων ήταν πανομοιότυπο μεταξύ του γονιδίου *ACT1* του στελέχους αγρίου τύπου και του *ACT1* που ελεγχόταν από τον υποκινητή του *CTR1* τόσο όταν συγκρίναμε τα ποσοστά διμεθυλίωσης της λυσίνης 79 της ιστόνης 3

(εικ. 1.2.18A) μεταξύ των δύο στελεχών όσο και όταν συγκρίναμε τα ποσοστά διμεθυλίωσης της λυσίνης 36 της ιστόνης 3 (εικ. 1.2.18B).



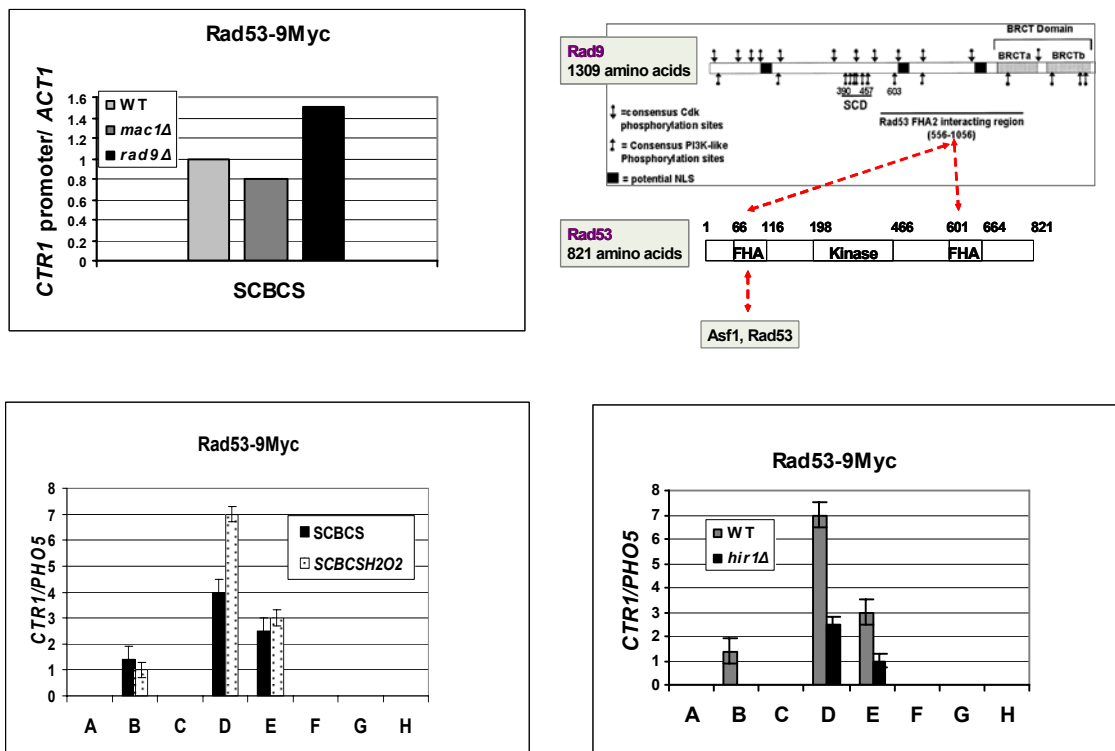
Εικόνα 1.2.18: Το πρότυπο κατανομής των τροποποιήσεων H3-K79Me και H3-K36Me είναι πανομοιότυπο μεταξύ του υβριδικού *CTR1* ελεγχόμενου γονιδίου *ACT1* και του *ACT1* του στελέχους αγρίου τύπου. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα όμοια με αυτά που περιγράφονται στην εικόνα 1.2.1 με την διάφορα ότι χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των τροποποιήσεων H3-K79Me και H3-K36Me αντίστοιχα.

Κατά συνέπεια κάποια από τα στοιχεία που στρατολογούνται στον υποκινητή (μεταξύ των οποίων και η Hir1) είναι υπεύθυνα για τον εντοπισμό της Rad9 στην κωδική περιοχή και όχι η διμεθυλίωση της λυσίνης 79 της H3.

1.2.8 Η Rad53 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1* (αλλά είναι μη ανιχνεύσιμη στον υποκινητή του).

Για να ελέγξουμε την πιθανότητα στρατολόγησης στο *CTR1* και άλλων παραγόντων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης πρωτεΐνης με στόχο να δούμε αν η Rad53 που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά άμεσα με την Rad9 (βλέπε εισαγωγή) εντοπίζεται στη συγκεκριμένη περιοχή. Ανιχνεύσαμε την Rad53 μόνο στην κωδική περιοχή και όχι στον υποκινητή σε

συνθήκες επαγωγής (έλλειψης χαλκού) καθώς και σε υψηλότερα επίπεδα (>50%) σε συνθήκες επαγωγής συνδυασμένες με συνθήκες στρες (παρουσία H₂O₂). Ο συνδυασμός αυτός των συνθηκών επιλέχθηκε προκειμένου να ενισχύσουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών Rad9 και Rad53 (βλέπε Εισαγωγή). Παρατηρήσαμε επομένως ότι ο εντοπισμός της Rad53 εξαρτάται από την παρουσία της Rad9. Μάλιστα παρατηρήσαμε ότι όπως η στρατολόγηση της Rad9 έτσι και η στρατολόγηση της Rad53 μειωνόταν όταν απουσίαζε η Hir1. Πιθανόν η μη ανίχνευση της Rad53 στον υποκινητή πιθανόν να οφείλεται όχι στην απουσία της αλλά στα χαμηλά επίπεδα εντοπισμού της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

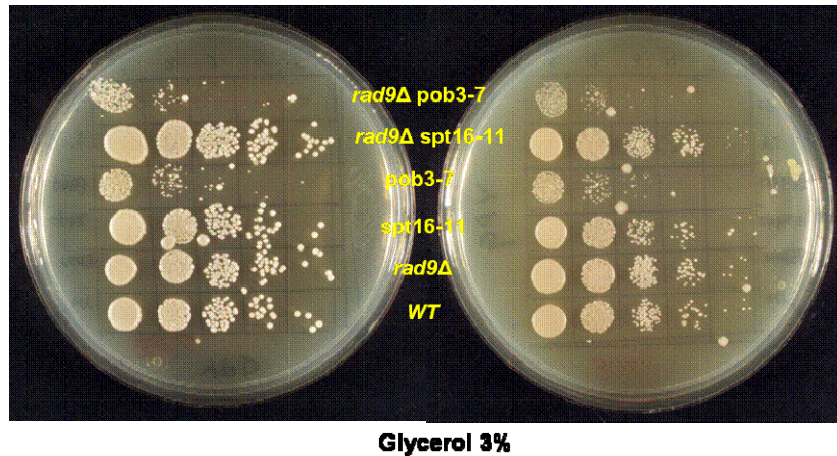


Εικόνα 1.2.19: Η Rad53 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1* (αλλά δεν ανιχνεύεται στον υποκινητή του) και η στρατολόγηση της επηρεάζεται από την παρουσία της *Hir1*. Α) Κύτταρα αγρίου τύπου, *rad9Δ* και *mac1Δ*, που εκφράζουν την Rad53-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή *CTR1* και κωδική περιοχή *PHO5*. Β) Κύτταρα αγρίου τύπου που συνεκφράζουν την Rad53-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το

ολικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή *CTR1*, την κωδική περιοχή *CTR1* (βλέπε εικόνα 1.2.10) και την κωδική περιοχή *PHO5*. Γ) Κύτταρα αγρίου τύπου και *hir1Δ*, που συνεκφράζουν την Rad53-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το αρχικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τον υποκινητή *CTR1*, την κωδική περιοχή *CTR1* (βλέπε εικόνα 1.2.10) και την κωδική περιοχή *PHO5*. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input του *CTR1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

1.2.9 Η Rad9 δεν φαίνεται να έχει συνθετικό φαινότυπο με τις υπομονάδες του yFACT στις συνθήκες που ελέγχθηκαν.

Προσπαθώντας να συσχετίσουμε την Rad9 με την μεταγραφική επιμήκυνση εξετάσαμε τη σχέση της με τα μεταλλάγματα *spt16-11* και *rob3-7* (Formosa et al., 2002). Οι πρωτεΐνες Spt16 και Rob3 αποτελούν υπομονάδες του συμπλόκου yFACT (facilitates chromatin transcription) το οποίο ως ρόλο έχει να διευκολύνει την διέλευση της RNA πολυμερασης II αποσταθεροποιώντας και επανασυναρμολογώντας την νουκλεοσωμική δομή κατά την μεταγραφική επιμήκυνση (Belotserkovskaya et al., 2003; Formosa et al., 2002). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι το μετάλλαγμα *spt16-11* προκαλεί μείωση της μεταγραφής του *CTR1* κατά 50% και το *rob3-7* κατά 80% σε συνθήκες επαγωγής (Voutsina et al). Όταν το γονίδιο *CTR1* δεν μεταγράφεται, τα μιτοχόνδρια των κυττάρων δεν είναι πλέον λειτουργικά λόγω έλλειψης χαλκού και τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκερόλη. Τα μεταλλάγματα *Spt16-11* και *rob3-7* παρουσιάζουν προβληματική ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο δεξτρόζης στους 30°C και η ανάπτυξη αυτών είναι χειρότερη σε θρεπτικό μέσο γλυκερόλης. Αντίθετα το στέλεχος *rad9Δ* δεν παρουσιάζει προβλήματα ανάπτυξης σε καμία από τις δύο περιπτώσεις. Συνδυάζοντας τα μεταλλάγματα με την έλλειψη Rad9 (*rad9Δ spt16-11* και *rad9Δ rob3-7*) παρατηρήσαμε ότι το διπλό μετάλλαγμα *rad9Δ rob3-7* αναπτύσσεται λίγο χειρότερα από το *rob3-7*. Επομένως ενδέχεται η Rad9 να συμμετέχει σε διαδικασίες που επηρεάζουν την μεταγραφική επιμήκυνση. Ωστόσο σε επανάληψη του πειράματος ο φαινότυπος δεν επιβεβαιώθηκε.



Εικόνα 1.2.20: Ανάπτυξη των πιο πάνω στελεχών στους 30°C σε στέρεο θρεπτικό μέσο με 3% γλυκερόλη.

Τα ίδια στελέχη αναπτύχθηκαν και σε στερεό θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 6-azauracil. (Η 6-azauracil ελαττώνει τα επίπεδα rNTP στο σακχαρομύκητα και επομένως απαιτούνται πλήρως λειτουργικοί παράγοντες επιμήκυνσης της μεταγραφής όποτε χρησιμοποιείται με σκοπό να αποκαλυφθούν παράγοντες εμπλέκονται στην μεταγραφική επιμήκυνση) (Exinger and Lacroute, 1992) (Powell and Reines, 1996). Σε αυτές τις συνθήκες δεν αποκαλύφθηκε συνθετικός φαινότυπος μεταξύ της Rad9 και των υπομονάδων του γFACT (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται).

1.2.10 Η πρωτεΐνη Asf1 δεν φαίνεται να επηρεάζει την μεταγραφή του *CTRI*.

Έχοντας ως δεδομένο ότι η Asf1 ρυθμίζει την έκφραση αρκετών γονιδίων (Korber et al., 2006; Rufiange et al., 2007) και ταυτόχρονα αλληλεπιδρά άμεσα τόσο με την Rad53 (Emili et al., 2001) όσο και με την Hir1 (Sharp et al., 2001) (πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο *CTRI*) θεωρήσαμε σκόπιμο να μελετήσουμε αν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μόνη της ή σε συνεργασία με Rad9 ή την Hir1 επηρεάζει και την μεταγραφή του *CTRI*. Μετρήσαμε τα επίπεδα του ολικού RNA των *CTRI* σε στελέχη που απουσίαζε η Asf1 (*asf1Δ*), σε

στελέχη που απουσίαζαν η *Asf1* και η *Rad9* (*asf1Δ rad9Δ*) και σε στελέχη που απουσίαζαν η *Asf1* και η *Hir1* (*asf1Δ hir1Δ*) σε συνθήκες επαγωγής. Ωστόσο δεν φάνηκε η *Asf1* να παίζει ρόλο στη μεταγραφή του γονιδίου ούτε μόνη της ούτε συνεργατικά με τις άλλες δύο πρωτεΐνες (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται).

1.3 Συζήτηση

Στην συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζονται νέες αλληλεπιδράσεις της πυρηνικής φωσφοπρωτεΐνης Rad9 α) με τον χαλκορυθμιζόμενο και προσδεδεμένο στο DNA μεταγραφικό παράγοντα Mac1 β) με τον σιδηροεξαρτώμενο μεταγραφικό παράγοντα Aft1 και γ) με την τσαπερόνη ιστονών Hir1. Βασιζόμενοι στις αλληλεπιδράσεις αυτές παρέχουμε στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η Rad9 έχει ένα νέο ρόλο στην μεταλλορυθμιζόμενη μεταγραφή. Ο ρόλος αυτός είναι ανεξάρτητος του ρόλου που έχει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου εφόσον δεν προϋποθέτει συνθήκες βλάβης DNA. Η μελέτη της Rad9 είναι ιδιαίτερης σημασίας διότι ενώ δεν υπάρχει ομόλογη πρωτεΐνη στα θηλαστικά, υπάρχουν τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες η BRCA1 και η 53BP1 που έχουν ομόλογες λειτουργικές επικράτειες (εντοπίζονται επικράτειες BRCT και στις δύο και ταυτόχρονα η 53BP φέρει και επικράτεια Tudor όπως η Rad9), εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, ρυθμίζουν τον κομβικό μεταγραφικό παράγοντα p53 και μεταλλάγματά τους οδηγούν σε καρκίνους.

Οι αλληλεπιδράσεις Mac1-Rad9, Aft1-Rad9 και Rad9-Hir1 δεν έχουν προηγουμένως αναφερθεί ούτε σε πειράματα χαρακτηρισμού πρωτεϊνικών συμπλόκων ούτε σε αναλύσεις σάρωσης βιβλιοθήκης με την τεχνολογία των δύο υβριδίων. Επομένως το εργαστήριο μας παρέχει το πρώτο παράδειγμα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταγραφή και αλληλεπιδρούν με την Rad9.

Δείξαμε ότι η Rad9 επηρεάζει αρνητικά τόσο την δυνατότητα πρόσδεσης όσο και την δυνατότητα ενεργοποίησης του Mac1 και αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι βρήκαμε την επικράτεια BRCT του Rad9 (η οποία περιέχεται στο καρβοξυτελικό άκρο) να αλληλεπιδρά τόσο με την αμινοτελική περιοχή (περιοχή πρόσδεσης στο DNA) όσο και με την καρβοξυτελική περιοχή (περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής) του Mac1 πιθανόν ευνοώντας την πιο κλειστή (ανενεργή) δομή του Mac1 (όπου οι δύο περιοχές ενεργοποίησης και πρόσδεσης είναι πιο κοντά)(Graden and Winge, 1997). Οι επικράτειες BRCT χαρακτηρίζονται ως μοτίβα που έχουν την ικανότητα να προσδέονται σε φωσφοπεπτίδια και μάλιστα με υψηλή συγγένεια σε κατάλοιπα φωσφοσερίνης και φωσφοθρεονίνης (Glover et al., 2004; Manke et al., 2003). Επιπλέον είναι γνωστό ότι ο Mac1 είναι φωσφορυλιώμενος στην ενεργή του μορφή (Heredia et al., 2001). Οι πιθανές

θέσεις φωσφορυλίωσης του Mac1 περιλαμβάνονται στις περιοχές με τις οποίες αλληλεπιδρά η Rad9. Η σημασία και οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης του Mac1 είναι υπό μελέτη.

Οι μέχρι τώρα αναλύσεις μας δείχνουν ότι η Rad9 δεν εντοπίζεται παντού σε όλο το γονιδίωμα ούτε σε όλα τα μεταγραφόμενα γονίδια. Αντίθετα φαίνεται πως εντοπίζεται σε υποκινητές που ρυθμίζονται από τον Mac1 σε συνθήκες επαγωγής και μάλιστα η στρατολόγηση της σε αυτούς εξαρτάται από την παρουσία του Mac1.

Τα πιο πάνω στοιχεία εντοπισμού της Rad9 σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η Rad9 αλληλεπιδρά *in vivo* με την Hir1, η οποία έχουμε βρει στο εργαστήριο μας (βλέπε κεφάλαιο 2) ότι αποτελεί στοιχείο του συμπλόκου επιμήκυνσης του γονιδίου *CTR1* μας ώθησε να διερευνήσουμε αν ο εντοπισμός της Rad9 περιορίζεται μόνο στην περιοχή των υποκινητών (διαδραματίζοντας συγκεκριμένο ρόλο στην έναρξη της μεταγραφής) ή αν ανιχνεύεται και στις κωδικές περιοχές των ρυθμιζόμενων από τον Mac1 γονιδίων. Βρήκαμε ότι σε αντίθεση με τον Mac1, η Rad9, εντοπίζεται και στην κωδική περιοχή του γονιδίου *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής, και μάλιστα η στρατολόγηση της εν μέρει εξαρτάται από την παρουσία της Hir1. Επίσης βρήκαμε ότι η Rad9 ακολουθεί το πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II.

Αποκλειστικά υπεύθυνα για την στρατολόγηση της Rad9 κωδική περιοχή του *CTR1* είναι στοιχεία του εξαρτώμενου από τον Mac1 συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής. Αυτό το αποδείξαμε επιτυχάνοντας την στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή του γονιδίου *ACT1* (όπου η Rad9 φυσιολογικά δεν εντοπίζεται) του οποίου ο υποκινητής είχε αντικατασταθεί από τον υποκινητή του *CTR1*.

Ανιχνεύοντας την Rad9 στην κωδική περιοχή τέθηκε το ερώτημα αν η Rad9 αποτελεί στοιχείο του μηχανισμού μεταγραφικής επιμήκυνσης ή αν τελικά αποτελεί και σε αυτή την περίπτωση στοιχείο του συμπλόκου επιδιόρθωσης του DNA παρόλο που δεν υπάρχουν συνθήκες βλάβης.

1.3.α). Εμπλέκεται η Rad9 στην μεταγραφική επιμήκυνση;

Όπως προαναφέρθηκε η Rad9 παρουσιάζει δομική ομολογία με την BRCA1 (πρωτεΐνη των θηλαστικών με επικράτειες BRCT). Η BRCA1 αλληλεπιδρά με το ολοενζύμο της

RNA πολυμεράσης II και εμπλέκεται μέσω πρόσδεσης, στη δράση πολλών ρυθμιστικών πρωτεϊνών (μεταξύ των οποίων και ο μεταγραφικός ρυθμιστής p53) (Annie Moisan and Luc Gaudreau). Ταυτόχρονα η BRCA1 συνεργάζεται και αλληλεπιδρά με την NUFIP και την P-TEFb (παράγοντες επιμήκυνσης για να επάγει την ενεργοτητα της RNA πολυμεράσης II καθώς και με το SWI/SNF (χρωματινικός αναδιαμορφωτής). Βέβαια άμεση αλληλεπίδραση της Rad9 με στοιχεία του SWI/SNF ή της RNA πολυμεράσης II δεν έχουμε ανιχνεύσει (ωστόσο η υπομοναδα Snf2 εντοπίζεται στον υποκινητή του *CTR1* παίζοντας κεντρικό ρόλο στην μεταγραφή του *CTR1* βλέπε κεφάλαιο 2). Επιπλέον η έλλειψη της Rad9 είχε πολύ μικρή επίδραση στην συσσώρευση του mRNA του *CTR1*. Για να διερευνηθεί περαιτέρω κατά πόσο η Rad9 εμπλέκεται στην μεταγραφική επιμήκυνση (elongation) κατασκευάστηκαν στελέχη στα οποία είχε αφαιρεθεί το γονίδιο της *RAD9* και ταυτόχρονα έφεραν μεταλλαγές σε πρωτεΐνες του συμπλόκου FACT (*spt16-11, pob3-7*) (Formosa *et al*, 2005). Ωστόσο δεν φάνηκε να υπάρχει συνθετικός φαινότυπος τόσο σε πειράματα μέτρησης της συσσώρευσης του *CTR1* RNA όσο και σε ταχύτητα ανάπτυξης σε καλλιέργειες που περιείχαν 6-azauracil (ελαττώνει τα επίπεδα rNTP στο σακχαρομύκητα και επομένως απαιτούνται πλήρως λειτουργικοί παράγοντες επιμήκυνσης της μεταγραφής όποτε χρησιμοποιείται με σκοπό να αποκαλυφθούν παράγοντες εμπλέκονται στην μεταγραφική επιμήκυνση) (Exinger and Lacroute, 1992) (Powell and Reines, 1996) ή γλυκερόλη (πηγή άνθρακα) αντί γλυκόζης (που προϋποθέτει λειτουργικό Mac1 για λειτουργικά μιτοχόνδρια).

Τέλος είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι όταν το DNA υποστεί βλάβη, η Rad9, αναγνωρίζει διμεθυλιωμένη K79 της ιστόνης H3 (Huyen *et al.*, 2004) Η διμεθυλιωμένη K79 ιστόνη H3 συσχετίζεται και με ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια αλλά όχι όλα και ο ρόλος της είναι άγνωστος (Kouzarides, 2002). Ωστόσο σε πειράματα που πραγματοποιήσαμε δεν φάνηκε να είναι υπεύθυνη η τροποποίηση αυτή για την στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή. Με βάση τα πιο πάνω στοιχεία ο ρόλος της Rad9 στην μεταγραφή δεν είναι ξεκάθαρος και πιθανόν ο ρόλος της στην μεταγραφή συνδέεται με άλλες πτυχές όπως επιτήρηση του γονιδιώματος (genomic surveillance), λειτουργία η οποία συνδέεται με την μεταγραφική μηχανή της RNA πολυμεράσης II. Η λειτουργία αυτή πιθανόν να είναι σημαντική για την μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζονται από παράγοντες που προσδένουν μέταλλα. Ιδιαίτερα πρωτεΐνες που

προσδένουν χαλκό και σίδηρο μπορεί να θέτουν σε κίνδυνο τα γονίδια στόχους τους μια και τα ιόντα Fe/Cu είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

1.3.β) Μοντέλο στο οποίο η Rad9 αποτελεί κόμβο μεταξύ της μεταγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA σε φυσιολογικές (unchallenged) συνθήκες

Είναι γνωστό ότι η Rad9 απομονώνεται σε δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. ένα μικρότερο στο οποίο συναντάμε την Rad9 στην υπερφωσφορυλιωμένη της μορφή και το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και ένα μεγαλύτερο με την υποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rad9 του οποίου η δράση είναι προς το παρόν άγνωστη (Toh and Lowndes, 2003). Βρήκαμε ότι η Rad9 σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες επαγωγής του *CTR1* ανιχνεύεται κυρίως στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή. Πιθανόν η υποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rad9 σε κύτταρα που δεν έχουν υποστεί βλάβη να εντοπίζεται κυρίως σε μεταγραφικά σύμπλοκα. Ωστόσο βρήκαμε ότι και η Rad53 [Chk2 στα θηλαστικά που μεταφέρει το σήμα βλάβης σε πρωτεΐνες του συστήματος έλεγχου του κυτταρικού κύκλου (Pelliccioli and Foiani, 2005)] εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *CTR1* και η στρατολόγηση της εξαρτάται από την παρουσία της Rad9. Προκύπτει λοιπόν το ερώτημα αν σε αυτές τις συνθήκες τελικά η Rad9 αποτελεί στοιχείο μεταγραφικού ή επιδιορθωτικού συμπλόκου.

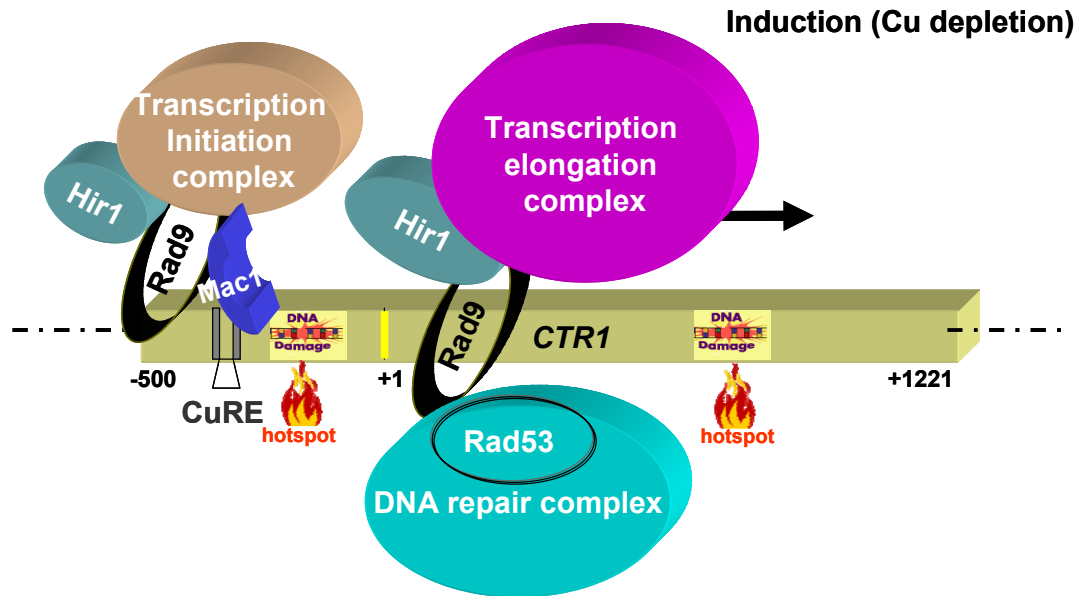
Ένας πιθανός ρόλος της Rad9 στα ρυθμιζόμενα από τον Mac1 γονίδια έρχεται από το γεγονός ότι το *CTR1* {και η γειτονία του *FRE1*-γονίδιο *CRR1*} ανήκει σε μια ομάδα γονιδίων που χαρακτηρίζονται ως «α hotspots» του μειωτικού ανασυνδυασμού. Ως «hotspots», χαρακτηρίζονται περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες εμφανίζουν ασυνήθιστα υψηλά ποσοστά μειωτικού ανασυνδυασμού. Στο σακχαρομύκητα ο μειωτικός ανασυνδυασμός ξεκινάει από το σχηματισμό DSB (δίκλωνου σπασίματος). Μελέτες που έγιναν με σκοπό να εντοπιστεί το σύνολο αυτών των περιοχών στο γονιδίωμα του *S. cerevisiae* έδειξαν ότι υπάρχουν 177 hotspots στα οποία περικλείονται 303 ORFs (γειτονικά hot ORFs ή hot ORFs που διαχωρίζονταν από ένα μη hot ORF χαρακτηρίζονταν ως ένα hotspot)(Gerton et al., 2000). Ως «α hotspots» χαρακτηρίζονται τα hotspots που απαιτούν την πρόσδεση στο DNA μεταγραφικού παράγοντα (Kirkpatrick et al., 1999).

Η επιτήρηση του ομόλογου ανασυνδυασμού κατά την μείωση είναι εξαιρετικής σημασίας μια και σε περίπτωση λάθους υπάρχει πιθανότητα να χαθεί ακόμα και ολόκληρος ο βραχίονας χρωμοσώματος. Στο μηχανισμό επιτήρησης εμπλέκεται και η Rad9 (Hochwagen and Amon, 2006).

Η υπόθεσή μας είναι ότι η Rad9 εντοπίζεται σε γονίδια (σε όλα ή σε μερικά) τα οποία είναι κοντά σε hotspots. Μετακινείται μαζί με την μεταγραφική μηχανή κατά την μεταγραφή. Αρχικά στρατολογείται μαζί με προσδεδεμένους στο DNA μεταγραφικούς παράγοντες (α hotspots). Δείξαμε ότι κατά την στρατολόγηση της η Rad9 φέρνει μαζί της και άλλα στοιχεία του συμπλόκου επιδιόρθωσης (όπως για παράδειγμα το Rad53). Κατά συνέπεια, κατά την έναρξη της μείωσης όπου επάγονται από την Spo11 DSB στα υπονήφια γονίδια (που περιέχονται στα hotspots) ή όταν προκύπτουν προβλήματα στον μειωτικό ανασυνδυασμό, παράγοντες οι οποίοι προηγουμένως συνέβαλλαν στην διαδικασία της μεταγραφής (η οποία στα περισσότερα γονίδια συμπεριλαμβανομένου και του *CTR1* έχει σταματήσει) είναι ήδη παρόντες και διαθέσιμοι να χρησιμοποιηθούν για την επιδιόρθωση του DNA. Στους παράγοντες οι οποίοι είναι γνωστό ότι εμπλέκονται τόσο στη διαδικασία της μεταγραφής όσο και της επιδιόρθωσης ανήκουν κυρίως χρωματινικοί αναδιαμορφωτές όπως για παράδειγμα Chd1, Ino80, RSC, Swi/Snf αλλά και τσαπερόνες ιστονών όπως Asf1 (Bao and Shen, 2007; Marfella and Imbalzano, 2007; Mousson et al., 2007). Μάλιστα πρόσφατα βρέθηκε το Pob3 (υπομονάδα το yFACT) να αλληλεπιδρά ασθενώς αλλά άμεσα με την RPA (VanDemark et al., 2006)[replication protein A που παίζει πρωταρχικό ρόλο στην επιτήρηση του ομόλογου ανασυνδυασμού κατά την μείωση.(Bannister and Schimenti, 2004; Gasior et al., 1998; Li and Schimenti, 2007; Soustelle et al., 2002)} Είναι πιθανόν το yFACT που κατά την βλαστική φάση της ζωής του κυττάρου εμπλέκεται στην επιμήκυνση της μεταγραφής, κατά την μείωση να εμπλέκεται στην ανασυγκρότηση νουκλωσωμάτων σε περιοχές που συμβαίνει μειωτικός ανασυνδυασμός.

Επομένως προτείνουμε για την Rad9 έναν καινούριο ρόλο ο οποίος είναι διαμεσολαβητικός μεταξύ της μεταγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA σε φυσιολογικές «χωρίς προκλήσεις» (unchallenged) συνθήκες. Άρα κατά την βλαστική φάση του κυτταρικού κύκλου το γονίδιο *CTR1* είναι μεταγραφικά ενεργό παρουσία της

Rad9. Κατά την μείωση η μεταγραφή σταματάει και αναλαμβάνει δράση ο επιδιορθωτικός μηχανισμός του DNA.



Εικόνα 1.3.1: Μοντέλο στο οποίο η Rad9 αποτελεί κόμβο μεταξύ της μεταγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA σε φυσιολογικές (unchallenged) συνθήκες.

Δ) ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

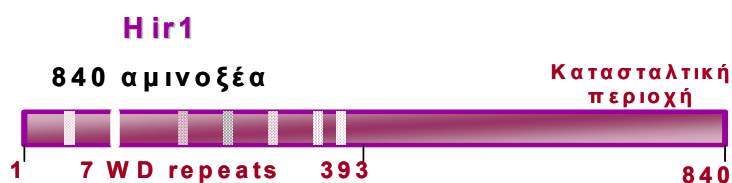
Νέος ενεργοποιητικός ρόλος της Hir1 στην έναρξη και επιμήκυνση της μεταγραφής του Mac1-εξαρτώμενου γονιδίου *CTR1* μέσω συνεργασίας με διαφορετικούς παράγοντες.

2.1.	<u>Εισαγωγή</u>	89
2.1.1	Σύντομη περίληψη των πειραμάτων που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μας σε σχέση με την Hir1.....	93 97
2.2	<u>Αποτελέσματα</u>	97
2.2.1	Η Snf2 αποτελεί απαραίτητο ρυθμιστή της μεταγραφής του <i>CTR1</i> και υπάρχει μερική και αμοιβαία εξάρτηση των Snf2 και Hir1 κατά την στρατολόγηση τους στον υποκινητή του <i>CTR1</i>	99
2.2.2	Η Ssn6 επηρεάζει δραστικά την στρατολόγηση του Snf2 στον υποκινητή του <i>CTR1</i> και η επιρροή αυτή εξαρτάται από την παρουσία της Hir1 σε συνθήκες επαγωγής.....	100
2.2.3	Η στρατολόγηση του Mac1 στον υποκινητή του <i>CTR1</i> επηρεάζεται από την συντονισμένη δράση των ρυθμιστών Snf2, Hir1 και Ssn6.....	99
2.2.4	Η Hir1 δρα συνεργατικά με την Spt16 (στοιχείο του γFACT) κατά την μεταγραφική επιμήκυνση του γονιδίου <i>CTR1</i>	102
2.2.5	Η Hir1 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του <i>CTR1</i> και η στρατολόγησή της σε αυτή τροποποιείται σε μεταλλάγματα <i>spt16-11</i>	104
2.2.6	Ο Snf2 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του <i>CTR1</i>	106
2.3	<u>Συζήτηση</u>	106

2.3.1	Συνθετικός ρόλος του στελέχους <i>hir1Δ ssn6Δ</i> στην έκφραση του <i>CTR1</i> και στην στρατολόγηση του Mac1 στον υποκινητή του <i>CTR1</i> σε συνθήκες επαγωγής.....	107
2.3.2	Ο Snf2 αποτελεί απαραίτητο ρυθμιστή της επαγόμενης μεταγραφής του <i>CTR1</i> –Συνεργατική δράση με Hir1, Ssn6 και Mac1.....	108
2.3.3	Προτεινόμενο μοντέλο για την εξαρτώμενη από τον Mac1 μεταγραφή. Τρεις διαφορετικοί γενικοί συρρυθμιστές αποκρίνονται στην ανενεργή και την ενεργή κατάσταση του Mac1 τροποποιώντας την εξαρτώμενη από τον Mac1 μεταγραφή του <i>CTR1</i>	109
2.3.3α)	Μη επαγωγικές συνθήκες στις οποίες ο Mac1 είναι κυρίως ανενεργός-Σχηματισμός προσυμπλόκου.....	110
2.3.3β)	Επαγωγικές συνθήκες-Ενεργός Mac1-Συγκρότηση ενεργού συμπλόκου.....	111
2.3.4	Η Hir1 και η Spt16, έχουν συνθετικό ρόλο στην μεταγραφική επιμήκυνση του γονιδίου <i>CTR1</i> σε συνθήκες επαγωγής.....	

2.1. Εισαγωγή

Κατά την σάρωση της γενωμικής βιβλιοθήκης με την βοήθεια της τεχνολογίας των δύο υβριδίων (Bilsland et al., 2004) μεταξύ των αλληλεπιδρώντων του Mac1 βρέθηκε και η Hir1 (Voutsina *et al* 2005). Η Hir1 αποτελείται από 840 αμινοξέα. Η αμινοτελική περιοχή της Hir1 εμπερικλείει 7 επαναλήψεις WD40 (β -transducin) ενώ η καρβοξυτελική της περιοχή είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα καταστολέα (εικ.2.1.1) (Lorain et al., 1996) (αντίστοιχες επαναλήψεις και λειτουργική δράση παρουσιάζει και η πρωτεΐνη Tup1(που δρα ως συγκαταστολέας με την Ssn6) γι' αυτό και η Hir1 πρωτονομάστηκε Tup-like)(Sherwood et al., 1993).



Εικόνα 2.1.1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του Hir1

Η Hir1 μαζί με τις Hir2, Hir3 (Histone regulatory proteins), Hpc1 και Hpc2 (histone promoter control) πρωτοταυτοποιήθηκαν μέσω γενετικών σαρώσεων ως *trans* παράγοντες οι οποίοι δρουν στον υποκινητή των γονιδίων των ιστονών με σκοπό να καταστείλουν την μεταγραφή τους σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου πλην των φάσεων G1/S (Lamour et al., 1995; Sherwood et al., 1993). Σήμερα είναι γνωστό ότι οι Hir1, Hir2, Hir3, και Hpc2 αποτελούν υπομονάδες ενός βιοχημικά απομονωμένου συμπλόκου (Hir complex) και ότι η δράση τους δεν περιορίζεται μόνο στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων αυτών (Prochasson et al., 2005).

Οι Hir1 και Hir2 παρουσιάζουν ομολογία με την αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης HIRA αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη αυτή συναντάται σε αρκετούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως στον *Xenopus* και στον άνθρωπο (Kirov et al., 1998; Lamour et al., 1995; Lorain et al., 1996). Πρωτοταυτοποιήθηκε ως *TUPL1* εξαιτίας της μερικής της ομοιότητας με τον γενικό μεταγραφικό καταστολέα Tup1 (Halford et al.,

1993). Η ανθρώπινη HIRA φαίνεται να έχει ρόλο στην απόκριση σημάτων του κυτταρικού κύκλου αποτελώντας υπόστρωμα για την κυκλίνη cdk2 (μάλιστα σε περίπτωση υπερέκφρασή της παρατηρείται επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου κατά την φάση S) (Hall et al., 2001). Επιπλέον η HIRA παίζει σημαντικό ρόλο στην συναρμολόγηση νουκλεοσωμάτων δρώντας ως τσαπερόνη ιστονών ανεξάρτητα από σύνθεση DNA (Ahmad et al., 2005; Hall et al., 2001; Nelson et al., 2002; Ray-Gallet et al., 2002). Πρόσφατα επίσης βρέθηκε να αλληλεπιδρά σε κυτταρικό εκχύλισμα από εμβρυα δροσοφίλας με την Chd1 (Konev et al., 2007). Στον άνθρωπο άτομα ετερόζυγα για το γονίδιο *HIRA* εκδηλώνουν το σύνδρομο DiGeorge/velocardiofacial (D'Antoni et al., 2004; Lamour et al., 1995) Ταυτόχρονα στοχευμένη μεταλλαξογένεση του γονιδίου *HIRA* στα ποντίκια οδηγεί σε προβληματική γαστριδίωση και πρόωρη εμβρυική θνησιμότητα (Roberts et al., 2002) γεγονός που αποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η *HIRA* κατά την ανάπτυξη στα μετόζωα.

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι Hir/Hpc καταστέλλουν την μεταγραφή των γονιδίων δεν είναι ακόμα σαφής και είναι πιθανόν να εμπεριέχει τροποποίηση της χρωματινικής δομής. Οι Hir πρωτεΐνες να στρατολογούνται στον υποκινητή πιθανόν μέσω ενός μη προσδιορισμένου ακόμα DNA προσδεδεμένου μεταγραφικού παράγοντα (DeSilva et al., 1998; Spector et al., 1997). Επίσης οι Hir αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο SWI/SNF και η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση του στον υποκινητή των ιστονών H2A και H2B στην φάση G1/S (Dimova et al., 1999). Το σύμπλοκο SWI/SNF ως ρόλο έχει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (chromatin-remodeling complex) με την κατανάλωση ATP. Απαλοιφή υπομονάδων του SWI/SNF δείχνει ότι το συγκεκριμένο σύμπλοκο χρειάζεται για την μέγιστη έκφραση των γονιδίων ιστόνης (Dimova et al., 1999). Αυτό πιθανόν να το επιτυγχάνει τροποποιώντας την χρωματίνη και επάγοντας την κινητοποίηση των νουκλεοσωμάτων γεγονός απαραίτητο για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων ιστόνης (Wang, 2003). Το σύμπλοκο SWI/SNF, στρατολογείται σε πολλούς υποκινητές με ποικίλους μηχανισμούς. Ένας από αυτούς είναι και η αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του υποκινητή. Οι Hir πρωτεΐνες έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν την ενεργότητα αναδιαμορφωτή (πιθανότατα σχηματίζοντας κάποια δομή με τα νουκλεοσώματα) που έχει το SWI/SNF χωρίς να εμποδίζουν την πρόσδεση του

στον υποκινητή. (Dimova et al., 1999). Άρα οι Hir δρουν όχι μόνο ως συγκαταστολείς αλλά και ως συνενεργοποιητές μια και είναι απαραίτητες για την στρατολόγηση του SWI/SNF στον υποκινητή των ιστονών. Το ερέθισμα το οποίο επιτρέπει την αλλαγή των πρωτεϊνών Hir από συγκαταστολείς σε συνενεργοποιητές σε συγκεκριμένο χρόνο κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου παραμένει άγνωστο. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η παρουσία των Hir1 and Hir2 στους υποκινητές των ιστονών HTA1/HTB1 είναι απαραίτητη προκειμένου να στρατολογηθεί το RSC (το οποίο στους συγκεκριμένους υποκινητές έχει ρόλο μεταγραφικού απενεργοποίηση) (Ng et al., 2002).

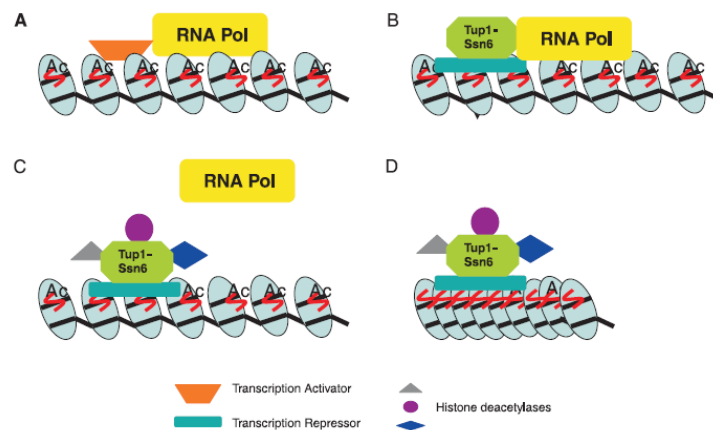
Οι Hir1, Hir2, Hir3, και Hrc2 έχουν και άλλους ρόλους εκτός της ρύθμισης των γονιδίων ιστόνης. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι αποτελούν τμήμα ενός μονοπατιού συναρμολόγησης ιστονών το οποίο λειτουργικά έχει κοινά στοιχεία με τον CAF-I (Cac1-3 chromatin assembly factor I) που κωδικοποιείται από τα γονίδια *CAC* (Sharp et al., 2001). Τα δύο αυτά μονοπάτια χρειάζονται για την συναρμολόγηση νουκλεοσωμάτων και την αποσιώπηση της ετεροχρωματίνης. Συνδυασμός μεταλλαγών σε στοιχεία των *CAC* και *HIR* οδηγεί σε μειωμένη αποσιώπηση τόσο των τελομερών όσο και του mating-type loci (Kaufman et al., 1998; Qian et al., 1998). Επίσης, βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν και δομικό ρόλο στο σχηματισμό κινητοχώρων μια και ανιχνεύονται σε μεγάλα ποσά στην περιοχή αυτή και μεταλλαγές αυτών δημιουργούν πολλά προβλήματα στο σχηματισμό της ατράκτου (Krude, 2002).

Ταυτόχρονα η Asf1 (anisilencing function 1) που παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο στην συναρμολόγηση ιστονών (τσαπερόνη ιστονών H3/H4) όταν το DNA υποστεί βλάβη καθώς και στη αποσιώπηση τόσο των τελομερών όσο και των γενετικών τόπων σύζευξης, βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την Hir1 (Green et al., 2005) και συμβάλλει και αυτή στην εξαρτώμενη από τον κυτταρικό κύκλο μεταγραφική καταστολή των ιστονών (Sutton et al., 2001).

Πρόσφατα επίσης αποδείχθηκε ότι η Asf1 μαζί με την Hir1 παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση και άλλων γονιδίων όπως του *PHO5*. Αυτό το επιτυγχάνουν επανασυναρμολογώντας τον υποκινητή κατά την καταστολή του γονιδίου με απόθεση ιστονών *in trans* (Schermer et al., 2005). Τέλος οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Hir/Hrc έχουν συνδεθεί γενετικά με την μεταγραφική επιμήκυνση μια και δίνουν συνθετικούς φαινοτύπους με τις υπομονάδες του yFACT (Formosa et al., 2002) και πιο πρόσφατα

βιοχημικά με την αποκάλυψη ότι η Hir1 πρωτεΐνη στρατολογείται σε συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής στον υποκινητή και στην κωδική περιοχή του *GAL1* μαζί με άλλους παράγοντες επιμήκυνσης, καθώς και ότι δρα συνεργατικά με την Spt2, και το σύμπλοκο PAF με σκοπό να καταστείλει την έναρξη της μεταγραφής από κρυπτικό υποκινητή στο γονίδιο *FLO8*. (Nourani et al., 2006).

Επιπλέον η Hir1 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά και με την Spt4 η οποία εμπλέκεται στην επιμήκυνση της μεταγραφής, στην επεξεργασία του pre-mRNA στην λειτουργία των κλητοχώρων και στην αποσιώπηση των γονιδίων (DeSilva et al., 1998) καθώς και με την Taf4 (TFIID) η οποία εμπλέκεται στην έναρξη της μεταγραφής RNA pol II γονιδίων (Sanders et al., 2002) και αποτελεί πιθανό υπόστρωμα της Cdc28. Σε πρόσφατες εξάλλου συστηματικές μελέτες αποκαλύφθηκαν πολλές γενετικές αλληλεπιδράσεις του *HIR1* (Collins et al., 2007a; Tong et al., 2004) (Pan et al., 2006). Συμπερασματικά, οι πρωτεΐνες Hir, μπορεί να αποτελούν στοιχεία διαφορετικών λειτουργικά συμπλόκων τα οποία να εμπλέκονται στην μεταγραφική ρύθμιση, στην αποσιώπηση γονιδίων, στην διατήρηση της συγκρότησης χρωματίνης, στην επανασυγκρότηση της κατά την μεταγραφική επιμήκυνση καθώς και στην καταστολή γονιδίων κατά την φάση G2/M.



Εικόνα 2.1.2: Μοντέλο δράσης συμπλόκου Tup1-Ssn6 (Malave and Dent, 2006)

Αν και οι Hir1 με την Tup1 παρουσιάζουν δομική ομολογία δεν έχει εξεταστεί αν η Hir1 δρα συνεργατικά με την πρωτεΐνη Ssn6. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι η Tup1 σε συνεργασία με τον Ssn6 παίζουν σημαντικό ρόλο στη καταστολή της μεταγραφής

αρκετών γονιδίων. Σε πρώτη φάση οι πρωτεΐνες αυτές στρατολογούνται στους ενεργούς ακόμα υποκινητές πιθανόν από κάποιο καταστολέα ο οποίος είναι συγκεκριμένος για κάθε υποκινητή. Ο καταστολέας αυτός αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο του Διαμεσολαβητή (Mediator) έτσι ώστε η RNA pol II να σταματήσει την μεταγραφή. Επιπλέον και το ίδιο το σύμπλοκο Tup1–Ssn6 έχει την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με στοιχεία του Mediator. Το σύμπλοκο Tup1–Ssn6 κατόπιν στρατολογεί απακετυλάσες (HDACs), επάγοντας την απακετυλίωση των ιστονών. Το γεγονός αυτό επάγει την συμπίκνωση των ιστονών και έτσι καταστέλλεται η μεταγραφή (Malave and Dent, 2006). Συμπληρωματικά αναφέρουμε ότι ο Ssn6 αλληλεπιδρά με μεγάλο αριθμό παραγόντων που προσδένονται στο DNA μεταξύ των οποίων και ο μεταγραφικός παράγοντας Aft1 (ενεργοποίηση γονιδίων για πρόσληψη σιδήρου) (Fragiadakis et al., 2004) αλλά και ο Mig1 (εμπλέκεται στην καταστολή γονιδίων για πρόσληψη γλυκόζης (Nehlin and Ronne, 1990).

2.1.2 Σύντομη περίληψη των πειραμάτων που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μας σε σχέση με την Hir1 (Α. Βουτσινά)-Συμπεράσματα/ Ερωτήματα που τέθηκαν

Όπως επισημάνθηκε στην εισαγωγή, σε υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις χαλκού τα ιόντα χαλκού οργανώνουν μια ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης της αμινοτελικής και καρβοξυτελικής περιοχής του Mac1 καθιστώντας την πρωτεΐνη ανίκανη να προσδεθεί στο DNA (Jensen and Winge, 1998). Ωστόσο στο εργαστήριο μας είχε βρεθεί ότι ο Mac1 στρατολογείται στον υποκινητή του *CTR1* όχι μόνο σε συνθήκες επαγωγής (λόγω απουσίας χαλκού) αλλά και κατά την παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων χαλκού (φυσιολογικές συνθήκες) παρόλο που η μεταγραφική του ικανότητα στις συνθήκες αυτές ήταν περιορισμένη. Πιθανόν λοιπόν και άλλοι βοηθητικοί παράγοντες να εμπλέκονται στην διαμόρφωση του Mac1, στην δυνατότητα στρατολόγησης του στον υποκινητή και στην ικανότητα του να ενεργοποιεί την μεταγραφή. Η υπόθεση αυτή μας ώθησε σε διερεύνηση της ύπαρξης πρωτεϊνών που να αλληλεπιδρούν με τον Mac1 μέσω το συστήματος των δύο υβριδίων (Bilsland et al.,

2004). Μεταξύ των υποψήφιων αλληλεπιδρώντων βρέθηκε και ο μεταγραφικός συμπαράγοντας Hir1.

Όπως προαναφέρθηκε η Hir1, πρωτοταυτοποιήθηκε ως συγκαταστολέας της μεταγραφής των γονιδίων ιστόνης και αργότερα ως συρρυθμιστής των περιοχών αποσιώπησης και ως συστατικό των κεντρομερών. Σε καμία όμως από τις πιο πάνω δράσεις του δεν φάνηκε να έχει δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA (Sherwood et al., 1993). Επιπλέον μέχρι σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί κανένας προσδεδεμένος στο DNA μεταγραφικός παράγοντας στον υποκινητή των *HTAI-HTBI* (Osley et al., 1986). Ενώ σε μελέτες *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν πρόσφατα το σύμπλοκο HIR βρέθηκε να προσδένεται μη ειδικά σε ανασυγκροτημένα νουκλεοσώματα (Prochasson et al., 2005). Στα θηλαστικά η πρωτεΐνη HIRA βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την αναπτυξιακά ελεγχόμενη πρωτεΐνη Pax3 η οποία έχει την δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA (Magnaghi et al., 1998). Η σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής δεν είναι ακόμα γνωστή

Στο εργαστήριο μας επιβεβαιώθηκε η άμεση φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της προσδεδεμένης στο DNA περιοχής του Mac1 και της λιγότερο συντηρημένης καρβοξυτελικής περιοχής της Hir1 (η οποία πιθανόν να εμπλέκεται σε περισσότερες ειδικευμένες λειτουργίες Hir1) *in vivo* σε κυτταρικά εκχυλίσματα και στην χρωματίνη αλλά και άμεσα *in vitro*.

Η αλληλεπίδραση Mac1-Hir1 δεν έχει προηγουμένως αναφερθεί ούτε σε πειράματα ευρείας κλίμακας ανάλυσης συμπλόκων (extensive affinity capture) ούτε σε αναλύσεις σάρωσης βιβλιοθήκης με την τεχνολογία των δύο υβριδίων. Επομένως το εργαστήριο μας παρέχει το πρώτο παράδειγμα ενός προσδεδεμένου στο DNA μεταγραφικού ενεργοποιητή ο οποίος αλληλεπιδρά με την Hir1. Βέβαια σε αντίθεση με το γνωστό ρόλο της Hir1 στην καταστολή των γονιδίων ιστόνης η Hir1 αλληλεπιδρά με τον Mac1 σε μεταγραφικά ενεργά γονίδια. Βρήκαμε ότι η Hir1 στρατολογείται στον υποκινητή του *CTR1* (και του *FRE1*) και ότι η στρατολόγηση της εξαρτάται από την παρουσία του Mac1. Συγκεκριμένα η στρατολόγηση της αυξάνει ποσοτικά ανάλογα με την στρατολόγηση του Mac1 σε συνθήκες επαγωγής. Πρέπει να επισημανθεί ότι οι ρυθμιζόμενοι από τον Mac1 υποκινητές στις μεγάλης κλίμακας αναλύσεις των υποκινητών του σακχαρομύκητα δεν είχαν χαρακτηριστεί ως περιοχές στόχοι της Hir1(ChIp on chip) (Lee et al., 2002). Αυτό πιθανόν να οφείλεται είτε στη χαμηλή

συγγένεια μια και όπως αναφέραμε η Hir1 δεν φαίνεται να έχει δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA, είτε εξαιτίας των συνθηκών στις οποίες αναπτύσσονταν οι καλλιέργειες. Αντίθετα στις αναλύσεις αυτές η Hir1 βρέθηκε σε υποκινητές άλλων γονιδίων όταν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (25 γονίδια με υψηλή πιθανότητα να στρατολογείται σε αυτά η Hir1). Αν υποθέσουμε ότι οι περισσότερες από αυτές τις συσχετίσεις είναι σημαντικές, μας είναι άγνωστο αν οι συσχετίσεις προκύπτουν με απευθείας πρόσδεση στο DNA ή αν μεσολαβούν άλλες αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες. Επιπλέον μας είναι άγνωστος ο λόγος στρατολόγησης της στους συγκεκριμένους υποκινητές.

Ταυτόχρονα στο εργαστήριο μας πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό να δούμε αν επηρεάζεται η έκφραση του *CTR1* σε στελέχη *hir1Δ*. Τα πειράματα αυτά δεν αποκάλυψαν απαραίτητο ρόλο της Hir1 στη λειτουργικότητα του Mac1. Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν σε στελέχη που απουσίαζαν τόσο το *HIR1* όσο και το *HIR2*. Είναι πιθανόν πάντως κάποια απαραίτητη λειτουργία να αποκαλυφθεί με την απαλοιφή και άλλων ή και όλων των στοιχείων του συμπλόκου HIR/HPC. Πρόσφατα μάλιστα βρέθηκε συνθετικός φαινότυπος μεταξύ των *HIR3* και *MAC1* (genetic enhancement)(Collins et al., 2007b). Πάντως τα πιο πάνω αποτελέσματα πάντως έρχονται σε συμφωνία με την πρόσφατη αναφορά ότι η Hir1 στρατολογείται στο γονίδιο *GALI* όταν αυτό είναι μεταγραφικά ενεργό αλλά απαλοιφή του *HIR1* αφήνει ανεπηρέαστη την έκφραση του (Nourani et al., 2006).

Ταυτόχρονα ο εντοπισμός του Mac1 στον υποκινητή του *CTR1* σε χαμηλές συγκεντρώσεις χαλκού (μη επαγωγικές συνθήκες) υπονοούσε ότι πιθανόν κάποιος συγκαταστολέας συνδέεται με τον συγκεκριμένο υποκινητή. Ως υποψήφιο προς μελέτη συγκαταστολέα επιλέξαμε τον *Ssn6* ο οποίος όπως αναφέραμε (βλέπε εισαγωγή) δημιουργεί σύμπλοκο με την *Tup1* η οποία φέρει ομόλογες περιοχές με την Hir1 και επομένως θα μπορούσε να δημιουργεί σύμπλοκο και /ή με την Hir1 στον συγκεκριμένο υποκινητή. Πράγματι απαλοιφή του γονιδίου *SSN6*, του οποίου η πρωτεΐνη αποτελεί ένα πολύ ισχυρό συγκαταστολέα σε συνθήκες μη επαγωγής, οδήγησε σε πολύ υψηλή έκφραση του *CTR1*. Αν και η δυνητικά ενεργοποιητική δράση της Hir1 δεν ήταν εμφανής σε στελέχη *hir1Δ*, αποκαλύφθηκε σε στελέχη *ssn6Δ* στα οποία απαλείφθηκε το *HIR1* και η συσσώρευση του mRNA του *CTR1* ελαττώθηκε σε σχέση με τα επίπεδα

αγρίου τύπου. Ο συνθετική δραση επιβεβαιώθηκε με επαναφορά του φαινοτύπου με μετασηματισμό πλασμιδίου πολλαπλών αντιγράφων (high copy) στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί το *HIR1* σε στέλεχος *hir1Δ ssn6Δ*. Επίσης σε συνθήκες επαγωγής η ταυτόχρονη απουσία της Hir1 και της Ssn6 έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων mRNA *CTR1* κατά 40%. Λαμβάνοντας υπόψιν το συνθετικά αποτελέσματα *hir1Δ ssn6Δ* δείχτηκε άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στην καρβοξυτελική περιοχή της Hir1 και της (10 TPR) περιοχής του Ssn6. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από σακχαρομύκητα έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα. Επομένως βρέθηκε μια νέα αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών ρυθμιστών.

Ταυτόχρονα βρήκαμε ότι ο Ssn6 στρατολογείται στον υποκινητή του *CTR1* και η στρατολόγηση του εξαρτάται από την παρουσία του Mac1. Παρόλα αυτά δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ Ssn6 και Mac1. Επιπλέον αν και ο Ssn6 αλληλεπιδρά με την Hir1, η στρατολόγηση των δύο πρωτεϊνών είναι ανεξάρτητη στον υποκινητή του *CTR1*. Πιθανόν ο Ssn6 που είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως σύμπλοκο με τον καταστολέα Tup1 να σχηματίζει και /ή κάποιο σύμπλοκο με την Hir1. Πρέπει στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι ο ρόλος του Tup1 στον υποκινητή του *CTR1* δεν είναι σαφής γιατί ενώ σε στελέχη *tup1Δ* και *tup1Δ hir1Δ* δεν υπήρχε διαφοροποίηση στην συσσώρευση mRNA του *CTR1* σε σχέση με στελέχη αγρίου τύπου ωστόσο το βρήκαμε να στρατολογείται στον υποκινητή ποσοτικά μαζί με την Hir1 στις διάφορες συνθήκες καλλιέργειας. Τα πειράματα αυτά δεν μας αποσαφηνίζουν αν η Hir1 και η Tup1 σχηματίζουν δύο διαφορετικά σύμπλοκα με την Ssn6 ή αν και οι τρεις μαζί βρίσκονται σε ένα σύμπλοκο και δρουν συντονισμένα (Voutsina et al., 2005)

Τα πειράματα που ακολουθούν έγιναν με σκοπό να αποσαφηνιστεί πως η πρωτεΐνη Hir1 δρα ενεργοποιητικά στον συγκεκριμένο υποκινητή και με ποιον τρόπο συνεργάζεται με την Ssn6 σε διάφορες συνθήκες (συνθήκες επαγωγής και συνθήκες μη επαγωγής). Πιθανό σενάριο αποτελούσε να εμπλέκεται στην στρατολόγηση του Snf2 με τον οποίο ήταν ήδη γνωστό ότι αλληλεπιδρά.. Ταυτόχρονα διερευνήθηκε και η υπόθεση η Hir1 να εμπλέκεται στην μεταγραφική επιμήκυνση.

2.2 Αποτελέσματα

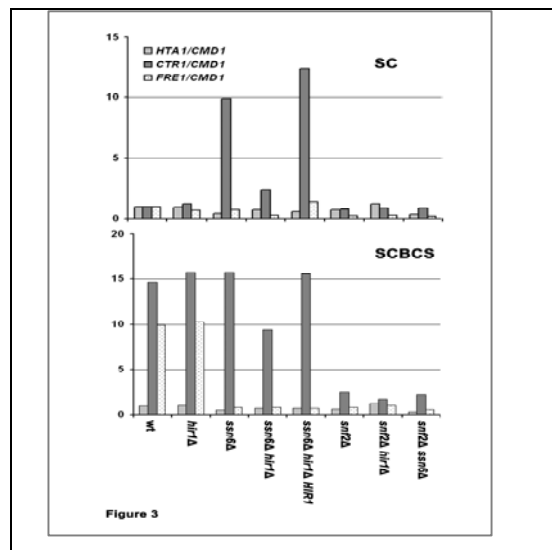
2.2.1 Η Snf2 αποτελεί απαραίτητο ρυθμιστή της μεταγραφής του *CTR1* και υπάρχει μερική και αμοιβαία εξάρτηση των Snf2 και Hir1 κατά την στρατολόγηση τους στον υποκινητή του *CTR1*.

Έχοντας ως δεδομένη την στρατολόγηση της Hir1 στον υποκινητή του *CTR1*, και την δράση της ως ενεργοποιητή σε συνθήκες επαγωγής επιλέξαμε να ερευνήσουμε την πιθανή εμπλοκή του χρωματινικού αναδιαμορφωτή Snf2 στην εξαρτώμενη από τον Mac1 μεταγραφική ενεργοποίηση του *CTR1*. Κίνητρο για αυτή την επιλογή αποτέλεσε το γεγονός ότι η Hir1 αλληλεπιδρά φυσικά με την Snf2 καθώς και ότι το σύμπλοκο των Hir πρωτεϊνών έχει ως ρόλο την στοχευμένη στρατολόγηση των Swi-Snf στον υποκινητή των *HTA1-HTB1* με σκοπό την μεταγραφική τους ενεργοποίηση κατά την φάση G1/S του κυτταρικού κύκλου (Dimova et al., 1999). Το ερώτημα που θέσαμε ήταν αν ο Snf2 στρατολογείται στον υποκινητή *CTR1* και αν η Hir1 εμπλέκεται στη στοχευμένη στρατολόγηση του. Βρήκαμε ότι ο Snf2 εντοπίζεται στον υποκινητή *CTR1* σε όλες τις συνθήκες αλλά ποσοτικά ανιχνεύεται πολύ περισσότερο σε συνθήκες επαγωγής (ελλείψει χαλκού) (εικ.2.2.2). Επιπλέον βρήκαμε ότι η στρατολόγηση του Snf2 στις συγκεκριμένες συνθήκες εξαρτάται μερικώς από την παρουσία της Hir1 (εικ.2.2.2). Η στρατολόγηση του Snf2 στον υποκινητή των *HTA1-HTB1*, χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control όπου φάνηκε ότι και σε αυτή την περίπτωση η στρατολόγηση της στον συγκεκριμένο υποκινητή εξαρτάται εν μέρει από την παρουσία του *HIR1*. Η παρατήρηση αυτή δεν έρχεται σε αντιδιαστολή με την αναφορά για πλήρη εξάρτηση της στρατολόγησης του Snf5 (που αποτελεί στοιχείο του συμπλόκου Swi/Snf) από το σύμπλοκο Hir μια και εκεί η στρατολόγηση του αναδιαμορφωτή μελετήθηκε σε περίπτωση που έλλειπαν τουλάχιστον δύο στοιχεία από το Hir σύμπλοκο (*hir1Δ hir2Δ*)(Dimova et al., 1999).

Επιχειρώντας το αντίστροφο πείραμα δηλαδή την διερεύνηση του αν η στρατολόγηση της Hir1 στον υποκινητή *CTR1* επηρεάζεται από τον Snf2 πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε στελέχη που απουσίαζε ο Snf2 (*snf2Δ*) και διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα εντοπισμού της Hir1 είναι ελαττωμένα σε σχέση με αυτά

του αγρίου τύπου (εικ.2.2.2). Επομένως, η αμοιβαία και μερική εξάρτηση φαίνεται να υπάρχει μεταξύ των Snf2 και Hir1 κατά την στρατολόγηση τους στον υποκινητή *CTR1*.

Για πληρέστερη κατανόηση του ρόλου του Snf2 μετρήσαμε τα επίπεδα μεταγραφής του *CTR1* σε στελέχη *snf2Δ*. Η απαλοιφή του συγκεκριμένου γονιδίου οδήγησε σε δραστική μείωση της έκφρασης του *CTR1* σε επαγωγικές και μη συνθήκες κάτι που δεν είχε παρατηρηθεί σε στελέχη *hir1Δ* (εικ.2.2.1 Α. Βουτσινά). Απαλοιφή του γονιδίου *HIR1* σε στελέχη *snf2Δ* δεν προκάλεσε περαιτέρω αλλαγή στη μεταγραφή (εικ.2.2.1 Α. Βουτσινά). Παρόμοια αποτελέσματα λάβαμε μετρώντας τα επίπεδα μεταγραφής σε διπλά μεταλλάγματα *snf2Δ snn6Δ* (Α. Βουτσινά) γεγονός που υποδεικνύουν τον κυρίαρχο ρόλο του Snf2 στον συγκεκριμένο υποκινητή. Πιθανότατα η παρατηρούμενη ποσοτική εξάρτηση της στρατολόγησης του Snf2 στον υποκινητή *CTR1* από τη Hir1 να μην είναι κρίσιμη για την έκφραση του *CTR1*. Επομένως ο Snf2 έχει απαραίτητο και σημαντικό ρόλο για την στη μεταγραφική ενεργοποίηση του *CTR1* και ο ρόλος του αυτός φαίνεται σε προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν να μην επηρεάζεται από την Hir1.

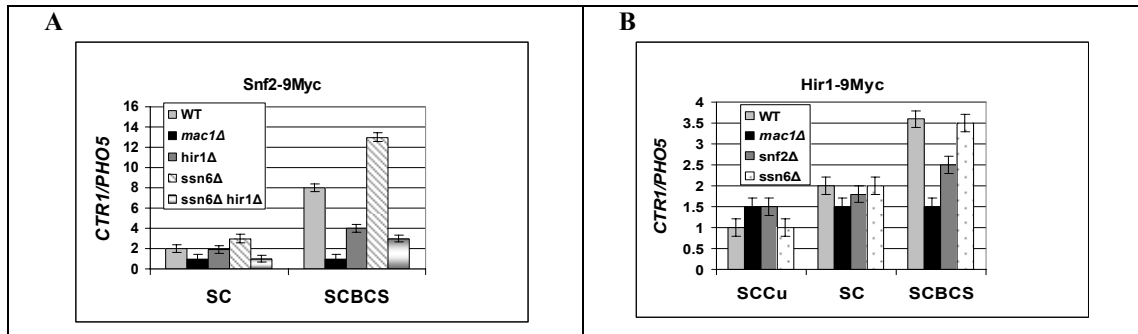


Εικόνα 2.2.1: Σε συνθήκες επαγωγής η *Ssn6* και η *Hir1* δρουν συνεργατικά και ο *Snf2* παίζει κυρίαρχο ενεργοποιητικό ρόλο. Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνυόμενα στην εικόνα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο SC ή SCBCS, με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). Οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν στον PhosphorImager με χρήση του κατάλληλου λογισμικού (Image-Quant). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους λόγους έντασης των αντίστοιχων ραδιοσημασμένων ζωνών στη μεμβράνη (κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA). (Α. Βουτσινά)

2.2.2 Η Ssn6 επηρεάζει δραστικά την στρατολόγηση του Snf2 στον υποκινητή του *CTR1* και η επιρροή αυτή εξαρτάται από την παρουσία της Hir1 σε συνθήκες επαγωγής.

Οι συρρυθμιστές Hir1 και Ssn6 δρουν ανεξάρτητα και αντίθετα (ο Ssn6 επικρατεί σαν καταστολέας παρεμποδίζοντας την ενεργοποιητική δράση της Hir1) στον υποκινητή του *CTR1* σε συνθήκες μη επαγωγής και στις συνθήκες αυτές ο Snf2 εντοπίζεται στον υποκινητή σε πολύ χαμηλά επίπεδα και διαδραματίζει μικρό ρόλο. Αντίθετα σε συνθήκες επαγωγής οι Hir1 και Ssn6 δρουν συνεργατικά στην επαγωγή της μεταγραφής του *CTR1* και ο Snf2 είναι απαραίτητος ενεργοποιητής.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τη σχέση μεταξύ των τριών πρωτεϊνών εξετάσαμε την στρατολόγηση του Snf2 σε στελέχη *ssn6Δ* and *hir1Δ ssn6Δ*. Η στρατολόγηση του Snf2-9Myc αυξανόταν όταν απουσίαζε ο Ssn6 (εικ.2.2.2). γεγονός που υπονοεί ότι Ssn6 δρα ως καταστολέας παρεμποδίζοντας την στρατολόγηση του χρωματινικού αναδιαμορφωτή Snf2. Η παρεμποδιστική δράση του Ssn6, είναι πιο έντονη σε συνθήκες επαγωγής όπου ο Snf2 στρατολογείται σε υψηλότερα ποσά στα κυτταρα που απουσιάζει ο Ssn6. Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι η στρατολόγηση του Snf2 μειώθηκε δραστικά σε στέλεχος που απουσίαζαν τόσο η Hir1 όσο και ο Ssn6 (εικ.2.2.2). γεγονός το οποίο ερχόταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που λάβαμε κατά την μέτρηση του επιπέδου ολικού RNA του *CTR1* στα ίδια στελέχη. Μπορούμε επομένως να συμπεράνουμε ότι η Hir1 σε συνεργασία με την πρωτεΐνη Ssn6 χρειάζονται σε συνθήκες επαγωγής για την επαρκή στρατολόγηση του Snf2 και την μέγιστη συσσώρευση mRNA του *CTR1*.



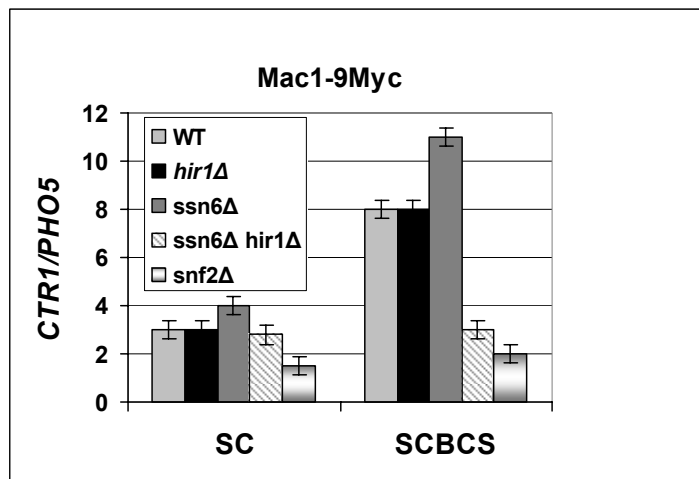
Εικόνα 2.2.2: Ο Snf2 στρατολογείται στον υποκινητή του *CTR1* και η στρατολόγηση του επηρεάζεται από την παρουσία της Hir1 σε συνθήκες επαγωγής.

A) Κύτταρα αγρίου τύπου, *mac1Δ*, *hir1Δ*, *ssn6Δ* και *hir1Δssn6Δ* που εκφράζουν την Snf2-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SC και SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το ολικό (input) DNA αναλύθηκαν με real-time PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για τους υποκινητές του *CTR1* και την κωδική περιοχή του *PHO5*. Εδώ, παρουσιάζονται οι λόγοι IP/input του *CTR1* σε κάθε στέλεχος, κανονικοποιημένοι ως προς τους αντίστοιχους της *PHO5* (μη μεταγραφόμενο γονίδιο).

B) Ομοίως αναλύθηκαν και κύτταρα αγρίου τύπου *mac1Δ*, *snf2Δ*, *ssn6Δ* που εκφράζουν την Hir1-9Myc και έχουν αναπτυχθεί σε SCCu, SC και SCBCS.

2.2.3 Η στρατολόγηση του Mac1 στον υποκινητή του *CTR1* επηρεάζεται από την συντονισμένη δράση των ρυθμιστών Snf2, Hir1 και Ssn6.

Η ενδοκυτταρική και κατά συνέπεια η ενδομοριακή συγκέντρωση του χαλκού φαίνεται να παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην λειτουργικότητα του Mac1. Ωστόσο το αν ο υποκινητής στόχος θα βρίσκεται σε επαγόμενη ή όχι κατάσταση εξαρτάται και από μια σειρά άλλες πρωτεΐνες οι οποίες φαίνεται να στρατολογούνται κατά την μεταγραφική ενεργοποίηση. Στην εικόνα 2.3.3 φαίνεται πως επιδρά κάθε μια από τις πρωτεΐνες αυτές στην στρατολόγηση του Mac1 στον υποκινητή του *CTR1*.



Εικόνα 2.2.3: Συνεργατική δράση συρρυθμιστών στην στρατολόγηση του Mac1 στον υποκινητή του *CTR1*: Κύτταρα αγρίου τύπου, *mac1Δ*, *hir1Δ*, *ssn6Δ* και *hir1Δssn6Δ* που εκφράζουν την Mac1-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SC και SCBCS υποβλήθηκαν σε ανάλυση ChIP με αντίσωμα anti-Myc. Η ποσοτικοποίηση έγινε όπως περιγράφεται στην εικόνα 2.2.2.

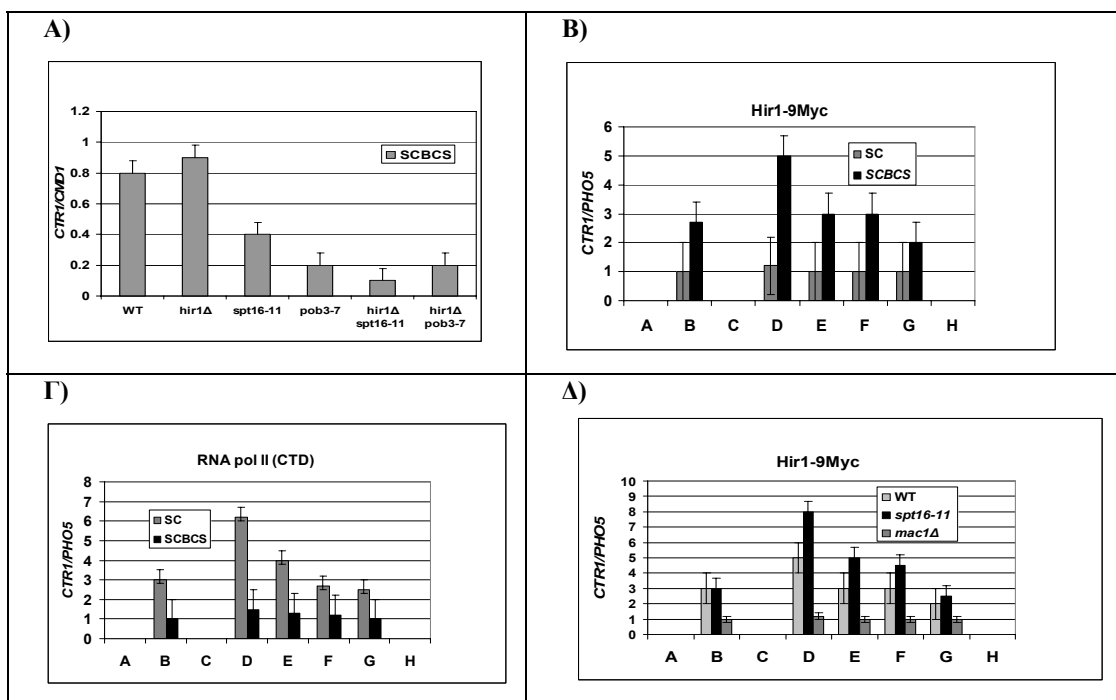
Εξετάζοντας τρεις διαφορετικές συνθήκες (SC, SCBCS, SCCu) παρατηρήσαμε ότι η παρουσία του Snf2 ήταν απαραίτητη για την ποσοτική στρατολόγηση του Mac1 καθώς και το αντίστροφο (εικ.2.2.3).Μαλιστα ο Snf2 μπορεί να επάγει το 70% των μέγιστων επιπέδων μεταγραφής (συνθήκες επαγωγής) ακόμα και σε συνθήκες SC όπου ο Mac1 είναι σε ημίκλειστη διαμόρφωση. Αντιθέτως ο Ssn6 παίζει κατασταλτικό ρόλο στην στρατολόγηση του Mac1 αν και η συγκεκριμένη (HA-Ssn6) στρατολογείται στον υποκινητή ποσοτικά κατά την παρουσία ενεργού Mac1 (Α. Βουτσινά). Τέλος, ενώ η στρατολόγηση του Mac1-9Myc δεν επηρεαζόταν από την απουσία της Hir1, ωστόσο μειωνόταν δραστικά όταν απουσίαζαν ταυτόχρονα η Ssn6 και η Hir1 σε συνθήκες επαγωγής. Κατά συνέπεια παρατηρούμε ότι εκτός από τις συγκεντρώσεις ιόντων χαλκού, υπάρχει αμοιβαία εξάρτηση μεταξύ του παράγοντα που αναγνωρίζει την αλληλουχία DNA και των συρρυθμιστών έτσι ώστε να βρίσκεται τελικά ο υποκινητής σε ενεργή ή όχι κατάσταση. Παρατηρώντας την αμοιβαία εξάρτηση της στρατολόγησης στον υποκινητή *CTR1* μεταξύ των πρωτεϊνών Mac1 και Snf2, ελέγξαμε αν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν φυσικά μέσω συνανοσοκατακρήμισης από κυτταρικά εκχυλίσματα αλλά δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε κάτι τέτοιο (δεν δείχνεται).

2.2.4 Η Hir1 δρα συνεργατικά με την Spt16 (στοιχείο του yFACT) κατά την μεταγραφική επιμήκυνση του γονιδίου *CTR1*.

Γενετικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν από τους Formosa *et al.* έδειξαν ότι η Hir1 συνεργάζεται με στοιχεία του συμπλόκου yFACT (Formosa *et al.*, 2002). Έχοντας ως δεδομένο ότι, η απαλοιφή του *HIR1* δεν επηρεάζει την μεταγραφή του *CTR1*, εκμεταλλευτήκαμε την γνώση που υπήρχε πάνω στο συνθετικό φαινότυπο αύξησης κυττάρων, μεταξύ του *hir1Δ* και των θερμοευαίσθητων μεταλλαγών των πρωτεϊνών Pob3 (*pob3-7*) και Spt16 (*spt16-11*), που αποτελούν στοιχεία του συμπλόκου yFACT, με σκοπό να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο της Hir1 κατά την μεταγραφική επιμήκυνση του *CTR1*. Σε συνθήκες επαγωγής, η μεταγραφή του *CTR1* γινόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε στέλεχος *pob3-7* και μειωνόταν κατά ~50% σε στελέχη *spt16-11* συγκρινόμενα με στελέχη αγρίου τύπου. Σε διπλό μετάλλαγμα *hir1Δ spt16-11*, παρατηρήσαμε περαιτέρω πτώση της μεταγραφής περίπου στο ~10% της μεταγραφής στελεχών αγρίου τύπου γεγονός που αποκαλύπτει συνεργατικό ρόλο για τις δύο πρωτεΐνες στη μεταγραφή. Τα επίπεδα *CTR1* mRNA στο στέλεχος *hir1Δ pob3-7* ήταν αντίστοιχα των επιπέδων μεταγραφής στο *pob3-7* (εικ.2.2.4A). Παρόμοια αποτελέσματα λάβαμε μετρώντας την συσσώρευση του mRNA του *FRE1*. Συμπεραίνουμε ότι η Hir1 δρα συνεργατικά με την Spt16 στην μεταγραφή των *CTR1* και *FRE1*.

2.2.5 Η Hir1 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *CTR1* και η στρατολόγησή της σε αυτή τροποποιείται σε μεταλλάγματα *spt16-11*

Με δεδομένο ότι οι πρωτεΐνες Hir1 και Spt16 συνεργάζονται σε επίπεδο μεταγραφής ήταν λογικό να διερευνήσουμε αν η Hir1 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *CTR1*. Ελέγξαμε μια σειρά από διακριτές περιοχές που εκτείνονται κατά μήκος της κωδικής περιοχής του γονιδίου *CTR1* και βρήκαμε ότι η Hir1 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *CTR1* σε υψηλότερα ποσοστά από αυτά στα οποία ανιχνεύεται στην περιοχή του υποκινητή σε συνθήκες επαγωγής (εικ.2.2.4B)



Εικόνα 2.2.4: Η Hir1 παίζει ρόλο στην επιμήκυνση της μεταγραφής.

A) Η Hir1 παρουσιάζει συνθετική δράση με την Spt16 στη μεταγραφή του *CTR1*. Ανάλυση Northern ολικού RNA από τα ενδεικνύμενα στην εικόνα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη χαλκού (SCBCS), με χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών για τα γονίδια *CTR1* και *CMD1* (εσωτερικός ποσοτικός δείκτης). Οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν στον PhosphorImager με χρήση του κατάλληλου λογισμικού (Image-Quant). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους λόγους έντασης των αντίστοιχων ραδιοσημασμένων ζωνών στη μεμβράνη (κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA).

B) Η Hir1 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής ακολουθώντας το πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της Hir1-9Myc πραγματοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στην εικόνα 2.2.2 χρησιμοποιώντας στελέχη αγρίου τύπου τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκες SC και SCBCS. Ο υποκινητής (B) και τέσσερις περιοχές του *CTR1* ORF (D, E, F, G) αναλύθηκαν με real-time PCR. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της Hir1-9Myc πραγματοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στην εικόνα 2.2.2 χρησιμοποιώντας στελέχη αγρίου τύπου σε συνθήκες SC και SCBCS. Τέσσερις περιοχές του *CTR1* ORF (C, D, E, F,) αναλύθηκαν με real-time PCR.

Γ) Ομοίως αναλύθηκαν στελέχη αγρίου τύπου χρησιμοποιώντας αντίσωμα 8WG16 με σκοπό να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί η στρατολόγηση της RNA πολυμεράση II.

Δ) Η στρατολόγηση της Hir1 στην κωδική περιοχή του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής επηρεάζεται από την Spt16. Ομοίως, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της Hir1-9Myc πραγματοποιήθηκαν και

ποσοτικοποιήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στην εικόνα 2.2.2 χρησιμοποιώντας στελέχη αγρίου τύπου *mac1Δ* και *spt16-11* τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκες SCBCS.

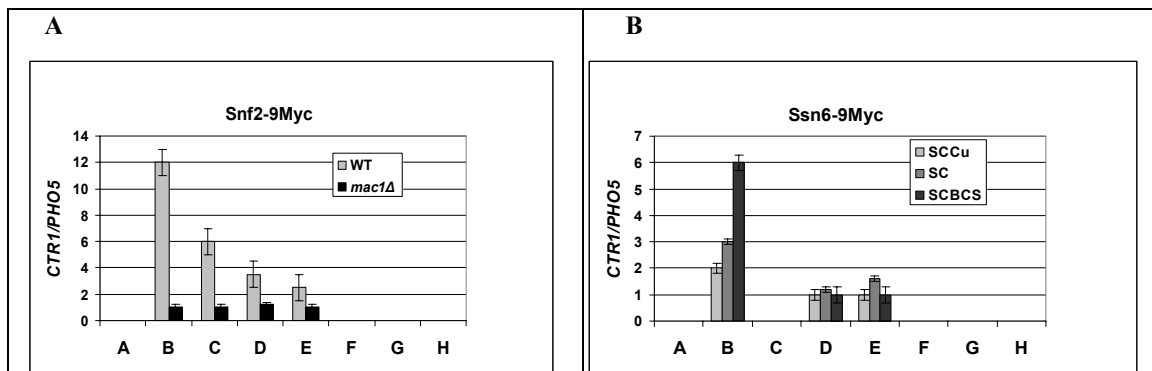
Το παρατηρούμενο ποσοτικό πρότυπο κατανομής της Hir1 στην κωδική περιοχή του *CTR1* κατά το οποίο η Hir1 στρατολογείται σε μεγάλα ποσοστά στο 5' άκρο του γονιδίου και σταδιακά η στρατολόγηση μειώνεται προς το 3' άκρο, είναι χαρακτηριστικό για το συγκεκριμένο γονίδιο και ακολουθεί ποσοτικό πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II (εικ.2.2.4Γ). Σε συνθήκες μη επαγωγής η Hir1 είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στην κωδική περιοχή (εικ.2.2.4B). Επομένως η Hir1 εμπλέκεται στην μεταγραφική επιμήκυνση της RNA Pol II στο γονίδιο *CTR1*.

Η στενή συνεργασία της Hir1 με στοιχεία του συμπλόκου yFACT φαίνεται και από το γεγονός ότι η στρατολόγηση της Hir1 στην κωδική περιοχή του *CTR1* αυξάνεται σε στελέχη *spt16-11* σε σχέση με την στρατολόγηση που παρατηρείται σε στελέχη αγρίου τύπου. Πρέπει βέβαια να επισημανθεί ότι η στρατολόγηση της Hir1 στον υποκινητή του *CTR1* φαίνεται ίδια και στα δύο στελέχη. Πιθανότατα η αυξημένη στρατολόγηση της Hir1 μπορεί να οφείλεται στην τροποποιημένη διαμόρφωση της θερμοευαίσθητης πρωτεΐνης που παράγεται Spt16-11 η οποία τελικά να οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση άμεσα ή έμμεσα των δύο πρωτεϊνών οδηγώντας όμως τελικά σε ένα μη λειτουργικό σύμπλοκο. Το γεγονός ότι τα ποσοστά στρατολόγησης της Hir1 δεν τροποποιούνται στον υποκινητή *CTR1* σε στελέχη *spt16-11*, μπορεί να σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν στη συγκεκριμένη περιοχή παρά το γεγονός ότι πρόσφατα βρέθηκε ότι το σύμπλοκο yFACT παίζει ρόλο και στην έναρξη της μεταγραφής (Biswas et al., 2005). Υποθέτουμε ότι τουλάχιστον στο συγκεκριμένο γονίδιο οι πρωτεΐνες Hir1 και Spt16, συνεργάζονται στενά μετά την έναρξη της μεταγραφής, στην μεταγραφική επιμήκυνση.

2.2.6 Ο Snf2 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *CTR1*.

Μια και οι πρωτεΐνες Mac1, Snf2 και Ssn6 αλληλεπιδρούν με την Hir1 στον υποκινητή του *CTR1* διερευνήσαμε την πιθανή στρατολόγηση αυτών στην κωδική περιοχή του

CTR1. Διαπιστώσαμε ότι ο Snf2 στρατολογείται στην κωδική περιοχή όμως σε ποσοστά μικρότερα από αυτά στα οποία την εντοπίζουμε στον υποκινητή του *CTR1* και με πρότυπο κατανομής διαφορετικό από αυτό της RNA πολυμεράσης II (εικ.2.2.5A). Αντίθετα οι Ssn6 και Mac1 εντοπίζονται μόνο στον υποκινητή του *CTR1* σε όλες τις υπό μελέτη συνθήκες (εικ.2.2.5B). Επομένως έχουμε ένα νέο στοιχείο για τον αναδιαμορφωτή Swi/Snf ότι στρατολογείται στην κωδική περιοχή, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με πολύ πρόσφατα ευρήματα στο σακχαρομύκητα (Schwabish and Struhl, 2007) και παλαιότερα ευρήματα στο γονίδιο *hsp70* του ποντικού (Corey et al., 2003). Πιθανόν ο Snf2 να είναι ένας από τους παράγοντες που μεταβιβάζουν την Hir1 από το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής στο σύμπλοκο επιμήκυνσης.



Εικόνα2.2.5: Πιθανόν ο Snf2 να εμπλέκεται στη μεταβίβαση της Hir1 στην κωδική περιοχή.

A) ο Snf2 στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1* και η παρουσία της εξαρτάται από τον Mac1. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη αγρίου τύπου που εκφράζουν Snf2-9Myc και αναπτύχθηκαν σε SCBCS όπως περιγράφονται στην εικόνα 2.2.2. Η περιοχή του υποκινητή (B) και τρεις περιοχές της κωδικής περιοχής *CTR1* ORF (C, D, E) αναλύθηκαν με real-time PCR.

B) Η Ssn6 δεν στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1*. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη αγρίου τύπου που εκφράζουσε Ssn6-9Myc και αναπτύχθηκαν στις αναγραφόμενες συνθήκες όπως περιγράφονται στην εικόνα 2.2.2. Η περιοχή του υποκινητή (B) και δύο περιοχές της κωδικής περιοχής *CTR1* ORF (D, E) αναλύθηκαν με real-time PCR.

2.3 Συζήτηση

2.3.1 Συνθετικός ρόλος του στελέχους *hir1Δ ssn6Δ* στην έκφραση του *CTR1* και στην στρατολόγηση του Mac1 στον υποκινητή του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής

Πληθώρα στοιχείων για τους μεταγραφικούς ρυθμιστές υποδηλώνουν διττούς ρόλους τόσο συνενεργοποίησης όσο και συγκαταστολής. Ο ρόλος που καλείται κάθε φορά να διαδραματίσει ο ρυθμιστής συχνά εξαρτάται από τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με τους παράγοντες του εκάστοτε υποκινητή αλλά και από τα μεταβολικά σήματα. Για παράδειγμα το σύμπλοκο Ssn6-Tup1 το οποίο εμπλέκεται καταστολή πολλών γονιδίων έχει και θετικό ρόλο σε κάποιες περιπτώσεις που αποδίδεται στον Ssn6. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *GALI* ανάπτυξη παρουσία γαλακτόζης (Paramichos-Chronakis et al., 2002), των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον Sko1 που επάγονται σε συνθήκες οσμωτικού stress (Proft and Struhl, 2002), του *FRE2* του οποίου η μεταγραφή ρυθμίζεται από τον Aft1 σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Fragiadakis et al., 2004). Όπως προαναφέρθηκε η δυνατότητα ενεργοποίησης από την Hir1 όταν απουσίαζε η Ssn6 αποκαλύφθηκε σε στελέχη *hir1Δ ssn6Δ* που αναπτύσσονταν τόσο σε συνθήκες επαγωγής όσο και σε συνθήκες μη επαγωγής. Η έλλειψη είτε του γονιδίου *HIR1* είτε του γονιδίου *SSN6* δεν επηρέασε την μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής αλλά απουσία και των δύο οδήγησε σε σημαντική μείωση (~40%) των επιπέδων mRNA του *CTR1*. Το αποτέλεσμα αυτό μας δείχνει ότι τουλάχιστον ένας παράγοντας θα πρέπει να είναι παρόν για πλήρη ενεργοποίηση. Είναι πιθανόν ότι οι Hir1 και Ssn6, αν και στον υποκινητή του *CTR1* έχουν ενεργοποιητική και κατασταλτική δράση αντίστοιχα, η θέση που κατέχουν στο οργανωμένο πολύπρωτεϊνικό σύμπλοκο του Mac1 είναι ίδια. Η απώλεια και των δύο μπορεί να επηρεάζει δραματικά την συγκρότηση του συμπλόκου το οποίο έρχεται σε συμφωνία με την δραστική μείωση του εντοπισμού του Mac1 στον υποκινητή του *CTR1* σε στελέχη *hir1Δ ssn6Δ*. Τα ευρήματα αυτά προσδίδουν στην Hir1 ένα νέο ρόλο εναλλακτικό αυτού του Ssn6 με στόχο την μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση του *CTR1*.

2.3.2 Ο Snf2 αποτελεί απαραίτητο ρυθμιστή της επαγόμενης μεταγραφής του *CTR1*–Συνεργατική δράση με Hir1, Ssn6 και Mac1

Οι πρωτεΐνες Hir1 και Ssn6 δεν περιέχουν γνήσιες ενεργοποιητικές περιοχές αλλά αντίθετα η ενεργοποιητική τους δράση αποκαλύπτεται με την στρατολόγηση γενικών κοινών συμπλόκων με τέτοιες ιδιότητες όπως για παράδειγμα του SWI/SNF στον υποκινητή *HTA1-HTB1* (Dimova et al., 1999) ή του συμπλόκου SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase) στον υποκινητή *GAL1* (Paramichos-Chronakis et al., 2002) αντίστοιχα. Γνωρίζοντας ότι η Hir1 αλληλεπιδρά βιοχημικά με τους Snf2 και Ssn6 θέσαμε το ερώτημα αν η Hir1 πρόσδιδε την ενεργοποιητική της δράση μέσω του Snf2. Πράγματι διαπιστώσαμε ότι η Snf2 στρατολογείται στον υποκινητή του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής. Μάλιστα βρήκαμε αλληλεξάρτηση μεταξύ των Hir1 και Snf2 κατά την στρατολόγηση τους στον υποκινητή. Ωστόσο σε αντίθεση με την Hir1, η Snf2 ήταν απαραίτητη για την έκφραση του *CTR1* (and *FRE1*) κυρίως κατά τις συνθήκες επαγωγής. Επιπλέον προκειμένου να αποκαλυφθεί η δράση της Hir1 κατά την απουσία του Ssn6 ήταν απαραίτητη η παρουσία του Snf2. Φαίνεται πως ακόμα και λιγότερη ποσοτικά στρατολόγηση του Snf2 (σε στελέχη *hir1Δ*) στον υποκινητή είναι αρκετή για να οδηγήσει σε μέγιστη συσσώρευση του mRNA του *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής.

Ο Ssn6 είναι βασικός καταστολέας της μεταγραφής του *CTR1* σε συνθήκες μη επαγωγής. Η άμεση αλληλεπίδραση του με την Hir1 πιθανόν να υποδεικνύει επικοινωνία μεταξύ των συμπλόκων Ssn6-Tup1 και Swi-Snf τα οποία σε άλλους υποκινητές έχει δείξει πως έχουν ανταγωνιστική σχέση (Fleming and Pennings, 2001).

Κατά την έλλειψη του Snf2, Mac1 παρουσιάζει μικρή δυνατότητα ενεργοποίησης σε συνθήκες μη επαγωγής η οποία είναι ελαφρώς μεγαλύτερη σε συνθήκες επαγωγής. Άρα στην περίπτωση αυτή η διαμόρφωση του Mac1 από τα υπάρχοντα ιόντα χαλκού δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ποσοτική του στρατολόγηση στον υποκινητή. Αντίθετα το κεντρικό ρόλο τον έχει ο Snf2. Επιπλέον ενώ ούτε το Hir1 ούτε το Ssn6 χρειάζονται για την στρατολόγηση του Mac1, η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφής κατά 40% του *CTR1* mRNA σε στελέχη *hir1Δ ssn6Δ* οφείλεται στην δραστική μείωση του εντοπισμού του Snf2. Επιπλέον ο Mac1 χρειάζεται για την στρατολόγηση του Snf2

το οποίο αποκαλύπτει αμοιβαία απαίτηση και δράση για την ενεργοποίηση του υποκινητή *CTR1*.

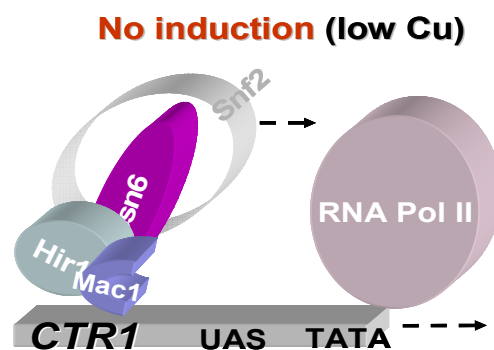
2.3.3 Προτεινόμενο μοντέλο για την εξαρτώμενη από τον Mac1 μεταγραφή. Τρεις διαφορετικοί γενικοί συρρυθμιστές αποκρίνονται στην ανενεργή και την ενεργή κατάσταση του Mac1 τροποποιώντας την εξαρτώμενη από τον Mac1 μεταγραφή του *CTR1*

Ο Mac1 έχει την ικανότητα να ανιχνεύει τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των ιόντων χαλκού και να τροποποιεί την δυνατότητα πρόσδεσης του στο DNA και την μεταγραφική του ενεργότητα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων χαλκού μέσα στο κύτταρο. Ωστόσο αποδεικνύεται ότι το αν ο Mac1 θα βρίσκεται σε ενεργή ή σε μη ενεργή κατάσταση επηρεάζεται και από την ύπαρξη άλλων συνενεργοποιητικών ή συγκατασταλτικών παραγόντων οι οποίοι διασφαλίζουν την μεταγραφική ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των υποκινητών *CTR1* (και *FRE1*).

Η επαγόμενη από τον Mac1 μεταγραφή απαιτεί πρωτίστως την παρουσία του χρωματινικού αναδιαμορφωτή Snf2. Βρήκαμε αμοιβαία εξάρτηση μεταξύ Mac1 και Snf2 κατά την στρατολόγηση τους στον υποκινητή του *CTR1*. Προτείνουμε ότι ενώ ο Mac1 αναγνωρίζει και προσδέεται σε αλληλουχίες CuRE ο Snf2 αναγνωρίζει χρωματινικές περιοχές, στις οποίες είναι προσδεδεμένος ο Mac1 και αναδιαμορφώνει την χρωματίνη. Το άνοιγμα της χρωματίνης οδηγεί σε περαιτέρω στρατολόγηση του Mac1 και αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε περαιτέρω στρατολόγηση του Snf2 και τελικά σε αυξημένη έκφραση του *CTR1*. Ο Ssn6 και η Hir1 στρατολογούνται στον υποκινητή από τον Mac1 διαδραματίζοντας διακριτούς ρόλους οι οποίοι περιγράφονται στη συνέχεια. Αν και αλληλεπιδρούν φυσικά μεταξύ τους στρατολογούνται ανεξάρτητα στον υποκινητή του *CTR1*.

2.3.3α) Μη επαγωγικές συνθήκες στις οποίες ο Mac1 είναι κυρίως ανενεργός-Σχηματισμός προσυμπλόκου

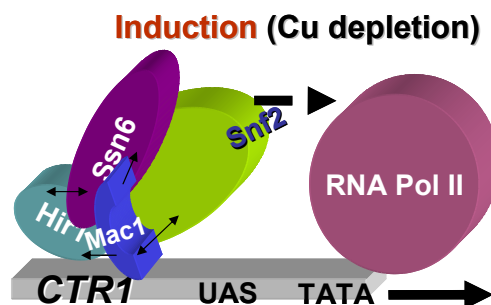
Σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού, ο Mac1 είναι εντελώς ανενεργός. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις χαλκού όταν ο Mac1 είναι σε «ημιενεργή» διαμόρφωση έχει την δυνατότητα να προσδένεται στο DNA και να επάγει ασθενώς την μεταγραφή παρουσία ή ανεξάρτητα από την παρουσία του Snf2 και του Hir1. Με αυτή την στερεοδιαμόρφωση και /ή σε αυτή την ποσότητα ο Mac1 δεν αναγνωρίζεται επαρκώς από τον Snf2, και αυτό γιατί «καλύπτεται» από το καταστολέα Ssn6. Ο Ssn6 απαιτεί την παρουσία του Mac1 προκειμένου να στρατολογηθεί στον υποκινητή *CTR1* σε μικρά ποσά. Ο ρόλος του είναι κυρίαρχος κατασταλτικός στον ασθενώς προσδεδεμένο Mac1 και την δράση του αυτή την επιτυγχάνει παρεμβαίνοντας τόσο στη στρατολόγηση του Mac1 όσο και του Snf2. Σε μικρές ποσότητες στρατολογείται και η Hir1 αλλά η δράση της σε αυτές τις συνθήκες δεν είναι εμφανής. Η έντονα ενεργοποιητική της συμπεριφορά αποκαλύπτεται όταν ο Ssn6 απουσιάζει. Παρατηρήσαμε αμοιβαία εξάρτηση της στρατολόγησης των Hir1 και Snf2 κατά την στρατολόγηση στον υποκινητή *CTR1*. Επομένως κατά την απουσία του Ssn6, η Hir1 διευκολύνει την στρατολόγηση του αναδιαμορφωτή Snf2 γεγονός που οδηγεί σε ποσοτικά μεγαλύτερη στρατολόγηση του Mac1 (~70% της μέγιστης επαγόμενης μεταγραφής του mRNA του *CTR1*). Επομένως στις τις μη επαγωγικές συνθήκες η διαμόρφωση του Mac1 και άρα και τα επίπεδα της μεταγραφής του *CTR1* δεν καθορίζονται τόσο από την ύπαρξη ιόντων χαλκού αλλά κυρίως από την ύπαρξη του καταστολέα Ssn6.



Εικόνα 2.3.1: Μη επαγωγικές συνθήκες / Ο Mac1 είναι κυρίως ανενεργός-Σχηματισμός προσυμπλόκου

2.3.3β) Επαγωγικές συνθήκες-Ενεργός Mac1-Συγκρότηση ενεργού συμπλόκου

Όταν ο χαλκός απουσιάζει, τότε ο Mac1 αποκτά την ανοιχτή ενεργή στερεοδιαμόρφωση, προσδέεται ισχυρά στο DNA. Την ανοιχτή αυτή στερεοδιαμόρφωση του Mac1 αναγνωρίζει καλύτερα ο χρωματινικός αναδιαμορφωτής Snf2 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω μέγιστη στρατολόγηση του Mac1 η οποία οδηγεί σε περαιτέρω μέγιστη ποσοτική στρατολόγηση του Snf2, καθώς και του Hir1 και του Ssn6, γεγονότα τα οποία τελικά οδηγούν στην μέγιστη έκφραση του *CTR1*. Υπερέκφραση της Hir1 δεν οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *CTR1*. Επιπλέον αν και μεγαλύτερες ποσότητες του συγκαταστολέα Ssn6 στρατολογούνται (πιθανόν εξαιτίας μεγαλύτερης προσβασιμότητας στην χρωματίνη), η κατασταλτική του δράση είναι ανύπαρκτη πάνω στον καλά προσδεμένο στο DNA, Mac1. Μάλιστα ενώ απαλοιφή του *SSN6* οδηγεί σε αύξηση της στρατολόγησης του Mac1 (και Snf2) τελικά δεν οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της μεταγραφής του *CTR1*. Απαλοιφή μόνο του *HIR1* δεν έχει εμφανές αποτέλεσμα στην έκφραση του *CTR1*. Ωστόσο ταυτόχρονη έλλειψη του Hir1 και του Ssn6 αποκαλύπτει ένα σημαντικό ρόλο της συνδυασμένης δράσης των δύο πρωτεϊνών στη στρατολόγηση των Snf2 και Mac1 και συνεπώς στη σταθεροποίηση του ενεργοποιητικού συμπλόκου. Επομένως στις συνθήκες επαγωγής η συνεισφορά της στερεοδιαμόρφωσης του Mac1 (ανοιχτός Mac1) συμβάλλει στην μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση του *CTR1* κατά ~60% ενώ ~40% οφείλεται σε στην παρουσία των συρρυθμιστών Hir1 and Ssn6 και επομένως σε ποσοτικά ικανή στρατολόγηση του Snf2 στον υποκινητή.



Εικόνα 2.3.2: Επαγωγικές συνθήκες-Ενεργός Mac1-Συγκρότηση ενεργού συμπλόκου.

2.3.4 Η Hir1 και η Spt16, έχουν συνθετικό ρόλο στην μεταγραφική επιμήκυνση του γονιδίου *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής.

Τα στάδια που περιλαμβάνονται σε ένα τυπικό κύκλο της RNA πολυμεράσης II είναι η έναρξη (initiation) και απόδραση από τον υποκινητή (promoter escape), η επιμήκυνση (elongation) και η λήξη (termination) (Hartzog 2003). Προκειμένου να διεκπεραιωθεί η μεταγραφή μια σειρά από παράγοντες πρέπει να στρατολογηθούν με στόχο να αποδιατάξουν τα νουκλεοσώματα (changes in chromatin integrity), να διευκολύνουν την διέλευση της RNA πολυμεράσης II και στη συνέχεια αφού περάσει η RNA πολυμεράση II να τα επανασυγκροτήσουν έτσι ώστε να αποφευχθεί η έναρξη της μεταγραφής από κρυπτικούς υποκινητές και ταυτόχρονα να ολοκληρωθεί η μεταγραφή (Kaplan et al., 2003). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες δεν περιορίζουν την δράση τους σε ένα μόνο στάδιο της μεταγραφής αλλά αντίθετα εμπλέκονται και επηρεάζουν περισσότερα (βλέπε Γενική Εισαγωγή). Στην κατηγορία αυτή ανήκει και το yFACT (που μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστό ότι έχει σημαντικό ρόλο στην επιμήκυνση της μεταγραφής) το οποίο βρέθηκε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην έναρξη με το να διευκολύνει την αλληλεπίδραση του TBP με το TFIIA στο νουκλεοσωμικό DNA (Biswas et al., 2005). Πρέπει βέβαια να επισημανθεί ότι το yFACT δεν είναι απαραίτητο για την μεταγραφή όλων το γονιδίων (Jimeno-Gonzalez et al., 2006).

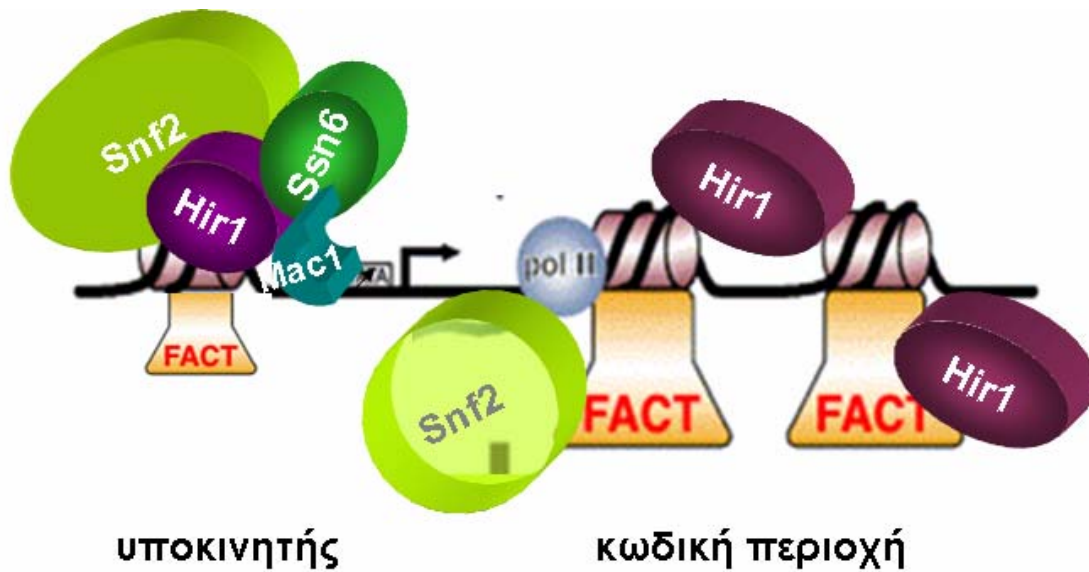
Για τις πρωτεΐνες του συμπλόκου Hir/Hpc υπήρχαν μια σειρά από πρόσφατα γενετικά στοιχεία που τις εμπλέκουν και στην επιμήκυνση της μεταγραφής. Συγκεκριμένα δείχνουν ότι σε περίπτωση μεταλλαγής στην Spt16 (υπομονάδα του yFACT υπεύθυνη για την επανατοποθέτηση ιστονών) τα κύτταρα χρειάζονται οπωσδήποτε τις πρωτεΐνες του συμπλόκου Hir/Hpc. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το yFACT είναι πλέον ανίκανο να ανασυγκροτήσει νουκλεοσώματα και αυτό το αναλαμβάνουν οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Hir/Hpc (Formosa et al., 2002). Εμείς βρήκαμε ότι η Hir1, εντοπίζεται και στην κωδική περιοχή του γονιδίου *CTR1* σε συνθήκες επαγωγής, παρατήρηση που έρχεται σε συμφωνία με πρόσφατα πειράματα στα οποία η Hir1 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του *GALI* σε συνθήκες επαγωγής (Nourani et al.,

2006). Επίσης βρήκαμε ότι η Hir1 ακολουθεί το πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II. Η παρατήρηση μας αυτή υποστηρίζει έναν άμεσο ρόλο της Hir1 στην μεταγραφική επιμήκυνση. Επιπλέον βρήκαμε ότι μεταλλαγές σε υπομονάδες του yFACT επηρεάζουν την συσσώρευση mRNA του *CTR1*. Είναι λοιπόν πιθανόν η χρωματίνη του 5' άκρου της μεταγραφόμενης περιοχής του *CTR1* να είναι οργανωμένη μια και το yFACT φαίνεται να εμπλέκεται μόνο στην διαδικασία της επιμήκυνσης της μεταγραφής γονιδίων με καλά οργανωμένη νουκλεοσωμική δομή (positioned nucleosomes at their transcribed coding region) (Jimeno-Gonzalez et al., 2006). Επίσης βρήκαμε τον πρώτο συνθετική δράση σε στέλεχος *hir1Δ spt16-11* διαπιστώνοντας δραματική ελάττωση στην συσσώρευση mRNA (του γονιδίου *CTR1*) σε συνθήκες επαγωγής. Εντοπίσαμε επίσης την Hir1 σε μεγαλύτερα ποσά ειδικά στην κωδική περιοχή σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγή στην *spt16-11*. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε προβληματική συγκρότηση συμπλόκου επιμήκυνσης (λόγω μεταλλαγμένης Spt16) που έχει αυξημένη συνάφεια του με την Hir1, είτε στο ότι το yFACT δεν είναι σε θέση να ανασυγκροτήσει νουκλεοσώματα και επομένως πρέπει να αναλάβουν δράση οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Hir/Hrc και επομένως να στρατολογηθούν στην μεταγραφομενη κωδική περιοχή σε μεγαλύτερα ποσά.

Στο ερώτημα αν και άλλοι παράγοντες από το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής που αλληλεπιδρούν άμεσα με την Hir1 εντοπίζονται στην κωδική περιοχή, βρήκαμε ότι ενώ ο Mac1 και ο Ssn6 (άμεσα αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες της Hir1) εντοπίζονται μόνο στην περιοχή του υποκινητή, ο Snf2 (του οποίου ο ρόλος μέχρι πρόσφατα πιστεύαμε ότι περιοριζόταν στην απομάκρυνση ιστονών από την περιοχή του υποκινητή-έναρξη μεταγραφής), στρατολογείται και στην κωδική περιοχή του *CTR1* γεγονός που υποδηλώνει ένα επιπλέον ρόλο του στην μεταγραφική επιμήκυνση. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με πρόσφατα ευρήματα τόσο στο σακχαρομύκητα, όπου ο Snf2 βρέθηκε να στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *GALI* και να παίζει σημαντικό στην απομάκρυνση ιστονών από την περιοχή αυτή (Schwabish and Struhl, 2007) όσο και με παλαιότερα ευρήματα στο γονίδιο *hsp70* του ποντικού (Corey et al., 2003)

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η Hir1 έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με διαφορετικούς εναλλακτικούς παράγοντες σε διαφορετικά στάδια της μεταγραφής. Πιο αναλυτικά στον υποκινητή αποκαλύψαμε ότι η Hir1 αλληλεπιδρά και δρα συνεργατικά

με τον Mac1, τον Ssn6 και τον Snf2 και κατόπιν «ταξιδεύει» στην κωδική περιοχή, (πιθανότατα μαζί με άλλους παράγοντες του συμπλόκου έναρξης όπως για παράδειγμα με τον Snf2) όπου και συνεργάζεται με στοιχεία του συμπλόκου επιμήκυνσης (Spt16) (εικ. 2.3.3). Συμπερασματικά αναφέρουμε ότι ανάλογα με τον υποκινητή στον οποίο εντοπίζεται η Hir1 μπορεί να επηρεάζει και τα δύο στάδια της μεταγραφής (έναρξη και επιμήκυνση) ή μόνο το ένα από τα δύο με ενδεχομένως διαφορετικό κάθε φορά τρόπο.



Εικόνα 2.3.3: Επαγωγικές συνθήκες-Ενεργός Mac1-Επιμήκυνση της μεταγραφής του γονιδίου *CTR1*.

Ε) ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**Απομόνωση μεταλλορυθμιζόμενων δυναμικών πολυπρωτεϊνικών
μεταγραφικών συμπλόκων και ταυτοποίηση πρωτεϊνών που
συναντώνται σε αυτά.**

3.1.	Εισαγωγή.....	114
3.2	Αποτελέσματα.....	119

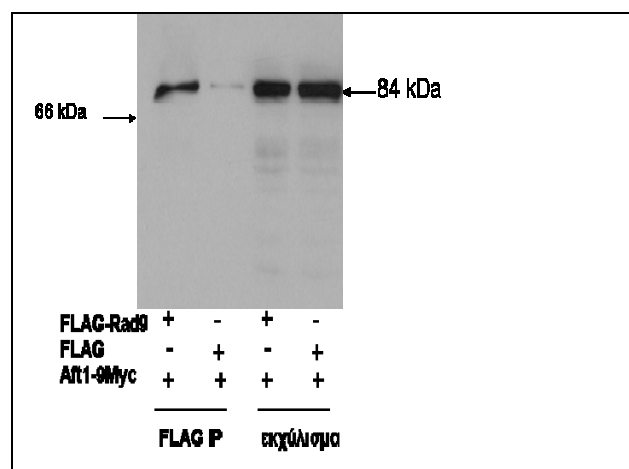
3.1 Σύντομη εισαγωγή

Οι περισσότερες βιολογικές διεργασίες πραγματοποιούνται εξαιτίας πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ των πρωτεϊνών του κυττάρου. Σήμερα πιστεύουμε ότι κάθε πρωτεΐνη του κυττάρου αλληλεπιδρά με κατά μέσο όρο 5 έως 10 πρωτεΐνες (Krogan et al., 2006). Ο συνδυασμός των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δεν είναι στατικός αλλά δυναμικός και άμεσα εξαρτώμενος από διάφορους παράγοντες όπως για παράδειγμα το αναπτυξιακό στάδιο του κυττάρου αλλά και τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που δέχεται αυτό κατά την διάρκεια της ζωής του.

Κατά συνέπεια η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αποτελούν υπομονάδες πολυπρωτεϊνικών συγκροτημάτων αποτελεί το πρώτο βήμα στην κατανόηση του τρόπου οργάνωσης και της δυναμικής των κυτταρικών λειτουργιών (Chen and Yuan, 2006; Fabrizio and Longo, 2003; Mustacchi et al., 2006; Workman et al., 2006). Στις μέρες μας η διερεύνηση των πρωτεϊνών που συγκροτούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα είναι εφικτή στο σακχαρομύκητα, εξαιτίας τόσο των εργαλείων και των μεθοδολογιών που έχουν αναπτυχθεί, όσο και εξαιτίας του πολύ καλά μελετημένου γονιδιώματος του οργανισμού αυτού (Johnston, 2000; Nash et al., 2007). Ταυτόχρονα είναι δυνατή η μελέτη της δυναμικότητας των πρωτεϊνικών συμπλόκων μια και ο συγκεκριμένος οργανισμός μοντέλο μπορεί να αναπτύσσεται σε διάφορες συνθήκες και να αντιδρά γρήγορα στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

Στο δικό μας σύστημα μελέτης όπως φάνηκε και από τα προηγούμενα κεφάλαια ο Mac1 συνεργάζεται είτε αλληλεπιδρώντας άμεσα είτε έμμεσα με μια σειρά από πρωτεΐνες προκειμένου να στρατολογηθεί στον υποκινητή χαλκορυθμιζόμενων γονιδίων και να ενεργοποιήσει την μεταγραφή τους. Ταυτόχρονα βρήκαμε ότι συχνά οι πρωτεΐνες που στρατολογούνται με τον Mac1 εμπλέκονται όχι μόνο στην έναρξη αλλά και στην φάση της επιμήκυνσης της μεταγραφής προκειμένου να διασφαλιστεί η σωστή μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου. Επιπλέον μελετώντας τον Aft1 (σιδηρορυθμιζόμενος μεταγραφικός παράγοντας) ο οποίος είναι γνωστό ότι στρατολογείται και στο υποκινητή του γονιδίου *FRE1* και επάγει την μεταγραφή του σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, όπως αντίστοιχα ο Mac1 επάγει την μεταγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου σε συνθήκες έλλειψης χαλκού (Dancis, 1998; Martins et al., 1998), διαπιστώσαμε ότι

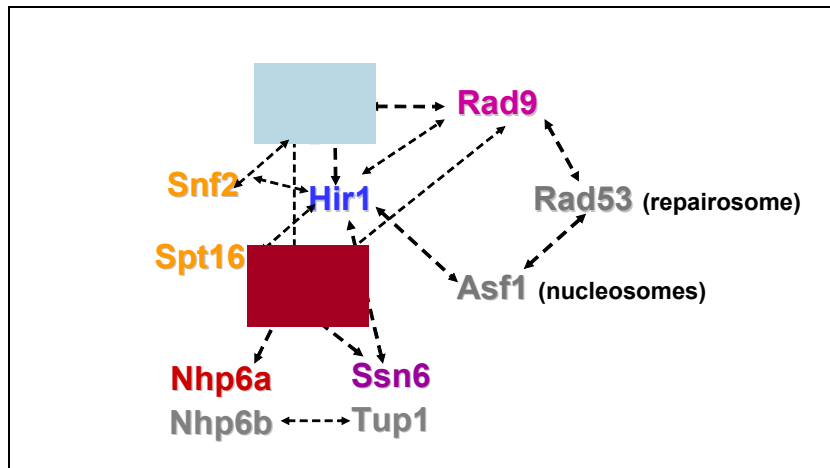
συνανοσοκατακρημνίζεται με πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται να αλληλεπιδρούν είτε άμεσα είτε έμμεσα με το Mac1. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη Ssn6 της οποίας ο ρόλος στη χαλκορυθμιζόμενη μεταγραφή αναπτύχθηκε στο τρίτο κεφαλαίο και η οποία δημοσιεύθηκε από το εργαστήριο ότι αλληλεπιδρά φυσικά μαζί με τον Aft1 παίζοντας σημαντικό ρόλο στην σιδηροεξαρτώμενη μεταγραφή του *FRE2* (Fragiadakis et al., 2004). Ταυτόχρονα σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που πραγματοποιήσαμε δείξαμε ότι ο Aft1 αλληλεπιδρά άμεσα με την Rad9 (εικ. 3.1.1) (Κ. Γκούσκου αδημοσίευτα αποτελέσματα).



Εικόνα 3.1.1: *In vivo* αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Aft1-9Myc και Flag-Rad9 σε συνθήκες επαγωγής. Κυτταρικά εκχυλίσματα από στέλεχος *rad9Δ* που αναπτύχθηκε SCBCS και στο οποίο συνεκφράστηκαν οι Flag-Rad9 ή η Flag επισωμικά και Aft1-9Myc χρωμοσωμικά, επώαστηκαν με αντίσωμα anti-flag και σφαιρίδια σεφαρόζης. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια αναλύθηκαν με SDS-PAGE και η Aft1-9Myc ανοσοανιχνεύτηκε με το αντίσωμα anti-Myc.

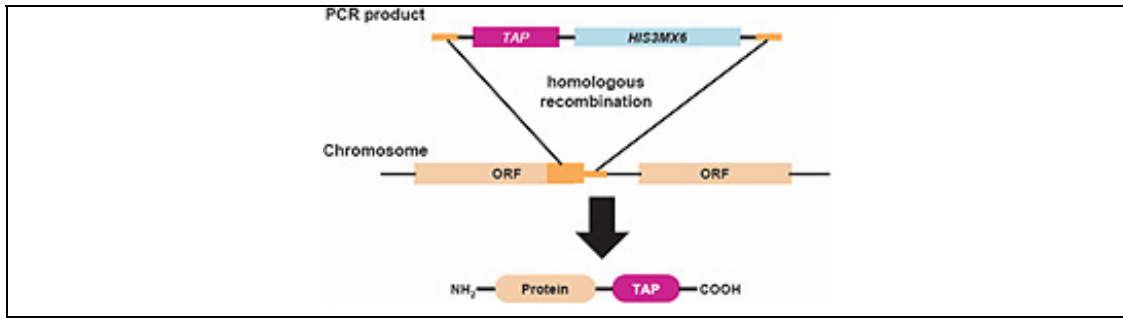
Με βάση τα παραπάνω στοιχεία θελήσαμε αξιοποιώντας σύγχρονες τεχνολογίες να ταυτοποιήσουμε το σύνολο των πρωτεϊνών που συγκροτούν τα σύμπλοκα της μεταλλορυθμιζόμενης μεταγραφής καθώς και των πρωτεϊνών που συγκροτούν το «επιδιορθόσωμα» του DNA (DNA repairosome) σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων εντοπίζοντας πιθανόν κοινούς παράγοντες στα διαφορετικά σύμπλοκα. Η ανάλυση τέτοιων συμπλόκων αποκτά ιδιαίτερη σημασία δεδομένου ότι ανάλογες πρωτεΐνες με αυτές που τίθενται υπό μελέτη συναντώνται και σε ανώτερους

ευκαρυωτικούς οργανισμούς και μεταλλαγές αυτών συχνά οδηγούν σε γενετικές ασθένειες και καρκίνο (Gough et al., 2007; Stucki et al., 2005).



Εικόνα 3.1.2: Διαγραμματική απεικόνιση συσχετίσεων μεταξύ των υπό μελέτη πρωτεϊνών, βασισζόμενη σε πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια (Δ. Αλεξανδράκη)

Βασισζόμενοι σε αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια (εικ.3.1.2) κατασκευάσαμε στελέχη στα οποία είχαν εντεθεί ενδογενώς δύο διαφορετικοί επίτοποι σε δύο διαφορετικά γονίδια. Συγκεκριμένα κάθε ένα από αυτά τα στελέχη εξέφραζε μια πρωτεΐνη η οποία στο καρβοξυτελικό άκρο της έφερε επίτοπο TAP (Tandem affinity purification) (Ghaemmaghami et al., 2003) και άλλη μια η οποία έφερε στο καρβοξυτελικό της άκρο είτε επίτοπο 3HA είτε επίτοπο 9Myc (Knop et al., 1999) (για την ένθεση επίτοπου 3HA σε στελέχη της Open Biosystems συναντήσαμε κάποιες τεχνικές δυσκολίες εξαιτίας ομόλογων περιοχών μεταξύ των *HIS3MX6* που έφεραν τα στελέχη και των *KANMX4* που έφερε η κασέτα ένθεσης 3HA. Το πρόβλημα ξεπεράστηκε με τον τρόπο που αναλύεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι).



Εικόνα 3.1.3: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου ένθεσης του επίτοπου TAP στο γονιδίωμα (Open Biosystems) (Ghaemmaghani et al., 2003)

Ο επίτοπος TAP (εικ.3.1.3) μας επέτρεπε να απομονώσουμε το πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Dziembowski and Seraphin, 2004; Ghaemmaghani et al., 2003; Puig et al., 2001) ενώ ο δεύτερος επίτοπος (τον οποίο έφερε πρωτεΐνη η οποία από πειράματα που έχουν προηγηθεί στο εργαστήριο μας ήταν γνωστό ότι ανοσοκατακρημνίζεται μαζί με την πρωτεΐνη που έφερε τον επίτοπο TAP, για παράδειγμα Mac1-TAP/Rad9-3HA) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας σε αναλύσεις Western που γινόταν με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι έχουμε απομονώσει το σωστό σύμπλοκο πριν αυτό σταλεί για ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα στελέχη που αγοράστηκαν από την Open Biosystems και Euroscarf και το σύνολο των στελεχών που κατασκευάστηκαν ώστε να έφεραν δύο επίτοπους. Η απομόνωση των συμπλόκων TAP, καθώς και η ανάλυση φασματομετρίας μάζας έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο της Dr.Rodriguez-Navarro (Institute of Principe Philippe, Valencia, Spain) το οποίο ήταν εξοπλισμένο με τα απαραίτητα όργανα και είχε εμπειρία σε τέτοιου τύπου μεθοδολογία.

Στελέχη με επίτοπο TAP (Open Biosystems)/ Parental strain = MATa (BY4741).
YDR217c (Rad9-TAP) προβληματικό διότι δεν επιβεβαιώθηκε με PCR για αυτό και τα παράγωγα του δεν αναγράφονται στον πίνακα 3
YGL071w (Aft1-TAP) (επιβεβαιώθηκε με PCR και Western)
YMR021c (Mac1-TAP) (επιβεβαιώθηκε με PCR και Western)
YPL202c (Aft2-TAP)

πίνακας 3.1.1

Στελέχη με επίτοπο TAP (Euroscarf)/ parental strain Genotype: MATa ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52
SC0000(parental strain)
SC3453 (Rad9-TAP) <i>The gene fusion cassette containing the TAP tag complements for the ura3 auxotrophy marker of the parental strain</i>

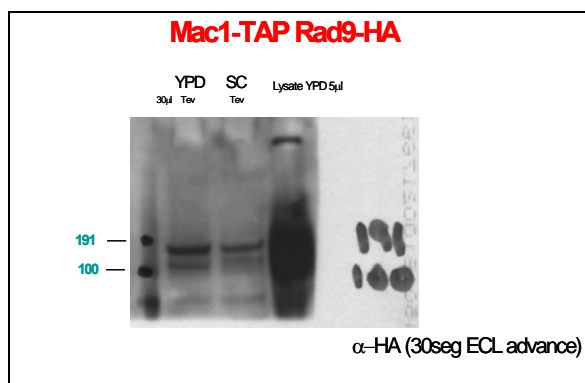
πίνακας 3.1.2

Στελέχη με επίτοπο TAP και δεύτερο επίτοπο 3HA ή (Myc)
Mac1-TAP/Rad9-3HA
Mac1-TAP/Aft1-3HA
Aft1-TAP/Rad9-3HA
FT5 Rad9-TAP (κατασκευάστηκε με κατάλληλους εκκινητές και pBS1539 Euroscarf)
FT5 Rad9-TAP/Aft1-9Myc
FT5 Rad9-TAP/Hir1-9Myc
FT5 Rad9-TAP/Mac1-9Myc

πίνακας 3.1.3

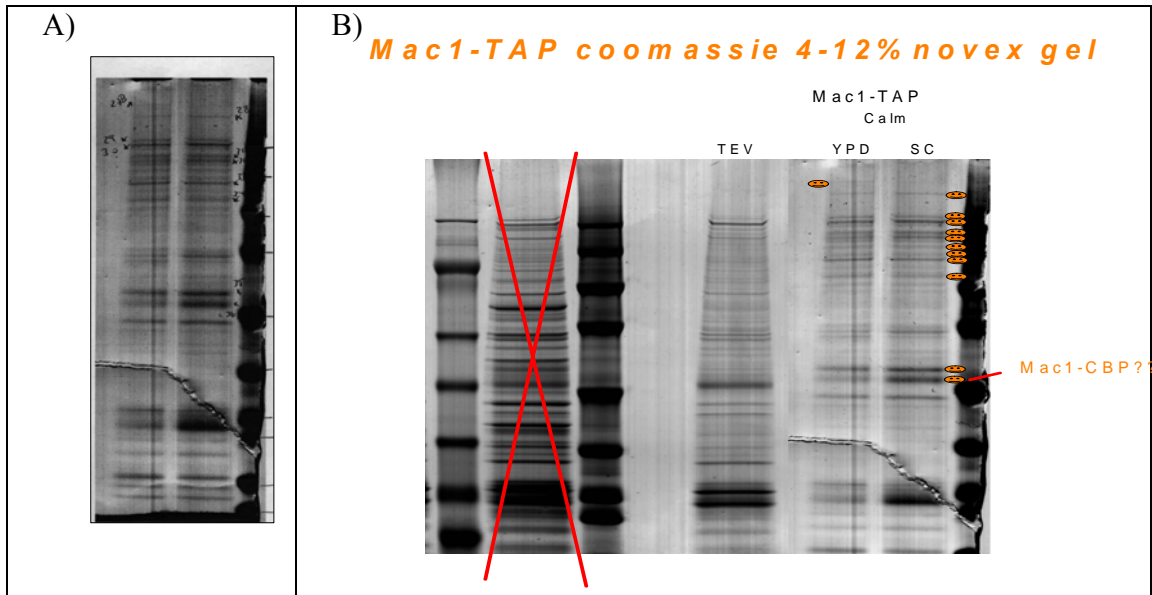
3.2 Αποτελέσματα

Τα πρώτα αποτελέσματα προέκυψαν από ανάλυση του συμπλόκου που απομονώθηκε από καλλιέργεια 6 lt στελέχους Mac1-TAP/Rad9-3HA η οποία είχε αναπτυχθεί είτε σε YPD είτε σε SC μέχρι OD₆₀₀=3 σε συνθήκες έλλειψης χαλκού (είχαν προστεθεί 100μM BCS 3 ώρες πριν την συλλογή τους). Αρχικά 10% ποσότητα του εκχυλίσματος του πρωτεϊνικού συμπλόκου ηλεκτροφορήθηκε και κατόπιν αναλύθηκε με Western στο οποίο ανοσοανιχνεύτηκε η Rad9-3HA.



Εικόνα 3.2.1: Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν με σύστημα ανοσοκατακρήμισης TAP από κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε SCBCS, YPDBCS στα οποία συνεκφράζονται οι Mac1-TAP /Rad9-3HA. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια σεφαρόζης A αναλύθηκαν με SDS-PAGE και οι πρωτεΐνες που έφεραν 3-HA ανοσοανιχνεύτηκαν με το αντίσωμα anti-HA

Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε η απομόνωση του σωστού συμπλόκου. Ένα ακόμα 10% της αρχικής ποσότητα του εκχυλίσματος του πρωτεϊνικού συμπλόκου υπέστη χρώση με Coomassie blue και με ανόργανα άλατα αργύρου (silver staining).

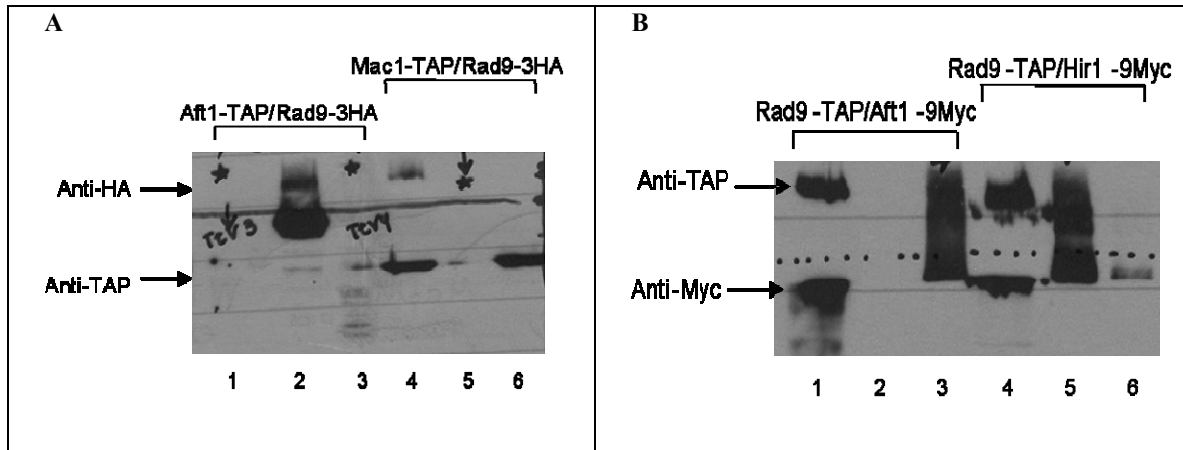


Εικόνα 3.2.2: Α) Χρώση με άργυρο από όπου απομονώθηκαν οι ζώνες που εστάλησαν για ανάλυση φασματομετρίας μάζας.
 Β) Χρώση με Coomassie blue όπου φαίνονται τα δείγματα έκλουσης με EGTA από καλμαδουλίνη (calm-eluates) που προέκυψαν από τις καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε YPD και SC αντίστοιχα. Με το πορτοκαλί σύμβολο έχουν σημαδευτεί οι υποψήφιες προς ανάλυση πρωτεΐνες.

Ζώνες οι οποίες δεν εντοπίζονταν στον αρνητικό ή στον θετικό μάρτυρα και άρα αποτελούσαν αλληλεπιδρώντα του Mac1 απομονώθηκαν και εστάλησαν για ανάλυση φασματομετρίας μάζας. Μεγαλύτερος αριθμός τέτοιων ζωνών εντοπίστηκε στα κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί σε SC. Τα πρώτα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά και οι πρώτες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν η Mac1, Top2, η Chd1, και η Isw1. Ωστόσο δεν λάβαμε περαιτέρω αποτελέσματα εξαιτίας προβλήματος του φασματόμετρου μάζας.

Σε επόμενη φάση του πειράματος απομονώθηκαν πρωτεϊνικά σύμπλοκα από καλλιέργειες 6 lt των στελεχών Mac1-TAP/Rad9-3HA (επανάληψη) και Rad9-TAP/Hir1-9Myc που είχαν αναπτυχθεί σε SC μέχρι OD₆₀₀=3 σε συνθήκες έλλειψης χαλκού (είχε προστεθεί 100μM BCS 3 ώρες πριν την συλλογή τους) καθώς και από καλλιέργειες 6 lt των στελεχών Aft1-TAP/Rad9-3HA και Rad9-TAP/Aft1-9Myc που είχαν αναπτυχθεί σε SC μέχρι OD₆₀₀=3 σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου και χαλκού (είχε προστεθεί 100μM BPS 6 ώρες πριν την συλλογή τους) το 10% του ποσού του

εκχυλίσματος του πρωτεϊνικού συμπλόκου ηλεκτροφορήθηκε και κατόπιν αναλύθηκε με Western στο οποίο ανοσοανιχνεύτηκαν οι πρωτεΐνες με το δεύτερο επίτοπο.



Εικόνα 3.2.3: Α) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν με σύστημα ανοσοκατακρήμνισης TAP από κύτταρα στα οποία συνεκφράζονται οι Aft1-TAP /Rad9-3HA και είχαν αναπτυχθεί σε SCBPS και κύτταρα στα οποία συνεκφράζονται οι Mac1-TAP /Rad9-3HA και είχαν αναπτυχθεί σε SCBCS. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια αναλύθηκαν με SDS-PAGE και οι πρωτεΐνες που έφεραν 3-HA ανοσοανιχνεύτηκαν με το αντίσωμα anti-HA. Στις διαδρομές (lanes) 2 και 5 έχουν ηλεκτροφορηθεί ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών των αντιστοιχών στελεχών ως θετικοί μάρτυρες (control). Στις υπόλοιπες διαδρομές (lanes) έχουν ηλεκτροφορηθεί δείγματα έκλουσης μετά από επώαση με πρωτεάση TEV (TEV eluates) των αντιστοιχών καλλιιεργειών.

Β) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν με σύστημα ανοσοκατακρήμνισης TAP από κύτταρα στα οποία συνεκφράζονται οι Rad9-TAP/Aft1-9Myc και είχαν αναπτυχθεί σε SCBPS και κύτταρα στα οποία συνεκφράζονται οι Rad9-TAP/ Hir1-9Myc και είχαν αναπτυχθεί σε SCBCS. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια αναλύθηκαν με SDS-PAGE και οι πρωτεΐνες που έφεραν 9Myc ανοσοανιχνεύτηκαν με το αντίσωμα anti-HA. Στις διαδρομές (lanes) 1 και 4 έχουν ηλεκτροφορηθεί ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών των αντιστοιχών στελεχών ως θετικοί μάρτυρες. Στις υπόλοιπες διαδρομές (lanes) έχουν ηλεκτροφορηθεί δείγματα έκλουσης μετά από επώαση με πρωτεάση TEV (TEV eluates) των αντιστοιχών καλλιιεργειών.

Παρατηρούμε ότι μόνο στις διαδρομές (lanes) B3 (Rad9-TAP/Aft1-9Myc TEV eluate) και B5 (Rad9-TAP/ Hir1-9Myc TEV eluate) φαίνεται να συνανοσοκατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες. Από ανάλυση φασματομετρίας μάζας των εκλουσμάτων από τις αντίστοιχες καλλιιεργειες δεν ελήφθησαν αποτελέσματα για τεχνικούς λόγους. Το πείραμα θα επαναληφθεί.

Πιο κάτω παρουσιάζεται πίνακας πρώιμων αποτελεσμάτων από συνολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών που λάβαμε πρόσφατα με πρωτεΐνες που συναπομονώθηκαν με την Mac1-TAP πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες έχουν χωριστεί σε ομάδες ανάλογα με την λειτουργικότητα τους. Εντύπωση σε πρώτη φάση προκαλεί το γεγονός ότι αρκετές από αυτές φαίνεται να εμπλέκονται στην διαδικασία της μείωσης και μίτωσης (σχηματισμός εκβλαστήματος). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που είχαν ληφθεί στο παρελθόν από το εργαστήριό μας, μέσω της σάρωσης γενωμικής βιβλιοθήκης με την τεχνολογία των δύο υβριδίων (βλέπε πίνακα E.1) όπου φάνηκε να αλληλεπιδρά άμεσα ο Mac1 με την πρωτεΐνη Mam1 (πρωτεΐνη του κινητοχώρου που εμπλέκεται στην πρόσδεση των χρωμοσωμάτων στη μειωτική άτρακτο -SGD) πιθανόν να αποκαλύπτουν κάποια νέα δράση του Mac1 στις διαδικασίες αυτές. Η υπόθεση αυτή πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Ρόλος								
Μεταγραφή	SNF2	SET2	SPT7	CHD1	INO80	SET1	TRA1	NUT1
	SWR1	TAF1						
Αποσιώπηση	NET1	NMD2	RAD50	CDC13	ZDS1			
Μάτισμα	PRP8	SPP41	EXO84					
Ουμπικουτινιλίωση	UBP2	CUE3	BUL1	HUL5	GRR1			
Σχηματισμός εκβλαστήματος	TCB3	BUD21	CDC3	IQG1	LAS1	BUD6	SHS1	
Σχηματισμός DSB/SSB	RAD50	RAD7	CDC13	RPA1	RAD2	SNF2 CHD1 INO80		
Διαχωρισμός χρωμοσωμάτων	SMC4	SPC105						
Μείωση	ZIP2	RAD50	ITC1	CDC13	RPA1			
ER/GOLGI	ERP4	USO1	SRP72	MGA2				

Πίνακας 3.2.1: Πρώιμα αποτελέσματα ανάλυσης συμπλόκου Mac1-TAP

Υπάρχουν βέβαια και πρωτεΐνες που δεν ομαδοποιούνται ή η λειτουργία τους είναι άγνωστη (FMP29, YFRO16, HEH2, YHR048W, SEY1, TFC3, TOM70, HRQ1, AVO1, POP1, ENS2, TRF5, FRE4, MSN4, NOP14, MLP2)

ΣΤ) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΕΦ. 1

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η Rad9, εκτός από τον ρόλο της ως πρωτεΐνη ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoint protein), έχει ένα νέο ρόλο στην εξαρτώμενη από την RNA πολυμεράση II-μεταγραφή. Συγκεκριμένα, βρήκαμε ότι:

- Η Rad9 αλληλεπιδρά άμεσα μέσω της BRCT επικράτειας της με το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο του χαλκορυθμιζόμενου μεταγραφικού παράγοντα Mac1 που περιλαμβάνουν περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες αλλά και πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης.
- Η Rad9 επιδρά αρνητικά τόσο στην δυνατότητα πρόσδεσης του Mac1 στο DNA όσο και στην μεταγραφική του δυνατότητα χωρίς ωστόσο να επηρεάζει ιδιαίτερα την συσσώρευση του mRNA του *CTR1* (γονίδιο που ρυθμίζεται μεταγραφικά από τον Mac1).
- Η Rad9 στρατολογείται στα ρυθμιζόμενα από τον Mac1 γονίδια *CTR1* και *FRE1* και μάλιστα η στρατολόγησή της να εξαρτάται από τον Mac1.
- Η στρατολόγηση της Rad9 δεν περιορίζεται μόνο στον υποκινητή των Mac1 ρυθμιζόμενων γονιδίων. Επεκτείνεται και κατά μήκος της κωδικής περιοχής του γονιδίου *CTR1* (όπου ο Mac1 δεν εντοπίζεται), ακολουθώντας μάλιστα το ιδιαίτερο πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II.
- Αποκλειστικά υπεύθυνα για την στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή είναι στοιχεία του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής αφού πετύχαμε την στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή του γονιδίου *ACT1* (όπου φυσιολογικά δεν στρατολογείται) συγχωνεύοντας στο 5' άκρο της στο γονιδίωμα τον υποκινητή του γονιδίου *CTR1*.
- Η στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή εν μέρει οφείλεται στην πρωτεΐνη Hir1 (τσαπερόνη ιστονών) με την οποία βρήκαμε την Rad9 να αλληλεπιδρά

άμεσα και η οποία εμπλέκεται τόσο στην έναρξη όσο και στην επιμήκυνση της μεταγραφής του *CTRI* (βλέπε κεφάλαιο 2).

- Αντίθετα, επιγενετικά σημάδια της χρωματίνης όπως η διμεθυλίωση της ιστόνης H3 στην K79 γνωστή για την αναγνώρισή της από την Rad9 σε περίπτωση βλάβης στο DNA (Huyen et al., 2004), δεν φαίνεται να εμπλέκονται, ούτε απαραίτητα να συσχετίζονται με την στρατολόγηση της Rad9 στην κωδική περιοχή του *CTRI*.

- Εκτός από παράγοντες που εμπλέκονται επιμήκυνση της μεταγραφής, στην κωδική περιοχή του *CTRI* στρατολογείται και η κινάση Rad53 (παράγοντας που επίσης εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA) και μάλιστα ο εντοπισμός της εκεί εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία της Rad9. Διαφαίνεται επομένως ότι η εμπλοκή της Rad9 με μεταγραφικά σύμπλοκα ίσως να μην σχετίζεται με την ίδια την μεταγραφή αλλά με τη δυνατότητα επιδιόρθωσης.

- Στις συνθήκες που εξετάσαμε (φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες έλλειψης χαλκού) η Rad9 εντοπίζεται στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή. Ας σημειωθεί ότι, η Rad9, σε περιπτώσεις βλάβης στο DNA, υπερφωσφορυλιώνεται (προσαρμοστής) και επάγει (προσαρμοστής) την κινάση Rad53 (τελεστής) που ολοκληρώνει το σηματοδοτικό μονοπάτι της βλάβης με την φωσφορυλίωση ποικίλων πρωτεϊνικών στόχων.

Για την κατανόηση του ρόλου της Rad9 στα μεταγραφόμενα Mac1 εξαρτώμενα γονίδια, συνδυάσαμε με τα πειραματικά μας δεδομένα, το γεγονός ότι το *CTRI* (και η «γειτονία» του *FRE1*) ανήκει σε μια ομάδα γονιδίων που χαρακτηρίζονται ως hotspots για μειωτικό ανασυνδυασμό (ο οποίος ξεκινά με σπάσιμο της δίκλωνης αλυσίδας του DNA). Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η Rad9 θα μπορούσε να έχει διαμεσολαβητικό ρόλο μεταξύ στοιχείων του συμπλόκου της μεταγραφικής μηχανής και του συμπλόκου επιδιόρθωσης του DNA κατά την μείωση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, δηλαδή χωρίς την επαγωγή βλαβών από εξωγενείς παράγοντες. Συνεπώς, στοιχεία της μεταγραφικής μηχανής (κυρίως χρωματινικοί αναδιαμορφωτές και τσαπερόνες ιστονών) είναι παρόντα κατά την βλαστική φάση της ανάπτυξης στην περιοχή μελλοντικής έναρξης του μειωτικού ανασυνδυασμού και διαθέσιμα να χρησιμοποιηθούν από τον επιδιορθωτικό μηχανισμό του DNA υπό την επίβλεψη του Rad9.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΕΦ. 2

Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε περαιτέρω τον ρόλο της Hir1, που όπως προαναφέρθηκε αλληλεπιδρά με την Rad9 (Γκούσκου Κ.) αλλά και με τον Mac1 (Voutsina *et al* 2005). Σε επίπεδο μεταγραφής του *CTR1* ο ενεργοποιητικός ρόλος της Hir1 αποκαλύπτεται όταν απουσιάζει ο Ssn6 (βασικός καταστολέας της μεταγραφής) τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής του *CTR1* (συνθετικοί φαινότυποι σε *CTR1* mRNA στο στέλεχος *hir1Δ ssn6Δ*).

- Γενετικά και βιοχημικά πειράματά μας, έδειξαν ότι η Hir1 παίζει ενεργοποιητικό ρόλο κατά την έναρξη της μεταγραφής σε συνθήκες επαγωγής (έλλειψης χαλκού) επηρεάζοντας άμεσα την στρατολόγηση του βασικού χρωματινικού αναδιαμορφωτή Snf2 στον υποκινητή του *CTR1*.
- Ο αναδιαμορφωτής Snf2 εντοπίζεται στην κωδική περιοχή αλλά δεν φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II.
- Ταυτόχρονα βρήκαμε ότι και η Hir1 παίζει ενεργοποιητικό ρόλο κατά την επιμήκυνση της μεταγραφής του *CTR1* εφόσον στρατολογείται στην κωδική περιοχή του *CTR1* ακολουθώντας το πρότυπο κατανομής της RNA πολυμεράσης II και δρα σε συνδυασμό με τον παράγοντα επιμήκυνσης Spt16 (υπομονάδα του yFACT) (συνθετικοί φαινότυποι σε *CTR1* mRNA στο στέλεχος *hir1Δ spt16-11*).

Επομένως αποκαλύψαμε ένα νέο ρόλο για την Hir1 κατά τον οποίο εμπλέκεται τόσο στην έναρξη όσο και στην επιμήκυνση της μεταγραφής μιας νέας ομάδας γονιδίων που επάγονται από την έλλειψη χαλκού και τον Mac1 μεταγραφικό ρυθμιστή, συνεργαζόμενη σε κάθε φάση του μεταγραφικού κύκλου με διαφορετικούς παράγοντες.

Ο αναδιαμορφωτής Snf2, εκτός από την αλληλεξάρτηση που εμφανίζει ως προς την στρατολόγησή του με την Hir1, είναι απαραίτητος για την μεταγραφή του *CTR1* και αλληλοεξαρτώμενος ως προς την στρατολόγησή του με τον Mac1. Υπενθυμίζουμε ότι, ενώ η λειτουργικότητα του Mac1 εξαρτάται από τα ιόντα χαλκού στο κύτταρο, οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εξασφαλίζουν την λειτουργία του ως διακόπτη on-off για τη ρύθμιση των γονιδίων στόχων στην Mac1-ρυθμιζόμενη μεταγραφή (Mac1-Snf2/Hir1, Mac1-Ssn6).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΕΦ. 3

Μέσα στους στόχους της παρούσας εργασίας ήταν να ξεκινήσει η απομόνωση συμπλόκων που περιέχουν:

1. Το σύνολο των παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τους μεταλλορυθμιζόμενους μεταγραφικούς παράγοντες Mac1 και Aft1 σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας. Επίσης, η σύγκριση των δύο συμπλόκων μεταξύ τους προκειμένου να βρεθούν κοινοί παράγοντες (πειράματα μας έχουν δείξει ότι τα δύο σύμπλοκα έχουν κοινά στοιχεία. Για παράδειγμα βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη Rad9 αλληλεπιδρά φυσικά και με τον Aft1)
2. Το σύνολο των παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Rad9 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ή συνθήκες έλλειψης χαλκού (απουσία συνθηκών που επάγουν βλάβη στο DNA)

Αρχικά αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συνθήκες επαγωγής στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του Mac1 απομονώνονται οι πρωτεΐνες Top2, Isw1 και Chd1.

Z) ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Από τα προαναφερθέντα συμπεραίνουμε ότι η Rad9 είναι μια πρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες, πλούσια σε μοτίβα που τις επιτρέπουν την αλληλεπίδραση της τόσο με την μεταγραφική μηχανή (σύμπλοκα έναρξης και επιμήκυνσης της μεταγραφής) όσο και με τον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Επομένως η Rad9 μπορεί να χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη σκαλωσιά για ποικίλα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Πρόεκταση της πιο πάνω μελέτης αποτελούν μια σειρά από μεγάλης κλίμακας πειράματα με στόχο να διαφανεί αν η Rad9 εμπλέκεται με πιο δραστικό τρόπο (αρνητικό ή θετικό) στην μεταγραφή άλλων γονιδίων εκτός αυτών που ρυθμίζονται από τον Mac1. Για το σκοπό αυτό μελετάται το μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης γονιδίων με DNA μικροσυστοιχίες σε στελέχη *rad9Δ* και σε στελέχη που η Rad9 υπερεκφράζεται σε κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (Χρήστος Ανδρεάδης- Θανάσης Μαργαρίτης).

Άμεση ωστόσο προτεραιότητα μας αποτελεί η πραγματοποίηση πειραμάτων CHIP on CHIP με σκοπό να διαπιστώσουμε αν τελικά η Rad9 εντοπίζεται σε όλους ή στους περισσότερους υποκινητές ή κωδικές περιοχές γονιδίων που έχουν χαρακτηριστεί ως hot ORFs (Χρήστος Ανδρεάδης).

Τέλος όπως αναφέρθηκε θα επαναληφθούν πειράματα και ταυτόχρονα θα πραγματοποιηθούν και νέα με σκοπό να απομονωθούν σε κατάλληλες συνθήκες πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα τόσο της Rad9 όσο και των δύο μεταλλορυθμιζόμενων μεταγραφικών παραγόντων Mac1 και Aft1. Στόχος των πειραμάτων αυτών είναι να χαρακτηριστούν όλες οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα η Rad9, ο Mac1 και ο Aft1. Με την μέθοδο αυτή θα διαπιστώσουμε σε ποία σύμπλοκα ανιχνεύονται και άλλες πρωτεΐνες του συμπλόκου επιδιόρθωσης και κάτω από ποιές συνθήκες (π.χ Rad53). Επιπλέον θα μπορέσουμε να μελετήσουμε συγκριτικά τις πρωτεΐνες που απομονώνονται με τον Mac1 σε σχέση με αυτές που απομονώνονται με τον Aft1.

Περαιτέρω πειράματα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν σε σχέση με την Top2 η οποία ανιχνεύτηκε στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του Mac1. Πρόσφατα δημοσιεύθηκε στα θηλαστικά ότι η στρατολόγηση της Top2 είναι απαραίτητη στους υποκινητές κάποιων γονιδίων προκειμένου να επάγει DSB διευκολύνοντας το ξεδίπλωμα της χρωματίνης με σκοπό να γίνει πιο προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες και να ξεκινήσει η μεταγραφή (Lis and Kraus, 2006). Κάτι τέτοιο δεν έχει δημοσιευτεί στο σακχαρομύκητα και ο ρόλος της περιορίζεται στη δημιουργία DSB προκειμένου να χαλαρώσει το DNA κατά την αντιγραφή (Rose and Holm, 1993). Βέβαια σε πειράματα μεγάλης κλίμακας έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με στοιχεία του yFACT γεγονός που ενισχύει την υπόθεση η Top2 να εμπλέκεται και στην μεταγραφή (Krogan et al., 2006). Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης Top2-Mac1 καθώς και της υπόθεσης για εισαγωγή από την πρωτεΐνη αυτή, DSB στον υποκινητή, σε συνθήκες επαγωγής, προκειμένου να αρχίσει η μεταγραφή, πιθανόν να ενίσχυε το σενάριο που θέλει την Rad9 να στρατολογείται εκεί, στα πλαίσια επιτήρησης του γονιδιώματος (genomic surveillance). Από την άλλη είναι γνωστό ότι η Top2 εμπλέκεται στην μείωση επάγοντας το «ξέπλεγμα» (μέσω της δράσης της να κόβει και να επανασυνδέει και τις δύο αλυσίδες του DNA) των χρωμοσωμάτων που έχουν υποστεί ανασυνδυασμό (Rose and Holm, 1993). Πιθανόν επομένως να αλληλεπιδρά σε συνθήκες επαγωγής με τον Mac1 με σκοπό να στρατολογηθεί και αυτή σε HOT ORFs.

Τέλος, στα πλαίσια περαιτέρω ανάλυσης άλλων αλληλεπιδρώντων του Mac1 και σε συνεργασία με την Σκούρτη-Σταθάκη Κωσταντίνα (διπλωματική Σκούρτη-Σταθάκη Κωνσταντίνα) διερευνήσαμε την πιθανή εμπλοκή της φωσφατάσης Ppt1 στη δράση του Mac1. Ξεκινήσαμε αυτή την εργασία βασιζόμενοι κυρίως σε δύο δεδομένα. Πρώτον στο γεγονός ότι σε πειράματα συστηματικής ανάλυσης «όλων» των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το σύστημα των δύο υβριδίων είχε βρεθεί ότι ο Mac1, αλληλεπιδρά με την φωσφατάση Ppt1 (Gross et al., 2000; Ito et al., 2001) και δεύτερον στο γεγονός ότι στην επαγωγή του Mac1 συμβάλλει και η φωσφορυλίωση από κινάσες οι οποίες ακόμα είναι άγνωστες. (Heredia et al., 2001). Η Ppt1 είναι μια φωσφατάση Ser/Thr κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι η παρουσία περιοχής tetratricopeptide repeat (TPR). Η περιοχή αυτή πρόσφατα βρέθηκε ότι προσδένεται και αποφωσφορυλιώνει την τσαπερόνη Hsp90 (Wandinger et al., 2006). Στο εργαστήριό μας δείξαμε ότι, η Ppt1 αλληλεπιδρά με

τον Mac1 σε κυτταρικά εκχυλίσματα (co-IP) και ότι στρατολογείται σε Mac1 ρυθμιζόμενους υποκινητές (*CTRI* και *FRE1*). Η στρατολόγηση αυτή είναι εξαρτώμενη από τον Mac1. Φαίνεται ότι η Ppt1 δρα τόσο παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του Mac1 στο DNA όσο και ελαττώνοντας δραματικά την μεταγραφική ενεργότητά του σε συνθήκες όπου ο Mac1 είναι αρχικά μεταγραφικά ενεργός και στη συνέχεια προστίθεται χαλκός στην καλλιέργεια. Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι όταν η Ppt1 υπερεκφραστεί τότε τα στελέχη παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα γλυκερόλη (που απαιτεί λειτουργικό Mac1) σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου.

Συνεπώς αποδείξαμε ότι η Ppt1 δρα παρεμποδίζοντας την δράση του Mac1. περαιτέρω πειράματα πρέπει να πραγματοποιηθούν με σκοπό να αποδειχτεί ότι η Ppt1 παρεμποδίζει την δραστηριότητα του Mac1 επηρεάζοντας το ποσοστό φωσφορυλίωσης του. Η λεπτομερής διερεύνηση της αλληλεπίδρασης Ppt1-Mac1 στον σακχαρομύκητα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των αναλογιών που υπάρχουν με ανθρώπινες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα η ανθρώπινη φωσφατάση Pp5, μοναδικό ομόλογο της Ppt1, παίζει σημαντικό ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν κυτταρικές αποκρίσεις σε συνθήκες stress και βλάβης DNA. Ταυτόχρονα η Pp5 αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα p53 τροποποιώντας τις ογκοκατασταλτικές του λειτουργίες (Jeong et al., 2003; Yang et al., 2005; Zuo et al., 1999).

H) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4A	Υλικά	133
4A.1	Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης.....	
4A.2	Στελέχη σακχαρομύκητα.....	
4A.3	Βακτηριακά στελέχη.....	
4A.4	Πλασμιδιακοί φορείς.....	
4A.5	Πρωτεϊνική έκφραση στο σακχαρομύκητα.....	
4B	Μέθοδοι	141
4B.1	Μεθοδολογίες ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων	
	Παρασκευή πλασμιδιακού DNA από βακτήρια.....	
	Διαδικασίες τροποποίησης του DNA.....	
	Ηλεκτροφορητική ανάλυση και απομόνωση του DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	
	Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	
	Ταυτοποίηση ανασυνδυσμένων πλασμιδιακών κλώνων (ανάλυση κατά Grunstein).....	
	Ραδιοσήμανση του DNA.....	
	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	
	Ανάλυση DNA κατά Southern και RNA κατά Northern.....	
4B.2	Μεθοδολογίες για την ανάλυση πρωτεϊνών	143
	Ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και ανοσοανίχνευση ακινητοποιημένων σε μεμβράνη πρωτεϊνών (Western blot analysis).....	
	Απομόνωση ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών από βακτήρια.....	
	Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων <i>in vitro</i>	
4B.3	Ειδικές μεθοδολογίες για το σακχαρομύκητα	145

Απομόνωση γενωμικού DNA και ολικού RNA	
Μετασχηματισμός κυττάρων	
Σήμανση ενδογενών γονιδίων της ζύμης με επίτοπους (epitope tagging).....	
Απαλοιφή γονιδίων στη ζύμη και αντικατάσταση (gene replacement) με γονίδιο μάρτυρα.....	148
Προσδιορισμός ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε μετασχηματισμένα κύτταρα	
Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων.....	149
Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation assay - ChIP)	151
Καθαρισμός TAP (πρωτόκολλο Cellzome).....	155
Ανταλλαγή του υποκινητή <i>CTRI</i> με τον υποκινητή <i>ACT1</i>	157

4A Υλικά

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν:

- Χημικά των εταιρειών Sigma, Merck και Amersham
- Θρεπτικά μέσα της Dife
- Ένζυμα περιοριστικά, τροποποίησης κ. Λπ. των Minotech IMBB, New England Biolabs, Promega, Boehringer, Sigma, Merck, USB και Stratagene
- Αντισώματα των Santa Cruz Biochemicals (anti-HA(Y-11) sc805, anti-HIS(G-13) SC804, anti-Myc(A-14) sc789, anti-GST (Z-13) sc459), Covance Innovative Antibodies (8WG16 MMS-126R, H5 MMS-129R, H14 MMS-134R), Sigma (anti-flag F3165), Jackson (δευτερογενές anti-rabbit 111-035-003),
- Ραδιενεργά νουκλεοτίδια (α -[³²P]dATP, α -[³²P]dCTP, γ -[³²P]dATP,
- Τα QiaQuick και Concert Gel Extraction Kits(c.no 28104), και ECL Western Blotting Detection Kit (Pierce) (c.no 34077
- Glass beads unwashed 425-600 μ m (c.no G9268-500G

- Μεμβράνες της Schleicher & Schuell, νάυλον για τη μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων (Nytran-N c.no 10416196) και νιτροκυτταρίνης για τη μεταφορά πρωτεϊνών (BA83 c.no 10 401396) και βακτηριακών αποικιών (BA85 c.no 10 401116)
- Φιλμ αυτοραδιογραφίας Fuji (c.no 90224)
- Σφαιρίδια Protein G Sepharose (GE Healthcare c.no 17-0618-01), Glutathione Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia 17-0756-01), Ni-NTA Agarose (Qiagen c.no 1000630)
- BCS (Bathocuproine disulfonic Na₂-salt) (SERVA c.no 14470), BPS (Bathophenanthroline disulfonic acid Na₂-salt) (SERVA c.no 14483 και Fluka c.no 11890)
- 6-Azauracil minimum 98% (Sigma A1757-5G)
- Geneticin G418 Sulphate c.no 11811-023)
- Ολιγονουκλεοτίδια από το Εργαστήριο Μικροχημείας του Ι.Τ.Ε. και από την MWG Biotech (Germany)
- Τα προγράμματα ποσοτικοποίησης ζωνών αυτοραδιογραφημάτων ImageQuant (για χρήση του PhosphorImager) και Scion Image
- SYBR green (Invitrogen cat.no S7563) και ποσοτικοποίηση προϊόντων *in real time* PCR μέσω MJ-Research Opticon Engine
- Οι βάσεις δεδομένων SGD (*Saccharomyces* Genome Database) και PubMed
 - <http://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/>

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης

Η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών έγινε σε θρεπτικό μέσο LB ενώ τα στελέχη ζύμης αναπτύχθηκαν σε μέσο SC (κυρίως) ή YPD, όπως έχει περιγραφεί (Sambrook, 1989). Το συνθετικό πλήρες μέσο (SC) περιέχει 0.67% yeast nitrogen base (που περιλαμβάνει 1.23μM FeCl₃ και 0.25μM CuSO₄), τα 20 αμινοξέα, ουρακίλη, αδερίνη και 2% γλυκόζη. Για τη δημιουργία συνθηκών επαγωγής της χαλκοεξαρτώμενης μεταγραφής, προστέθηκαν σε αυτό, σε τελική συγκέντρωση 100μM, ο χηλικός παράγοντας του μονοσθενούς και δισθενούς χαλκού, BCS (bathocuproine disulfonic acid-Na₂ salt). Για τη

δημιουργία συνθηκών επαγωγής της μεταλλοεξαρτώμενης μεταγραφής, προστέθηκαν σε αυτό, σε τελική συγκέντρωση 100μM, ο χηλικός παράγοντας του μονοσθενούς και δισθενούς σιδήρου και χαλκού, BPS (Bathophenanthroline disulfonic acid Na₂ salt). Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες αναπτύχθηκαν μέχρι OD₅₅₀ = 0.6-1.0,

- σε SC (συνθήκες επάρκειας μετάλλων) ή
- σε SC στο οποίο προστέθηκε BCS 3h πριν τη συλλογή των κυττάρων (συνθήκες έλλειψης χαλκού).
- σε SC στο οποίο προστέθηκε BCS 3h πριν τη συλλογή των κυττάρων (συνθήκες έλλειψης χαλκού) και 10μM Cu 5 λεπτά πριν τη συλλογή των κυττάρων.
- σε SC στο οποίο προστέθηκε BCS 3h (συνθήκες έλλειψης χαλκού) πριν τη συλλογή των κυττάρων και 10μM Cu 10 λεπτά πριν τη συλλογή των κυττάρων.
- σε SC στο οποίο προστέθηκε BCS 3h πριν τη συλλογή των κυττάρων (συνθήκες έλλειψης χαλκού) και 0.3-0.8 μM H₂O₂ 20 λεπτά πριν τη συλλογή των κυττάρων.
- σε SC στο οποίο προστέθηκε 10μM Cu 20 λεπτά πριν την συλλογή των κυττάρων.

Στελέχη σακχαρομύκητα

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη αγρίου τύπου:

- ✓ FT5 (*MATα ura3-52 trp1-Δ63 HIS3-Δ200 LEU2::PET56*) και
- ✓ 4053-5-2 (*MATα ura3 LEU2 trp1 HIS7*) (Formosa T 2002)
- ✓ Τα μεταλλάγματα *ssn6Δ (cyc8-Δ9::HIS3)* από Τζαμαρία Δ, *ssn6Δ::LEU2 hir1Δ::KAN* (Α. Βουτσινά) και *snf2Δ::HIS3* (Θηραίος Γ.) προήλθαν από το στέλεχος FT5
- ✓ μεταλλάγματα 7864-11-1 *spt16-11 (MATα his3 ura3 leu2 trp1)* Formosa T 2002
- ✓ μεταλλάγματα 7973-4-4 *pob3-7 (MATα his3 ura3 leu2 trp1)* Formosa T 2002.
- ✓ Αγοράστηκαν από την Open Biosystems τα στελέχη *MAC1-TAP*, *AFT1-TAP*, και *RAD9-TAP* (προβληματικό στέλεχος) τα οποία προήλθαν από το στέλεχος BY4741 <http://www.openbiosystems.com/GeneExpression/Yeast/TAP/>

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι τα στελέχη που αγοράστηκαν ήταν σωστά είναι οι εξής:

5'**RAD9(+3108)**

5'-AACTTCACTCATCCGCTAGC-3'

3'F2CHK TAP

5'-AACCCGGGGA TCCGTCGA CC -3'

5'HIRI (+1791)

5'-.GGTACGAGCAACAGTATTG -3'

3'F2CHK TAP

5'-AACCCGGGGA TCCGTCGA CC -3'

5'MAC1(+984)

5'-.CTGCACTTGTGATGGATG -3'

3'F2CHK TAP

5'-AACCCGGGGA TCCGTCGA CC -3'

- Επίσης αγοράστηκαν από την Euroscarf τα στελέχη SC0000(WT), και SC3453 (*RAD9-TAP*) τα οποία προήλθαν από στέλεχος με γονότυπο MATa *ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52*

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/cellzome.html>

- Απαλοιφή του γονιδίου *RAD9* έγινε στα στελέχη που αναγράφονται στον πίνακα 2. Το *RAD9* απομονώθηκε από την πλασμιδιακή κατασκευή pDB20flag *RAD9* με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *NotI*. Ακολούθησε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα pRS315 στη θέση *NotI* κατόπιν ακολούθησε πέψη με το ένζυμο *BsmI* και επώαση με Klepov πολυμεράση εκτομή από +72 έως +3605). Στα τυφλά άκρα της κατασκευής αυτής έγινε ένθεση του *KANMX4* χρησιμοποιώντας μια πλασμιδιακή κατασκευή (στο φορέα pBluescript) που περιείχε το γονίδιο *KANMX4* μεταξύ δύο θέσεων *BsaHI EcoRI*. Η απαλοιφή επιβεβαιώθηκε φαινοτυπικά και γενωμικά με PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση είναι οι εξής:

K2(R)

5'-ACAGATCTGGCGCGCCTTAAT -3'

K3(F)

5'- CGATTCGATACTAACGCCGCC-3

3'RAD9 UTR

5'.GCCTCGTTCAGCACATTTCC -3'

- Απαλοιφή του γονιδίου *MAC1* έγινε στα στελέχη που αναγράφονται στον πίνακα 2 με ομόλογο ανασυνδυασμό, χρησιμοποιώντας μια πλασμιδιακή κατασκευή

(στο φορέα pBluescript) στην οποία ήταν κλωνοποιημένο το *mac1Δ::URA3* (Ε. Γεωργιάτσου). Η απαλοιφή επιβεβαιώθηκε φαινοτυπικά και γενωμικά με PCR.

Στελέχη	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν
Single mutants	
FT5 <i>asf1Δ::TRP1</i>	5 ASF1 dīsrS3 5'-CAGCGTACTCTCCCTACCATCCAATTGAAACATAA GATATAGAAAAGCGTACGCTGCAGGTCGAC -3' 5 'ASF1 S2 5'- AAGTGTACCTCTCTTGCAGGTACCATTAATCTTA TAACCCATAAAATTCATCGAATTCGAGCTCG -3' Κ. Γκούσκου
FT5 <i>hir1Δ::KAN</i>	Α. Βουτσινά
FT5 <i>mac1Δ::URA3</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>mac1Δ::KAN</i>	Ε. Γεωργιάτσου
7973-4-4 <i>pob3-7</i>	Τ. Formosa
FT5 <i>ppt1Δ::KAN</i>	Κ. Σκούρτη -Σταθάκη
FT5 <i>rad9Δ::KAN</i>	Κ. Γκούσκου
7864-11-1 <i>spt16-11</i>	Τ. Formosa
FT5 <i>ssn6Δ::HIS3</i>	Δ. Τζαμαρίας
FT5 <i>snf2Δ::HIS3</i>	Γ. Θηραιος
Double mutants	
FT5 <i>asf1Δ::TRP1 hir1Δ::KAN</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>hir1Δ::KAN pob3-7</i>	Π. Σπηλιωτοπούλου
FT5 <i>asf1Δ::TRP1 rad9Δ::KAN</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>hir1Δ::TRP1 rad9Δ::KAN</i>	5 HIR1 dīsrS3 5'-A CCAACGAAGCATAATAAAAATTGCCAGTAACCAA AGGTCTCTGATAACCGTACGCTGCAGGTCGAC -3' 3' HIR1S2 5'-CGTAATTATGAGGGAAAAACTTGTCCAAAGGAAG GGGTATAAGCATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
FT5 <i>hir1Δ::KAN spt16-11</i>	Π. Σπηλιωτοπούλου
FT5 <i>hir1Δ::KAN ssn6Δ:: LEU2</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>hir1Δ::KAN ssn6Δ:: LEU2</i>	Κ. Γκούσκου

FT5 <i>mac1Δ::URA3 ppt1Δ::KAN</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>mac1Δ::URA3 rad9Δ::KAN</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>ppt1Δ::KAN rad9Δ::KAN</i>	Κ. Γκούσκου

Πίνακας 1

Βακτηριακά στελέχη

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

Πλασμιδιακοί φορείς

Οι βασικοί πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- για την κλωνοποίηση γονιδίων του σακχαρομύκητα και τη δημιουργία γονιδίων αναφοράς ο pRS315 CEN, Amp, *LEU2*) Euroscarf
- για την έκφραση πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα, pYX142 (Novagen - CEN, Amp, *LEU2*), pGBT9 (Clontech - 2μ, Amp, *TRP1*) και pACT2 (Clontech - 2μ, Amp, *LEU2*), pDB20 (2μ, Amp, *URA3*)
- για την έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια, pGEX2T (Pharmacia) και pRSET-A pRSET-B και pRSET-C (Invitrogen)
- ο pYM6 με γονίδιο ανθεκτικότητας *kITRP1* (Knop et al., 1999) και ο pYM1 με γονίδιο ανθεκτικότητας *KANMX6* (Knop et al., 1999) τη δημιουργία κασετών απαλοιφής γονιδίων
- ο pYM6 με γονίδιο ανθεκτικότητας *kITRP1* (Knop et al., 1999) και ο pYM1 με γονίδιο ανθεκτικότητας *KANMX6* (Knop et al., 1999) για τη δημιουργία κασετών για την ένθεση επιτόπου 9Myc και 3HA αντίστοιχα
- και ο pBS1539(Euroscarf) για την ένθεση επιτόπου TAP

Πρωτεϊνική έκφραση στο σακχαρομύκητα

pDB20-Flag (έκφραση Flag): το τμήμα Flag (προϊόν σύνθεσης του Εργαστηρίου Μικροχημείας) υδρολύθηκε με *XhoI* και *NotI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα.

XhoI FLAGNotI

5'- atagtttagcgccgcttgtcatcgtcgtcctttagtccatctcgagcgg -3'

pDB20-Flag RAD9 (έκφραση Flag-Rad9): Το γονίδιο RAD9 (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *NotI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pDB20-*FLAG*

[εκκινητές: 5'- ATAAGAATGCGGCCGCAATGTCAGGCCAGTTAGTTC -3'
5'- ATAAGAATGCGGCCGCAATGTCAGGCCAGTTAGTTC -3']

pRSETA-N- RAD9 (έκφραση N-Rad9): Το τμήμα του γονιδίου +1 έως +1518 *RAD9* (προϊόν πέψης **pDB20-Flag RAD9**) υδρολύθηκε με *AvaI* και *EcoRI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pRSETA

pRSETC-C- RAD9 (έκφραση 6xHis- C-Rad9): Το τμήμα +1518 έως + 3260 του γονιδίου *RAD9* (προϊόν πέψης **pDB20-Flag RAD9**) υδρολύθηκε με *EcoRI* και *HindIII* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pRSETC

pRSETC-C1- RAD9 (έκφραση 6xHis-C1-Rad9): Το τμήμα +1518 έως + 3930 του γονιδίου *RAD9* (προϊόν πέψης **pDB20-Flag RAD9**) υδρολύθηκε με *NotI* και υπέστη επεξεργασία με *Klenow* και κατόπιν υδρολύθηκε με *EcoRI* και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pRSETC ο οποίος είχε αρχικά υδρολυθεί με *HindIII* είχε υποστεί επεξεργασία με *Klenow* και κατόπιν είχε υδρολυθεί με *EcoRI*.

pRSETA-BRCTd RAD9 (έκφραση 6xHis BRCTd Rad9): Το τμήμα +2986 έως + 3930 του γονιδίου *RAD9* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* και *EcoRI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pRSETA

[εκκινητές: 5'- CGGGATCCGGG TGTATTTGATAAATG -3'
5'- CCGGAATTCTCATCTAACCTCAGAAATAG -3']

pGEX2T-N-MAC1 (έκφραση GST-Mac1): το τμήμα +1 έως +159 του γονιδίου *MAC1* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pGEX2T.

[εκκινητές: 5'- CGGGATCCATAATATTTAATGGGAACAAA -3'
5'- CGGGATCCCTAGCTTCGCTCTTTCTTC -3']

pGEX2T-C-MAC1 (έκφραση GST-C-Mac1): το τμήμα +159 έως +417 του γονιδίου *MAC1* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pGEX2T.

[εκκινητές: 5'- CGGGATCCCGGCTTCAACAGGAGC -3'
5'- CGGAATCCTTATGAAGTGGTGGCATC -3']

pGEX2T-(40-257)-MAC1 (έκφραση GST-[40-257aa] Mac1): το τμήμα +40 έως +257 του γονιδίου *MAC1* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pGEX2T.

[εκκινητές: 5'- CGGGATCCCCCATGGCTATCAGAGA -3'
5'- CGGGATTCTTAGCCCTTATGAGTCAGG -3']

pGEX2T-(287-417)-MAC1 (έκφραση GST-[287-417aa] Mac1): το τμήμα +287 έως +417 του γονιδίου *MAC1* (προϊόν PCR) υδρολύθηκε με *BamHI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pGEX2T.

[εκκινητές: 5'-CGGGATCCTATATTCAACAAAGTGGTG -3'
5'- CGGGATCCTTATGAAGTGGTGGCATC -3']

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

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

pACT2-(651-1310)-RAD9 (έκφραση Gal4DAD-(651-1310)-Rad9 A. Βουτσινά)

4B Μέθοδοι

4B.1 Μεθοδολογίες ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA από βακτήρια

Για παρασκευή σε μικρή κλίμακα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λύσης με βρασμό (Sambrook, 1989) Η παρασκευή σε μεσαία ή μεγάλη κλίμακα έγινε είτε με συνδυασμό αλκαλικής λύσης και κατακρήμνισης του DNA με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG 8000) (Sambrook, 1989) είτε, όταν χρειάστηκε να απομονωθεί DNA πολύ υψηλής καθαρότητας, με την χρήση ειδικών στηλών καθαρισμού νουκλεϊνικών οξέων της Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Διαδικασίες τροποποίησης του DNA

Περιέλαβαν (α) τον τεμαχισμό μορίων με υδρόλυση τους από ενδονουκλεάσες περιορισμού, (β) τη δημιουργία τυφλών άκρων σε μόρια που είχαν (5' ή 3') προεξέχοντα άκρα, με χρήση του κομματιού Klenow της DNA πολυμεράσης I, και (γ) τη συνένωση μορίων με χρήση της T4 DNA λιγάσης. Οι παραπάνω διαδικασίες εφαρμόστηκαν όπως έχει περιγραφεί (Sambrook, 1989) και σε συμφωνία με τις οδηγίες των εταιρειών κατασκευής των αντίστοιχων ενζύμων.

Ηλεκτροφορητική ανάλυση και απομόνωση του DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό του μεγέθους μορίων DNA, αλλά και για μια εκτίμηση της ποσότητάς τους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης (Sambrook, 1989). Η απομόνωση ηλεκτροφορητικά

διαχωρισμένων τμημάτων DNA έγινε είτε με ειδικά συστήματα εξαγωγής DNA από πήκτωμα (QiaQuick ή Concert Gel Extraction Kits) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών είτε με χρήση ειδικού πηκτώματος αгарόζης χαμηλού σημείου τήξης όπως έχει περιγραφεί (Sambrook, 1989).

Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και ο μετασηματισμός τους έγιναν με τη συμβατική χημική μέθοδο των γλωριούχου ασβεστίου (Ausubel, 1987-2007).

Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κλώνων (ανάλυση κατά Grunstein)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λύσης *in situ* μετασηματισμένων βακτηριακών αποικιών πάνω σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης, τα οποία στη συνέχεια υβριδοποιήθηκαν με ειδικούς ραδιοσημασμένους ανιχνευτές γονιδίων (κωδικά τμήματα που προέκυψαν με PCR), με τη μέθοδο κατά Church. Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν όπως έχει περιγραφεί (Sambrook, 1989).

Ραδιοσήμανση του DNA

Δίκλιωνα μόρια DNA ραδιοσημάνθηκαν είτε (α) με τη μέθοδο μετάφρασης εγκοπής (nick translation) που βασίζεται στη δημιουργία τυχαίων εγκοπών στο DNA και στην επιδιόρθωσή τους από τη DNA πολυμεράση I, παρουσία ραδιενεργών νουκλεοτιδίων είτε (β) με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών (random priming) που βασίζεται στην παροδική αποδιάταξη του DNA και στη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων από το κομμάτι Klenow της DNA πολυμεράσης I, παρουσία τυχαίων εξαμερών εκκινητών και ραδιενεργών νουκλεοτιδίων. Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (μονόκλιωνα ή δίκλιωνα) ραδιοσημάνθηκαν με χρήση της T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν όπως έχουν περιγραφεί (Ausubel, (1987-2007); Sambrook, 1989).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

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

Ανάλυση DNA κατά Southern και RNA κατά Northern

Τα διάφορα δείγματα DNA ή RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης (στην περίπτωση του RNA τα τελευταία είχαν πυκνότητα 1.5% και περιείχαν φορμαλδεΰδη) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε νάυλον μεμβράνες όπου στερεώθηκαν ομοιοπολικά με έκθεση στο UV για 4min. Τελικά υβριδοποιήθηκαν με ειδικούς ραδιοσημασμένους ανιχνευτές γονιδίων (κωδικά τμήματα που προέκυψαν με PCR), με τη μέθοδο Church. Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν όπως έχει περιγραφεί (Ausubel, (1987-2007); Sambrook, 1989)

4B.2 Μεθοδολογίες για την ανάλυση πρωτεϊνών

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

Οι διάφορες υπό μελέτη πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν, ανάλογα με τα μεγέθη τους, σε αποδιατακτικά πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδης 8-15%, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ανοσοεντοπισμός τους με χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων (πρωτογενών και δευτερογενών) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιρειών. Για την τελική πρωτεϊνική ανίχνευση εφαρμόστηκε η μέθοδος ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που στηρίζεται στη δράση της συζευγμένης με τα δευτερογενή αντισώματα υπεροξειδάσης HRP. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν όπως έχουν περιγραφεί, (Ausubel, 1987-2007; Sambrook, 1989).

Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

Γονίδια που κωδικοποιούν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς με τους οποίους στη συνέχεια μετασηματίστηκαν κύτταρα *E. coli* ER2566. Τα GST υβρίδια της Mac1 εκφράστηκαν σε κατάλληλα κύτταρα τα οποία εκφράζουν θειορεδοξίνη thioredoxin BL21 (DE3) και στα οποία έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη διαλυτότητα ορισμένων πρωτεϊνών και σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς (Lutsenko and Kaplan, 1995). Ακολούθησε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με προσθήκη IPTG στις βακτηριακές καλλιέργειες (0.3mM τελική συγκέντρωση) και επώαση στις κατάλληλες συνθήκες (συνήθως στους 30°C για 3h όταν απομονώνονται πρωτεΐνες με GST επίτοπο και στους 25°C για 3h όταν απομονώνονται πρωτεΐνες με HIS επίτοπο).

Για την παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, τα κύτταρα επαγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 50ml φυγοκεντρήθηκαν για 5min, επαναδιαλύθηκαν σε 250μl διαλύματος λύσης (10% γλυκερόλη, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0,05% Triton, 1mM

PMSF, 5mg/ml Leupeptin), ηχοβολήθηκαν 4 φορές από 15sec (με παρεμβολές στον πάγο) και φυγοκεντρήθηκαν εν ψυχρώ για 30sec. Το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20°C.

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

- Πρωτεΐνες με αμινοτελική συγχώνευση GST (Glutathione S-Transferase) (φορέας έκφρασης pGEX) απομονώθηκαν με χρήση Glutathione Sepharose 4B (Amersham) ως εξής: 500ml κύτταρα επαγμένης με IPTG βακτηριακής καλλιέργειας στα οποία είχε προστεθεί 1.4 mM CuSO₄ 30 min μετά την προσθήκη IPTG αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 4 ώρες και κατόπιν ξεπλύθηκαν με διάλυμα σουκρόζης 0,25M επαναδιαλύθηκαν σε 10ml διαλύματος λύσης (20mM NaH₂PO₄ pH 7.5, 250mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTT), ηχοβολήθηκαν 3 φορές από 20sec (με παρεμβολές στον πάγο) και φυγοκεντρήθηκαν εν ψυχρώ για 15min. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν Triton-X σε τελική συγκέντρωση 1% και εξισορροπημένα σφαιρίδια Glutathione Sepharose (30μl/100ml αρχικής καλλιέργειας) και ακολούθησε επώαση στους 4°C για 1h (με περιστροφική ανάδευση). Τα σφαιρίδια πλύθηκαν 5 φορές με τουλάχιστον ίσο όγκο του παραπάνω διαλύματος (χωρίς BSA) και αποθηκεύτηκαν στους 4°C (Jensen and Winge, 1998).

- Πρωτεΐνες με αμινοτελική συγχώνευση 6xHIS (φορείς έκφρασης pRSET, pET) απομονώθηκαν με χρήση Ni-NTA Agarose (Qiagen) ως εξής: Τα κύτταρα επαγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 100ml επαναδιαλύθηκαν σε 2ml διαλύματος A (50mM HEPES pH 7.9, 500mM NaCl, 0.1% NP40, 5mM ιμιδαζόλιο, 0.25% BSA, αναστολείς πρωτεασών), ηχοβολήθηκαν 3 φορές από 20sec (με παρεμβολές στον πάγο) και φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C για 15min. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 100μl εξισορροπημένα σφαιρίδια Ni-NTA Agarose και ακολούθησε επώαση στους 4°C για 1h (με περιστροφική ανάδευση). Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν 2 φορές από 20min σε 15ml διάλυμα B (όπως το A, αλλά με 50mM ιμιδαζόλιο και χωρίς BSA) και ακολούθησε έκλυση σε 300μl διαλύματος αλληλεπίδρασης (βλ. παρακάτω) στο οποίο προστέθηκε ιμιδαζόλιο (250mM), στους 4°C για 2h (με περιστροφική ανάδευση).

Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vitro*

Ο έλεγχος αλληλεπίδρασης μεταξύ βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών συγχωνευμένων με GST και αντίστοιχων συγχωνευμένων με 6xHIS έγινε ως εξής: 2μg συγχωνευμένης με 6xHIS πρωτεΐνης αναμίχθηκαν με ένα μικρό ποσό σφαιριδίων Glutathione Sepharose στα οποία ήταν δεσμευμένη αντίστοιχη ποσότητα GST υβριδίου, σε συνολικό όγκο 200μl διαλύματος αλληλεπίδρασης (75-150mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8, 0.01% NP40, 0.25% BSA, αναστολείς πρωτεασών). Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 8-12h (με περιστροφική ανάδευση), πλύσιμο των σφαιριδίων στο ίδιο διάλυμα (χωρίς BSA) και ανάλυση των πρωτεϊνών που κατακρατήθηκαν σε αυτά με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση (Jensen and Winge, 1998).

4B.3 Ειδικές μεθοδολογίες για το σακχαρομύκητα

Απομόνωση γενωμικού DNA και ολικού RNA

Γενωμικό DNA σακχαρομύκητα απομονώθηκε με χρήση γυάλινων σφαιριδίων (glass beads unwashed 425-600μm), όπως έχει περιγραφεί τους Ausubel et al, από καλλιέργειες 10ml αναπτυγμένες σε YPD. Ολικό RNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης (Ausubel, 1987-2007) από καλλιέργειες 30ml αναπτυγμένες σε SC στις κατάλληλες κατά περίπτωση συνθήκες.

Μετασηματισμός κυττάρων

Η παρασκευή και ο μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων σακχαρομύκητα έγινε με τη μέθοδο του οξικού λιθίου (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. (Gietz et al., 1995) (<http://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/>)

Σήμανση ενδογενών γονιδίων της ζύμης με επίτοπους (epitope tagging)

Με σκοπό την ανίχνευση πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης, εισάγουμε γνωστούς επίτοπους, που αναγνωρίζονται από εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα, στα ενδογενή γονίδια που ενδιαφέρουν. Η μέθοδος βασίζεται στην δυνατότητα ομόλογου (~100%) ανασυνδυασμού στη ζύμη και εφαρμόστηκε όπως ακριβώς περιγράφηκε από τους Knop et al (Knop et al., 1999). Οι επίτοποι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε 9Myc είτε 3HA είτε TAP (Euroscarf) http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/cz_plas.html χρησιμοποιώντας κάθε φορά το κατάλληλο πλασμίδιο. Ο επίτοπος εισάγεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα στελέχη τα οποία έχουν υποστεί σήμανση ενδογενών γονιδίων με επίτοπους :

Στέλεχη	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν
FT5 <i>RAD9</i> -9Myc	5'RAD9 S3 5'- GATATTACGGACAATGATATATACAACACTATTCTGAGGTTAGAC GTACGCTGCAGGTCGAC-3' 3'RAD9 S2 5'- AATCGTCCCTTTCTATCAATTATGAGTTATATATTTT TATAATTATCGATGAATTCGA GCTCG - 3' Κ. Γκούσκου
FT5 <i>mac1Δ::URA3 RAD9</i> -9Myc	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>hir1Δ::KAN RAD9</i> -9Myc	Κ. Γκούσκου
<i>RAD9</i> -TAP	Προβληματικό Open Biosystems
<i>MAC1</i> -TAP	Open Biosystems
<i>AFT1</i> -TAP	Open Biosystems
<i>MAC1</i> -TAP <i>RAD9</i> -3HA	Κ. Γκούσκου
<i>AFT1</i> -TAP <i>RAD9</i> -3HA	Κ. Γκούσκου
<i>RAD9</i> -TAP <i>AFT1</i> -3HA	Κ. Γκούσκου

FT5 <i>RAD9-TAP</i>	<p>5' RAD9 TAP 5'-GATGATATTACGGACAATGATATATATAACAACACTATTTCTGAGGTTA GATCCATGGAA AAGAGAAG -3'</p> <p>3' RAD9 TAP 5'TTTAATCGTCCCTTCTATCAATTATGAGTTTATATAATTTTATAAATT ACGACTCACTA TAGGG 3'</p> <p>Κ. Γκούσκου</p>
FT5 <i>MAC1-9Myc</i>	Α. Βουτσινά
FT5 <i>ppt1Δ::KAN MAC1-9Myc</i>	Κ. Σκούρτη -Σταθάκη
FT5 <i>rad9Δ::KAN MAC1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>ssn6Δ::HIS3 MAC1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>snf2Δ::HIS3 MAC1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>hir1Δ::KAN MAC1-9Myc</i>	Α. Βουτσινά
FT5 <i>hir1Δ::KAN ssn6Δ::LEU2 MAC1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>RAD9-TAP MAC1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>HIR1-9Myc</i>	Α. Βουτσινά
FT5 <i>rad9Δ::KAN HIR1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>ssn6Δ::HIS3 HIR1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>snf2Δ::HIS3 HIR1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>RAD9-TAP HIR1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
4053-5-2 <i>HIR1-9Myc</i>	Π. Σπηλιωτοπούλου
7864-11-1 <i>spt16-11 HIR1-9Myc</i>	Π. Σπηλιωτοπούλου
FT5 <i>RAD53-9Myc</i>	<p>5'RAD53 S3 5'-AAATTGGACCAAACCTCAAAAAGGCCCGAGAATTTGCAA TTTTCGCGTACGCTGCA GGTCGA C</p> <p>3'RAD53 S2 5'-CTCTCTTAAAAAGGGGCAGCA TTTTCTA TGGGTA TTTGT CCTTGGATCGA TGAA TTCGA GCTCG</p> <p>Κ. Γκούσκου</p>
FT5 <i>rad9Δ::KAN RAD53-</i>	Κ. Γκούσκου

9Myc	
FT5 <i>mac1Δ::URA3 RAD53-</i>	Κ. Γκούσκου
9Myc	
FT5 <i>ssn6Δ::LEU2 SNF2-</i>	Κ. Γκούσκου
9Myc	
FT5 <i>ssn6Δ::LEU2 hir1Δ::KAN SNF2-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>rad9Δ::KAN AFT1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>RAD9-TAP AFT1-9Myc</i>	Κ. Γκούσκου
FT5 <i>SSN6-9Myc</i>	Δ. Τζαμαρίας.
FT5 <i>PPT1-9Myc</i>	Σκούρτη -Σταθάκη Κ.
FT5 <i>mac1Δ::KAN PPT1-9Myc</i>	Σκούρτη -Σταθάκη Κ.
FT5 <i>rad9Δ::KAN PPT1-9Myc</i>	Σκούρτη -Σταθάκη Κ.

Πίνακας 2

Η ένθεση επίτοπου 3HA σε στελέχη της Open Biosystems απαιτεί ένα επιπλέον βήμα μια και το *KANMX6* του 3HA παρουσιάζει ομολογία με το *HIS3MX6* που φέρουν ενδογενώς τα συγκεκριμένα στελέχη με αποτέλεσμα η κασέτα με τον επίτοπο 3HA να κάνει σε μεγάλο βαθμό ομόλογο ανασυνδυασμό στο *HIS3MX6*. Για να επιλεγθούν τα σωστά στελέχη πρέπει αρχικά να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο με G418 και κατόπιν να μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο που δεν έχει ιστιδίνη. Όσα στελέχη δεν απαιτούν ιστιδίνη (όπως και το γονεϊκό) σημαίνει ότι δεν έκαναν ανασυνδυασμό στο *HIS3MX6* και επομένως έχουν πιο πολλές πιθανότητες να έχει εντεθεί επίτοπος 3HA στο επιθυμητό γονίδιο.

Απαλοιφή γονιδίων στη ζύμη και αντικατάσταση (gene replacement) με γονίδιο μάρτυρα

Στο σακχαρομύκητα εκμεταλλευόμαστε το φαινόμενο του αποτελεσματικού (100%) ομόλογου ανασυνδυασμού προκειμένου να επιτύχουμε την αποσιώπηση και την αντικατάσταση γονιδίων. Εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι της «αποσιώπησης σε ένα βήμα»

(one step gene disruption) με χρήση ειδικής κασέτας αποσιώπησης (Knop et al., 1999) και ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τμήμα της κασέτας και περιοχών 45 βάσεων πέρα των ακρών του προς αποσιώπηση γονιδίου «αποσιώπηση σε ένα βήμα» (one step gene disruption) όπως περιγράφεται από τους Guthrie and Fink (1991).

Στον πίνακα παρουσιάζονται τα στελέχη τα οποία έχουν υποστεί απαλοιφή γονιδίων με την παραπάνω μέθοδο :

Προσδιορισμός ενεργότητας β -γαλακτοσιδάσης σε μετασχηματισμένα κύτταρα

Καλλιέργειες 5ml μετασχηματισμένων με τα κατάλληλα πλασμίδια (που εκφράζουν Lac-Z) αναπτύχθηκαν αρχικά σε SC μέχρι $OD_{550}=1.5$. Στη συνέχεια αραιώθηκαν 5-15 φορές (ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης) και αναπτύχθηκαν για ακόμη 3h στο ίδιο μέσο, στο οποίο κατά περίπτωση προστέθηκε ή όχι ο χηλικός δεσμευτής του χαλκού BCS (επαγωγικές/μη επαγωγικές συνθήκες). Τελικά, έγινε συλλογή των κυττάρων και μέτρηση σε αυτά της ενεργότητας β -γαλακτοσιδάσης όπως έχει περιγραφεί (Ausubel, 1987-2007).

Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (whole cell extracts)

Πρωτόκολλο 1 (μεγάλες καλλιέργειες)

Για την ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα, παρασκευάστηκαν τυπικά κυτταρικά εκχυλίσματα ως εξής: Τα κύτταρα καλλιέργειας 50ml, αναπτυγμένα σε OD_{550} μέχρι 1, αφού πλύθηκαν διαδοχικά σε μισό όγκο νερού και 1.5ml διαλύματος εκχύλισης (10% γλυκερόλη, 400mM $(NH_4)_2SO_4$, 10mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 7mM β -μερκαπτοαιθανόλη, 1mM PMSF, 5mg/ml Leupeptin), επαναδιαλύθηκαν σε 200μl του τελευταίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε αυτά 200μl γυάλινα σφαιρίδια και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) 8 φορές από 30sec με παρεμβολές ίσου χρόνου στον πάγο. Το υπερκείμενο κρατήθηκε, στα σφαιρίδια προστέθηκαν άλλα 150μl διαλύματος εκχύλισης και ακολούθησε νέα ισχυρή ανάδευση. Το δεύτερο υπερκείμενο

προστέθηκε στο πρώτο και το συνολικό (περίπου 350μl) φυγοκεντρήθηκε στους 4⁰C για 30 min για την απομάκρυνση του ιζήματος και αποθηκεύτηκε στους -80 ⁰C.

Πρωτόκολλο 2 (μικρές καλλιέργειες)

Κύτταρα καλλιέργειας 5ml, αναπτυγμένα σε OD₅₅₀ μέχρι 1, συλλέχθηκαν με φυγοκεντρηση και ξεπλύθηκαν με μισό όγκο νερού. Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκε 1ml παγωμένο H₂O και διάλυμα NaOH 18.5% και β-merc (μερκαπτοαιθανόλη) 7,5% (σπάσιμο S-S δεσμών) και επώαστηκε στον πάγο για 10 λεπτά. Εν συνεχεία προστέθηκαν 150μl TCA 55% (κατακρήμιση πρωτεϊνών) και ακολούθησε επώαση για ακόμα 10min στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση εν ψυχρώ για 10min και κατόπιν απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το πρωτεϊνικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20μl ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών θερμάνθηκε στους 65⁰C για 10 λεπτά αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοανιχνεύτηκαν με SDS-PAGE (Sambrook, 1989). (Το χρώμα γίνεται κίτρινο, καθώς στα δείγματα υπάρχουν υπολείμματα TCA και το pH μειώνεται κατά πολύ. Προσθήκη ελάχιστης 1M Tris-HCl pH 8.8 αυξάνει το pH και το μπλε χρώμα επανέρχεται)

Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vivo* (πρωτόκολλο 1)

Η πιθανή αλληλεπίδραση ανάμεσα σε μια πρωτεΐνη με καρβοξυτελική συγχώνευση Myc και μια δεύτερη συντηγμένη με τον επίτοπο FLAG, εξετάστηκε σε κύτταρα σακχαρομύκητα ως εξής: Από καλλιέργεια 150-300ml (OD₅₅₀=0.8) η οποία αναπτύχθηκε σε SC κάτω από συνθήκες παρουσίας ή έλλειψης μετάλλων (ανάλογα με την περίπτωση), παρασκευάστηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Η εκχύλιση έγινε με 400μl διάλυμα A (βλέπε παρακάτω) και τα μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια erpendorf με προσθήκη 500μl γυάλινων σφαιριδίων. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) 10 φορές από 12 sec με παρεμβολές ίσου χρόνου στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο κρατήθηκε και ακολούθησε νέα ισχυρή φυγοκεντρηση στις 13.000rpm για 30 λεπτά. Κρατήθηκαν 20 μl ολικό εκχύλισμα για να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικοποίηση στη δοκιμασία Western (input). Στο υπόλοιπο (380μl) προστέθηκαν 6μl από το αντίσωμα (ant-flag M2

monoclonal) και επώστηκαν με κυκλική ανάδευση για μια νύχτα στους 4°C. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης G εξισορροπημένα σε διάλυμα B (βλέπε παρακάτω) (η εξισορρόπηση είχε γίνει με 4 διαδοχικά ξεπλύματα των δύο λεπτών και φυγοκεντρήση στις 4000 στροφές και όχι πιο ψηλά διότι αλλιώς σπανέ) και επώστηκαν με κυκλική ανάδευση για 4-5 περίπου ώρες στους 4°C. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα B (βλέπε παρακάτω) με διαδοχική φυγοκέντρωση των δειγμάτων στους 4°C στις 4000rpm για 1min. Τελικά, οι πρωτεΐνες που κατακρατήθηκαν σε αυτά αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοανιχνεύτηκαν. Κατόπιν ακολουθείται κανονικά η διαδικασία του Western blotting (με αντίσωμα anti-Myc).

Διάλυμα B

50 mM Hepes pH 7.5

10 mM MgAc

10% γλυκερόλη

150mM CH₃COOK

0,1% NP40

0,5mg/ml BSA

1ml DTT

10μl protease cocktail inhibitor

Διάλυμα A

50 mM Hepes pH 7.5

10 mM MgAc

10% γλυκερόλη

150mM CH₃COOK

Η συγκέντρωση του άλατος CH₃COOK μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με τα αποτελέσματα.

Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation assay -ChIP)

Για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και DNA σε χρωματινικό περιβάλλον εφαρμόστηκε η μέθοδος της ομοιοπολικής διασύνδεσης και

ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης *in vivo*, σύμφωνα με τους Kuo και Allis (Kuo and Allis, 1999). Στη μέθοδο έγιναν συγκεκριμένες τροποποιήσεις οι οποίες αναφέρονται παρακάτω.

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

Παρασκευή ανοσοκατακρημνισμένου DNA (IP): Τα 30μl ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος αραιώθηκαν σε συνολικό όγκο 200μl διαλύματος λύσης (που περιείχε αναστολείς πρωτεασών) και επώστηκαν με 12μl anti-Myc στους 4°C όλη τη νύχτα με περιστροφική ανάδευση. Το επόμενο πρωί, προστέθηκαν στο δείγμα 20μg salmon sperm DNA και 30μl εξισορροπημένων σφαιριδίων Protein A Sepharose και έγινε επώασή του εν ψυχρώ για 2h με περιστροφική ανάδευση. Τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές για 1min και πλύθηκαν, σε θερμοκρασία δωματίου για 10min με περιστροφική ανάδευση, διαδοχικά σε 1.5ml των εξής διαλυμάτων: (α) λύσης με 150mM NaCl, (β) λύσης με 500mM NaCl, (γ) 10mM Tris-HCl pH 8, 250mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 1mM EDTA και (δ) TE. Τελικά, επαναδιαλύθηκαν σε 100μl TE, επώστηκαν με 20μg RNάση A στους 37°C για 20min και ακολούθησε

έκλυση της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης από αυτά με 2 διαδοχικές πλύσεις τους για 15min σε 250μl διαλύματος έκλυσης (1% SDS, 1mM NaHCO₃). Στη συνέχεια, το συνολικό υπερκείμενο (500μl) επώαστηκε στους 65°C για 5h έτσι ώστε να σπάσουν οι ομοιοπολικοί δεσμοί που είχαν δημιουργηθεί. Έπειτα, ακολούθησε επώαση της χρωματίνης με πρωτεΐνάση K στους 42°C για 30min, καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη παρουσία 20μg γλυκογόνου και τελικά επαναδιάλυση σε 100μl TE.

Παρασκευή ολικού κυτταρικού DNA (input): Τα 30μl ολικού χρωματινικού εκχυλίσματος αραιώθηκαν στα 100μl με TE και έγινε επεξεργασία τους αντίστοιχη με αυτή που περιγράφεται παραπάνω. Τελικά, το δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 500μl TE.

Για την ανίχνευση των προϊόντων οι αντιδράσεις PCR γίνονται είτε παρουσία ραδιενεργών νουκλεοτιδίων και σε συνθήκες γραμμικότητας της αντίδρασης οπότε τα προϊόντα αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτιμώνται ποσοτικά με Phosphoimager, είτε παρουσία χρωστικής SYBR Green για ανάλυση "πραγματικού χρόνου" (real time PCR). Το ανοσοκατακρημνισμένο (IP) και το ολικό κυτταρικό (input) DNA (5μl/100μl και 5μl/500μl αντίστοιχα) αναλύθηκαν με PCR σε αντιδράσεις των 25μl που περιείχαν 200ng ενός ζεύγους ειδικών εκκινητών, 0.2mM από καθένα dNTP, 0.25μl α-[³²P]dATP και 1.25U πολυμεράσης Taq. Οι παράμετροι θερμοπολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: [4min στους 94°C], [30sec στους 94°C, 30sec στους 52°C, 55sec στους 72°C] (27 κύκλοι) και [5min στους 72°C]. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης 1.7%, αυτοραδιογραφήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση του κατάλληλου λογισμικού. Στις real time αναλύσεις εφαρμόστηκαν ίδιες συνθήκες με μόνη διαφορά την προσθήκη της χρωστικής 1μl SYBR Green, οπτικής απορρόφησης OD₄₉₅= 0.4 και την πραγματοποίηση της αντίδρασης σε MJ-Research Opticon Engine. Στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικά για ρυθμιστικές ή κωδικές γονιδιακές αλληλουχίες οι βασικότερες από τις οποίες ήταν οι *CTRI*(-475/-220), *FRE1*(-353/-1), *CTRI*(-180/+71), *CTRI*(+118/+360), *CTRI*(+360/+597), *CTRI*(+703/+944), *CTRI*(+1073/+1309), *CTRI*(-284/-73) (*CTRI*-339/*ACT1*+25), *ACT1*(+47/+313), *PHO5*(+1017/+1220) and *ACT1*(+415/+724), *ACT1*(+776/+1042), *CTRI*(-536/-337), *CTRI*(+1222/+1464). Επίσης ως αρνητικά control χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες αριστερά από τον υποκινητή του *CTRI* και δεξιά της κωδικής περιοχής. Οι

εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

(I)

5' *CTRI PROM new* (-339)

5'- GGGATATTTGCTCAAGACGAC-3'

3' *ACTI* (+25)new

5'- A GCGCT A GAACA TACCAGAATC -3'

(II)

5' *ACTI* (+47) new

5'- AAGAAGAATTGCACGGTCCC -3'

3' *ACTI* (+313)new

5'CCAAAGCAGCAACCTCTAAAC-3'

(III)

5' *ACTI* (+415)

5'-GTAGACCAAGACA CCAAG GT-3'

3' *ACTI* (+ 724)

5'-ACGGCTTGGATGGAAACGTA-3'

(IV)

5' *ACTI* (+776)

5'- TGATGGTGTACTCACGTGC-3

3' *ACTI* (+ 1042)

5'- CCATCTGGAAGTTCGTAGG -3'

(A)

5' *CTRI* (R)

5'- AATAGACACAGCGACCTTCCTA -3'

3' *CTRI* (R)

5'- ACACGATCTGAATAATGTCCTC -3'

(B)

5' *CTRI* (-475)

5'- AGAGCACTTTTCAAGATTCGG -3'

3' *CTRI* (-220)

5'- CCTCTCGAGATGACAATAC -3'

(C)

5' *CTRI* (-180)

5'- AGTAAAACAGATACGCAGTGTG -3'

3' *CTRI* (+71)

5'- GATGCTACTGTCTTGGATGCAC -3'

(D)

5' *CTRI* (+118)

5'- CGA TA TTA TCGAGCATGTCA TC -3'

3' *CTRI* (+360)

5'- ATCCA TCCCTGAAGAGCTACTG -3'

(E)

5' *CTRI* (+360)

5'- TATGGACATGAGTATGGGAATG -3'

3' *CTRI* (+597)

5'- GGAGTTTGCTGAAGGTAAAGTG -3'

(F)

5'CTRI (+703)

5'- CTCTTTCATGACATTATAAGGGC -3'

3'CTRI(+944)

5'- TGTCTACCACATTGGCAGTTAC -3'

(G)

5'CTRI(+1073)

5'- CACAAGAAGAGGGATGTAATTG-3'

3'CTRI(+out 1309)

5'- GAGCTTCTGAGAAATGAACGAT -3'

(H)

5'CTRI (L)

5'- AACCGTATTTTGCTCGTTCCAG -3'

3' CTRI (L)

5'- CCCATGATTTGCATCAATACAT -3'

5'FRE1 (-409)

5'- GTTGAAGAATACCCGATA -3'

3' FRE1(-)

5'- GTAGATTAATCATCGCAAGAT -3'

(CONTROL)

5' PHO5 ORF

5'- CGATATCCTAAACTTTTGA C -3'

3'PHO5 ORF

5'- GTTTC AATTGGAACAACAGCA -3'

Καθαρισμός TAP (πρωτόκολλο Cellzome)

Συλλογή καλλιέργειας

Κύτταρα καλλιέργειας SC όγκου 6l , αναπτυγμένα σε OD₅₅₀ μέχρι 3.5 στα οποία, τρεις ώρες πριν τη συλλογή τους είχε προστεθεί ο χηλικός δεσμευτής του χαλκού BCS, συλλέχθηκαν με φυγοκεντρήση και ξεπλύθηκαν με μισό όγκο νερού. Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκε 200ml παγωμένο διάλυμα 1x LB (+PMSF). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκεντρήση (τελικός συνολικός όγκος κύτταρων περίπου 13 ml) και τελικά εμβαπτίστηκαν σε υγρό N₂ για 10 περίπου λεπτά και φυλάχτηκαν στους -80°C.

Λύση καλλιέργειας

Τα κύτταρα ξεπαγώθηκαν σε υδατόλουτρό στους 37°C και κατόπιν τοποθετήθηκαν στον πάγο. Στην συνέχεια προστέθηκε διάλυμα 1xLB (+ PMSF+ 1mM DTT) ώστε ο

τελικός όγκος να φτάσει τα 25ml. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν προσεκτικά (χωρίς δημιουργία αφρού γιατί ο αφρός μπορεί να οδηγήσει στην ανεπαρκή λύση) και κατόπιν προστέθηκε ένας όγκος (25ml) γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 0.45-0.5 χιλ. και τοποθετήθηκαν σε γαλλικό πιεστήριο (French press) για 15 περίπου λεπτά. Το μίγμα γυάλινων σφαιριδίων και εκχύλισματος κύτταρων που προέκυψε τοποθετήθηκε σε σύριγγα στη βάση της οποίας έχει τοποθετηθεί ειδικό φίλτρο και με τον τρόπο αυτό συλλέχθηκε το εκχύλισμα ενώ συγκρατήθηκαν τα γυάλινα σφαιρίδια (διαχωρισμός). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στους 4°C. Κατόπιν το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 4.000rpm (περιστροφές /λεπτό) για 10 λεπτά στους 4°C. Τέλος το υπερκείμενο συλλέγεται σε σωλήνα υπερφυγοκέντρου (ultrazentrifuge) και φυγοκεντρήθηκε για 1h περίπου στις 32.000 περιστροφές /λεπτό (= 100.000 γ). Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε καθαρό σωλήνα (falcon) με προσοχή έτσι ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά ιζήματος. Τέλος προστέθηκε σε αυτό γλυκερόλη σε τελικό όγκο 5% και αποθηκεύτηκε στους -80°C (εκχύλισμα λύσης).

Καθαρισμός

Το εκχύλισμα λύσης αποψύχθηκε σταδιακά σε υδάτινο λουτρό στους 37°C και τελικά τοποθετήθηκε στον πάγο. Κατόπιν προστέθηκε σε αυτό 0.5ml εξισορροπημένων σφαιριδίων IgG και έγινε επώασή του στους 4°C για 2h με περιστροφική ανάδευση για να αλληλεπιδράσει με τον επίτοπο TAP. Τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν με φυγοκεντρήση στις 2.000rpm για 3min σε θερμοκρασία 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε (κρατήθηκε μόνο μια μικρή ποσότητα FT). Εν συνεχεία τα σφαιρίδια μεταφέρθηκαν σε mobicol το οποίο φέρει LUERLOCK Cap (έτσι ώστε να είναι κλειστό στη βάση του). Στο επάνω μέρος του mobicol βιδώθηκε μια σύριγγα των 20 ml. Στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 10 ml LB (+ 0.5 mM DTT) και κατόπιν απομακρύνθηκε το LUERLOCK Cap από το mobicol έτσι ώστε τα σφαιρίδια να ξεπλυθούν σταδιακά από το διάλυμα (αυτό επιτυγχάνεται με την βοήθεια της βαρύτητας και η διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C). Κατόπιν επανατοποθετήθηκε το LUERLOCK Cap.

Πέψη με TEV

Στα σφαιρίδια προστέθηκαν 150 LB μ l (+ 0,5 mM DTT) και 4 μ l πρωτεάση TEV (3 mg/ml). Κατόπιν επώαστηκαν στους 16°C, για 1h και 30 λεπτά με περιστροφική

ανάδευση. Στη συνέχεια ελήφθη το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα mobicol.

Προσθήκη σφαιριδίων καλμαδουλίνης

Στο mobicol προστέθηκαν 300μl από σφαιρίδια καλμαδουλίνης για αλληλεπίδραση με τον επίτοπο, τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί σε κατάλληλο διάλυμα LB (+2mM CaCl₂ +1mM DTT) και το πλεόνασμα του διαλύματος απομακρύνθηκε προσεκτικά με ήπια φυγοκέντρωση του mobicol (2000rpm). Στη συνέχεια προστέθηκαν 150μl διάλυμα LB (+ 4mM CaCl₂ +1mM DTT) και επώαστηκαν για 1h στους 4°C. Στο τέλος τοποθετήθηκε στο mobicol σύριγγα των 10ml και τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με προσθήκη 5 ml LB + (2mM CaCl₂) στη σύριγγα. Το ξέπλυμα έγινε σταδιακά με την βοήθεια της βαρύτητας.

Έκλουση σφαιριδίων

Το mobicol σφραγίστηκε στη βάση του με Cap και κατόπιν ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις των σφαιριδίων καλμαδουλίνης για 10 min με 250μl διαλύματος έκλουσης (10 mM TrisHCl, pH 8.0+10 mM EGTA +50mM NaCl) στους 37°C (in eppis in Eppendorf shaker). Η υψηλή αλατότητα του διαλύματος έκλουσης βοηθάει στην καλύτερη λυοφιλοποίηση του δείγματος. Το διάλυμα έκλουσης απομακρύνθηκε με την βοήθεια σύριγγας των 3 ml και, κατόπιν τοποθετήθηκε σε νέο eppendorf. Στη συνέχεια ακολούθησε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με προσθήκη παγωμένου TCA (σε τελική συγκέντρωση 55% κατ' όγκο). Τέλος το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 περίπου λεπτά στους 4°C και ξεπλύθηκε με παγωμένη ακετόνη. Αφέθηκε να στεγνώσει και τελικά επαναδιαλύθηκε σε 50 μl 1x SB.

10x LB buffer

1 M NaCl, 0.5 M TrisHCl, pH 7.5, 15 mM MgCl, 1.5% NP 40

Stock PMSF

0,1 M διαλυμένο σε ισοπροπανόλη. Για κάθε 100 ml διαλύματος χρησιμοποιείτε 500 μl του stock.

Ανταλλαγή του υποκινητή *CTRI* με τον υποκινητή *ACTI*

Αρχικά ο *CTRI* κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα με τέτοιο τρόπο ώστε αριστερά από το 5' ακρο του να κωδικοποιείται και να εκφράζεται το γονίδιο επιλογής (*KANMX4*)

(βλέπε κεφαλαίο: Πλασμιδιακοί φορείς). Ο υποκινητής και το γονίδιο επιλογής πολλαπλασιάστηκαν μέσω PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές με άκρα ομόλογα σε περιοχές παρακείμενες στα σημεία που επιθυμούσαμε την ένθεση στο γονιδίωμα και ο μεν 5' εκκινητής με περιοχή ομόλογη στο 3' άκρο του γονιδίου επιλογής ενώ ο 3' με περιοχή ομόλογη στο 3' άκρο του υποκινητή *CTR1*. Μετασηματίσαμε το προϊόν της PCR κύτταρα σακχαρομύκητα. Με ομόλογο ανασυνδυασμό απομακρύνθηκε ο υποκινητής *ACT1* και στην θέση εντέθηκε ο υποκινητής του *CTR1* μαζί με τον μάρτυρα επιλογής. Τα μετασηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (εξαιτίας της παρουσίας του γονιδίου μάρτυρα) και η σωστή ανταλλαγή του αρχικού υποκινητή με τον νέο υποκινητή ελέγχθηκε μέσω PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές στον νέο υποκινητή και στο γονίδιο *ACT1* το οποίο πλέον βρίσκεται υπό τον έλεγχο του νέου υποκινητή (Verstrepen and Thevelein, 2004).

Θ) α. Δημοσιεύσεις σε προετοιμασία

Voutsina A., Gkouskou K., Alexandraki D. A new activating role for Hir1 revealed by distinct partners in the transcriptional initiation and elongation of the Mac1-dependent *CTR1* gene, *under submission*.

Gkouskou K., Voutsina A., Fragiadakis GS., Alexandraki D. New role for the *S. cerevisiae* Rad9 DNA damage checkpoint protein in Mac1-dependent transcription, *in preparation*.

Gkouskou K., Skourti-Stathaki K., Alexandraki D. The *Saccharomyces cerevisiae* Ppt1 phosphatase specifically downregulates the copper-modulated Mac1 transactivation function *in preparation*

β. Περίληψεις στις επιστημονικά συνέδρια

Kalliopi Gkouskou^{1,2}, Alexandra Voutsina^{1,3}, George S. Fragiadakis², Christos Andreadis^{1,2} and Despina Alexandraki^{1,2} A NOVEL ROLE FOR THE *S. CEREVISIAE* Rad9 DNA DAMAGE CHECKPOINT PROTEIN IN METALLOREGULATED TRANSCRIPTION [59⁰ Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα](#) (2007)

K. Gkouskou, A. Voutsina, G. S. Fragiadakis, C. Andreadis and D. Alexandraki. New role for the *S. cerevisiae* Rad9 DNA damage checkpoint protein in metalloregulated transcription. [XXIIIrd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology](#), Melbourne, Australia, July 1 - July 6, 2007.

K. Gkouskou, K. Skourti-Stathaki and D. Alexandraki. The *Saccharomyces cerevisiae* Ppt1 phosphatase specifically downregulates the copper-modulated Mac1 transactivation

function. [XXIIIrd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology](#), Melbourne, Australia, July 1 - July 6, 2007.

Voutsina A., **Gkouskou K.** and Alexandraki D. Hir1 and Ssn6 coregulators function in combination on the Mac1-dependent *CTR1* transcription. [XXII International Conference on Yeast Genetics & Molecular Biology](#), Bratislava, Slovak Republic, August 7-12 2005.

I) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Fink, G. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol*, **194**, 1-863.
- Abraham, R.T. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, **15**, 2177-2196.
- Adelman, K., Wei, W., Ardehali, M.B., Werner, J., Zhu, B., Reinberg, D. and Lis, J.T. (2006) Drosophila Paf1 modulates chromatin structure at actively transcribed genes. *Mol Cell Biol*, **26**, 250-260.
- Adkins, M.W., Carson, J.J., English, C.M., Ramey, C.J. and Tyler, J.K. (2007a) The histone chaperone anti-silencing function 1 stimulates the acetylation of newly synthesized histone H3 in S-phase. *J Biol Chem*, **282**, 1334-1340.
- Adkins, M.W., Howar, S.R. and Tyler, J.K. (2004) Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol Cell*, **14**, 657-666.
- Adkins, M.W. and Tyler, J.K. (2004) The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 52069-52074.
- Adkins, M.W., Williams, S.K., Linger, J. and Tyler, J.K. (2007b) Chromatin disassembly from the PHO5 promoter is essential for the recruitment of the general transcription machinery and coactivators. *Mol Cell Biol*.
- Ahmad, A., Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T. (2005) Different roles of N-terminal and C-terminal halves of HIRA in transcription regulation of cell cycle-related genes that contribute to control of vertebrate cell growth. *J Biol Chem*, **280**, 32090-32100.
- Allen, J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G. and Kell, D.B. (2003) High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol*, **21**, 692-696.
- Anderson, R.M., Latorre-Esteves, M., Neves, A.R., Lavu, S., Medvedik, O., Taylor, C., Howitz, K.T., Santos, H. and Sinclair, D.A. (2003) Yeast life-span extension by calorie restriction is independent of NAD fluctuation. *Science*, **302**, 2124-2126.
- Ausubel, F.M. (1987-2007) *Current Protocols in Molecular Biology: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York*.
- Bannister, L.A. and Schimenti, J.C. (2004) Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenet Genome Res*, **107**, 191-200.
- Bao, Y. and Shen, X. (2007) INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat Res*, **618**, 18-29.
- Barr, M.M. (2003) Super models. *Physiol Genomics*, **13**, 15-24.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M. and Reinberg, D. (2003) FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*, **301**, 1090-1093.
- Bernstein, B.E., Liu, C.L., Humphrey, E.L., Perlstein, E.O. and Schreiber, S.L. (2004) Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol*, **5**, R62.
- Bhaumik, S.R. and Green, M.R. (2001) SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev*, **15**, 1935-1945.

- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A. and Sunnerhagen, P. (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol*, **53**, 1743-1756.
- Biswas, D., Yu, Y., Prall, M., Formosa, T. and Stillman, D.J. (2005) The yeast FACT complex has a role in transcriptional initiation. *Mol Cell Biol*, **25**, 5812-5822.
- Blankley, R.T. and Lydall, D. (2004) A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast. *J Cell Sci*, **117**, 601-608.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S. and Kornberg, R.D. (2004) Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol Cell*, **14**, 667-673.
- Boer, V.M., de Winde, J.H., Pronk, J.T. and Piper, M.D. (2003) The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *J Biol Chem*, **278**, 3265-3274.
- Bono, H. and Okazaki, Y. (2002) Functional transcriptomes: comparative analysis of biological pathways and processes in eukaryotes to infer genetic networks among transcripts. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 355-361.
- Borde, V., Goldman, A.S. and Lichten, M. (2000) Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science*, **290**, 806-809.
- Borner, G.V. (2006) Balancing the checks: surveillance of chromosomal exchange during meiosis. *Biochem Soc Trans*, **34**, 554-556.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2005) The DNA damage response during DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 568-575.
- Brewster, N.K., Johnston, G.C. and Singer, R.A. (2001) A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription. *Mol Cell Biol*, **21**, 3491-3502.
- Bruno, M., Flaus, A., Stockdale, C., Rencurel, C., Ferreira, H. and Owen-Hughes, T. (2003) Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol Cell*, **12**, 1599-1606.
- Buratowski, S. (2003) The CTD code. *Nat Struct Biol*, **10**, 679-680.
- Buratowski, S. (2005) Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 257-261.
- Cakir, T., Patil, K.R., Onsan, Z., Ulgen, K.O., Kirdar, B. and Nielsen, J. (2006) Integration of metabolome data with metabolic networks reveals reporter reactions. *Mol Syst Biol*, **2**, 50.
- Carballo, J.A. and Cha, R.S. (2007) Meiotic roles of Mec1, a budding yeast homolog of mammalian ATR/ATM. *Chromosome Res*, **15**, 539-550.
- Castrillo, J.I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S.J. and Oliver, S.G. (2003) An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*, **62**, 929-937.
- Castrillo, J.I., Zeef, L.A., Hoyle, D.C., Zhang, N., Hayes, A., Gardner, D.C., Cornell, M.J., Petty, J., Hakes, L., Wardleworth, L., Rash, B., Brown, M., Dunn, W.B., Broadhurst, D., O'Donoghue, K., Hester, S.S., Dunkley, T.P., Hart, S.R., Swainston, N., Li, P., Gaskell, S.J., Paton, N.W., Lilley, K.S., Kell, D.B. and Oliver, S.G. (2007) Growth control of the eukaryote cell: a systems biology study in yeast. *J Biol*, **6**, 4.

- Chang, F. and Peter, M. (2003) Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol*, **5**, 294-299.
- Chen, J. and Yuan, B. (2006) Detecting functional modules in the yeast protein-protein interaction network. *Bioinformatics*, **22**, 2283-2290.
- Collinge, J. and Clarke, A.R. (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, **318**, 930-936.
- Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.C., Greenblatt, J.F., Spencer, F., Holstege, F.C., Weissman, J.S. and Krogan, N.J. (2007a) Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 439-450.
- Collins, S.R., Miller, K.M., Maas, N.L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C.S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., Ding, H., Xu, H., Han, J., Ingvarsdottir, K., Cheng, B., Andrews, B., Boone, C., Berger, S.L., Hieter, P., Zhang, Z., Brown, G.W., Ingles, C.J., Emili, A., Allis, C.D., Toczyski, D.P., Weissman, J.S., Greenblatt, J.F. and Krogan, N.J. (2007b) Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature*, **446**, 806-810.
- Connelly, S. and Manley, J.L. (1988) A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev*, **2**, 440-452.
- Corey, L.L., Weirich, C.S., Benjamin, I.J. and Kingston, R.E. (2003) Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes Dev*, **17**, 1392-1401.
- Cornell, M., Paton, N.W., Hedeler, C., Kirby, P., Delneri, D., Hayes, A. and Oliver, S.G. (2003) GIMS: an integrated data storage and analysis environment for genomic and functional data. *Yeast*, **20**, 1291-1306.
- Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*, **97**, 299-311.
- D'Antoni, S., Mattina, T., Di Mare, P., Federico, C., Motta, S. and Saccone, S. (2004) Altered replication timing of the HIRA/Tuple1 locus in the DiGeorge and Velocardiofacial syndromes. *Gene*, **333**, 111-119.
- Dancis, A. (1998) Genetic analysis of iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Pediatr*, **132**, S24-29.
- David, L., Huber, W., Granovskaia, M., Toedling, J., Palm, C.J., Bofkin, L., Jones, T., Davis, R.W. and Steinmetz, L.M. (2006) A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5320-5325.
- De Freitas, J.M., Kim, J.H., Poynton, H., Su, T., Wintz, H., Fox, T., Holman, P., Loguinov, A., Keles, S., van der Laan, M. and Vulpe, C. (2004) Exploratory and confirmatory gene expression profiling of *mac1Delta*. *J Biol Chem*, **279**, 4450-4458.
- de Lichtenberg, U., Jensen, L.J., Brunak, S. and Bork, P. (2005) Dynamic complex formation during the yeast cell cycle. *Science*, **307**, 724-727.
- Delneri, D., Colson, I., Grammenoudi, S., Roberts, I.N., Louis, E.J. and Oliver, S.G. (2003) Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature*, **422**, 68-72.
- DeSilva, H., Lee, K. and Osley, M.A. (1998) Functional dissection of yeast Hir1p, a WD repeat-containing transcriptional corepressor. *Genetics*, **148**, 657-667.

- Dimova, D., Nackerdien, Z., Furgeson, S., Eguchi, S. and Osley, M.A. (1999) A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell*, **4**, 75-83.
- Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2002) Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem*, **277**, 28368-28371.
- Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S.J., Jackson, S.P. and Cote, J. (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell*, **16**, 979-990.
- Downs, J.A., Lowndes, N.F. and Jackson, S.P. (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, **408**, 1001-1004.
- Dujon, B. (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet*, **12**, 263-270.
- Dziembowski, A. and Seraphin, B. (2004) Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett*, **556**, 1-6.
- Emili, A. (1998) MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Mol Cell*, **2**, 183-189.
- Emili, A., Schieltz, D.M., Yates, J.R., 3rd and Hartwell, L.H. (2001) Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1. *Mol Cell*, **7**, 13-20.
- Exinger, F. and Lacroute, F. (1992) 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **22**, 9-11.
- Fabrizio, P. and Longo, V.D. (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, **2**, 73-81.
- Fang, J., Hogan, G.J., Liang, G., Lieb, J.D. and Zhang, Y. (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* histone demethylase Jhd1 fine-tunes the distribution of H3K36me2. *Mol Cell Biol*, **27**, 5055-5065.
- Feldmann, H. (2000) Genolevures--a novel approach to 'evolutionary genomics'. *FEBS Lett*, **487**, 1-2.
- Fernandez-Bellot, E. and Cullin, C. (2001) The protein-only theory and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the prions and the propagons. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1857-1878.
- Fernandez-Bellot, E., Guillemet, E., Ness, F., Baudin-Baillieu, A., Ripaud, L., Tuite, M. and Cullin, C. (2002) The [URE3] phenotype: evidence for a soluble prion in yeast. *EMBO Rep*, **3**, 76-81.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and White, F.M. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, **20**, 301-305.
- Field, L.S., Luk, E. and Culotta, V.C. (2002) Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J Bioenerg Biomembr*, **34**, 373-379.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.

- Fleming, A.B. and Pennings, S. (2001) Antagonistic remodelling by Swi-Snf and Tup1-Ssn6 of an extensive chromatin region forms the background for FLO1 gene regulation. *Embo J*, **20**, 5219-5231.
- Formosa, T., Ruone, S., Adams, M.D., Olsen, A.E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A.R., Kaufman, P.D. and Stillman, D.J. (2002) Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics*, **162**, 1557-1571.
- 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.
- Galbraith, S.J., Tran, L.M. and Liao, J.C. (2006) Transcriptome network component analysis with limited microarray data. *Bioinformatics*, **22**, 1886-1894.
- Garrels, J.I., McLaughlin, C.S., Warner, J.R., Futcher, B., Latter, G.I., Kobayashi, R., Schwender, B., Volpe, T., Anderson, D.S., Mesquita-Fuentes, R. and Payne, W.E. (1997) Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis*, **18**, 1347-1360.
- Gasior, S.L., Wong, A.K., Kora, Y., Shinohara, A. and Bishop, D.K. (1998) Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev*, **12**, 2208-2221.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-147.
- Georgakopoulos, T., Koutroubas, G., Vakonakis, I., Tzermia, M., Prokova, V., Voutsina, A. and Alexandraki, D. (2001) Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* YFR021w/YGR223c/YPL100w ORF family suggests relations to mitochondrial/peroxisomal functions and amino acid signalling pathways. *Yeast*, **18**, 1155-1171.
- Georgatsou, E., Mavrogiannis, L.A., Fragiadakis, G.S. and Alexandraki, D. (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem*, **272**, 13786-13792.
- Gerton, J.L., DeRisi, J., Shroff, R., Lichten, M., Brown, P.O. and Petes, T.D. (2000) Inaugural article: global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11383-11390.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. and Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737-741.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein,

- M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Giannattasio, M., Lazzaro, F., Plevani, P. and Muzi-Falconi, M. (2005) The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J Biol Chem*, **280**, 9879-9886.
- 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.
- Glover, J.N., Williams, R.S. and Lee, M.S. (2004) Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem Sci*, **29**, 579-585.
- Goffeau, A. (2000) Four years of post-genomic life with 6,000 yeast genes. *FEBS Lett*, **480**, 37-41.
- Gough, C.A., Gojobori, T. and Imanishi, T. (2007) Cancer-related mutations in BRCA1-BRCT cause long-range structural changes in protein-protein binding sites: a molecular dynamics study. *Proteins*, **66**, 69-86.
- Graden, J.A. and Winge, D.R. (1997) Copper-mediated repression of the activation domain in the yeast Mac1p transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5550-5555.
- Green, E.M., Antczak, A.J., Bailey, A.O., Franco, A.A., Wu, K.J., Yates, J.R., 3rd and Kaufman, P.D. (2005) Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr Biol*, **15**, 2044-2049.
- Gregory, P.D., Schmid, A., Zavari, M., Munsterkotter, M. and Horz, W. (1999) Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *Embo J*, **18**, 6407-6414.
- Grenon, M., Costelloe, T., Jimeno, S., O'Shaughnessy, A., Fitzgerald, J., Zgheib, O., Degerth, L. and Lowndes, N.F. (2007) Docking onto chromatin via the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Tudor domain. *Yeast*, **24**, 105-119.
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V.R., Brown, P.O. and Winge, D.R. (2000) Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem*, **275**, 32310-32316.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F. and Gaudreau, L. (2005) Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol*, **3**, e384.
- Hahn, S. (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 394-403.
- Halford, S., Wadey, R., Roberts, C., Daw, S.C., Whiting, J.A., O'Donnell, H., Dunham, I., Bentley, D., Lindsay, E., Baldini, A. and et al. (1993) Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome,

- Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum Mol Genet*, **2**, 2099-2107.
- Hall, C., Nelson, D.M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J.A., Seeholzer, S., Lipinski, M. and Adams, P.D. (2001) HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol Cell Biol*, **21**, 1854-1865.
- Hammet, A., Magill, C., Heierhorst, J. and Jackson, S.P. (2007) Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep*, **8**, 851-857.
- Hampsey, M. (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 465-503.
- Harrison, J.C. and Haber, J.E. (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet*, **40**, 209-235.
- Hayes, A., Zhang, N., Wu, J., Butler, P.R., Hauser, N.C., Hoheisel, J.D., Lim, F.L., Sharrocks, A.D. and Oliver, S.G. (2002) Hybridization array technology coupled with chemostat culture: Tools to interrogate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods*, **26**, 281-290.
- Heredia, J., Crooks, M. and Zhu, Z. (2001) Phosphorylation and Cu⁺ coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J Biol Chem*, **276**, 8793-8797.
- Hochwagen, A. and Amon, A. (2006) Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Curr Biol*, **16**, R217-228.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B. and Sinclair, D.A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, **425**, 191-196.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. and O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686-691.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S. and Halazonetis, T.D. (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*, **432**, 406-411.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4569-4574.
- Jamison McDaniels, C.P., Jensen, L.T., Srinivasan, C., Winge, D.R. and Tullius, T.D. (1999) The yeast transcription factor Mac1 binds to DNA in a modular fashion. *J Biol Chem*, **274**, 26962-26967.
- Jensen, L.T., Posewitz, M.C., Srinivasan, C. and Winge, D.R. (1998) Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 23805-23811.
- Jensen, L.T. and Winge, D.R. (1998) Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **17**, 5400-5408.

- Jeong, J.Y., Johns, J., Sinclair, C., Park, J.M. and Rossie, S. (2003) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* protein Ser/Thr phosphatase T1 and comparison to its mammalian homolog PP5. *BMC Cell Biol*, **4**, 3.
- Jimeno-Gonzalez, S., Gomez-Herreros, F., Alepuz, P.M. and Chavez, S. (2006) A gene-specific requirement for FACT during transcription is related to the chromatin organization of the transcribed region. *Mol Cell Biol*, **26**, 8710-8721.
- Johnston, M. (2000) The yeast genome: on the road to the Golden Age. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 617-623.
- Jones, J.C., Phatnani, H.P., Haystead, T.A., MacDonald, J.A., Alam, S.M. and Greenleaf, A.L. (2004) C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J Biol Chem*, **279**, 24957-24964.
- Jungmann, J., Reins, H.A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D. and Jentsch, S. (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *Embo J*, **12**, 5051-5056.
- Kao, C.F., Hillyer, C., Tsukuda, T., Henry, K., Berger, S. and Osley, M.A. (2004) Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev*, **18**, 184-195.
- Kaplan, C.D., Laprade, L. and Winston, F. (2003) Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science*, **301**, 1096-1099.
- Kaufman, P.D., Cohen, J.L. and Osley, M.A. (1998) Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol Cell Biol*, **18**, 4793-4806.
- Keeney, S. (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol*, **52**, 1-53.
- Keller, G., Bird, A. and Winge, D.R. (2005) Independent metalloregulation of Ace1 and Mac1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **4**, 1863-1871.
- Keller, G., Gross, C., Kelleher, M. and Winge, D.R. (2000) Functional independence of the two cysteine-rich activation domains in the yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem*, **275**, 29193-29199.
- Kellis, M., Birren, B.W. and Lander, E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **428**, 617-624.
- Kireeva, M.L., Hancock, B., Cremona, G.H., Walter, W., Studitsky, V.M. and Kashlev, M. (2005) Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol Cell*, **18**, 97-108.
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M. and Studitsky, V.M. (2002) Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol Cell*, **9**, 541-552.
- Kirkpatrick, D.T., Fan, Q. and Petes, T.D. (1999) Maximal stimulation of meiotic recombination by a yeast transcription factor requires the transcription activation domain and a DNA-binding domain. *Genetics*, **152**, 101-115.
- Kirov, N., Shtilbans, A. and Rushlow, C. (1998) Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster*. *Gene*, **212**, 323-332.

- Kitajima, T.S., Kawashima, S.A. and Watanabe, Y. (2004) The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature*, **427**, 510-517.
- Kizer, K.O., Phatnani, H.P., Shibata, Y., Hall, H., Greenleaf, A.L. and Strahl, B.D. (2005) A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol*, **25**, 3305-3316.
- Knight, Z.A., Schilling, B., Row, R.H., Kenski, D.M., Gibson, B.W. and Shokat, K.M. (2003) Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*, **21**, 1047-1054.
- 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.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D. and Myung, K. (2002) Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **297**, 552-557.
- Konev, A.Y., Tribus, M., Park, S.Y., Podhraski, V., Lim, C.Y., Emelyanov, A.V., Vershilova, E., Pirrotta, V., Kadonaga, J.T., Lusser, A. and Fyodorov, D.V. (2007) CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin in vivo. *Science*, **317**, 1087-1090.
- Korber, P., Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Schermer, U.J., Blaschke, D. and Horz, W. (2006) The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J Biol Chem*, **281**, 5539-5545.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 148-151.
- Kouzarides, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 198-209.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A. and Greenblatt, J.F. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **440**, 637-643.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J. (2003) Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **23**, 4207-4218.
- Krude, T. (2002) Chromatin assembly: the kinetochore connection. *Curr Biol*, **12**, R256-258.
- 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.

- Kurdistani, S.K. and Grunstein, M. (2003) Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 276-284.
- Kurdistani, S.K., Tavazoie, S. and Grunstein, M. (2004) Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell*, **117**, 721-733.
- Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M.A. and Lipinski, M. (1995) A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet*, **4**, 791-799.
- Lancelot, N., Charier, G., Couprie, J., Duband-Goulet, I., Alpha-Bazin, B., Quemeneur, E., Ma, E., Marsolier-Kergoat, M.C., Ropars, V., Charbonnier, J.B., Miron, S., Craescu, C.T., Callebaut, I., Gilquin, B. and Zinn-Justin, S. (2007) The checkpoint *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein contains a tandem tudor domain that recognizes DNA. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5898-5912.
- Lashkari, D.A., DeRisi, J.L., McCusker, J.H., Namath, A.F., Gentile, C., Hwang, S.Y., Brown, P.O. and Davis, R.W. (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13057-13062.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, **308**, 551-554.
- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., Zeitlinger, J., Jennings, E.G., Murray, H.L., Gordon, D.B., Ren, B., Wyrick, J.J., Tagne, J.B., Volkert, T.L., Fraenkel, E., Gifford, D.K. and Young, R.A. (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **298**, 799-804.
- Lee, T.I. and Young, R.A. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, **34**, 77-137.
- Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, **128**, 707-719.
- Li, X.C. and Schimenti, J.C. (2007) Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genet*, **3**, e130.
- Lim, F.L., Hayes, A., West, A.G., Pic-Taylor, A., Darieva, Z., Morgan, B.A., Oliver, S.G. and Sharrocks, A.D. (2003) Mcm1p-induced DNA bending regulates the formation of ternary transcription factor complexes. *Mol Cell Biol*, **23**, 450-461.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. (1994) The role of O₂⁻ in the production of HO₂[·]: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, **16**, 29-33.
- Lis, J.T. and Kraus, W.L. (2006) Promoter cleavage: a topoIIbeta and PARP-1 collaboration. *Cell*, **125**, 1225-1227.
- Liti, G., Barton, D.B. and Louis, E.J. (2006) Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*, **174**, 839-850.
- Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, J.E., Jr. and Shenk, T. (1987) A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8306-8310.
- Lorain, S., Demczuk, S., Lamour, V., Toth, S., Aurias, A., Roe, B.A. and Lipinski, M. (1996) Structural Organization of the WD repeat protein-encoding gene HIRA in

- the DiGeorge syndrome critical region of human chromosome 22. *Genome Res*, **6**, 43-50.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B. and Kornberg, R.D. (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3090-3093.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., Alt, F.W. and Chen, J. (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*, **21**, 187-200.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J.H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry*, **34**, 15607-15613.
- Ma, J.L., Lee, S.J., Duong, J.K. and Stern, D.F. (2006) Activation of the checkpoint kinase Rad53 by the phosphatidylinositol kinase-like kinase Mec1. *J Biol Chem*, **281**, 3954-3963.
- Magnaghi, P., Roberts, C., Lorain, S., Lipinski, M. and Scambler, P.J. (1998) HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nat Genet*, **20**, 74-77.
- Majka, J., Binz, S.K., Wold, M.S. and Burgers, P.M. (2006) Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem*, **281**, 27855-27861.
- Malave, T.M. and Dent, S.Y. (2006) Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem Cell Biol*, **84**, 437-443.
- Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A. and Yaffe, M.B. (2003) BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, **302**, 636-639.
- Marfella, C.G. and Imbalzano, A.N. (2007) The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res*, **618**, 30-40.
- Martins, L.J., Jensen, L.T., Simon, J.R., Keller, G.L. and Winge, D.R. (1998) Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 23716-23721.
- Mason, P.B. and Struhl, K. (2003) The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol*, **23**, 8323-8333.
- Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R. and Verreault, A. (2005) A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature*, **436**, 294-298.
- Melo, J. and Toczyski, D. (2002) A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 237-245.
- Meneghini, R. (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med*, **23**, 783-792.
- Michaud, G.A., Salcius, M., Zhou, F., Bangham, R., Bonin, J., Guo, H., Snyder, M., Predki, P.F. and Schweitzer, B.I. (2003) Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol*, **21**, 1509-1512.

- Mimura, S., Seki, T., Tanaka, S. and Diffley, J.F. (2004) Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature*, **431**, 1118-1123.
- Mitchell, P. (2002) A perspective on protein microarrays. *Nat Biotechnol*, **20**, 225-229.
- Morgan. (2006) The Cell Cycle Principles of Control. *New Science Press*.
- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E. and Shen, X. (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell*, **119**, 767-775.
- Mousson, F., Ochsenbein, F. and Mann, C. (2007) The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways. *Chromosoma*, **116**, 79-93.
- Mustacchi, R., Hohmann, S. and Nielsen, J. (2006) Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast*, **23**, 227-238.
- 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.
- Nash, R., Weng, S., Hitz, B., Balakrishnan, R., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hong, E.L., Livstone, M.S., Oughtred, R., Park, J., Skrzypek, M., Theesfeld, C.L., Binkley, G., Dong, Q., Lane, C., Miyasato, S., Sethuraman, A., Schroeder, M., Dolinski, K., Botstein, D. and Cherry, J.M. (2007) Expanded protein information at SGD: new pages and proteome browser. *Nucleic Acids Res*, **35**, D468-471.
- Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L. and Workman, J.L. (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol Cell Biol*, **22**, 1615-1625.
- Nehlin, J.O. and Ronne, H. (1990) Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *Embo J*, **9**, 2891-2898.
- Nelson, D.M., Ye, X., Hall, C., Santos, H., Ma, T., Kao, G.D., Yen, T.J., Harper, J.W. and Adams, P.D. (2002) Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol Cell Biol*, **22**, 7459-7472.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2002) Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev*, **16**, 806-819.
- Niu, H., Wan, L., Baumgartner, B., Schaefer, D., Loidl, J. and Hollingsworth, N.M. (2005) Partner choice during meiosis is regulated by Hop1-promoted dimerization of Mek1. *Mol Biol Cell*, **16**, 5804-5818.
- Nourani, A., Robert, F. and Winston, F. (2006) Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **26**, 1496-1509.
- Osley, M.A., Gould, J., Kim, S., Kane, M.Y. and Hereford, L. (1986) Identification of sequences in a yeast histone promoter involved in periodic transcription. *Cell*, **45**, 537-544.
- Outeiro, T.F. and Lindquist, S. (2003) Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, **302**, 1772-1775.
- Page, S.L. and Hawley, R.S. (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 525-558.

- Pan, X., Ye, P., Yuan, D.S., Wang, X., Bader, J.S. and Boeke, J.D. (2006) A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, **124**, 1069-1081.
- Papamichos-Chronakis, M., Petrakis, T., Ktistaki, E., Topalidou, I. and Tzamarias, D. (2002) Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1. *Mol Cell*, **9**, 1297-1305.
- Parrish, J.R., Gulyas, K.D. and Finley, R.L., Jr. (2006) Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Curr Opin Biotechnol*, **17**, 387-393.
- Pelliccioli, A. and Foiani, M. (2005) Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr Biol*, **15**, R769-771.
- Pena, M.M., Koch, K.A. and Thiele, D.J. (1998) Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **18**, 2514-2523.
- Pena, M.M., Lee, J. and Thiele, D.J. (1999) A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr*, **129**, 1251-1260.
- Pokholok, D.K., Hannett, N.M. and Young, R.A. (2002) Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol Cell*, **9**, 799-809.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K. and Young, R.A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, **122**, 517-527.
- Pope, G.A., MacKenzie, D.A., Defernez, M., Aroso, M.A., Fuller, L.J., Mellon, F.A., Dunn, W.B., Brown, M., Goodacre, R., Kell, D.B., Marvin, M.E., Louis, E.J. and Roberts, I.N. (2007) Metabolic footprinting as a tool for discriminating between brewing yeasts. *Yeast*, **24**, 667-679.
- Powell, W. and Reines, D. (1996) Mutations in the second largest subunit of RNA polymerase II cause 6-azauracil sensitivity in yeast and increased transcriptional arrest in vitro. *J Biol Chem*, **271**, 6866-6873.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd and Grant, P.A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*, **433**, 434-438.
- Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2005) The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev*, **19**, 2534-2539.
- Proft, M. and Struhl, K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell*, **9**, 1307-1317.
- Proudfoot, N. (2000) Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci*, **25**, 290-293.
- Proudfoot, N. (2004) New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 272-278.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.

- Puig, S. and Thiele, D.J. (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 171-180.
- Qian, Z., Huang, H., Hong, J.Y., Burck, C.L., Johnston, S.D., Berman, J., Carol, A. and Liebman, S.W. (1998) Yeast Ty1 retrotransposition is stimulated by a synergistic interaction between mutations in chromatin assembly factor I and histone regulatory proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 4783-4792.
- Qin, S. and Parthun, M.R. (2002) Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **22**, 8353-8365.
- Qiu, H., Hu, C., Wong, C.M. and Hinnebusch, A.G. (2006) The Spt4p subunit of yeast DSIF stimulates association of the Paf1 complex with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **26**, 3135-3148.
- Raamsdonk, L.M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M.C., Berden, J.A., Brindle, K.M., Kell, D.B., Rowland, J.J., Westerhoff, H.V., van Dam, K. and Oliver, S.G. (2001) A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol*, **19**, 45-50.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M., Lipinski, M. and Almouzni, G. (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell*, **9**, 1091-1100.
- Reinke, H. and Horz, W. (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell*, **11**, 1599-1607.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T.L., Wilson, C.J., Bell, S.P. and Young, R.A. (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, **290**, 2306-2309.
- Rhoades, A.R., Ruone, S. and Formosa, T. (2004) Structural features of nucleosomes reorganized by yeast FACT and its HMG box component, Nhp6. *Mol Cell Biol*, **24**, 3907-3917.
- Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., Mudrak, I., Ogris, E., Mechtler, K., Pelletier, L., Buchholz, F., Shirahige, K. and Nasmyth, K. (2006) Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature*, **441**, 53-61.
- Roberts, C., Sutherland, H.F., Farmer, H., Kimber, W., Halford, S., Carey, A., Brickman, J.M., Wynshaw-Boris, A. and Scambler, P.J. (2002) Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. *Mol Cell Biol*, **22**, 2318-2328.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.
- Rose, A.H.a.H., J. S. (1987-1995) *The yeasts*.
- Rose, D. and Holm, C. (1993) Meiosis-specific arrest revealed in DNA topoisomerase II mutants. *Mol Cell Biol*, **13**, 3445-3455.
- Rosonina, E. and Manley, J.L. (2005) From transcription to mRNA: PAF provides a new path. *Mol Cell*, **20**, 167-168.

- Ross-Macdonald, P., Coelho, P.S., Roemer, T., Agarwal, S., Kumar, A., Jansen, R., Cheung, K.H., Sheehan, A., Symoniatis, D., Umansky, L., Heidtman, M., Nelson, F.K., Iwasaki, H., Hager, K., Gerstein, M., Miller, P., Roeder, G.S. and Snyder, M. (1999) Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature*, **402**, 413-418.
- Rufiange, A., Jacques, P.E., Bhat, W., Robert, F. and Nourani, A. (2007) Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol Cell*, **27**, 393-405.
- Sambrook, J.F.J., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- Sanders, S.L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A.J. and Weil, P.A. (2002) Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol Cell Biol*, **22**, 4723-4738.
- Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2004) Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell*, **119**, 603-614.
- Saunders, A., Core, L.J. and Lis, J.T. (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 557-567.
- Savarese, F. and Grosschedl, R. (2006) Blurring cis and trans in gene regulation. *Cell*, **126**, 248-250.
- Schermer, U.J., Korber, P. and Horz, W. (2005) Histones are incorporated in trans during reassembly of the yeast PHO5 promoter. *Mol Cell*, **19**, 279-285.
- Schmidt, P.J., Kunst, C. and Culotta, V.C. (2000) Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. Role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. *J Biol Chem*, **275**, 33771-33776.
- Schwabish, M.A. and Struhl, K. (2004) Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **24**, 10111-10117.
- Schwabish, M.A. and Struhl, K. (2006) Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, **22**, 415-422.
- Schwabish, M.A. and Struhl, K. (2007) The Swi/Snf Complex is important for histone eviction during transcriptional activation and RNA polymerase II elongation in vivo. *Mol Cell Biol*.
- Schwacha, A. and Kleckner, N. (1997) Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell*, **90**, 1123-1135.
- Schwartz, M.F., Duong, J.K., Sun, Z., Morrow, J.S., Pradhan, D. and Stern, D.F. (2002) Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol Cell*, **9**, 1055-1065.
- Serpe, M., Joshi, A. and Kosman, D.J. (1999) Structure-function analysis of the protein-binding domains of Mac1p, a copper-dependent transcriptional activator of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **274**, 29211-29219.
- Sharma, V.M., Li, B. and Reese, J.C. (2003) SWI/SNF-dependent chromatin remodeling of RNR3 requires TAF(II)s and the general transcription machinery. *Genes Dev*, **17**, 502-515.

- Sharp, J.A., Fouts, E.T., Krawitz, D.C. and Kaufman, P.D. (2001) Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Curr Biol*, **11**, 463-473.
- Shen, C., Li, L. and Chen, J.Y. (2006) A statistical framework to discover true associations from multiprotein complex pull-down proteomics data sets. *Proteins*, **64**, 436-443.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. and Wu, C. (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, **406**, 541-544.
- Sherwood, P.W., Tsang, S.V. and Osley, M.A. (1993) Characterization of HIR1 and HIR2, two genes required for regulation of histone gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **13**, 28-38.
- Shinohara, M., Sakai, K., Ogawa, T. and Shinohara, A. (2003) The mitotic DNA damage checkpoint proteins Rad17 and Rad24 are required for repair of double-strand breaks during meiosis in yeast. *Genetics*, **164**, 855-865.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A. and Arndt, K.M. (2003) Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *Embo J*, **22**, 1846-1856.
- Soulier, J. and Lowndes, N.F. (1999) The BRCT domain of the *S. cerevisiae* checkpoint protein Rad9 mediates a Rad9-Rad9 interaction after DNA damage. *Curr Biol*, **9**, 551-554.
- Soustelle, C., Vedel, M., Kolodner, R. and Nicolas, A. (2002) Replication protein A is required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **161**, 535-547.
- Spector, M.S., Raff, A., DeSilva, H., Lee, K. and Osley, M.A. (1997) Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Mol Cell Biol*, **17**, 545-552.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. and Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, **9**, 3273-3297.
- Squazzo, S.L., Costa, P.J., Lindstrom, D.L., Kumer, K.E., Simic, R., Jennings, J.L., Link, A.J., Arndt, K.M. and Hartzog, G.A. (2002) The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *Embo J*, **21**, 1764-1774.
- Strom, L., Lindroos, H.B., Shirahige, K. and Sjogren, C. (2004) Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol Cell*, **16**, 1003-1015.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J. and Jackson, S.P. (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, **123**, 1213-1226.
- Sugimoto, K., Ando, S., Shimomura, T. and Matsumoto, K. (1997) Rfc5, a replication factor C component, is required for regulation of Rad53 protein kinase in the yeast checkpoint pathway. *Mol Cell Biol*, **17**, 5905-5914.
- Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D.S. and Stern, D.F. (1998) Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science*, **281**, 272-274.

- Suter, B., Auerbach, D. and Stagljar, I. (2006) Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques*, **40**, 625-644.
- Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M.A. and Sternglanz, R. (2001) Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription. *Genetics*, **158**, 587-596.
- Svejstrup, J.Q. (2007) Elongator complex: how many roles does it play? *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 331-336.
- Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Durocher, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol*, **15**, 1364-1375.
- Thiele, D.J. (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol*, **8**, 2745-2752.
- Toh, G.W. and Lowndes, N.F. (2003) Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein in sensing and responding to DNA damage. *Biochem Soc Trans*, **31**, 242-246.
- Tong, A.H. and Boone, C. (2006) Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, **313**, 171-192.
- Tong, A.H., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., Chen, Y., Cheng, X., Chua, G., Friesen, H., Goldberg, D.S., Haynes, J., Humphries, C., He, G., Hussein, S., Ke, L., Krogan, N., Li, Z., Levinson, J.N., Lu, H., Menard, P., Munyana, C., Parsons, A.B., Ryan, O., Tonikian, R., Roberts, T., Sdicu, A.M., Shapiro, J., Sheikh, B., Suter, B., Wong, S.L., Zhang, L.V., Zhu, H., Burd, C.G., Munro, S., Sander, C., Rine, J., Greenblatt, J., Peter, M., Bretscher, A., Bell, G., Roth, F.P., Brown, G.W., Andrews, B., Bussey, H. and Boone, C. (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science*, **303**, 808-813.
- Tornaletti, S., Reines, D. and Hanawalt, P.C. (1999) Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA. *J Biol Chem*, **274**, 24124-24130.
- Tran, D.P., Kim, S.J., Park, N.J., Jew, T.M. and Martinson, H.G. (2001) Mechanism of poly(A) signal transduction to RNA polymerase II in vitro. *Mol Cell Biol*, **21**, 7495-7508.
- van Bakel, H., Strengman, E., Wijmenga, C. and Holstege, F.C. (2005) Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. *Physiol Genomics*, **22**, 356-367.
- van den Boom, V., Jaspers, N.G. and Vermeulen, W. (2002) When machines get stuck--obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide. *Bioessays*, **24**, 780-784.
- van den Bosch, M. and Lowndes, N.F. (2004) Remodelling the Rad9 checkpoint complex: preparing Rad53 for action. *Cell Cycle*, **3**, 119-122.
- Van Ho, A., Ward, D.M. and Kaplan, J. (2002) Transition metal transport in yeast. *Annu Rev Microbiol*, **56**, 237-261.
- van Leeuwen, F., Gafken, P.R. and Gottschling, D.E. (2002) Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell*, **109**, 745-756.

- VanDemark, A.P., Blanksma, M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C.P. and Formosa, T. (2006) The structure of the yFACT Pob3-M domain, its interaction with the DNA replication factor RPA, and a potential role in nucleosome deposition. *Mol Cell*, **22**, 363-374.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M.,

- Xia, A., Zandieh, A. and Zhu, X. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- Verstrepen, K.J. and Thevelein, J.M. (2004) Controlled expression of homologous genes by genomic promoter replacement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, **267**, 259-266.
- Vialard, J.E., Gilbert, C.S., Green, C.M. and Lowndes, N.F. (1998) The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *Embo J*, **17**, 5679-5688.
- Vijg, J. and Suh, Y. (2006) Ageing: chromatin unbound. *Nature*, **440**, 874-875.
- Villas-Boas, S.G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J. and Nielsen, J. (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev*, **24**, 613-646.
- Volles, M.J. and Lansbury, P.T., Jr. (2007) Relationships between the sequence of alpha-synuclein and its membrane affinity, fibrillization propensity, and yeast toxicity. *J Mol Biol*, **366**, 1510-1522.
- Voutsina, A., Fragiadakis, G.S., Boutla, A. and Alexandraki, D. (2001) The second cysteine-rich domain of Mac1p is a potent transactivator that modulates DNA binding efficiency and functionality of the protein. *FEBS Lett*, **494**, 38-43.
- Voutsina, A., Gkouskou, K. and Alexandraki, D. (2005) Hir1 and Ssn6 coregulators function in combination on the Mac1-dependent CTR1 transcription. *The XXII International Conference on Yeast Genetics & Molecular Biology. Bratislava, Slovak Republic.*
- Wandinger, S.K., Suhre, M.H., Wegele, H. and Buchner, J. (2006) The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *Embo J*, **25**, 367-376.
- Wang, L. and Hatzimanikatis, V. (2006) Metabolic engineering under uncertainty--II: analysis of yeast metabolism. *Metab Eng*, **8**, 142-159.
- Wang, W. (2003) The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol*, **274**, 143-169.
- Washburn, M.P. (2003) Soft landing for protein chips. *Nat Biotechnol*, **21**, 1156-1157.
- Willingham, S., Outeiro, T.F., DeVit, M.J., Lindquist, S.L. and Muchowski, P.J. (2003) Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science*, **302**, 1769-1772.
- Winzeler, E.A., Lee, B., McCusker, J.H. and Davis, R.W. (1999a) Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. *Parasitology*, **118 Suppl**, S73-80.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. and Davis, R.W. (1999b) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.

- Wittschieben, B.O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C.D., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*, **4**, 123-128.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H. and Lockhart, D.J. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, **15**, 1359-1367.
- Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2003) The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem*, **278**, 34739-34742.
- Workman, C.T., Mak, H.C., McCuine, S., Tagne, J.B., Agarwal, M., Ozier, O., Begley, T.J., Samson, L.D. and Ideker, T. (2006) A systems approach to mapping DNA damage response pathways. *Science*, **312**, 1054-1059.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, **67**, 545-579.
- Wu, L., van Winden, W.A., van Gulik, W.M. and Heijnen, J.J. (2005) Application of metabolome data in functional genomics: a conceptual strategy. *Metab Eng*, **7**, 302-310.
- Xiao, T., Kao, C.F., Krogan, N.J., Sun, Z.W., Greenblatt, J.F., Osley, M.A. and Strahl, B.D. (2005) Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **25**, 637-651.
- Xing, B. and van der Laan, M.J. (2005) A statistical method for constructing transcriptional regulatory networks using gene expression and sequence data. *J Comput Biol*, **12**, 229-246.
- Yang, J., Roe, S.M., Cliff, M.J., Williams, M.A., Ladbury, J.E., Cohen, P.T. and Barford, D. (2005) Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *Embo J*, **24**, 1-10.
- Yonaha, M. and Proudfoot, N.J. (1999) Specific transcriptional pausing activates polyadenylation in a coupled in vitro system. *Mol Cell*, **3**, 593-600.
- Yonkovich, J., McKendry, R., Shi, X. and Zhu, Z. (2002) Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. *J Biol Chem*, **277**, 23981-23984.
- Zanton, S.J. and Pugh, B.F. (2006) Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes Dev*, **20**, 2250-2265.
- Zhang, N., Osborn, M., Gitsham, P., Yen, K., Miller, J.R. and Oliver, S.G. (2003) Using yeast to place human genes in functional categories. *Gene*, **303**, 121-129.
- Zhu, H., Bilgin, M. and Snyder, M. (2003) Proteomics. *Annu Rev Biochem*, **72**, 783-812.
- Zhu, H. and Snyder, M. (2003) Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 55-63.
- Zhu, Z., Labbe, S., Pena, M.M. and Thiele, D.J. (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem*, **273**, 1277-1280.
- Zou, L. and Elledge, S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, **300**, 1542-1548.

Zuo, Z., Urban, G., Scammell, J.G., Dean, N.M., McLean, T.K., Aragon, I. and Honkanen, R.E. (1999) Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest. *Biochemistry*, **38**, 8849-8857.