

ΑΒΕΚΤ 00644

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗΣ *Gcn4*:
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ

Νεκτάριος Ταβερναράκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1995



.....ΕΣΩΦΥΛΟ.....



Magritte: Το κάστρο των Πυρηναίων.

1954 (Νέα Υόρκη, Ιδιωτική συλλογή²¹⁶)

“.....η ιδιότητα αυτή της σκέψης που ονομάζεται φαντασία.”

Στη Δανάη.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<u>I)</u>	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΕΙΣ.....	10
<u>II)</u>	ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ.....	16
<u>A)</u>	Περίληψη.....	17
<u>B)</u>	Summary.....	20
<u>III)</u>	ΕΚΤΕΝΕΣΤΕΡΑ.....	23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Υλικά και πειραματικές μέθοδοι.

☛	Τα στελέχη.....	24
☛	Τα θρεπτικά μέσα.....	25
☛	Μέθοδοι χειρισμού των μορίων DNA για την δημιουργία των πλασμιδιακών κατασκευών.....	26
☛	Μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	29
☛	Μέθοδοι παρασκευής πλασμιδιακού DNA απο καλλιέργειες βακτηρίων.....	30
☛	Ταυτοποίηση μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων με ανάλυση κατά Grunstein.....	32
☛	Ραδιοσήμανση μορίων DNA. Κατασκευή ραδιοανιχνευτών.....	32
☛	Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA.....	33
☛	Μετασχηματισμός στελεχών ζύμης.....	33
☛	Απομόνωση συνολικού RNA απο κύτταρα ζύμης.....	34
☛	Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης φορμαλδεΐδης. Ανάλυση Northern.....	34
☛	Απομόνωση γενωμικού DNA απο κύτταρα ζύμης.....	35
☛	Ανάλυση κατά Southern.....	36
☛	Χαρτογράφηση του σημείου έναρξης της μεταγραφής με επέκταση γνωστής αλληλουχίας-εκκινητή. (Primer extension analysis).....	36
☛	Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.....	36

☛ Ραδιοσήμανση πολυπεπτιδίων και απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα ζύμης, in vivo.....	37
☛ Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεΐνης από συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων ζύμης.....	37
☛ Αντίδραση κινάσης σε ανοσοσύμπλοκα.....	38
☛ Προσδιορισμός της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης.....	38
☛ Μελέτη της διαδικασίας ωρίμανσης και συσσώρευσης ριβοσωμικού RNA....	39
☛ Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με χρήση συντήξεων με την S Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST).....	40
☛ Σύνθεση μεγάλης ποσότητας RNA, in vitro	40
☛ Αντίδραση σύνδεσης πρωτεΐνης-DNA.....	41
☛ Περιορισμένη πρωτεόλυση συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης.....	41
☛ Ανάλυση γενικής πολυσωμικής κατατομής.....	41
☛ Ανάλυση πολυσωμικής κατατομής ενός μορίου mRNA σε κλίση συνκρόξης..	42
☛ Μεταλλαξογένεση με EMS.....	43
☛ Μεταλλαξογένεση DNA in vitro, με Υδροξυλαμίνη.....	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

α) Εισαγωγή στη γονιδιακή ρύθμιση.

☛ Γενικότητες.....	45
☛ Η ομοιότητα ως παράδειγμα δυναμικής κατάστασης.....	46
☛ Το σύστημα γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων στο σακχαρομύκητα.....	48

β) Ο μεταφραστικός έλεγχος του γονιδίου GCN4.

☛ Ανασκόπηση.....	52
☛ Γιατί μεταφραστικός έλεγχος;.....	60
☛ Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης του μεταφραστικού ελέγχου του GCN4.....	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

α) Η ανεξάρτητη από την κινάση Gcn2, ενεργοποίηση του GCN4.

- ☛ Όταν υπερεκφραστούν κάποια tRNAs..... 66
- ☛ Όταν υπερεκφραστεί το μικρό RNA που κωδικοποιείται από το γονίδιο NME1..... 72
- ☛ Όταν προκληθούν μεταλλάξεις στην α υπομονάδα του eIF2 και όταν υπερεκφραστεί η β υπομονάδα..... 76
- ☛ Όταν παρεμποδιστεί η αμινοακυλίωση των tRNAs της Ιστιδίνης και όταν μειωθούν τα επίπεδα των ενδογενών αμινοξέων του κυττάρου..... 85
- ☛ Καταστολή των συνεπειών που έχουν μεταλλάξεις του eIF2α..... 89

β) Υπάρχει σύνδεση ανάμεσα στην ελεγχόμενη από cAMP κινάση Trk2 και τη ρύθμιση της έκφρασης του GCN4;

- ☛ Ενεργοποίηση της Trk2 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του GCN4 χωρίς την ανάγκη Gcn2..... 95
- ☛ Είναι η Trk2 μια ακόμα κινάση του eIF2;..... 103

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η σχέση της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης και του μεταφραστικού ελέγχου του GCN4.

- ☛ Μια περιορισμένη δομική-λειτουργική ανάλυση του γονιδίου GCN2..... 107
- ☛ Είναι η κινάση Gcn2 ειδική μόνο για τη ρύθμιση του GCN4;..... 113

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συζήτηση των αποτελεσμάτων που καταγράφονται στα Κεφάλαια 3 και 4. Συμπεράσματα, και προοπτική.

- ☛ Η μετάφραση του GCN4 mRNA εμφανίζεται ευαίσθητη σε μεταβολές που αφορούν την πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή του κυττάρου..... 120
- ☛ Συμμετέχει ο eIF2 στη διαδικασία παροδικής ενεργοποίησης του GCN4;..... 125
- ☛ Είναι εντοπισμένη η δράση της κινάσης Gcn2;..... 129

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Η πρωτεΐνη Gcn4 ως μεταγραφικός ενεργοποιητής.

- ☛ Η δομή της πρωτεΐνης Gcn4..... 134
- ☛ Οι DNA στόχοι: Διαφορές ανάμεσα στα γονίδια που ελέγχονται από την πρωτεΐνη Gcn4..... 137
- ☛ Η αναγκαιότητα για πρωτεΐνες διαμεσολαβητές. Οι πρωτεΐνες Gcn5, Ada2 και Ada3..... 140
- ☛ Ο σκοπός της παρούσας μελέτης της μεταγραφής που οφείλεται στην πρωτεΐνη Gcn4..... 146

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

α) Όταν η πρωτεΐνη Gcn4 υπερπαράγεται.....

- ☛ Το φαινόμενο της τιτλοδότησης..... 149
- ☛ Τιτλοδότηση και απουσία διαμεσολαβητών;..... 157
- ☛ Ο TFIIB δεν επαρκεί σε συνθήκες υπερέκφρασης του GCN4..... 162
- ☛ Ενεργοποίηση χωρίς Ada2 και Gcn5. Υπάρχουν και άλλοι διαμεσολαβητές;.. 164

β) Παρόλο που η πρωτεΐνη Gcn4 υπερπαράγεται.....

- ☛ Κατάργηση της τιτλοδότησης..... 166
- ☛ Η γενωμική μεταλλαγή AFR1-1..... 168
- ☛ Η έλλειψη του γονιδίου GCN5 σε γενετικό υπόβαθρο AFR1-1 είναι θανατηφόρα..... 178
- ☛ Ένα γονίδιο καταστολέας της μεταλλαγής AFR1-1..... 180
- ☛ Ένα γονίδιο που πιθανά είναι το AFR1..... 184

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

α) Πως η πρωτεΐνη Gcn4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων;

- ☛ Μη συμμετρικοί στόχοι..... 188
- ☛ Ετεροδιμερή Gcn4;..... 191
- ☛ Μεταλλαγμένα Gcn4 ομοδιμερή και μη συμμετρικοί στόχοι..... 194

- ☛ Μεταβολές στη δομή του διμερούς Gcn4, επαγόμενες απο τη δέσμευση σε DNA στόχο..... 196

β) Παράμετροι ενεργοποίησης.

- ☛ Gcn5, Ada2 και ο DNA στοχος 202
- ☛ Το στοιχείο TATA..... 203

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Συζήτηση των αποτελεσμάτων που καταγράφονται στα Κεφάλαια 7 και 8. Συμπεράσματα, και προοπτική.

- ☛ Με πόσους τρόπους επιδρά η πρωτεΐνη Gcn4 στην μεταγραφική μηχανή του κυττάρου;..... 207
- ☛ Τα δυο μονομερή που απαρτίζουν το διμερές Gcn4 δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμα..... 209
- ☛ Η φύση του DNA στόχου επάγει μεταβολές στη δομή του διμερούς Gcn4..... 217
- ☛ Αποτελεί η πρωτεΐνη Aft1 συστατικό εναλλακτικού τρόπου επικοινωνίας του ενεργοποιητή Gcn4 με τη μεταγραφική μηχανή;..... 220
- ☛ Μονοκατευθυντική ενεργοποίηση απο συμμετρικό ενεργοποιητή;..... 223

IV) ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 226

- A)** Μια εναλλακτική μέθοδος κλωνοποίησης επικρατών αλληλόμορφων, γονιδίων του σακχαρομύκητα..... 227
- B)** Οι πλασμιδιακοί φορείς..... 232
- Γ)** Τα ολιγονουκλεοτίδια..... 234
- Δ)** Οι πλασμιδιακοί κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν..... 236
- Ε)** Οι συντμήσεις..... 258
- ΣΤ)** Ενα μικρό λεξικό όρων..... 260

V) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 263

- A)** Αναφορές..... 264
- B)** Δημοσιεύσεις..... 293



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

&

ΕΝΗΓΗΣΕΙΣ



ΤΡΕΙΣ ΣΕΛΙΔΕΣ ΧΩΡΙΣ ΤΙΤΛΟ

Κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου εκτός απο την ενασχόληση με τη Μοριακή Βιολογία, είχα την ευκαιρία να γνωρίσω και αρκετούς ανθρώπους. Μερικοί απ' αυτούς έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση μου ως επιστήμονα αλλά και με βοήθησαν να τα καταφέρω σ' αυτά τα πέντε χρόνια που πέρασα στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Ειλικρινά θεωρώ πως η γνωριμία μου μαζί τους είναι πιο πολύτιμη απο τον τίτλο που απόκτησα. Αυτούς τους ανθρώπους αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω στις σελίδες αυτές.

Ο Γιώργος Θηραΐος μου έκανε την μεγάλη-οπως διαπίστωση αργότερα-τιμή να μου προτείνει να κάνω το διδακτορικό μου στο εργαστήριο του. Η απόφαση μου τότε, βασίστηκε σε ένα και μόνο δεδομένο, μια που το μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* που ήταν το πειραματικό μου υλικό, ούτε ονομαστικά δεν τον ήξερα τότε. Το δεδομένο αυτό ήταν η εντυπωσιακή ικανότητα του Γιώργου να προσεγγίζει επιστημονικά ερωτήματα, και να με εκπλήσει με τους εναλλακτικούς τρόπους που είχε για να παρουσιάζει και να ερμηνεύει διάφορα θέματα-όχι μόνο επιστημονικά. Μια που η δουλειά μου στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου, απορρόφησε σχεδόν όλο το χρόνο που είχα στη διάθεση μου, αυτό το κριτήριο αποδείχτηκε καθοριστικό. Η επίδραση του Γιώργου ως επιστήμονα, στη σκέψη μου ήταν καταλυτική και αν μπορώ να ισχυριστώ οτι σ' αυτά τα χρόνια απέκτησα κι εγώ την ικανότητα να σκέφτομαι κριτικά πάνω σε βιολογικά ζητήματα, το οφείλω σ' αυτόν. Θέλω λοιπόν απο 'δω να τον ευχαριστήσω αν και ξέρω ότι αυτό δεν είναι αρκετό για να εκφράσω την εκτίμηση μου. Η βοήθεια του στα πιο κρίσιμα σημεία του διδακτορικού αλλά και της ζωής μου ήταν πάντα ουσιαστική, χωρίς καθόλου να είναι κραυγαλέα και οι λύσεις που πρότεινε αποδεικνυόντουσαν οι πιο κατάλληλες. Με τον άνθρωπο Γιώργο είχα πάντα την ευκαιρία να συζητώ για διάφορα θέματα, από φιλοσοφικά και κοινωνικά, μέχρι για ανιαρές καθημερινές καταστάσεις. Μέσα από αυτές τις συζητήσεις διαπίστωνα την ευαισθησία και την προσοχή με την οποία αντιλαμβανόταν τα διάφορα θέματα. Αν και συνεχώς εγώ είχα μια διάθεση αντίρρησης, κατέληγα να λέω τις περισσότερες φορές: "Σωστά"!! Για όλα τα παραπάνω, εύχομαι μόνο να έχω την ευκαιρία να αλληλεπιδρώ μαζί του και στα χρόνια που θα 'ρθουν.

Η Δέσποινα Αλεξανδράκη ήταν ο πρώτος άνθρωπος απο το Ινστιτούτο που γνώρισα όταν είχα έρθει για τις εισαγωγικές εξετάσεις. Χωρίς την παρέμβαση της τότε,

δεν θα μου δινόταν η ευκαιρία να συμμετάσχω σ' αυτές αφού ήμουν εντελώς εκπρόθεσμος! Αν δεν γινόταν αυτό ίσως ποτέ να μην είχα αρχίσει διδακτορικό. Πέρα απ' αυτό όμως η Δέσποινα ήταν ένας άνθρωπος πάντα πρόθυμος να βοηθήσει με τις συμβουλές της σε περιόδους που τα πράγματα δεν πήγαιναν καλά. Η Δέσποινα ακόμα, λόγω της συμμετοχής της στο πρόγραμμα Yeast Sequencing, βοήθησε στο να αποκτηθούν μερικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται μέσα σ' αυτή τη δατριβή. Για όλα αυτά άλλα και για την κριτική της στάση απέναντι στη σχέση επιστήμης και ζωής, θέλω να την ευχαριστήσω. Υπήρξαν αρκετές φορές που κατέφυγα σ' εκείνες τις απόψεις της, όταν ερχόντουσαν στιγμές έντονης αμφισβήτησης των επιλογών μου.

Ο Κίτσος Λούης και ο Σήφης Παπαματθαϊάκης ήταν οι καθηγητές που μαζί με το Γιώργο, έκριναν τη δουλειά μου ως μέλη της τριμελούς μου επιτροπής. Εκτός απ' αυτό, στις λίγες φορές που είχα την ευκαιρία να συζητάω μαζί τους, διαπίστωνα πάντα την προθυμία τους να προσφέρουν βοήθεια και κουράγιο που σίγουρα έκανε τις δυσκολίες να φαίνονται μικρότερες. Το ίδιο ισχύει και για το Νίκο Μοσχονά. Χαίρομαι που δέχτηκε την τελευταία στιγμή να είναι μέλος της επταμελούς επιτροπής μου. Θέλω λοιπόν να τους ευχαριστήσω και να ζητήσω την κατανόηση του Κίτσου αν διαπιστώσει την έλλειψη αρκετών τόνων στο κείμενο!

Με το Νίκο Πανόπουλο και το Χρήστο Δελιδάκη είχα την τύχη να γνωριστώ στην τελευταία περίοδο του διδακτορικού μου. Τους ευχαριστώ για τη διάθεσή τους να είναι μέλη της επταμελούς μου επιτροπής αλλά και για την υπομονή που σίγουρα θα έδειξαν κατά τη διόρθωση του κειμένου. Τον Πόλυ Χατζόπουλο τον γνώριζα μόνο μέσα από τις διηγήσεις του Κίτσου και του Γιώργου. Τον ευχαριστώ που χωρίς να με ξέρει καθόλου δέχτηκε να είναι μέλος της επταμελούς μου επιτροπής και να ταξιδέψει στο Ηράκλειο για το λόγο αυτό.

Αρκετά από τα πιο συναρπαστικά κατά τη γνώμη μου, πειράματα που έκανα αυτά τα χρόνια δε θα γινόταν χωρίς την βοήθεια του Δημήτρη Τζαμαριά. Ο Δημήτρης αποτέλεσε το άλλο άκρο της αερογέφυρας ανάμεσα στο Ηράκλειο και τη Βοστώνη, στέλνοντας υλικά και πληροφορίες που αρκετές φορές μας έλυσαν τα χέρια. Το λιγότερο που μπορώ να κάνω είναι να τον ευχαριστήσω.

Με τον Αλέξανδρο Αργυροκαστρίτη, το Δημήτρη Καφετζόπουλο, το Νίκο Κυρπίδη, τον Πέτρο Λιόδη, το Γιάννη Παπανικολάου το Γιώργο Χατζηδάκη και τη Χριστιάνα Χουλιάκη όχι μόνο έκανα παρέα αλλά και συνεργάστηκα σε αρκετές περιπτώσεις. Ήταν οι φίλοι στο περιβάλλον της δουλειάς και οι άνθρωποι που πάντα

βοηθούσαν να φαίνεται η ζωή καλύτερη απ' ότι εγώ πίστευα. Το ότι τους αναφέρω όλους μαζί με αλφαβητική σειρά, καθόλου δε σημαίνει ότι η προσφορά τους ήταν ασαφής. Καθένας απ' αυτούς έπαιξε ένα ιδιαίτερο ρόλο χωρίς τον οποίο πολλά πράγματα δε θα είχαν γίνει. Πιο πολύ απ' όλα χαίρομαι γιατί η διαδικασία του διδακτορικού, μου έδωσε την ευκαιρία εκτός απο τον τίτλο να αποκτήσω αυτούς τους φίλους στους οποίους ξέρω ότι θα μπορώ πάντα να υπολογίζω. Τους ευχαριστώ.

Το κείμενο που κρατάτε στα χέρια σας το επιμελήθηκε, το διόρθωσε αλλά και δακτυλογράφησε μεγάλο μέρος του, η Νεκταρία Κελαϊδή. Χωρίς τη βοήθεια της δε νομίζω ότι θα είχα ποτέ καταφέρει να το γράψω μόνος μου και μάλιστα σ' αυτή τη μορφή. Ακόμα περισσότερο η Νεκταρία όλα αυτά τα χρόνια ήταν μια όμορφη παρουσία που με την ηρεμία και τη διάθεση της κατόρθωνε να κάνει και τα δυσκολότερα προβλήματα να φαίνονται ασήμαντα. Τελειώνοντας λοιπόν την ευχαριστώ.

Και κάτι τελευταίο: Οσο κι αν φαίνεται παράξενο, αυτά που γράφω εδώ τα εννοώ!



ΕΞΗΓΗΣΕΙΣ

Κατά το ξεκίνημα της συγγραφής του διδακτορικού αντιμετώπισα την εξής δυσκολία: Η διατριβή αφορούσε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς μηχανισμούς, την μετάφραση και την μεταγραφή. Το εξεταζόμενο γονίδιο ήταν πάντα το GCN4, μέσα στο γενικότερο πλαίσιο της απόκρισης του συστήματος του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων του σακχαρομύκητα, στη διαθεσιμότητα αμινοξέων στο περιβάλλον. Επρεπε λοιπόν η πληροφορία που αποκτήθηκε να καταγραφεί με τρόπο που να γίνεται φανερή η συσχέτιση και η αλληλεξάρτηση των δυο μηχανισμών, που υφίσταται προκειμένου να ενορχηστρωθεί μια τέτοια απόκριση. Έτσι η παρουσίαση οργανώθηκε σε εννέα κεφάλαια, για των οποίων τη δομή και το περιεχόμενο αισθάνομαι την ανάγκη να δώσω μερικές εξηγήσεις:

Στο **πρώτο** περιγράφονται οι πειραματικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν με σκοπό να αποκτηθούν τα δεδομένα που αναφέρονται στη διατριβή. Οι μέθοδοι αυτές δίνονται με σειρά που αντανακλά τη πρακτική σχέση μεταξύ τους και όχι την εμφάνισή τους στο κείμενο. Επίσης στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται και πληροφορίες σχετικές με τα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τις συνθήκες που αυτοί αναπτύχθηκαν.

Το **δεύτερο** κεφάλαιο αποτελεί την κύρια εισαγωγή στο θέμα της διατριβής. Στην πρώτη ενότητα αναπτύσσονται μερικές φιλοσοφικές μου ανησυχίες πάνω στο θέμα της γονιδιακής ρύθμισης και για τις οποίες ζητώ κατανόηση. Επίσης σκιαγραφείται το σύστημα του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων του σακχαρομύκητα. Στη δεύτερη ενότητα γίνεται μια ανασκόπηση της υπάρχουσας πληροφορίας που σχετίζεται με τον έλεγχο της μετάφρασης του GCN4 mRNA και υπογραμμίζονται τα σημεία εκείνα που έχουν σχέση με δραστηριότητα του δικού μας εργαστηρίου. Ακόμα καταγράφονται τα ερωτήματα προς τα οποία στράφηκε η πειραματική προσέγγιση του μηχανισμού μεταφραστικής ρύθμισης του γονιδίου GCN4.

Στο **τρίτο** και **τέταρτο** κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν σχετικά με τη μετάφραση του GCN4 mRNA.

Τα αποτελέσματα αυτά αλλά και οι προεκτάσεις τους συζητούνται στο **πέμπτο** κεφάλαιο, όπου γίνεται προσπάθεια να εξαχθούν μερικά συμπεράσματα που να διαφωτίζουν περισσότερο το μηχανισμό της μεταφραστικής ρύθμισης του GCN4.

Το **έκτο** κεφάλαιο αποτελεί την εισαγωγή στο μηχανισμό της μεταγραφής. Το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα μοντέλου, έχει εδώ η πρωτεΐνη Gcn4. Αναλύεται επίσης η σημασία και ο ρόλος των πρωτεϊνών διαμεσολαβητών και επισημαίνονται τα ερωτήματα που μας απασχόλησαν σχετικά με το πως η πρωτεΐνη Gcn4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή.

Τα δεδομένα που συσσωρεύτηκαν κατά την προσπάθεια προσέγγισης των παραπάνω ερωτημάτων, παρουσιάζονται στα δυό επόμενα κεφάλαια, το **έβδομο** και το **όγδοο**.

Η ανάλυση και η ερμηνεία που δίνουμε στα αποτελέσματα αυτά καταγράφεται στο **έννατο** κεφάλαιο.

Στο **παράρτημα** παρουσιάζεται μια νέα μέθοδος κλωνοποίησης επικρατών αλληλόμορφων στο σακχαρομύκητα, που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της προσπάθειας απομόνωσης ενός γονιδίου που πιθανά κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό διαμεσολαβητή. Επίσης αναφέρονται οι πλασμιδιακοί φορείς, οι κατασκευές και τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για να διεξαχθούν ορισμένα πειράματα. Τελος διευκρινίζονται ορισμένες συντμήσεις και ξενόγλωσσοι όροι που υπάρχουν στο κείμενο.

Σχετικά με τη **βιβλιογραφία**: Οι **αναφορές** είναι διαταγμένες αλφαβητικά και στο κείμενο εμφανίζονται οι αριθμοί που τους αντιστοιχούν. Σημειώνονται επίσης οι **δημοσιεύσεις** αποτελεσμάτων του διδακτορικού που έχουν εμφανιστεί ή θα εμφανιστούν σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά.

Όσον αφορά τις συνθήκες καταστολής ή αποκαταστολής του συστήματος βιοσύνθεσης των αμινοξέων: Επειδή ο σακχαρομύκητας έχει την ικανότητα να συνθέτει όλα τα αμινοξέα, ουσιαστικά δεν αποκαταστέλει πλήρως το σύστημα βιοσύνθεσης των αμινοξέων όταν αυτά απουσιάζουν μόνιμα από το θρεπτικό μέσο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την πλήρη αποκαταστολή, ο αναστολέας της σύνθεσης της Ιστιδίνης, 3-AT (Παραπάνω εξηγήσεις στο κεφάλαιο 3). Συνθήκες σχεδόν πλήρους καταστολής, επιβλήθηκαν με χρήση ελάχιστου θρεπτικού μέσου (Min, Κεφάλαιο 1).

Κάτι τελευταίο σχετικά με την τρέχουσα ονοματολογία στο σακχαρομύκητα, όπως αυτή εφαρμόζεται στο κείμενο. Με παράδειγμα το GCN4:

- GCN4:** Το γονίδιο.
gen4-n: Υπολειπόμενη μεταλλαγή στο γονίδιο GCN4 (n: φυσικός αριθμός).
GCN4-n: Επικρατής μεταλλαγή στο γονίδιο GCN4.
Δgen4: Ελλειψη του γονιδίου GCN4 από το γένωμα.
Gcn4: Η πρωτεΐνη-προϊόν, του γονιδίου GCN4.

Θα διαπιστώσετε ίσως, ότι το ύφος της γραφής δεν είναι αυστηρά τεχνικό. Κάτι τέτοιο πιστεύω πως βοηθά και στο διάβασμα και στην κατανόηση του κειμένου. Για το λόγο αυτό διακινδύνεψα τη χρήση του, από κάποιο άλλο πιθανά σοβαρότερο που τελικά θα ήταν απλώς σοβαροφανές.



ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ.....



ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ

A) Περίληψη

Το γονίδιο GCN4 του σακχαρομύκητα κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που έχει λειτουργία μεταγραφικού ενεργοποιητή και αποτελεί κόμβο του ομοιοστατικού μηχανισμού που ρυθμίζει τα επίπεδα αμινοξέων του κυττάρου. Η έκφραση του γονιδίου αυτού ρυθμίζεται στο επίπεδο της μετάφρασης του μυνήματός του. Σε συνθήκες επάρκειας αμινοξέων το μήνυμα δεν μεταφράζεται με τρόπο που να οδηγεί στη σύνθεση Gcn4 πρωτεΐνης. Όταν ένα ή περισσότερα αμινοξέα λείψουν από το θρεπτικό μέσο, η μετάφραση του μυνήματος αυτού τροποποιείται έτσι ώστε να συντίθεται με αυξημένο ρυθμό η πρωτεΐνη Gcn4. Η απόκριση του κυττάρου στην έλλειψη αμινοξέων μπορεί να αναλυθεί σε δύο διακριτά στάδια με κριτήρια και ποιοτικά και ποσοτικά. Στην αρχή της απόκρισης συμβαίνει έντονη και απότομη αύξηση της σύνθεσης της πρωτεΐνης Gcn4 η οποία στη συνέχεια ισορροπεί σε ένα αρκετά χαμηλότερο σταθερό επίπεδο εφ' όσον η κατάσταση έλλειψης αμινοξέων παραμείνει.

Όσον αφορά το δεύτερο στάδιο της διατήρησης της σύνθεσης της πρωτεΐνης Gcn4 σε σταθερά επίπεδα σε συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης αμινοξέων, βρέθηκε ότι συμμετέχουν τα προϊόντα των γονιδίων GCN2 και SUI2 που είναι η κινάση Gcn2 και ο παράγοντας eIF2α αντίστοιχα. Το πρώτο στάδιο της απότομης και έντονης αλλά παροδικής αύξησης της σύνθεσης Gcn4 είναι ανεξάρτητο από την ύπαρξη Gcn2 αλλά και μεταλλαγών του eIF2α που παρεμποδίζουν τη διεξαγωγή του δεύτερου σταδίου. Ανεξάρτητη από αυτά τα δυο είναι επίσης και η επαγωγή της σύνθεσης Gcn4 εξ' αιτίας υπερέκφρασης γονιδίων για tRNAs και συγκεκριμένα ενός tRNA^{val} που είναι μεταλλαγμένο ώστε να μην μπορεί να συνδεθεί με το αμινοξύ, και ενός κανονικού tRNA^{ser}. Ιδιο αποτέλεσμα στην έκφραση του GCN4 έχει η υπερέκφραση του μικρού RNA που αποτελεί συστατικό της ριβονουκλεάσης MRP η οποία εμπλέκεται στην ωρίμανση των ριβοσωμικών RNAs και στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA. Το RNA αυτό κωδικοποιείται από το γονίδιο NME1. Η υπερέκφραση του γονιδίου SUI3 που κωδικοποιεί για τη β υπομονάδα του παράγοντα eIF2, επίσης αυξάνει την παραγωγή Gcn4 ανεξάρτητα από την ύπαρξη Gcn2 ή μεταλλαγών στην υπομονάδα του. Επομένως είναι δυνατή η μεταφραστική ενεργοποίηση του GCN4 και ανεξάρτητα από τη διαθεσιμότητα αμινοξέων. Ο μηχανισμός που ελέγχει τη μετάφραση του GCN4 μυνήματος αποδεικνύεται ευαίσθητος σε μεταβολές που

αφορούν τη μεταφραστική μηχανή. Τέτοιες μεταβολές προκαλούνται και από ενεργοποίηση της απόκρισης RAS. Η ενεργοποίηση του τελεστή της απόκρισης αυτής που είναι η κινάση πρωτεϊνών TPΚ, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης Gcn4. Τα αποτελέσματα αυτών των υπερέκφρασεων θα πρέπει να οφείλονται σε μηχανισμό κοινό μ' αυτόν της αρχικής, παροδικής απόκρισης στην έλλειψη αμινοξέων και θα αποτελέσουν πιθανό τρόπο προσέγγισης του.

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Gcn2 και η φωσφορυλίωση του eIF2α απ' αυτήν, εκτός από τη διατήρηση της σχετικά υψηλής σύνθεσης Gcn4, δεν έχει άλλα εμφανή αποτελέσματα στη γενικότερη πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου. Εξετάστηκε το ενδεχόμενο αυτή η διαδικασία να αφορά ειδικά το γονίδιο GCN4, μέσω εντοπισμένης δράσης της κινάσης Gcn2. Η πρώτη γενετική προσέγγιση του ερωτήματος συσώρευσε ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι αυτό είναι πιθανό.

Το διμερές Gcn4 λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής των γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αμινοξέων αλλά και κάποιων νουκλεοτιδίων. Για να ενεργοποιήσει τα γονίδια αυτά στο μέγιστο δυνατό βαθμό απαιτούνται και πρωτεΐνες που αποκαθιστούν επαφή και επικοινωνία ανάμεσα σ' αυτό και την βασική μεταγραφική μηχανή του κυττάρου. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι Gcn5, Ada2 και Ada3. Η έλλειψη παρόλα αυτά των αντίστοιχων γονιδίων δεν καταργεί την μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω Gcn4 αλλά την εξασθενεί περίπου στο μισό. Συνεπώς υπάρχει και άλλος τρόπος επίδρασης του Gcn4 στη βασική μεταγραφική μηχανή. Η υπερέκφραση του GCN4 γονιδίου εκτός του να οδηγεί στην αναμενόμενη ισχυρή ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφής αρκετών άλλων γονιδίων τα οποία δεν ελέγχονται καθόλου απ' αυτό. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίστηκε ως ένα τυπικό παράδειγμα τιτλοδότησης βασικών μεταγραφικών παραγόντων και αποτελεί κοινή ιδιότητα ισχυρών μεταγραφικών ενεργοποιητών. Η τιτλοδότηση αυτή αναιρείται με ταυτόχρονη υπερέκφραση του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIIB υποδεικνύοντας ότι ο παράγοντας αυτός αποτελεί το τιτλοδοτούμενο μόριο. Σε συνθήκες υπερέκφρασης του GCN4 ο TFIIIB συγκεντρώνεται στους υποκινητές γονιδίων που ελέγχονται από Gcn4 και επομένως μειώνεται η διαθεσιμότητα του σε υποκινητές άλλων γονιδίων.

Η έλλειψη των γονιδίων GCN5 και ADA2 εξασθενεί επίσης και αυτό το φαινόμενο τιτλοδότησης χωρίς όμως να το καταργεί. Θεωρήθηκε ότι η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών σακχαρομύκητα στα οποία αναιρείται ή εξασθενεί η τιτλοδότηση, θα έχει ως αποτέλεσμα την αποκάλυψη και άλλων πρωτεϊνών εκτός από τις Gcn5, Ada2 και Ada3 που διαμεσολαβούν για την μεταγραφική

ενεργοποίηση μέσω Gcn4. Ο χαρακτηρισμός της γενωμικής μεταλλαγής AFR1-1 έδειξε ότι αυτή πληρεί τα κριτήρια για μεταλλαγή σε πρωτεΐνη διαμεσολαβητή. Επειδή η μεταλλαγή αυτή είναι επικρατής, αναπτύχθηκε ένας εναλλακτικός τρόπος κλωνοποίησης του αντίστοιχου γονιδίου. Καταστολείς σε υπερέκφραση, της μεταλλαγής αυτής οδήγησαν στην αναγνώριση του γονιδίου που φέρει το αναγνωστικό πλαίσιο NO320 του δεκάτου τετάρτου χρωμοσώματος του σακχαρομύκητα το οποίο έχει σημαντική ομοιότητα με το γονίδιο ROX1.

Το διμερές Gcn4 δεσμεύεται σε ψευδοπαλίνδρομο DNA στόχο. Η μελέτη του μηχανισμού με το οποίο το Gcn4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή έδειξε ότι τα δύο μονομερή που απαρτίζουν το διμερές δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμα. Αυτό που βρίσκεται δεσμευμένο στο αριστερό μέρος της αλληλουχίας στόχου, επιδρά με τη βασική μεταγραφική μηχανή μέσω των πρωτεϊνών Gcn5 και Ada2 ενώ το δεξί με άλλο μηχανισμό, πιθανώς μέσω της πρωτεΐνης Aft1. Υπάρχει μεταβολή της δομής της πρωτεΐνης Gcn4 επαγόμενη από τη δέσμευση της στο DNA. Δέσμευση της σε στόχο που φέρει ένα ατελές ήμισυ έχει ως συνέπεια τη λειτουργική αχρήστευση του αντίστοιχου, συνδεδεμένου στο ήμισυ αυτό, μονομερούς. Η γωνία-φάση του DNA στοιχείου TATA σε σχέση με το Gcn4 DNA στόχο, επίσης επιδρά στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Ο συνδιασμός των παρατηρήσεων αυτών προτείνεται ότι μπορεί να ερμηνεύσει τη μονοκατευθυντική δράση ενός κατά τ'άλλα συμμετρικού διμερούς μεταγραφικού ενεργοποιητή. Πραγματικά τα ελεγχόμενα από την Gcn4 πρωτεΐνη, γονίδια δεν φέρουν στις περισσότερες περιπτώσεις ιδανικά ψευδοπαλίνδρομους DNA στόχους στους υποκινητές τους. Είναι δε σημαντικό να μην επεκτείνεται η δράση της πρωτεΐνης αυτής στη ρύθμιση της έκφρασης πολύ γειτονικών, αλλά κατά τ'άλλα μη ελεγχόμενων από αυτή, γονιδίων.



B) Summary

The GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* codes for a transcriptional activator that participates in the regulation of the intracellular aminoacid levels. This gene is itself regulated at the level of translation. Under conditions of aminoacid availability in the medium, the message of the gene is not translated in a Gcn4 producing manner. However when the medium is depleted for one or more aminoacids the translation of this message is modified so as to allow Gcn4 synthesis. The cellular response to aminoacid starvation can be dissected into two qualitatively and quantitatively different steps. A transient and acute increase of Gcn4 synthesis occurs early in the response that declines to a lower steady level during prolonged aminoacid starvation.

The Gcn2 protein kinase and the translation factor eIF2 α which are encoded by the GCN2 and SUI2 genes respectively participate in the response to prolonged starvation. The initial transient and acute response is however independent of the presence of the GCN2 gene and of mutations in the SUI2 gene that block the second phase of the response. In addition the induction of Gcn4 protein synthesis by overexpression of certain tRNA genes is also independent by these two. A mutant tRNA^{val} pseudogene that cannot be loaded with valine and a normal tRNA^{ser} gene induce Gcn4 synthesis in the absence of a functional Gcn2 protein and in certain sui2 mutant backgrounds. The same effect is observed by overexpression of the small RNA component of the Ribonuclease MRP involved in the maturation of ribosomal RNAs and the replication of mitochondrial DNA. This RNA is encoded by the NME1 gene. Overexpression of the SUI3 gene encoding the beta (β) subunit of eIF2 effects an increase in Gcn4 synthesis, independent of Gcn2 and mutations in the alfa (α) subunit. In conclusion the induction in Gcn4 synthesis may occur even when an aminoacid starvation signal is not imposed. The mechanism governing GCN4 mRNA translation proves to be very sensitive to modifications of the translation machinery. Such modifications seem to result by the activation of the RAS response. The activation of the operator of this response which is the protein kinase TPK also results in Gcn4 synthesis increase. All these effects should share a common basis with the initial transient response to aminoacid starvation and should thereby facilitate the dissection of the mechanism involved.

The activation of the Gcn2 kinase and the concomitant phosphorylation of the eIF2 α subunit by this protein does not result in any pronounced effects in the general protein synthesis of the cell. The possibility that this process is restricted to

the GCN4 message by the localised action of Gcn2, was investigated. A preliminary genetic approach indicated that this is a probable situation.

The Gcn4 dimer functions as a transcriptional activator of the genes encoding amino acid and purine biosynthetic enzymes. Other auxiliary proteins such as Gcn5, Ada2 and Ada3 are needed in order to obtain full activation capacity by Gcn4. These proteins are termed adaptors or cofactors and are thought to establish a productive connection between the activator and the basic transcription machinery. However deletion of the respective genes does not abolish the Gcn4 dependent activation but suppresses it to about half the normal levels. This implies the existence of additional means to connect an activator to the basic transcription factors. Apart from the expected strong activation of the target genes, overexpression of the GCN4 gene also severely reduces the transcription of otherwise unrelated genes. This “squenching” effect is typical of titration of basic transcription factors by an activator protein and is common to strong activators. In the case of the Gcn4 activator, co-overexpression of the general transcription factor TFIIB relieves titration indicating that this factor is the titrated molecule. TFIIB is sequestered to Gcn4 target promoters under conditions of GCN4 overexpression, thereby its availability to other gene promoters is reduced.

Deletion of the GCN5 and ADA2 genes also reduces but does not abolish the titration effect. The generation of mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains that reduce or suspend this effect should facilitate the identification of proteins additional to Gcn5, Ada2 and Ada3 that link Gcn4 to the basic transcription machinery. The characterisation of the AFR1-1 genomic mutation demonstrated that it fulfils the criteria to reside in a putative adaptor protein. An alternative approach was developed to clone the gene corresponding to this dominant mutation. High copy suppressors of the AFR1-1 mutation identified a gene containing the ORF NO320 of the fourteenth chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* that is similar to the ROX1 gene.

The Gcn4 dimer binds a pseudopalindrome DNA target. A study of the Gcn4 mediated activation mechanism demonstrated that the monomers forming the dimer are not functionally equivalent. The one bound to the left half side of the target is linked to the basic transcription machinery via Gcn5 and Ada2 whereas the right bound monomer via other means possibly involving the Afr1 protein. Binding of Gcn4 to DNA induces a conformational change in the structure of the molecule. When a Gcn4 dimer is bound to a DNA target containing an imperfect half site, the monomer attached to that site is functionally incapacitated. The phase angle of

the TATA DNA element with respect to the Gcn4 DNA target does also affect Gcn4 mediated transcriptional activation. The totality of these observations suggests a model for the unidirectional action of a symmetric dimeric transcriptional activator. Indeed the Gcn4 regulated genes very rarely contain optimal Gcn4 pseudopalindromic DNA targets in their promoters. In addition it is a primary concern that the action of Gcn4 is not interfering with the expression of neighbouring but otherwise unrelated genes.



ΕΚΤΕΝΕΣΤΕΡΑ.....

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Υλικά και πειραματικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι και οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται με σειρά που αντιστοιχεί στη μεταξύ τους σχέση.

Τα στελέχη.

Τα βακτηριακά στελέχη της *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν:

DH5a με γενότυπο: *F'endA1, hsdR 17,supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA1, Δ(lacZYA-argF)*.

HB101 με γενότυπο: *pro, leu, thi, lacY, hsdS20, endA, recA, rpsL20, ara14, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44, mcrB*.

Τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν:

S288C: *gal2, MATa*.

RH1168: (wt, Φυσιικός τύπος): *MATa, ura3-52, leu2-1, gal2*.

wt/9Z: *ura3::GCN4LacZ, leu2-1*, ισογενές του wt.

gcn1: *gcn1-14, ura3-52*, ισογενές του wt.

gcn2: *gcn2-11, ura3-52*, ισογενές του wt.

gcn3: *gcn3-1, ura3-52*, ισογενές του wt.

gcn4: *gcn4-1, ura3-52*, ισογενές του wt.

gcn5: *Δgcn5, ura3-52, leu2-2, trp1-3*, ισογενές του wt.

ada2: *Δada2, ura3-52, leu2-2, trp1-3*, ισογενές του wt.

FYH: *ura3-52, leu2-2, trp1-3, MATa*.

ada2/L9FT5: *Δada2, LexA:HIS3, ura3-52, leu2-2, trp1-3*, ισογενές του *FYH*.

Δgcn4: *Δgcn4, ura3-52, leu2-2, trp1-3*, ισογενές του *FYH*.

ada2/gcn5: *Δada2, Δgcn5, ura3-52, leu2-2, trp1-3*, ισογενές του *FYH*.

ada2/gcn4: *Δada2, Δgcn4, ura3-52, leu2-2, trp1-3*, ισογενές του *FYH*.

sui2;ala: *sui2::S51-A, ura3-52*, ισογενές του *wt/9Z*.

sui2;1: *sui2Δ293-304, ura3-52*, ισογενές του *wt/9Z*.

sui2;9: *sui2Δ288-291, ura3-52*, ισογενές του *wt/9Z*.

gcn2/sui2;ala: *Δgcn2, sui2::S51-A, ura3-52*, ισογενές του *wt/9Z*.

gcn2/sui2;1: *Δgcn2, sui2Δ293-304, ura3-52*, ισογενές του *wt/9Z*.

gcn2/sui2;9: *Δgcn2, sui2Δ288-291, ura3-52*, ισογενές του *wt/9Z*.

gcn2/hts1: *Δgcn2, hts1, leu2-2*, ισογενές του *wt*.

gcn2/gcn4: *Δgcn2, Δgcn4, leu2-2*, ισογενές του *wt*.

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν.

LB 1lt

10gr NaCl

5gr Yeast Extract

10gr Tryptone

LB-amp

LB συμπληρωμένο με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100γ/ml

Min 1lt

6.7gr Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

20gr Glucose

Min-AT

Min συμπληρωμένο με 10mM 3-αμινο-τριαζόλη, Το 3-AT συναγωνίζεται το ένζυμο, που κωδικοποιείται από το γονίδιο HIS3 του βιοσυνθετικού μονοπατιού της Ιστιδίνης.

Min-AA

Min συμπληρωμένο με αμινοξέα στις παρακάτω συγκεντρώσεις (σε mM):

Αργινίνη	0.15	Θρεονίνη	2.00
Μεθειονίνη	1.00	Ασπαρτικό οξύ	1.00
Λευκίνη	2.00	Γλουταμίνη	1.00
Λυσίνη	1.50	Αλανίνη	1.00
Ισολευκίνη	0.75	Γλυκίνη	1.00
Βαλίνη	2.50	Κυστεΐνη	10.00
Φαινυλαλανίνη	0.75	Τυροσίνη	0.50
Γλουταμινικό οξύ	1.05	Κυστεΐνη	0.20
Τρυπτοφάνη	0.40	Σερίνη	2.00
Ιστιδίνη	0.40	Ασπαραγίνη	1.00
Προλίνη	1.00		

YEP 1lt

10gr Yeast Extract

10gr Peptone

20gr Glucose

Μέθοδοι χειρισμού των μορίων του DNA για την δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών.**1) Πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού.**

Μιά τυπική αντίδραση υδρόλυσης με ενδονουκλεάση περιορισμού περιέχει συνήθως DNA σε συγκέντρωση 100-500 ng/λ και ενδονουκλεάση περιορισμού απο 1 έως 5 μονάδες/γ DNA. Η αντίδραση διαρκεί 1-2 ώρες στη θερμοκρασία και στο διάλυμα που το ένζυμο έχει τη μέγιστη ενεργότητα σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας²⁶⁰.

2) Χρησιμοποίηση των εξωνουκλεασών Bal31 και ExoIII για την κατασκευή ελλείψεων σε μόρια DNA.

α) Η αντίδραση με την εξωνουκλεάση Bal31, περιέχει 5-10γ γραμμικού DNA, 200-1000 μονάδες ενζύμου/γ DNA και γίνεται σε διάλυμα :

12 mM CaCl₂

0.2M NaCl

20mM Tris-HCl pH 8

1mM EDTA

Ο χρόνος της αντίδρασης εξαρτάται απο το μήκος της ακολουθίας που επιθυμείται να αφαιρεθεί.

β) Η εξωνουκλεάση ExoIII υδρολύει αποτελεσματικά και ελεγχόμενα, μόρια γραμμικού DNA με άκρα 5' προεξέχοντα και τυφλά και με δυσκολία 3' προεξέχοντα άκρα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, δημιουργεί ελλείψεις μόνο προς την μία κατεύθυνση του γραμμικού μορίου DNA γιατί το άλλο έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε δέν αναγνωρίζεται απο την εξωνουκλεάση.

3. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

Γραμμικά μόρια DNA κινούνται μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης, υπο την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους των. Η πυκνότητα του πηκτώματος ποικίλει απο 0.6 εως και 1.5 % και καθορίζεται με βάση τα μεγέθη του κάθε δείγματος, ώστε να

επιτυγχάνεται ο μέγιστος δυνατός διαχωρισμός.

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι 1X TBE.

5X TBE περιέχει ανα λίτρο :

Tris base 54gr

Boric acid 27.5gr

EDTA 20ml απο διάλυμα 500mM.

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 1-10 Volts/cm πηκτώματος¹²

4. Κατασκευή τυφλών άκρων.

Χρησιμοποιήθηκε η μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης I (Klenow fragment), είτε η νουκλεάση S1. Το πρώτο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή των 5' προεξεχόντων άκρων ενώ το δεύτερο για την μετατροπή των 3' προεξεχόντων, σε τυφλά.

α) Klenow fragment.

Γραμμικό DNA, σε συγκέντρωση 100ng/λ επωάζεται με το ένζυμο (1-2 μονάδες/λ) παρουσία dNTPs σε τελική συγκέντρωση 50μM. Η αντίδραση γίνεται σε nick διάλυμα:

10X nick

600mM Tris-Cl pH7.5

60mM MgCl₂

10mM DTT

10mg/ml BSA

Η επώαση διαρκεί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου¹².

β) Νουκλεάση S1.

Γραμμικά μόρια DNA σε συγκέντρωση 10-50 ng/λ επωάστηκαν επι 10 λεπτά στους 37 βαθμούς Κελσίου με 100-1000 μονάδες ενζύμου. Η αντίδραση γίνεται σε 1X S1 διάλυμα:

2X S1 b.

0.1M NaAc pH 4.5

2mM ZnAc

10%Glycerol

1mg/ml Calf Thymous DNA.

Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 10mM²⁶⁰.

5. Υδροόλυση των 5' ελεύθερων φωσφορικών ομάδων με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (CIP), (αποφωσφορυλίωση).

Η αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης γίνεται στις εξής δύο περιπτώσεις:

- 1)** Για να αποφευχθεί η κυκλοποίηση του φορέα σε μια αντίδραση συνένωσης
- 2)** Για να ραδιοσημανθεί το 5' άκρο ενός μονόκλωνου ή δίκλωνου μορίου.

Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης γίνεται σε 1x CIP διάλυμα και περιέχει γραμμικό DNA σε συγκέντρωση 100-500 ng/λ και 2-5 μονάδες/γ ένζυμο (CIP).

Η αντίδραση στις περιπτώσεις των 5' εξεχόντων άκρων γίνεται στους 37°C για 30 λεπτά, ενώ στις περιπτώσεις των 3' εξεχόντων άκρων γίνεται για 15 λεπτά στους 65°C και για 15 λεπτά στους 37°C

Προστίθεται SDS σε συγκέντρωση 0.1% και το δείγμα μεταφέρεται στους 65°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του DNA με αιθυλική αλκοόλη.

10X CIP b.

0.5M Tris-Cl pH 9

1mM ZnCl₂

10mM MgCl₂

1mM σπερμιδίνη

6. Απομόνωση μορίων DNA απο πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται, όπως έχει περιγραφεί πιο πάνω, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται αγαρόζη με σημείο τήξης 65°C. Η περιοχή του πηκτώματος που περιέχει τη ζώνη της επιθυμητής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας αφαιρείται απο το υπόλοιπο πήκτωμα και αναμιγνύεται με διπλάσιο όγκο νερού. Προστίθεται οξικό νάτριο pH 4.5 σε τελική συγκέντρωση 0.3M και επιάζεται στους 65°C έως ότου τακεί η αγαρόζη. Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης, η οποία έχει επίσης θερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία και γίνεται vortex για 1 λεπτό. Κατόπιν φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 10.000rpm σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση εκχυλίζεται και πάλι με φαινόλη και τέλος με διαιθυλικό αιθέρα. Το DNA κατακρημνίζεται με αιθυλική αλκοόλη.

7. Συνένωση μορίων DNA με το ένζυμο λιγάση: Διαμοριακή συνένωση φορέα με δεύτερο γραμμικό μόριο:

α) Με 5' προεξέχοντα άκρα.

Τα δύο γραμμικά μόρια, σε μοριακή αναλογία 1 φορέα: 5 εντιθέμενου DNA και με απόλυτη συγκέντρωση φορέα 100-500 ng/λ επωάζονται για 1-2 ώρες στους 15°C με 0.01-0,1 μονάδες (Weiss) T4 DNA λιγάση σε 1X διάλυμα συνένωσης. Στη συνέχεια ο όγκος της αντίδρασης αυξάνεται, έτσι ώστε το DNA να βρίσκεται σε συγκέντρωση 5-10 ng/λ, προστίθενται 1-2 μονάδες λιγάσης και η αντίδραση συνεχίζεται για 2-6 επιπλέον ώρες. Κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης ευνοούνται οι διαμοριακές συνενώσεις, ενώ στο δεύτερο ευνοούνται οι ενδομοριακές (κυκλοποίηση)²⁶⁰.

β) Με 3' προεξέχοντα ή τυφλά άκρα.

Η αντίδραση γίνεται στις ίδιες συνθήκες με την διαφορά ότι δέν αυξάνεται ο όγκος της και χρησιμοποιούνται απο την αρχή 1-2 μονάδες ενζύμου. Το διάλυμα στο οποίο γίνεται η συνένωση περιέχει:

MgCl₂ 10mM

Tris-HCl pH 7.5, 0.5mM

BSA 1mg/ml

DTT 10mM

ATP 1mM

Μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* με πλασμιδιακό DNA.

Το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε απαραίτητως την αλληλουχία *ori* (origin of replication), που επιτρέπει τον αναδιπλασιασμό του μορίου στο βακτήριο και το γονίδιο *Amp^R* που κωδικοποιεί το ένζυμο β λακταμάση η οποία ανενεργοποιεί το αντιβιοτικό. Έτσι σε θρεπτικά μέσα αμπικιλίνης αναπτύσσονται μόνο βακτήρια μετασχηματισμένα ως προς την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό.

Η μέθοδος μετασχηματισμού εκτελείται ως εξής¹²:

Βακτηριακή καλλιέργεια σε λογαριθμική φάση (οπτικής πυκνότητας 0.5-1), ανεπτυγμένη σε LB, φυγοκεντρείται επί 5 λεπτά σε 2.000rpm στους 4°C. Τα κύτταρα πλένονται στην ίδια θερμοκρασία με διάλυμα (όγκου 1/2 του όγκου της καλλιέργειας) που περιέχει:

10mM MOPS pH 7.0

10mM RbCl

Φυγοκεντρώνονται και επαναιωρούνται επι 10 λεπτά στους 4 βαθμούς, στον ίδιο όγκο διαλύματος, που περιέχει:

0.1mM MOPS pH 6.5

50mM CaCl₂

10mM RbCl

Φυγοκεντρώνονται στις ίδιες συνθήκες και επανεωρούνται σε όγκο 1/10 του αρχικού, στο ίδιο διάλυμα. Προστίθεται το DNA και κατόπιν DMSO σε συγκέντρωση 6λ/200λ διαλύματος. Τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο επι 20 λεπτά και κατόπιν μεταφέρονται στους 43°C επι 1.5 λεπτό. Προστίθενται 5ml θρεπτικού υλικού LB και επωάζονται επι 60 λεπτά στους 37°C. Φυγοκεντρώνονται σε θερμοκρασία δωματίου επι 5 λεπτά στις 2.500rpm, και απλώνονται σε τρυβλία LB-άγαρ με αμπικιλίνη. Οι αποικίες των μετασχηματισμένων στελεχών αναπτύσσονται μετά απο επώαση 8-12 ωρών στους 37°C. Ακολουθεί ταυτοποίηση των κλώνων στα μετασχηματισμένα κύτταρα, με παρασκευή πλασμιδιακού DNA και ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα ή με την μέθοδο κατά Grunstein.

Μέθοδοι παρασκευής πλασμιδιακού DNA απο καλλιέργειες βακτηρίων

A). Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Η μέθοδος ενδείκνυται για την απομόνωση και τον έλεγχο με ενζυμική ανάλυση, πλασμιδιακού DNA απο ενα μεγάλο αριθμό διαφορετικών αποικιών²⁶⁰.

1) Αναπτύσσονται καλλιέργειες βακτηρίων σε 2 ml LB-amp για 8-15 ώρες στους 37°C.

2) 1.5 ml βακτηρίων φυγοκεντρείται για ενα λεπτό σε φυγόκεντρο eppendorf.

3) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται σε 0.7 ml STET, το οποίο περιέχει:

8% σουκρόζη

0,5% Triton X-100

50mM EDTA pH 8

10mM Tris-Cl pH 8

4) Προστίθενται 40-50μl λυσοζύμης (10mg/ml) και αμέσως τοποθετείται σε νερό που ήδη βράζει, για 1-1.5 λεπτό.

5) Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 10000rpm.

6) Σε 0.4-0.5 ml απο το υπερκείμενο (απομακρύνονται προσεκτικά απο το ίζημα και τη

φάση της σουκρόζης) γίνεται κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με ισοπροπανόλη¹²⁶. Με την μέθοδο αυτή μπορεί να παρασκευασθεί και μεγαλύτερη ποσότητα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας 250ml καλλιέργειας, 25ml STET και 2ml λυσοζύμη. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 200ml νερό, προστίθεται 10μl RNase A και επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Στην συνέχεια προστίθεται 10μl πρωτεΐνωση K και επωάζεται για 30 λεπτά στους 37 βαθμούς Κελσίου. Το DNA καθαρίζεται μετά απο υπερφυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας CsCl. Η καθαρότητα του δείγματος είναι συγκρίσιμη με της αλκαλικής μεθόδου και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τους ίδιους σκοπούς.

B). Αλκαλική μέθοδος παρασκευής πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη ποσότητα.

Η ποσότητα και η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA που απομονώνεται με την μέθοδο αυτή είναι πολύ σημαντική.

Η μέθοδος εκτελείται όπως περιγράφεται απο τους Sambrook et al (260).

Μεγάλης κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA-Κλίση πυκνότητας CsCl.

Βακτηριακά κύτταρα καλλιεργούνται στους 37 βαθμούς Κελσίου μέχρι τη στατική φάση σε θρεπτικό υλικό LB-Amp όγκου 1lt. Προστίθενται 5ml διαλύματος χλωραμφαινικόλης συγκέντρωσης 34mg/ml και επωάζονται επιπλέον για 8 ώρες. Συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 5000 rpm επί 10 λεπτά και πλένονται με 200ml διαλύματος:

100mm Tris-HCl pH 7.5

100mM NaCl

1mM EDTA.

Επαναιωρούνται σε 20ml διαλύματος που περιείχε:

50mM γλυκόζη

25mM Tris-HCl pH 8

10mM EDTA

Προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 5mg/ml και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα λύνονται σε θερμοκρασία δωματίου επί 10 λεπτά με την προσθήκη 40ml διαλύματος που περιέχει:

1% SDS

0.2M καυστικού νατρίου.

Προστίθενται 30ml 5M Οξικού νατρίου pH 4.8 (60ml 5M Οξικού νατρίου και 11.5ml Οξικού οξέος/100ml), θερμοκρασίας 4 βαθμών και παραμένουν στην ίδια θερμοκρασία επί 30 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm επί 20 λεπτά και το διαλυτό υπερκείμενο αναμιγνύεται με6/10 του όγκου του ισοπροπανόλη. Αφού παραμείνει 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρείται στις 15000 rpm επί 10 λεπτά, το ίζημα πλένεται με 70% αλκοόλη, επαναδιαλύεται σε 9.5ml TE με 200λ 20mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, προστίθενται 9.5gr CsCl και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 45000rpm επί 36 ώρες σε κεφαλή Ti 50 υπερφυγοκέντρου Beckman, ή παρόμοια. Το υπερ-ελικώμενο πλασμίδιο συγκεντρώνεται σε ζώνη μέσα στην κλίση του κεσίου, συλλέγεται, εκχυλίζεται με ισοαμυλική αλκοόλη έως ότου απομακρυνθεί το βρωμιούχο αιθίδιο και κατακρημνίζεται με αιθυλική αλκοόλη²⁶⁰.

Ταυτοποίηση μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων με ανάλυση κατά Grunstein.

Αποικίες μετασηματισμένων βακτηρίων αναπτύσσονται επί 8-12 ώρες στους 37°C σε LB-amp τριβλία. Φίλτρο νιτροκυτταρίνης τοποθετείται στην επιφάνεια του τριβλίου, έτσι ώστε να εφάπτεται των αποικιών, για 1 λεπτό. Το DNA των βακτηρίων αποδιατάσσεται μετά απο εναπόθεση του φίλτρου σε διυθητικό χαρτί το οποίο είναι εμβαπτισμένο με 1.5M NaCl, 0.5M NaOH. Ο χρόνος αποδιάταξης είναι 7 λεπτά. Ακολουθεί εξουδετέρωση με διάλυμα το οποίο περιέχει 1M Tris-Cl pH 8, 1.5M NaCl επί 6 λεπτά. Το φίλτρο υβριδοποιείται με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές¹².

Ραδιοσήμανση μορίων DNA. Κατασκευή ραδιο-ανιχνευτών.

1). Μέθοδος Nick translation.

Η αντίδραση ραδιοσήμανσης περιέχει τα εξής:

Το δίκλωνο DNA (κυκλικό ή γραμμικό) που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής σε συγκέντρωση 5-25 ng/λ, 60 mM Tris-HCl pH 7.5, 6mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1mg/ml BSA, 30 μM dTTP, 30 μM dGTP, 2μl α³²P dATP, 2μl α³²P dCTP, DNase I 0,01 μg/ml, 2 μονάδες E.coli DNA πολυμεράση I.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 20λ και διαρκεί 45-60 λεπτά στους 15°C. Τερματίζεται με την προσθήκη 2λ EDTA 0.5M και τα μή ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια απομακρύνονται με χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης¹⁵¹. Χρησιμοποιείται στήλη Sephadex G-50 όγκου 2ml. Το σημασμένο δείγμα θερμένεται στους

100°C για 3 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA και να γίνει μονόκλωνο και προστίθεται στην αντίδραση της υβριδοποίησης²⁶⁰.

2). Ραδιοσήμανση του 5' άκρου του μορίου.

Γίνεται αποφωσφορυλίωση με το ένζυμο φωσφατάση όπως έχει περιγραφεί και μετά ακολουθεί η αντίδραση φωσφορυλίωσης με την T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση παρουσία $\gamma^{32}\text{P}$ ATP όπως περιγράφεται από τους Maniatis και Dair (260)

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (DNA Sequencing).

Το DNA που χρησιμοποιείται, συνήθως ανασυνδυασμένα πλασμίδια pUC 18, απομονώνεται από κλίση πυκνότητας CsCl ή τις άλλες μεθόδους που αναφέρθηκαν. Εφαρμόστηκε κατ'αποκλειστικότητα η μέθοδος των διεδόξυ-νουκλεοτιδίων²⁶¹.

Πήκτωμα ουρίας- πολυακρυλαμίδης.

Οι διαστάσεις ενός συνηθισμένου πηκτώματος είναι 40cmx15cmx0.1cm.

Περιέχει:

4-6% ακρυλαμίδης-Bis ακρυλαμίδης, σύστασης 38:2

8M Urea σε διάλυμα 1X TBE.

Πολυμερίζεται με την προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου και TEMED σε συγκέντρωση 0.02%. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής ισχύος 30 watt, σε διάλυμα 1X TBE¹².

Μετασχηματισμός στελεχών ζύμης.

Εφαρμόστηκε η μέθοδος επεξεργασίας των κυττάρων με LiCl¹³⁵. Κύτταρα ζύμης καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό YEP (50 ml) μέχρι οπτική πυκνότητα 0.6-0.8 στα 550nm και κατόπιν συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 3.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναιωρούνται σε 20ml TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) και φυγοκεντρώνονται με τον ίδιο τρόπο. Κατόπιν αιωρούνται σε 5 ml διαλύματος 0.5M LiCl επί 30 λεπτά στους 30 βαθμούς Κελσίου. Το LiCl απομακρύνεται με φυγοκέντρωση των κυττάρων και προστίθεται 0.5 ml TE. Επωάζονται στον πάγο για 10 λεπτά και σε 100μl από αυτό το αιώρημα προστίθενται 1-5 γ υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα επωάζεται στην ίδια θερμοκρασία για 10 λεπτά. Ακολουθεί θερμοπληξία των κυττάρων στους 43°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται 1ml διαλύματος 40% PEG (πολυαιθύλενο-γλυκόλης), 0.1M

LiCl σε TE. Μετά απο επώαση 20 λεπτών στους 4°C η PEG απομακρύνεται, τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα 0.8% σορβιτόλης και απλώνονται σε τριβλία με άγαρ και τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα¹⁰³.

Απομόνωση συνολικού RNA απο κύτταρα ζύμης.

Καλλιέργεια κυττάρων ζύμης (100ml), σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm και τα κύτταρα, αφού πλυθούν με 5 ml αποστειρωμένο νερό, επαναιωρούνται σε 2 ml διαλύματος ουρίας-SDS το οποίο περιέχει:

0.35M NaCl

8M Urea

10mM Tris-HCl pH 7.5

10mM EDTA

2% SDS

Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου και ίσος όγκος σφαιριδίων υάλου (glass beads) διαμέτρου 450-500μ. Το δείγμα ανακινείται δυνατά σε vortex επι 2 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρείται στις 4.000rpm επι 5 λεπτά. Η υδατική φάση, επανεκχυλίζεται με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατόπιν μόνο χλωροφόρμιο και το RNA κατακρημνίζεται με αιθυλική αλκοόλη. Η ποιότητα και ποσότητα του RNA που παράγεται με αυτή τη μέθοδο είναι ικανοποιητική¹⁰³. Το RNA αυτό χρησιμοποιείται για ανάλυση κατα Northern.

Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης-φορμαλδεύδης. Ανάλυση Northern.

Το πήκτωμα (200ml) παρασκευάζεται με τήξη 3gr αγαρόζης σε 150ml νερού, ενώ στη συνέχεια προστίθενται 20ml διαλύματος 10X MOPS το οποίο περιέχει ανα lt:

40.86 gr MOPS

4.1 gr άνυδρο NaOAc (οξυκό νάτριο).

20 ml διαλύματος 0.5M EDTA

Το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με NaOH

Το πήκτωμα ψύχεται στους 65°C και τότε προστίθενται 30ml φορμαλδεύδης και χύνεται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, διαστάσεων 13X20cm. Η τάση του πεδίου που εφαρμόζεται είναι 100-150 Volts σε διάλυμα 1X MOPS το οποίο ανακυκλώνεται κατα την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Μετά την ηλεκτροφόρηση επάνω στο πήκτωμα τοποθετείται και ποσότητα

Το RNA μεταφέρεται απο το πήκτωμα σε φίλτρο Gene Screen με την βοήθεια διαλύματος 20X SSC σε 6-12 ώρες. Η διαδικασία για την μεταφορά του RNA στο φίλτρο περιγράφεται απο τους Sambrook et al (260).

Η υβριδοποίηση γίνεται με την μέθοδο κατά Church, σε διάλυμα που περιέχει:

0.5M φωσφορικό διάλυμα κατα Church .

1% BSA

1mM EDTA

7% SDS

Η προυβριδοποίηση γίνεται στους 65°C επι 15-30 λεπτά και η υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή (probe) στην ίδια θερμοκρασία για 6-24 ώρες.

(1M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος κατά Church περιέχει 71gr ανίδρου Na_2HPO_4 και 4ml 85% H_3PO_4 στο 1lit).

Απομόνωση γενωμικού DNA απο κύτταρα ζύμης.

Η μέθοδος που περιγράφεται είναι γρήγορη και μικρής κλίμακας¹⁰³. Η ποιότητα του DNA που προκύπτει είναι ικανοποιητική για ανάλυση κατα Southern.

Αναπτύσσεται καλλιέργεια ζύμης σε 10 ml YEP για 12-15 ώρες. Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου και πλένεται σε 10 ml σορβιτόλης. Φυγοκεντρείται στις 4.000rpm για 5 λεπτά.

Επαναδιαλύεται σε 1ml διαλύματος σφαιροπλαστοποίησης και επωάζεται για 40-60 λεπτά στους 30°C. Το διάλυμα σφαιροπλαστοποίησης περιέχει:

1M σορβιτόλη

50mM Tris-Cl pH 7.5

19mM β-Μερκαπτοαιθανόλη.

100μg/ml Ζυμολάση (μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντ' αυτής, γλουσιλάση).

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2.000rpm και επαναδιάλυση σε 0.5 ml διαλύματος λύσης: 10mM EDTA pH 8.5; 0.3% SDS. Λύνονται με vortex και επωάζονται για 20 στους 65°C όπου αποδιατάσσονται οι πρωτεΐνες. Προστίθενται 100μl 5M οξικό Καλιο και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Φυγοκεντρούνται στις 10.000rpm για 1-2 λεπτά και στο υπερκείμενο γίνεται πέψη με 5μl πρωτεϊνάση K (10mg/ml) με επώαση 10 λεπτών στους 37°C.

Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με εκχύλιση με φαινόλη και Sevag. Ακολουθεί εκχύλιση με αιθέρα και κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων με αιθανόλη.

Ανάλυση κατα Southern.

Μόρια DNA διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης και το πήκτωμα προετοιμάζεται για την μεταφορά του DNA με διαδοχική αλλαγή απο το διάλυμα αποδιάταξης (1.5M NaCl και 0.5M NaOH) για 30 λεπτά, στο διάλυμα εξουδετέρωσης (1M Tris-Cl pH 8 και 1.5M NaCl) για 30 λεπτά και τέλος στο διάλυμα μεταφοράς (20X SSC) για 10 λεπτά²⁷⁵.

Το DNA μεταφέρεται και υβριδοποιείται όπως και στην ανάλυση κατα Northern.

Χαροτογράφιση του σημείου της μεταγραφής με επέκταση γνωστής αλληλουχίας-εκκινητή (primer extension analysis).

Ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία UPE1 που είναι ειδική για το γονίδιο URA3. Ο εκκινητής ραδιοσημαίνεται στο 5' άκρο του με γ -³²P-ATP χρησιμοποιώντας την πολυνουκλεοτιδική κινάση. Ο ραδιοσημασμένος εκκινητής (5ng) μαζί με το RNA (1-5μg) διαλύονται σε διάλυμα (100mM Tris-Cl pH 8.3, 100mM KCl και αποδιάτασονται με υδατόλουτρο 100°C για 2 λεπτά. Στη συνέχεια το μίγμα κρυώνεται γρήγορα στο πάγο και γίνεται η αντίδραση επέκτασης με την αντίστροφη μεταγράφαση παρουσία δεοξυριβονουκλεοτιδίων^{12, 261}. Επωάζεται στους 37°C επί 5 λεπτά και ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Το μέγεθος του DNA που έχει συντεθεί προσδιορίζεται σε sequencing πήκτωμα, παράλληλα με αντιδράσεις νουκλεοτιδικής ανάλυσης γνωστής αλληλουχίας.

Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

Ένα τυπικό πήκτωμα διαχωρισμού πρωτεϊνικών μορίων έχει διαστάσεις 15X10X0.4 cm και περιέχει δύο διαδοχικά μέρη:

Το πρώτο-το αναλυτικό μέρος-ενός πήκτωματος 10%, μήκους 10cm και όγκου 20ml περιέχει:

3.3 ml Tris-Cl pH 8.9

6.6 ml 30%Bis-ακρυλαμίδης σύστασης 29.2:0.8

0.5 ml 20% SDS

Πολυμερίζεται με προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου και TEMED σε συγκέντρωση 0.02%. Μετά το πολυμερισμό του πρώτου μέρους προστίθεται το δεύτερο (stacking), όγκου 10 ml που περιέχει:

0.835 ml 1.5M Tris-Cl pH 6.8

1 ml 40% Bis-ακρυλαμίδης

0.25 ml 20% SDS

Πολυμερίζεται με τον ίδιο τρόπο για 30 λεπτά, έτσι ώστε να αποφευχθεί η ανάμιξη των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων λόγω διάχυσης¹². Το πεδίο που εφαρμόζεται έχει ένταση 20 mA και η ηλεκτροφόρηση γίνεται με διάλυμα που περιέχει ανα λίτρο:

25 mM Tris

192 mM γλυκίνη

0.1% SDS

Ιn vivo ραδιοσήμανση πολυπεπτιδίων και απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα ζύμης.

Καλλιέργεια κυττάρων σακχαρομύκητα, όγκου 2ml, αναπτύσσεται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο συμπληρωμένο ή όχι με αμινοξέα (πλὴν αυτού που χρησιμοποιείται για σήμανση πολυπεπτιδίων) παρουσία του ραδιενεργού αμινοξέος για καθορισμένο χρονικό διάστημα (αναφέρεται στο εκάστοτε πείραμα). Τα κύτταρα συλλέγονται, πλένονται με dH₂O και επανααιωρούνται σε 100-200μl Laemli διαλύματος. Γίνεται vortex για 2 λεπτά (αφού αναμιχτεί με 50-100μl σφαιριδίων γυαλιού) και κατόπιν τοποθετείται για 2 λεπτά σε νερό που βράζει. Το υπερκείμενο (μετά από φυγοκέντρηση στις 10000rpm, 5 λεπτά) περιέχει το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα που είναι κατάλληλο για ηλεκτροφορητική ανάλυση.

1x Laemli διάλυμα

2% SDS

10% γλυκερόλη

62.5mM Tris-HCl pH6.8,

τέλος προσθέτουμε β-meSH αμέσως πριν την χρήση, σε αναλογία 20:1, διάλυμα: μερκαπταιθανόλη¹⁰³.

Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεΐνης από συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων ζύμης.

Η απομόνωση συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έγινε αφού τα κύτταρα ζύμης λυθούν σε διάλυμα λύσης. Στο διαλυτό υπερκείμενο προστίθεται ορρός σε αναλογία 1:10 (ορρός:υπερκείμενο) και το δείγμα επωάζεται 1-2 ώρες στους 4°C. Προστίθεται πρωτεΐνη A συνδεδεμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης (Pharmacia) σε αναλογία 3:10 και το δείγμα

αναδεύεται για 1 ώρα στο coldroom. Με φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 5 λεπτά απομακρύνονται το ίζημα με τις μή ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες και το υπερκείμενο υποββάλεται στην ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας τον ειδικό αντιορρό εναντίον της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Οι επώσεις όμως με τον ειδικό αντιορρό διαρκούν 12 και 2-3 ώρες αντίστοιχα. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος, συνδεδεμένο με πρωτεΐνη A, συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 5 λεπτά και το σύμπλοκο πλένεται φορές με διάλυμα λύσης και στη συνέχεια αποσυγκροτείται, αφού κατεργαστεί με διάλυμα Laemli και 2 λεπτά σε νερό που βράζει. Τα σφαιρίδια σεφαρόζης απομακρύνονται με φυγοκέντρηση και το διαλυτό υπερκείμενο διαχωρίζεται ηλεκτροφορητικικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS⁹. Το ανοσοσύμπλοκο πριν την αποσυγκρότηση μπορεί να υποβληθεί σε αντίδραση κινάσης²⁵⁵.

διάλυμα λύσης

10mM Tris-Cl pH 8

150mM NaCl

0.1% Triton X 100

0.05% SDS

Αντίδραση κινάσης σε ανοσοσύμπλοκα.

Τα ανοσοσύμπλοκα που προκύπτουν από την ανοσοκατακρήμνιση με τον ειδικό αντιορρό πλένονται διαδοχικά με 1ml από τα διαλύματα I, II, III. Στο τελικό ίζημα προσθέτεις 30μl διαλύματος III, γ32P-ATP και κρύο ATP και αφήνεται το δείγμα να επωαστεί στους 30°C για 30-60 λεπτά²⁵⁵. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη EDTA και ακολουθεί η αποσυγκρότηση του συμπλόκου και η ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων όπως έχει ήδη περιγραφεί.

διάλυμα I

50mM Tris-Cl pH 8

5mM EDTA

1mM DTT

1mM PMSF

διάλυμα II

διάλυμα I +

0.1% SDS

0.5% δεοξυχολικό (DOC)

1.0% TritonX-100

διάλυμα III

διάλυμα I +

5mM MgCl₂

Προσδιορισμός της ενεργότητας της β-Γαλακτοσιδάσης.

Καλλιέργεια 5 ml στελέχους, μετασχηματισμένου με φορέα που φέρει το Lac-Z γονίδιο, οπτικής πυκνότητας <1/0.8 στα 550nm (OD 550), φυγοκεντρείται και το κύτταρα

επαναιωρούνται σε 0.6 ml διαλύματος που περιέχει:

60 mM Na₂HPO₄.

40 mM NaH₂PO₄

10 mM KCl.

1 mM Mg₂SO₄

50 mM β-Μερκαπτοαιθανόλη

Προστίθενται 50λ διαλύματος 0.1% SDS και 100λ χλωροφόρμιο και το δείγμα αναμιγνύεται με vortex για 15 δευτερόλεπτα. Προθερμαίνεται στους 28-30°C και προστίθενται 200λ διαλύματος ONPG (χρωμοφόρο, τεχνικό υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης). Η αντίδραση διαρκεί 15-30 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία και τερματίζεται με 300λ διαλύματος 1M Na₂CO₃. Το δείγμα φυγοκεντρείται και μετρείται η οπτική του πυκνότητα στα 420nm (OD₄₂₀). Το επίπεδο ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης υπολογίζεται ως εξής¹²:

$\beta\text{-Gal Units} = \text{OD (420)} \times 1000 / \text{OD (550)} \times V \times t$

V= ο όγκος της καλλιέργειας σε ml.

t= ο χρόνος της αντίδρασης σε λεπτά.

Μελέτη της διαδικασίας ωρίμανσης και συσσώρευσης ριβοσωμικού

RNA.

Η μελέτη έγινε με τρεις τρόπους³⁰⁰:

α. Με απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα ζύμης και διαχωρισμό σε gel αγαρόξης 1.5%, παρουσία EtBr. Τα rRNAs ξεχωρίζουν, λόγω της μεγάλης περισσειας σε σχέση με τα υπόλοιπα μόρια RNA.

β. Με την χρήση ραδιενεργού L-[μεθυλ-3H]-μεθειονίνης⁴⁶. Σε κύτταρα gcn2, leu2-2, ura3-52 έγιναν οι ακόλουθοι μετασχηματισμοί:

pRS315 + pRS316

pRS315 + Yep352-13

Δ3-13 + Δ3-24

Υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν ο/ η μέχρι OD (550 nm) 0.8 έως 1.0. Για να χρησιμοποιηθεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων από τις τρεις καλλιέργειες, έγινε κανονικοποίηση των όγκων με βάση τις τιμές της απορρόφησης. 2 ml από κάθε καλλιέργεια επωάστηκαν (**pulse**) με 0.1 mCi L-[μεθυλ-3H]-μεθειονίνη για 5 min. Το μισό από το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε και κρατήθηκε στους -80°C. Το υπόλοιπο επωάστηκε με μη ραδιενεργό (ψυχρή, cold) L-μεθειονίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ ml για 15 min (**chase**).

Απομονώθηκε RNA από τα 6 δείγματα (όπως και στην περίπτωση (α)), αποδιατάχθηκε με φορμαλδεύδη (Sambrook et al 1989), βάφτηκε με EtBr και διαχωρίστηκε ως προς το μέγεθος σε gel αγαρόζης 1.5%(w/v), το οποίο περιέχει 2.2 M φορμαλδεύδη, 40 mM MOPS (pH 7), 10 mM CH₃COONa και 1 mM EDTA. Το gel φωτογραφήθηκε κάτω από UV και στη συνέχεια υπέστη επεξεργασία για φθορισμογραφία με En3Hance (NEN/Dupont) και εξετάθη σε φιλμ Kodak X-Omat για 10 έως 48 h στους -80°C, ώστε να εντοπιστούν οι ζώνες των tRNAs. Η σημασμένη στο μεθύλιο μεθειονίνη ραδιοσημαίνει τα RNA μόρια, λόγω της μεθυλίωσης που υπόκεινται αυτά. Η σήμανση δεν είναι ειδική για τα tRNAs, όμως αυτά ξεχωρίζουν, επειδή βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα^{265, 266}.

γ. Προκειμένου να μελετηθούν το 5.8S tRNA και τα πρόδρομά του, ένα μέρος από τα δείγματα RNA που απομονώθηκε από το πείραμα β αποδιατάχθηκε με ουρία, βάφτηκε με EtBr και διαχωρίστηκε σε gel, που περιέχει 5%(w/v) πολυακρυλαμίδα και 7%(w/v) ουρία. Το gel φωτογραφήθηκε στο UV και στην συνέχεια υπέστη επεξεργασία En3Hance (NEN/Dupont) και εξετάθη σε φιλμ X-Omat για 10 έως 48 h, στους -80°C.

Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με χρήση συντήξεων με την S Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST).

Οι χιμερικές πρωτεΐνες εκφράστηκαν στην *E. coli* και καθαρίστηκαν όπως περιγράφεται στην αναφορά 12. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με άλλες κατασκευασμένες και ραδιενεργά σημασμένες *in vitro*, διεξήχθη όπως περιγράφεται στην αναφορά 299.

In vitro σύνθεσης μεγάλης ποσότητας RNA.

Η σύνθεση έγινε χρησιμοποιώντας την RNA πολυμεράση SP6 (Promega). Η πολυμεράση αναγνωρίζει τον αντίστοιχο υποκινητή πίσω από τον οποίο είναι κλωνοποιημένα τα γονίδια ενδιαφέροντος. Το DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο πρέπει να είναι γραμμοποιημένο κατά προτίμηση με ένζυμα περιορισμού, που απελευθερώνουν 5' προεξέχοντα ή τυφλά άκρα. Η αντίδραση όγκου 100μl γίνεται στο διάλυμα μεταγραφής και περιέχει 2-4μg γραμμοποιημένου DNA, 1 μονάδα/μl αναστολέα ριβονουλεασών (RNasin), 1.5 mM από κάθε ριβονουκλεοτίδιο, 10mM DTT και 10-20 μονάδες πολυμεράση. Η επώαση γίνεται για 1-2 ώρες στους 38-39°C. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 5-10μg RNA/μg DNA. Ακολουθεί επώαση 1-2 μονάδες/μg DNA δεοξυριβονουκλεάση ελεύθερη ριβονουκλεασών, εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του RNA με αιθυλική αλκοόλη¹². Το RNA χρησιμοποιήθηκε για *in vitro* μετάφραση.

Αντίδραση σύνδεσης πρωτεΐνης-DNA.

Οι αντιδράσεις έγιναν όπως περιγράφεται από τους Hope and Struhl με τη διαφορά ότι η πρωτεΐνη GCN4 παράχθηκε σε in vitro σύστημα δικτυοκυττάρων κουνελιού¹²⁹.

Περιορισμένη πρωτεόλυση συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης.

Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε για την αποκάλυψη μεταβολών στη διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης που έχει την ικανότητα να συνδέεται στο DNA, όταν αυτή συνδεθεί με αυτό και μάλιστα σε ποικιλία στόχων. Αρχικά η πρωτεΐνη που έχει συντεθεί και σημανθεί ραδιενεργά in vitro αφήνεται να αλληλεπιδράσει με την DNA αλληλουχία που αποτελεί το στόχο της. Η αντίδραση σύνδεσης γίνεται όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Κατόπιν η αντίδραση μοιράζεται σε πέντε μέρη τα οποία αφήνονται να επιδράσουν με διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεολυτικού ενζύμου (0-20ng/λ) (χρησιμοποιήθηκε η Τρυψίνη και η Χυμοτριψίνη)²⁸². Μετά από χρόνο πέντε λεπτών, η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη PMSF σε τελική συγκέντρωση 1mM. Ακολουθεί ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης είτε σε αποδιατακτικό είτε σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης.

Ανάλυση γενικής πολυσωμικής κατατομής.

Κύτταρα ζύμης σε καλλιέργεια όγκου 50ml αναπτύσσονται μέχρι οπτική πυκνότητα 1/0.5-0.8 και κατόπιν προστίθεται κυκλοεξιμίδιο σε τελική συγκέντρωση 50γ/ml, καθώς επίσης και 10ml πάγου. Το κυκλοεξιμίδιο είναι ισχυρός αναστολέας της μεταφραστικής επιμύκνωσης. Η προσθήκη του σε συνδυασμό με την ακαριαία ψύξη των κυττάρων παρεμποδίζει την εξέλιξη οποιασδήποτε μεταφραστικής διεργασίας κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αφού τα κύτταρα παραμείνουν σε παγόλουτρο επί 5 λεπτά φυγοκεντρώνται στους 4 βαθμούς (5 λεπτά στις 5000rpm). Τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα κυκλοεξιμιδίου της ίδιας συγκέντρωσης που επίσης έχει ψυχθεί στην ίδια θερμοκρασία. Αιωρούνται σε 0.7ml διαλύματος που περιέχει:

Tris-HCl pH 7.5 10mM

Χλωριούχο Νάτριο 100mM

Χλωριούχο Μαγνήσιο 30mM

Κυκλοεξιμίδιο 50γ/ml

Ηπαρίνη 200μg/ml

Αναμιγνύονται με ίσο όγκο σφαιριδίων γυαλιού διαμέτρου 450-500 μικρών και αναταράσσονται σιχυρά (vortex) επί 2 λεπτά στους 4 βαθμούς. Το δείγμα φυγοκεντρείται

στις 10000rpm επί 10 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο που αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα και είναι απαλλαγμένο πυρήνων, μεμβρανών και μιτοχονδρίων. Το εκχύλισμα επιστιβάζεται σε 7-47% κλίση συγκέντρωσης σουκρόζης, η οποία παρασκευάζεται ως εξής:

Tris-Acetate pH 7.5 50mM

Χλωριούχο Αμμώνιο 50mM

Χλωριούχο Μαγνήσιο 12mM

αναμιγνύονται με τη κατάλληλη συσκευή (Gradient maker), έτσι ώστε να δημιουργηθεί γραμμική διαβάθμιση συγκέντρωσης σουκρόζης, σε σωληνίσκο συμβατό με την κεφαλή SW41 της υπερφυγοκέντρου Beckman L8. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 40000rpm επί 1.5 ώρες στους 4 βαθμούς Κελσίου. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του σωληνίσκου ρέει με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας σε φωτομετρική κυψελίδα συνδεδεμένη με σύστημα καταγραφέα. Η συσκευή (UV monitor, Pharmacia model sex3q) έχει τη δυνατότητα να μετρά την απορρόφηση του δείγματος στα 250 νανόμετρα και παράλληλα να την αποτυπώνει γραφικά σε συνάρτηση του χρόνου ροής. Η καμπύλη που προκύπτει αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση μορίων RNA κατά μήκος της κλίσης σουκρόζης²⁹⁸.

Οι τρεις πρώτες κορυφές απορρόφησης αντιστοιχούν στα κλάσματα που περιέχουν 40S και 60S ελεύθερες ριβοσωμικές υπομονάδες και 80S ριβοσωμικά σύμπλοκα. Οι κορυφές που εμφανίζονται στην συνέχεια αντιστοιχούν σε δισωμάτια, τρισωμάτια κ.λ.κ.

Ανάλυση της πολυσωμικής κατανομής μορίου mRNA σε κλίση σουκρόζης.

Η πλασμάτωση του κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος γίνεται με το τρόπο που περιεγράφη πιο πάνω, μέχρι το στάδιο της υπερ-φυγοκέντρωσης. Κατόπιν το δείγμα συλλέγεται σε 18 κλάσματα των 0.7ml και στο κάθε πλάσμα προστίθενται 50λ διαλύματος 20% SDS. Κάθε δείγμα εκχυλίζεται με φαινόλη Sevag και το RNA κατακρημνίζεται με αιθυλική αλκοόλη²⁹⁸. Το RNA διαχωρίζεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης-φορμαλδεύδης, μεταφέρεται σε φίλτρο Gene-Screen και υβριδοποιείται με ραδιο-ανιχνευτή συμπληρωματικό του μηνύματος του οποίου η κατανομή αναλύεται.

Μεταλλαξογένεση με EMS.

Η μεταλλαξογένεση έγινε όπως περιγράφεται από τους Guthrie και Fink στις αναφορές 103 και 200.

Μεταλλαξογένεση DNA in vitro, με Υδροξυλαμίνη.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται στην αναφορά 246.



2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

α) Εισαγωγή στη γονιδιακή ρύθμιση

Γενικότητες

Η πληροφορία για τη συγκρότηση και τη λειτουργία οποιουδήποτε κυττάρου αλλά και οργανισμού, εδράζεται στο γενετικό του υλικό. Η μη αυθαίρετη αλλά ρυθμιζόμενη χρονικά και τοπικά, έκφραση της πληροφορίας αυτής εξασφαλίζει τη σωστή εκτέλεση διαδικασιών όπως η οντογένεση, η ομοιόσταση και η αναπαραγωγή. Συνεπώς η αντίληψη και η περιγραφή της ρύθμισης αυτής είναι από τα σημαντικότερα ζητήματα που αφορούν την κατανόηση του φαινομένου της ζωής. Το θέμα αυτό αποτέλεσε το αντικείμενο έντονης μελέτης τα τελευταία τριάντα χρόνια ώστε να έχει συσσωρευτεί μεγάλος όγκος πληροφορίας σχετικής με τη ρύθμιση παρα πολλών γονιδίων σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών.

Είναι δυνατό να γίνει διαχωρισμός της πληροφορίας αυτής, σε εκείνη που αφορά τη φυσιολογία της ρύθμισης, ποια δηλαδή ερεθίσματα προκαλούν ή συντηρούν ένα συγκεκριμένο πρότυπο ρύθμισης, και σε εκείνη που αφορά τη μηχανική της. Με το τελευταίο περιγράφεται η γνώση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται το πρότυπο αυτό. Και οι δυο παραπάνω παράμετροι είναι σημαντικές για την ολοκλήρωση μιας συνεπούς εικόνας σχετικής με τη γονιδιακή έκφραση. Επειδή μάλιστα στα βιολογικά συστήματα οποιασδήποτε κλίμακας, μια λειτουργία υπαγορεύει, καθορίζει τη δομή που θα τη διεξάγει και αντίστροφα μια συγκεκριμένη δομή αντανακλά τη λειτουργία για την οποία έχει κατασκευαστεί, οι δυο αυτές παράμετροι αλληλοσυμπληρώνονται και ακόμα αλληλοεπιβεβαιώνονται.

Ειδόμενες στο πλαίσιο αυτό κάποιες φαινομενικά αυθαίρετες επιλογές των ζωντανών συστημάτων, εντάσσονται πλέον σε μια λογικά συνεπή θεώρηση. Η κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται η γονιδιακή ρύθμιση και η συσχέτιση του με τις εκάστοτε επιταγές της φυσιολογίας, είναι η προσέγγιση εκείνη που μετέτρεψε τη Βιολογία από περιγραφική και φαινομενολογική, σε θετική επιστήμη. Η μελέτη απλών αρχικά συστημάτων έχει δώσει την δυνατότητα να διακριθεί μια οικονομία στους τρόπους επίτευξης της γονιδιακής ρύθμισης που αφορά διαδικασίες χωρίς προφανή φυσιολογική συσχέτιση. Το γεγονός αυτό δίνει το δικαίωμα επέκτασης και γενίκευσης των συμπερασμάτων και σε πιο περίπλοκα συστήματα ανωτέρων εξελικτικά οργανισμών, τα οποία δεν είναι το ίδιο προσιτά σε τέτοιες προσεγγίσεις.

Ο έλεγχος της έκφρασης ενός γονιδίου, είναι δυνατό να ασκείται σε ένα από τα στάδια που περιλαμβάνει η διαδοχή των γεγονότων για την αποκωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας. Δηλαδή κατά την αντιγραφή, τη μεταγραφή, μετα-μεταγραφικά, κατά τη μετάφραση και τέλος μετα-μεταφραστικά.

Η ομοιόσταση ως παράδειγμα δυναμικής κατάστασης

Οι οργανισμοί, είτε μονοκύτταροι είτε πολυκύτταροι, απο τα πρώτα στάδια της ζωής τους βρίσκονται σε συνεχή αλληλεπίδραση με το περιβάλλον τους, το οποίο τις περισσότερες φορές δεν είναι αυστηρά καθορισμένο αλλά υπόκειται σε συνεχείς αλλαγές. Υφίσταται, επομένως, ένα είδος δυναμικής κατάστασης ανάμεσα στους οργανισμούς και το μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Δηλαδή υπάρχει η αναγκαιότητα για προσαρμογή της λειτουργίας του οργανισμού στις εκάστοτε συνθήκες, με σκοπό όμως τη διατήρηση ενός σταθερού εσωτερικού μικροπεριβάλλοντος που να επιτρέπει τη διεξαγωγή βασικών βιοχημικών διαδικασιών προκειμένου να επιβιώσει ο οργανισμός.

Όλοι οι οργανισμοί είναι θερμοδυναμικά ανοικτά συστήματα, ανταλλάσσουν δηλαδή ενέργεια και ύλη με το περιβάλλον τους. Παρόλα αυτά έχουν τη δυνατότητα να απομονώνονται ώστε να κατορθώνουν να διατηρούν μια σταθερή εσωτερική κατάσταση. Αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των οργανισμών απο τους απλούστερους ως τους πιο εξελιγμένους, η κατοχή ομοιοστατικών μηχανισμών που διεκπεραιώνουν την ανάγκη της διατήρησης της σταθερής αυτής κατάστασης. Οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί στο σύνολο τους, και αυτοί που απαντούν στα βιολογικά συστήματα και αυτοί που εξοπλίζουν ανθρώπινες επινοήσεις, αποτελούν διατάξεις αρνητικής ανάδρασης.

Μια ομοιοστατική απόκριση περιλαμβάνει τρία διάκριτα στάδια:

- α) Αντίληψη της μεταβολής ενός εξωτερικού προς το σύστημα παράγοντα που τείνει να τροποποιήσει μια εσωτερική παράμετρο.
- β) Ολοκλήρωση της πληροφορίας του πρώτου σταδίου, καθορισμός της φύσης της και ενεργοποίηση ανάλογων με την περίπτωση τελεστών που θα δράσουν κατά το τρίτο στάδιο.
- γ) Εκτέλεση των απαραίτητων λειτουργιών ώστε να επιτευχθεί προσαρμογή στις νέες συνθήκες.

Όπως μπορεί να διακριθεί, η διεξαγωγή των δυο τελευταίων σταδίων απο ένα οργανισμό είναι δυνατό να περιλαμβάνει ρύθμιση της έκφρασης των σχετικών γονιδίων. Πραγματικά, μελέτες που έχουν γίνει σε ευρύ φάσμα οργανισμών, δείχνουν οτι ένα εκτεταμένο μέρος της γονιδιακής ρύθμισης αφορά ομοιοστατικούς μηχανισμούς. Προκειμένου να προσαρμοστεί στο περιβάλλον ένας οργανισμός καταστέλει ή ενεργοποιεί ένα σύνολο γονιδίων, πολλές φορές με διαδοχή αρκετών βημάτων όπου η κατάσταση της έκφρασης ενός γονιδίου καθορίζει την κατάσταση της έκφρασης άλλων.

Η παρακολούθηση των γεγονότων που συνιστούν μια ομοιοστατική απόκριση στο μοριακό επίπεδο μπορεί να εξασφαλίσει τον καθορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων φαινομενικά ασύνδετων και να τα εντάξει σε μια λειτουργική ομάδα. Μπορεί τέλος να ρίξει φως στους μηχανισμούς που κρύβονται κάτω από την ικανότητα προσαρμογής στο περιβάλλον, αποκαλύπτοντας ίσως ένα κοινό σύνολο κανόνων που διέπουν τέτοιες διαδικασίες.

Το σύστημα γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων στο σακχαρομύκητα

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό ρυθμίζεται από ειδικούς και γενικούς μηχανισμούς ελέγχου. Ειδικοί έλεγχοι ασκούνται στην ρύθμιση της έκφρασης δομικών γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό ενός αμινοξέος, σακχάρου ή νουκλεοτιδίου, ενώ οι γενικοί μηχανισμοί ελέγχου ασκούνται σε ένα σύνολο ειδικών ελέγχων με σκοπό την ισόρροπη λειτουργία του κυττάρου.

Τέτοιοι μηχανισμοί γενικού ελέγχου έχουν παρατηρηθεί και στους μύκητες και καλύπτουν ένα μεγάλο μέρος του μεταβολισμού τους. Στον *S.cerevisiae*, παρατηρήθηκε ότι έκφραση ενός μεγάλου αριθμού καταβολικών ενζύμων καταστέλλεται παρουσία γλυκόζης^{29, 102, 90, 180}. Στην *N. crassa*³⁴, στον *A. nidulans*²³¹ και στον *S. cerevisiae* παρατηρήθηκε ότι η έλλειψη ενός αμινοξέος από το θρεπτικό τους μέσο έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης ενζύμων τα οποία ενέχονται στην βιοσύνθεση των περισσότερων αμινοξέων^{71, 69, 228}. Η απόκριση αυτή επιτυγχάνεται με ένα σύστημα μηχανισμών το οποίο ονομάστηκε σύστημα γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων. Η μελέτη του συστήματος έχει γίνει εκτεταμένα στην ζύμη και δίνει απαντήσεις σε ερωτήματα σχετικά με την έκφραση της γενετικής πληροφορίας στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εναρμονισμένης στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες^{216, 319}.

Η έλλειψη έστω και ενός αμινοξέος από το θρεπτικό μέσο όπου αναπτύσσεται ο σακχαρομύκητας έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής ασύνδετων, μεταξύ τους γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα για την βιοσύνθεση των περισσότερων αμινοξέων¹²². Η επαγωγή αυτών των ενζύμων υπόκειται στην ρύθμιση ενός γενικού ελέγχου, τον γενικό έλεγχο της βιοσύνθεσης των αμινοξέων¹¹⁹.

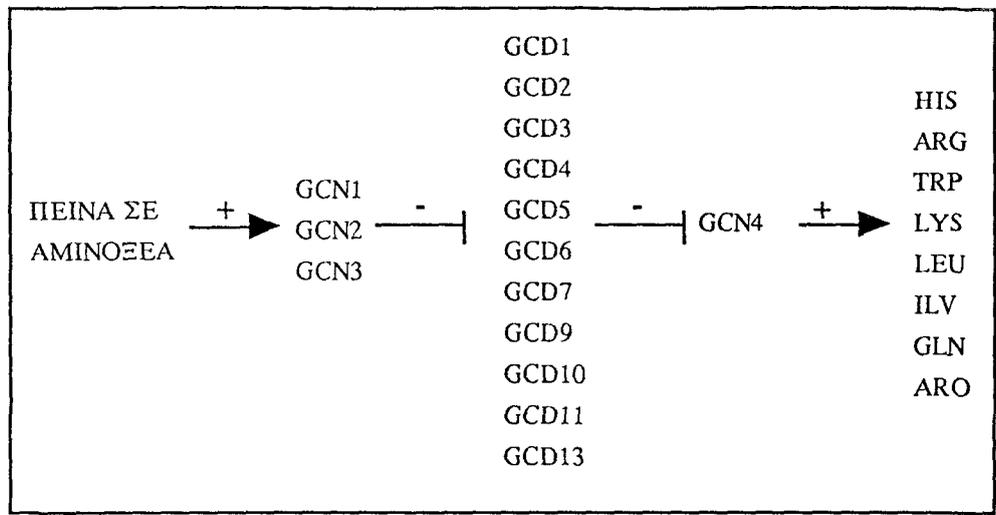
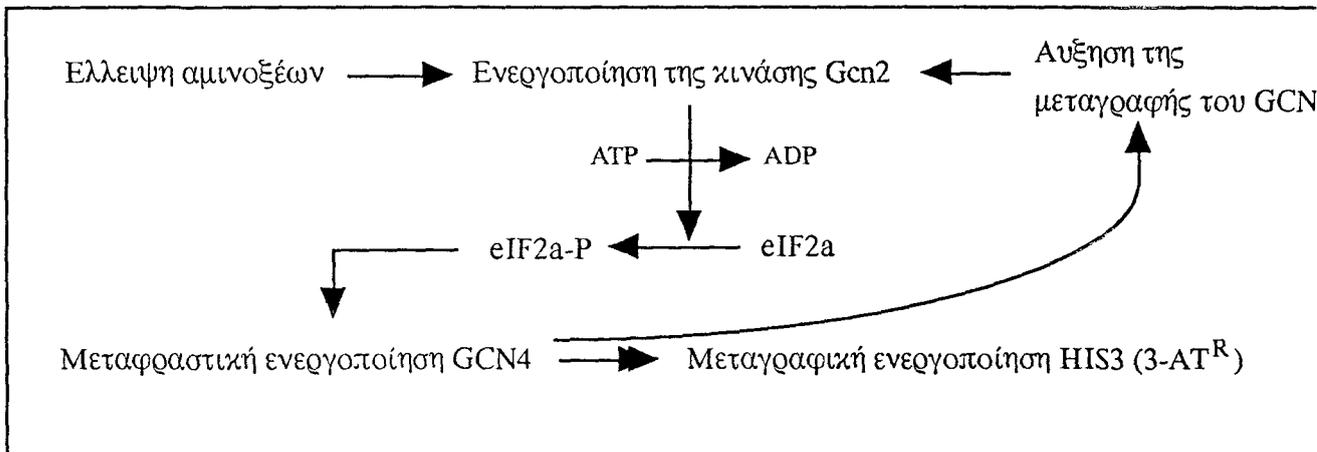
Η μεταφορά των αμινοξέων από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου γίνεται από ειδικές, για κάθε αμινοξύ και γενικές, για όλα τα αμινοξέα, περμεάσες. Μετά την εισαγωγή τους στο κύταρο, ένα μικρό ποσοστό από τα αμινοξέα παραμένει στο κυτταρόπλασμα ενώ τα περισσότερα κατευθύνονται και αποθηκεύονται στα χυμοτόπια όπου παραμένουν μεταβολικά ανενεργά³¹⁴. Η αναλογία των αμινοξέων που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε σχέση με τα αμινοξέα που βρίσκονται στο χυμοτόπιο είναι σταθερή¹⁹⁸. Η έλλειψη από το κυτταροπλασματικό απόθεμα ή η αλλαγή της αναλογίας μεταξύ κυτταροπλασματικού και χυμοτοπικού αποθέματος αμινοξέων, ίσως αποτελεί το έναυσμα για την ενεργοποίηση του γενικού ελέγχου βιοσύνθεσης των αμινοξέων.

Στον γενικό έλεγχο συμμετέχουν τα γονίδια GCN σαν θετικοί και τα GCD σαν αρνητικοί ρυθμιστές^{211, 109, 209} (Σχήμα 2.1A). Τα γονίδια GCN (General Control Non derepressible) είναι τουλάχιστον 5^{106, 107, 119}. Τα GCN 1, 2, 3, 4 και 5. Απο τα 5 αυτά γονίδια, με βιοχημική και γενετική ανάλυση δείχθηκε ότι το Gcn4 επάγει άμεσα την μεταγραφή των βιοσυνθετικών ενζύμων^{11, 65, 205}, ενώ τα υπόλοιπα συμμετέχουν στην θετική ρύθμιση της έκφρασης αυτού του γονιδίου στο επίπεδο της μετάφρασης του μυνήματος του¹¹⁸. Μεταλλαγή σε ένα απο τα παραπάνω γονίδια έχει σαν αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων βιοσύνθεσης των αμινοξέων⁷⁰. Ο φαινότυπος των gcn μεταλλαγών παρουσιάζεται με την μη δυνατή ανάπτυξη του σακχαρομύκητα σε θρεπτικό μέσο που περιέχει συναγωνιστικούς αναστολείς των βιοσυνθετικών ενζύμων, όπως την 3-αμινο 1,2,3-τριαζόλη (3-AT), η οποία ανταγωνίζεται το προϊόν του γονιδίου HIS3⁷¹. Στο γεγονός αυτό βασίστηκε και η απομόνωση των μεταλλαγών αυτών. Οι μεταλλαγές gcn δηλαδή επιλέχθηκαν μετα απο μεταλαξογένεση με την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας (UV) σε κύτταρα σακχαρομύκητα ώστε πλέον αυτά να μην είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων.

Αρνητικοί παράγοντες για την έκφραση του GCN4 γονιδίου αποτελούν τα προϊόντα των γονιδίων GCD 1, 3, 5, 10, 12^{109, 110, 119}. Μεταλλαγή σε ένα απο τα παραπάνω γονίδια έχει σαν αποτέλεσμα την συνεχή επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων των βιοσυνθετικών ενζύμων^{83, 101}. Οι gcd τύπου μεταλλαγές είναι επιστατικές στις gcn (εκτός απο την μεταλλαγή gcn4)¹¹⁹. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα GCD γονίδια έχουν και άλλες λειτουργίες εκτός απο την συμμετοχή τους στον γενικό έλεγχο της βιοσύνθεσης των αμινοξέων²²⁵. Για παράδειγμα η δράση της πρωτεΐνης Gcd1 σχετίζεται τόσο με την βιοσύνθεση των αμινοξέων όσο και με τον κυτταρικό κύκλο και επηρεάζει τον πρωτεϊνοσυνθετικό μηχανισμό¹⁵³.

Απο τα γονίδια τα οποία υπόκεινται στον γενικό έλεγχο της βιοσύνθεσης των αμινοξέων, μέχρι τώρα έχουν μελετηθεί περίπου 30 τα οποία συμμετέχουν σε 10 βιοσυνθετικά μονοπάτια^{70, 71}. Η επαγωγή της μεταγραφής αυτών των γονιδίων αρχίζει 5-10 λεπτά μετά την μεταφορά του σακχαρομύκητα απο πλούσιο σε φτωχό θρεπτικό μέσο και φτάνει στην μέγιστη τιμή, (2-10 φορές, ανάλογα με το βιοσυνθετικό ένζυμο που επάγεται), μετά απο 2-4 ώρες, οπου παραμένει σταθερή μέχρι την αποκατάσταση της συγκέντρωσης των αμινοξέων στο θρεπτικό μέσο⁷⁰.

Συγκριτική νουκλεοτιδική ανάλυση σε 16 απο αυτά τα γονίδια έδειξε ότι στον

A**B****Σχήμα 2.1:**

A. Ιεράρχιση των ρυθμιστικών παραγόντων του γενικού ελέγχου βιοσύνθεσης αμινοξέων, με βάση τις επιστατικές σχέσεις σε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη.

Τα βέλη με σημείο (+) δηλώνουν ενεργοποιητική δράση, ενώ οι μπάρες με το σημείο (-) δηλώνουν κατασταλτική δράση.

B. Το μονοπάτι ενεργοποίησης της βιοσύνθεσης των αμινοξέων μέσω της κινάσης Gcn2 και της πρωτεΐνης Gcn4 .

υποκινητή τους βρίσκεται, σε μία ή περισσότερες επαναλήψεις, το επτανουκλεοτίδιο 5'-TGACTCA-3'¹¹⁹. Καταστροφή αυτής της αλληλουχίας με μεταλλαγές, έχει σαν αποτέλεσμα τά γονίδια να μην υπόκεινται πλέον σε μεταγραφική επαγωγή όταν ο σακχαρομύκητας βρεθεί σε φτωχό θρεπτικό μέσο¹¹⁶. Αντίθετα, ένθεση αυτής της αλληλουχίας στον υποκινητή γονιδίων που δέν ελέγχονται από το σύστημα, είχε σαν αποτέλεσμα τα γονίδια αυτά να τεθούν κάτω από την μεταγραφική ρύθμιση του γενικού ελέγχου βιοσύνθεσης αμινοξέων. Το επτανουκλεοτίδιο 5'-TGACTCA-3' αποτελεί τον πυρήνα μιας περιοχής 12 νουκλεοτιδίων η οποία είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση^{119, 116}.

Με πειράματα αλλαγής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας, (gel mobility shift) και με πειράματα προστασίας σε δεοξυριβονουκλεάση I (DNaseI footprinting), δείχθηκε ότι το επτανουκλεοτίδιο αυτό αποτελεί στόχο για σύνδεση της πρωτεΐνης Gcn4^{129, 127, 277}.

Η επαγωγή της μεταγραφής των βιοσυνθετικών, για τα αμινοξέα, ενζύμων πραγματοποιείται μετά από την σύνδεση του Gcn4 στο επτανουκλεοτίδιο 5'-TGACTCA-3' που εντοπίζεται στον υποκινητή των αντίστοιχων γονιδίων^{119, 116}.

Από τα παραπάνω γίνεται προφανές ότι το σύστημα του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων στο σακχαρομύκητα είναι δομημένο με τέτοιο τρόπο ώστε να περιλαμβάνει περσιπτώσεις ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεταγραφικό, μεταφραστικό καθώς και μετα-μεταγραφικό. Αποτελεί συνεπώς ένα σύστημα ιδεώδες για τη μελέτη της συσχέτισης των ρυθμίσεων αυτών μεταξύ τους αλλά και με τις φυσιολογικές μεταβολές που επάγουν την ενεργοποίηση του συστήματος αυτού. Πρόκειται για ένα τυπικό σύστημα ομοιόστασης.

β) Ο μεταφραστικός έλεγχος του γονιδίου GCN4

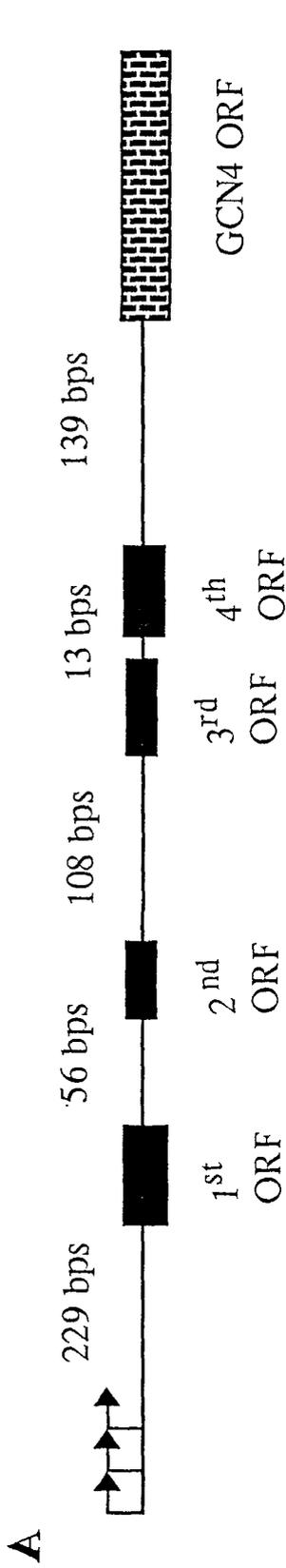
Ανασκόπηση

Το GCN4 mRNA έχει μήκος 1500 βάσεων και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 281 αμινοξέων². Η κωδική περιοχή του γονιδίου αρχίζει 580 περίπου νουκλεοτίδια απο το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Στην ασυνήθιστα εκτεταμένη μή μεταγραφόμενη περιοχή, από την θέση 200 έως 440, υπάρχουν τέσσερα μικρά αναγνωστικά πλαίσια^{117, 121, 207, 286} τα οποία κωδικοποιούν 2-3 αμινοξέα⁸⁸ (Σχήμα 2.2Α). Δείχθηκε ότι τα τέσσερα αυτά μικρά πλαίσια έχουν πολύ μεγάλη σημασία για την ρύθμιση της μεταφραστικότητας του GCN4 μηνύματος^{1, 120, 207, 208, 213, 315, 296}. Καταστροφή με έλλειψη ή με σημειακές μεταλλάξεις και των τεσσάρων αναγνωστικών πλαισίων έχει σαν αποτέλεσμα την μόνιμη και ανεξάρτητα απο θρεπτικά μέσα, υψηλή μεταφραστικότητα του GCN4 mRNA^{296, 298}. Στα φυσικού τύπου κύτταρα, η μεταφραστικότητα του GCN4 μηνύματος 10-πλασιάζεται μετά την μεταφορά των κυττάρων απο πλούσιο σε φτωχό για αμινοξέα θρεπτικό μέσο^{81, 137}. Για την ρύθμιση της μεταφραστικότητας του μηνύματος, εκτός απο την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του, είναι απαραίτητη και μια σειρά άλλων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα δρουν ως θετικοί ή αρνητικοί ρυθμιστές^{49, 110, 119}.

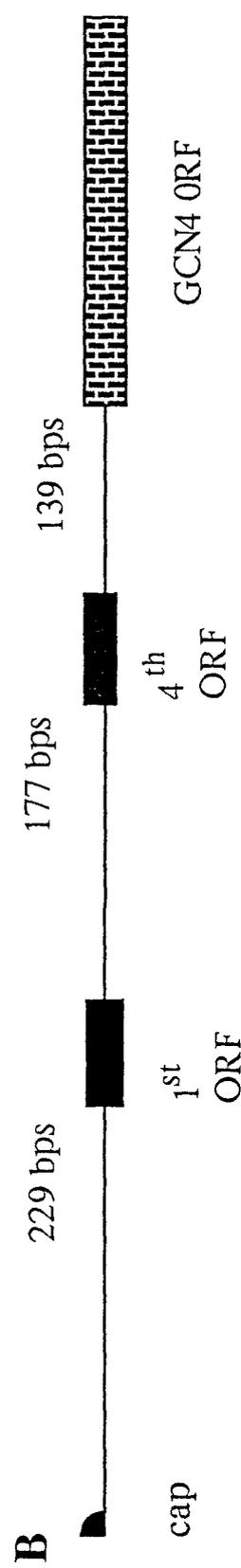
Το GCN2 mRNA είναι περίπου 4.7Kb και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 180KDa³¹⁰. Στην 5' μη μεταγραφόμενη περιοχή του γονιδίου υπάρχει η αλληλουχία 5'-TGACTCA-3' στην οποία, με *in vitro* πειράματα δείχθηκε ότι προσδέεται η πρωτεΐνη Gcn4²⁵⁵. Απο την σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της Gcn2 πρωτεΐνης με αλληλουχίες γνωστών πρωτεϊνών βρέθηκε ότι μια περιοχή 400 περίπου αμινοξέων έχει μεγάλη ομολογία με τις καταλυτικές υπομονάδες όλων των γνωστών κινασών πρωτεϊνών²⁵⁵. Επίσης ανάλογη ανάλυση αποκάλυψε μια περιοχή 900 αμινοξέων προς το καρβοξυ-τελικό άκρο της, όμοια με περιοχές tRNA συνθετασών και ειδικότερα με αυτήν της tRNA συνθετάσης της Ιστιδίνης^{310, 311} (Σχήμα 2.2Γ). Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση των αμινοξέων με τα αντίστοιχα tRNAs. Η εύρεση της ομοιότητας αυτής σε συνδυασμό με την υπόθεση ότι έλλειψη αμινοξέων συνεπάγεται και περίσσεια tRNAs ασύνδετων με αμινοξέα, οδήγησε στη διαμόρφωση της πρότασης ότι η κινάση Gcn2 είναι το μόριο που ανιχνεύει την έλλειψη αμινοξέων και επάγει τη μετάφραση του GCN4 mRNA³¹⁰.

Το προϊόν Gcn2 είναι απο τους πιο άμμεσους θετικούς παράγοντες ρύθμισης της έκφρασης του GCN4, αφού μεταλλάξεις του έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση της μεταφραστικότητας του GCN4 μηνύματος ακόμα και σε πλούσια θρεπτικά μέσα. Στο

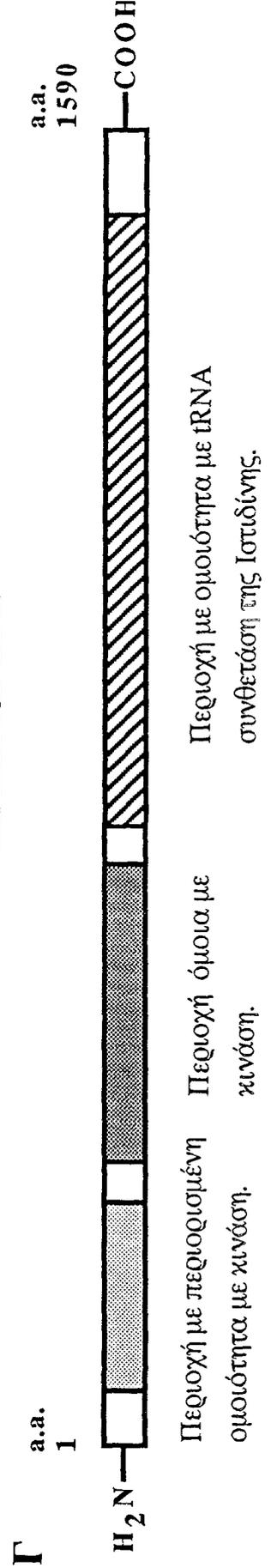
Το μήνυμα GCN4.



Μια απλούστερη έκδοση.



Η κινάση Gcn2.



Σχήμα 2.2: Απεικόνιση δομών.

A. Δομή του φυσικού τύπου μηνύματος του GCN4.

B. Μια απλοποιημένη έκδοσή του A, το ίδιο καλά λειτουργική.

Γ. Η δομή της πρωτεΐνης Gcn2.

σύστημα γενικού ελέγχου φαίνεται ότι η κινάση Gcn2 διατηρεί υψηλή την μετάφραση του GCN4 mRNA ενώ το προϊόν Gcn4 επάγει την μεταγραφή του γονιδίου GCN2²⁵⁵. Αυτό το κύκλωμα θετικής ανάδρασης που υφίσταται ανάμεσα στα δυο γονίδια διατηρεί και ενισχύει την απόκριση στην έλλειψη αμινοξέων (Σχήμα 2.1B). Πώς όμως η Gcn2 πρωτεΐνη επιδρά στη μετάφραση του GCN4 mRNA;

Σύμφωνα με την τρέχουσα άποψη για την έναρξη της μετάφρασης, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα¹⁵⁹ συνδέεται αρχικά με το 5' άκρο του mRNA, φέροντας το εναρκτήριο tRNA Μεθειονίνης και στη συνέχεια σαρώνει προς το 3' ώσπου να εντοπίσει το κωδικό έναρξης AUG^{4, 30, 66, 78, 197, 221, 227}. Κατόπιν συνδέεται με τη 60S ριβοσωμική υπομονάδα και η μετάφραση του αναγνωστικού πλαισίου αρχίζει^{235, 238}. Μετά τον τερματισμό της μετάφρασης, αφού το 80S πλέον ριβόσωμα έχει φτάσει σε κάποιο κωδικό λήξης (UAG, UAA, UGA), η 60S υπομονάδα αποσυνδέεται και η 40S συνεχίζει τη σάρωση για νέο AUG ή αποσυνδέεται φτάνοντας στο τέλος του μηνύματος^{115, 168, 169}. Εάν στο μεταξύ συναντήσει ATG, η διαδικασία έναρξης της μετάφρασης επαναλαμβάνεται εφ' όσον η υπομονάδα έχει φορτωθεί με το εναρκτήριο Met-tRNA^{120, 297}. Το μοντέλο αυτό της σάρωσης, και επανέναρξης σε μερικές περιπτώσεις, εμφανίζεται να ισχύει για τις περισσότερες περιπτώσεις της μετάφρασης των mRNAs^{160, 204, 249}. Υπάρχουν παρόλα αυτά και τεκμηριωμένες εξαιρέσεις όπου δεν ακολουθείται αυτός ο κανόνας^{114, 136, 168, 169}. Εκεί η 40S υπομονάδα φαίνεται να εισέρχεται σε κάποιο εσωτερικό σημείο στο mRNA ή και απευθείας πάνω στο εναρκτήριο ATG^{26, 141, 161, 162, 194, 196, 313}.

Εφαρμόζοντας τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπ όψη την ιδιαίτερη δομή του μηνύματος του GCN4, έχει διαμορφωθεί η εξής θεώρηση για τη ρύθμιση της μετάφρασης του:

α) Σε κανονικές συνθήκες όπου παρέχονται όλα τα αμινοξέα από το θρεπτικό μέσο, Η 40S ριβοσωμική υπομονάδα εισέρχεται από το 5' άκρο του mRNA, συνδεδεμένη με το εναρκτήριο tRNA Μεθειονίνης. Σαρώνει το μήνυμα μέχρι το πρώτο ή δεύτερο αναγνωστικό πλαίσιο όπου και συνδέεται με την 60S υπομονάδα του ριβοσώματος αρχίζοντας τη μετάφραση^{2, 47}. Όταν η μετάφραση ολοκληρωθεί, η 60S ριβοσωμική υπομονάδα αποσυνδέεται και η 40S συνεχίζει τη σάρωση πάντα προς το 3' άκρο. Στις συνθήκες που εξετάζονται, ο χρόνος που απαιτείται για τη σάρωση μέχρι τα επόμενα αναγνωστικά πλαίσια, δηλαδή το τρίτο ή το τέταρτο, επαρκεί για την επαναπροσλήψη Met-tRNA²⁰¹. Επομένως η 40S υπομονάδα έχει την ικανότητα να αναγνωρίσει το εναρκτήριο κωδικό ATG των ORFs αυτών (ORF: Open Reading Frame, ανοικτό

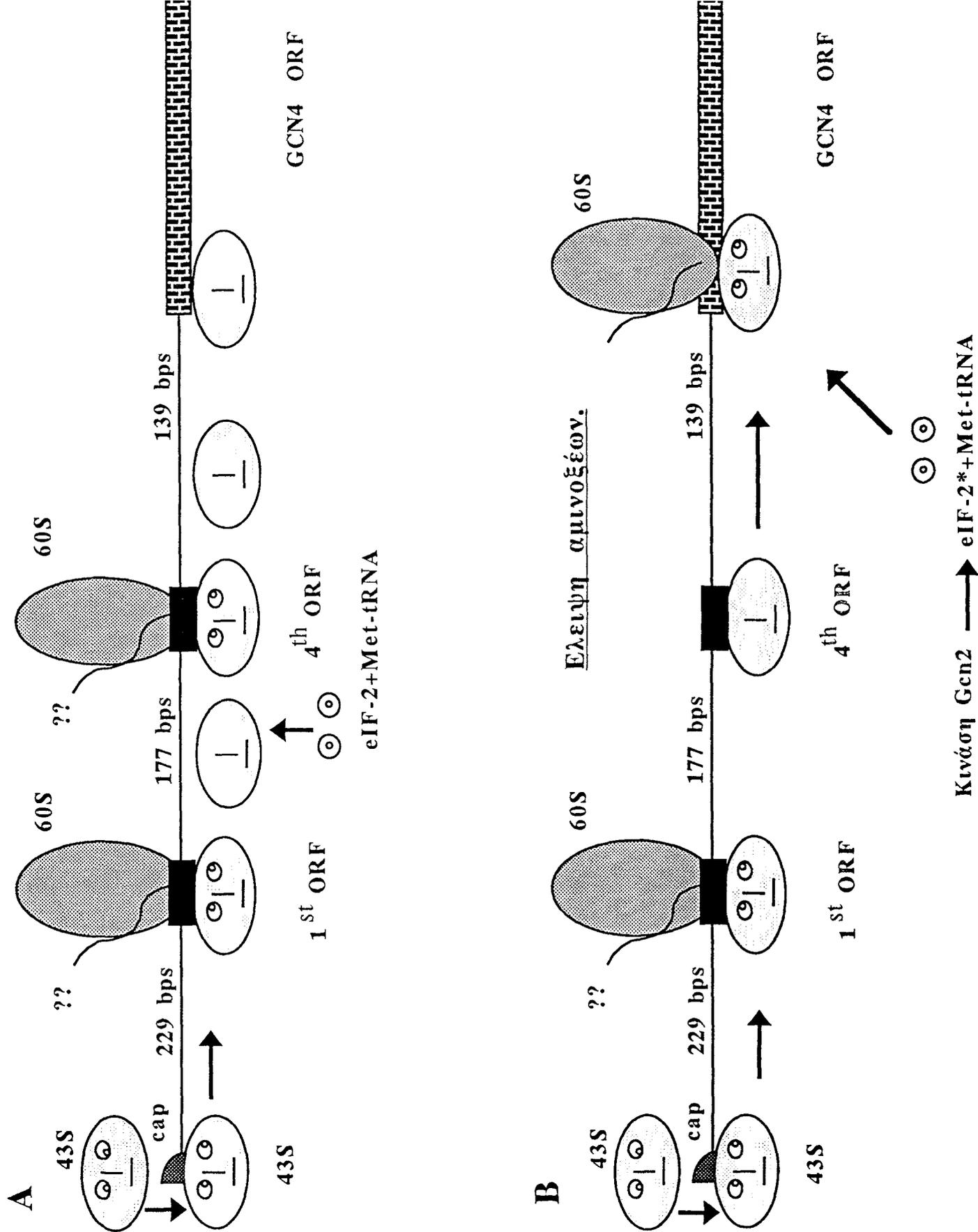
πλαίσιο μεταφραστικής ανάγνωσης). Η διαδικασία της αναγνώρισης διεξάγεται ακριβώς από το tRNA αυτό^{66, 250}.

Η σύνδεση με την 60S υπομονάδα επαναλαμβάνεται και αφού ολοκληρωθεί η μετάφραση του τρίτου ή τέταρτου ORF, συνεχίζει η σάρωση του μηνύματος από την 40S υπομονάδα. Όμως στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την μετακίνηση της στο πέμπτο αναγνωστικό πλαίσιο, δεν είναι δυνατή η επαναπρόσληψη εναρκτήριου tRNA Μεθιονίνης. Αυτό συμβαίνει επειδή η απόσταση ανάμεσα στο τρίτο και τέταρτο με το πέμπτο αναγνωστικό πλαίσιο είναι μικρή και αντίστοιχα μικρός είναι και ο χρόνος που απαιτείται για τη σάρωση της.

Η απουσία του εναρκτήριου tRNA από τη 40S υπομονάδα δεν επιτρέπει την αναγνώριση του κωδικού έναρξης του πέμπτου αναγνωστικού πλαισίου που είναι και αυτό που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Gcn4. Συνεπώς η 40S υπομονάδα το προσπερνά, αγνοώντας το, με αποτέλεσμα να μην συντίθεται η πρωτεΐνη (Σχήμα 2.3A).

β) Κατά την έλλειψη έστω και ενός αμινοξέως από το θρεπτικό μέσο, η παραπάνω διαδικασία τροποποιείται. Ας παρακολουθήσουμε πως. Αρχικά και στην περίπτωση αυτή συμβαίνει σύνδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας που ήδη φέρει εναρκτήριο Met-tRNA, στο 5' άκρο. Η σάρωση προς το 3' άκρο αρχίζει και ένα από τα δυο πρώτα αναγνωστικά πλαίσια υπόκειται και εδώ σε μετάφραση. Όμως στις συνθήκες που εξετάζονται, η διαδικασία επαναπρόσληψης του εναρκτήριου tRNA της Μεθιονίνης δεν είναι αποτελεσματική². Το γεγονός αυτό δεν επιτρέπει την έγκαιρη επαναπρόσληψη Met-tRNA από την 40S ριβοσωμική υπομονάδα κατά τη διάρκεια της σάρωσης προς τα αναγνωστικά πλαίσια τρία και τέσσερα. Κατά συνέπεια αυτά αγνοούνται από την υπομονάδα αυτή και η σάρωση συνεχίζει προς το πέμπτο πλέον πλαίσιο ανάγνωσης. Η απόσταση που χωρίζει το πλαίσιο αυτό από το πρώτο ή το δεύτερο είναι τέτοια ώστε ο χρόνος που απαιτείται για τη σάρωση της να επαρκεί τώρα για την επαναπρόσληψη εναρκτήριου tRNA. Η 40S υπομονάδα είναι έτσι σε θέση να αναγνωρίσει το κωδικό μεταφραστικής έναρξης του πέμπτου αναγνωστικού πλαισίου και να ξεκινήσει τη μετάφραση του αφού συνδεθεί με την 60S υπομονάδα, οδηγώντας στη σύνθεση της πρωτεΐνης Gcn4 (Σχήμα 2.3B).

Απο την περιγραφή αυτή φαίνεται ότι σε οποιοσδήποτε θρεπτικές συνθήκες το μεταφραστικό εμπόδιο των δύο πρώτων αναγνωστικών πλαισίων, υφίσταται εφ' όσον αυτά πάντα μεταφράζονται. Μάλιστα είναι απαραίτητο να προηγούνται των άλλων δύο για να συμβεί επαγωγή της σύνθεσης του Gcn4 σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων. Η καττροφή ή η απομάκρυνση τους καταργεί την επαγωγή στις συνθήκες αυτές.



Σχήμα 2.3: Η σάρωση του GCN4 mRNA.

A. Σε συνθήκες όπου παρέχονται όλα τα αμινοξέα.

B. Όταν απουσιάζει έστω και ένα αμινοξύ από το θρεπτικό μέσο.

Κατά κάποιον τρόπο, έχουν επομένως θετική επίδραση στη μετάφραση του GCN4 mRNA²⁵¹. Επίσης και στις δυο περιπτώσεις η σάρωση ξεκινάει από το 5' άκρο του mRNA. Το γεγονός που εμφανίζεται να είναι ρυθμιζόμενο είναι η μετάφραση ή μη των αναγνωστικών πλαισίων τρία και τέσσερα. Σε κανονικές συνθήκες αυτά μεταφράζονται, ενώ δε συμβαίνει κάτι τέτοιο σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων (Το μοντέλο που αναλύθηκε εδώ σκιαγραφείται στο σκαρίφημα της σελίδας). Το τί θα συμβεί στο πέμπτο αναγνωστικό πλαίσιο, είναι απλή συνέπεια του τί θα γίνει στα δυο προηγούμενα. Η μετάφραση τους αποκλείει την μετάφραση του πέμπτου, αντίθετα η μή αναγνώριση τους την επιτρέπει.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να δοθούν ορισμένες διευκρινίσεις:

α) Θα πρέπει να ειπωθεί ότι κατά την παρουσίαση του μοντέλου αυτού τα πλαίσια ένα και δύο, καθώς και τα τρία και τέσσερα αντιμετωπίστηκαν ως εννιαία, λειτουργικά. Κάτι τέτοιο είναι νόμιμο γιατί είναι πολύ κοντά μεταξύ τους και ακόμα έχει δείχθει ότι είναι δυνατό να τεθεί κάτω από μεταφραστικό έλεγχο το πέμπτο αναγνωστικό πλαίσιο, όταν προηγουμένως αυτού μόνο δυο άλλα μικρά^{2, 251}. Ενα στη θέση του πρώτου ζευγους και ενα στη θέση του δεύτερου (Σχημα 2.2B).

β) Δεν είναι γνωστό αν τα μικρά αναγνωστικά πλαίσια που προηγούνται του πλαισίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Gcn4, πραγματικά μεταφράζονται, αφού δεν έχει γίνει δυνατό να ανιχνευθούν βιοχημικά τα δι- και τριπεπτίδια που αυτά κωδικοποιούν. Δεν έχει όμως μεγάλη σημασία αν κάτι τέτοιο συμβαίνει αφού το μοντέλο δεν απαιτεί αυτά τα πεπτίδια να έχουν ρυθμιστικό ρόλο όπως σε άλλες περιπτώσεις αναλόγων καταστάσεων^{104, 253}. Πιο πιθανό είναι, τα πλαίσια αυτά να δρουν ως “καταναλωτές” εναρκτηρίων tRNAs, μια που κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο να γίνει προκειμένου να υπάρξει διαφορική μεταφρασιμότητα του GCN4 μηνύματος.

Το τελικό αποτέλεσμα της έλλειψης αμινοξέων, λοιπόν πρέπει να είναι η παρεμπόδιση της διαδικασίας επαναπρόσληψης του εναρκτηρίου tRNA Μεθιονίνης από την 40S ριβοσωμική υπομονάδα. Με ποιο μηχανισμό διεξάγεται αυτή η διαδικασία; Υπεύθυνος για την σύνδεση της 40S υπομονάδας με το tRNA Μεθιονίνης είναι ο γενικός παράγοντας έναρξης της πρωτεΐνοσύνθεσης eIF2^{6, 24}. Αρχικά αυτός συμπλέκεται με το tRNA και στη συνέχεια συνδέεται με την 40S υπομονάδα μέχρι τη συνάντησή της με το εναρκτηριο κωδικό¹⁹. Αφού γίνει η έναρξη, αποσυνδέεται απ αυτήν. Για τη διαδικασία αυτή καταναλώνεται, ενέργεια με τη μορφή GTP που είναι συνδεδεμένο με τον eIF2^{62, 82}. Προκειμένου να επαναληφθεί ο κύκλος, το GTP αναγεννάται πάνω στον eIF2 με τη βοήθεια ενός άλλου παράγοντα, του GEF (Guanosine Exchange Factor)^{99, 100, 256, 259}. Οι δυο αυτοί παράγοντες είναι

πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα⁶¹. Ο eIF2 αποτελείται από τρεις υπομονάδες, την α , τη β και τη γ ^{13, 50, 54, 231, 64, 316}. Στο σακχαρομύκητα η α και η β κωδικοποιούνται από τα γονίδια SUI2 και SUI3, αντίστοιχα^{35, 48, 67}. Δεν είναι ακριβώς γνωστή η σύσταση του GEF. Στη συγκρότηση του συμμετέχουν τουλάχιστον τα προϊόντα των γονιδίων GCN3, GCD1, GCD2 και GCD12²⁶.

Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι φωσφορυλίωση ενός συγκεκριμένου αμινοξέως της α υπομονάδας του eIF2, έχει ως επακόλουθο την παρεμπόδιση της διαδικασίας ανταλλαγής του GDP με GTP, από τον GEF, και κατά συνέπεια την πτώση του ρυθμού σύνδεσης του eIF2 με το Met-tRNA^{252, 271, 288}. Κάτι τέτοιο μειώνει την αποτελεσματικότητα της μεταφραστικής έναρξης γενικά αφού καθυστερεί η φόρτωση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας με εναρκτήριο tRNA.

Γενετική αλλά και βιοχημική ανάλυση, αποκάλυψε ότι η φωσφορυλίωση της α υπομονάδας του eIF2 στο αμινοξύ σερίνη 51, είναι το ρυθμιζόμενο γεγονός πάνω στο οποίο βασίζεται ο μεταφραστικός έλεγχος του GCN4 mRNA³¹⁶. Σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων, η α υπομονάδα του eIF2 φωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα την πτώση της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης από τη μια και την αύξηση της παραγωγής Gcn4 από την άλλη. Το τελευταίο συμβαίνει επειδή παρακάμπτονται τα αναγνωστικά πλαίσια τρία και τέσσερα από την 40S υπομονάδα που δεν έχει προλάβει να επαναπροσλάβει tRNA Μεθειονίνης μετά την μετάφραση των δυο πρώτων αναγνωστικών πλαισίων, κάτω από αυτές τις συνθήκες². Το κύτταρο, με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζει οικονομία σε αμινοξέα όταν υπάρχει έλλειψη, αφού καταναλώνονται με μειωμένο πλέον ρυθμό στη πρωτεϊνοσύνθεση και ταυτόχρονα ενεργοποιεί τους μηχανισμούς που τα δημιουργούν.

Το μόριο που φωσφορυλιώνει εκλεκτικά την α υπομονάδα του eIF2 όταν λείπουν αμινοξέα, είναι η κινάση Gcn2¹²⁵. Δεν είναι όμως γνωστό το πως αυτή ενεργοποιείται ώστε να γίνει κάτι τέτοιο. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, έχει προταθεί ότι στη διαδικασία αυτή συμμετέχει η περιοχή εκείνη της πρωτεΐνης που έχει ομοιότητα με tRNA συνθετάση. Η περιοχή αυτή, έχει προταθεί ότι αναγνωρίζει την αύξηση της συγκέντρωσης μη συνδεδεμένων με αμινοξύ, tRNAs που υποτίθεται ότι συμβαίνει όταν δεν υπάρχουν αρκετά αμινοξέα στο θρεπτικό μέσο³¹⁰. Η αναγνώριση αυτή θα ενεργοποιούσε την κινάση η οποία στη συνέχεια μέσω του eIF2, μεταβάλλει το ρυθμό έναρξης της μετάφρασης. Αυτή η άποψη σχετικά με την ενεργοποίηση της κινάσης Gcn2, παρόλο που φαίνεται ελκυστική, δεν έχει ακόμα λάβει πειραματική επιβεβαίωση.

Όλα όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα αφορούν την εκκίνηση της απόκρισης στην έλλειψη αμινοξέων. Όταν αποκατασταθεί η παρουσία τους στο θρεπτικό μέσο, παύει η επαγωγή της σύνθεσης της πρωτεΐνης Gcn4 και κατά συνέπεια η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων. Η μεταγραφική σιώπηση των γονιδίων αυτών είναι άμεση, δεδομένης της αστάθειας της πρωτεΐνης Gcn4²⁵¹. Η δε λήξη της σύνθεσης της πρωτεΐνης αυτής, όπως γίνεται φανερό από όσα έχουν αναφερθεί έως τώρα, απαιτεί την αποφωσφορυλίωση της α υπομονάδας του eIF2. Η φωσφατάση G1c7 έχει βρεθεί ότι συμμετέχει μαζί με άλλες ίσως φωσφατάσες, στην αποφωσφορυλίωση³¹². Να διευκρινιστεί εδώ ότι η αντίδραση αυτή δεν είναι ρυθμιζόμενη. Απλώς συμβαίνει συνεχώς και όταν πάψει η φωσφορυλίωση από την κινάση Gcn2, ο eIF2 τελικά αποφωσφορυλιώνεται, αποκαθιστώντας το φυσιολογικό ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης και την καταστολή της έκφρασης του GCN4.

Γιατί μεταφραστικός έλεγχος;

Τα γεγονότα που σηματοδοτούν την έλλειψη αμινοξέων στο θρεπτικό μέσο συγκλίνουν στην επαγωγή της μετάφρασης του GCN4 mRNA. Παρόλο που ο έλεγχος της έκφρασης ενός γονιδίου, είναι συνήθως φαινόμενο να ασκείται στο επίπεδο της μεταγραφής του, για την περίπτωση του GCN4 παρατηρείται στο στάδιο της μετάφρασης. Ποιά είναι η λειτουργική αναγκαιότητα που έθεσε το γονίδιο αυτό κάτω από τέτοιο έλεγχο;

Το σύστημα του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων αφορά την επαγωγή της σύνθεσης τους σε συνθήκες έλλειψης. Επειδή τα αμινοξέα καταναλώνονται κυρίως κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, η διαδικασία αυτή δυσχερύνεται όταν απουσιάζουν. Θα πρέπει επομένως αυτή να προσαρμοστεί στις νέες απαιτήσεις. Είναι λογικό λοιπόν να υπάρχει ένας μηχανισμός που να την προσαρμόζει. Αυτό αποτελεί την πρώτη παράμετρο της απόκρισης στη έλλειψη αμινοξέων που δηλαδή είναι η μείωση της κατανάλωσης τους.

Ο σακχαρομύκητας έχει την ικανότητα να βιοσυνθέτει όλα τα αμινοξέα, δεν υπάρχει κάποιο που να είναι απολύτως απαραίτητο να παρέχεται από το θρεπτικό μέσο. Ένα άλλο μέτρο που μπορεί να παρθεί όταν υπάρχει έλλειψη, είναι η βιοσύνθεση των αμινοξέων. Ο κεντρικός ρυθμιστής της βιοσύνθεσης είναι η πρωτεΐνη Gcn4 που ενεργοποιεί μεταγραφικά τα κατάλληλα γονίδια. Η ίδια η ρύθμιση του ρυθμιστή επιτυγχάνεται κατά το στάδιο της μετάφρασης του. Αυτό γιατί εξελίχθηκε έτσι η δομή του μηνύματος του ώστε το ίδιο το αίτιο που ευθύνεται για την πτώση της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης, να επάγει μεταφραστικά το GCN4.

Τα πλεονεκτήματα από μια τέτοια σύνδεση είναι πολλαπλά. Επιτυγχάνεται οικονομία ρυθμιστικών μηχανισμών από πλευράς του κυττάρου καθώς και ταχύτητα στην απόκριση. Πράγματι, ήδη από τα πέντε πρώτα λεπτά της απουσίας ενός αμινοξέος, η μεταφραστική επαγωγή του GCN4 είναι πλήρης²⁹⁸. Πρόκειται για μία από τις ταχύτερες αποκρίσεις που έχουν παρατηρηθεί.

Επειδή, μετά την επαγωγή του GCN4 και μέχρι τις βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης των αμινοξέων μεσολαβούν αρκετές διαδικασίες, ίσως είναι απαραίτητο αυτή η πρώτη επαγωγή να είναι γρήγορη ώστε να εξασφαλίζεται η διεξαγωγή της βιοσύνθεσης σε αποδεκτό χρονικό διάστημα. Τα αμινοξέα αποτελούν τους δομικούς λίθους των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια η διαδικασία που δυσχερύνεται από την έλλειψη τους είναι κυρίως η πρωτεϊνοσύνθεση.

Δεν είναι λοιπόν αυθαίρετη η εξέλιξη μιας τέτοιας δομής στο mRNA του μεταγραφικού ρυθμιστή που ευθύνεται για την ομοίωση των αμινοξέων, που να

τον θέτει κάτω από τον έλεγχο του ίδιου του μηχανισμού που δυσλειτουργεί κατά την έλλειψη των μορίων αυτών. Δηλαδή της μετάφρασης. Και είναι η δομή αυτή που προσδίδει πλεονέκτημα στο μήνυμα αυτό σε συνθήκες που η αποτελεσματικότητα της αποκωδικοποίησης όλων των υπόλοιπων ελατώνεται σημαντικά.

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης του μεταφραστικού ελέγχου του GCN4

Τα τελευταία χρόνια έχει συσσωρευτεί αρκετή πληροφορία που αφορά τον έλεγχο της μετάφρασης του γονιδίου GCN4, ώστε να είναι γνωστά αρκετά από τα βασικότερα μοριακά γεγονότα που κρύβονται πίσω από αυτή τη διαδικασία. Παρόλα αυτά, αρκετά κεντρικά ερωτήματα σχετικά με το μηχανισμό της ρύθμισης αυτής παραμένουν αναπάντητα.

Όπως αναφέρθηκε στην ανασκόπηση, η κινάση Gcn2 φωσφορυλιώνει τη α υπομονάδα του eIF2 σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων, επάγωντας έτσι τη μετάφραση του GCN4 mRNA. Όμως η επαγωγή αυτή είναι ανεξάρτητη από την παρουσία ή όχι της κινάσης αυτής στα πρώτα της στάδια. Δηλαδή σε στελέχη που το γονίδιο GCN2 έχει καταστραφεί, είναι δυνατή η εκκίνηση της επαγωγής της σύνθεσης Gcn4 το ίδιο καλά σε σύγκριση με στελέχη φυσικού τύπου. Δεν είναι βέβαια εφικτή η παράταση της για μεγάλο σχετικά χρονικό διάστημα, πρόκειται δηλαδή για παροδική απόκριση χωρίς συνέχεια. Επομένως ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για κάτι τέτοιο καθώς και η ίδια η αντίληψη της πείνας για αμινοξέα, δεν απαιτεί την παρουσία της κινάσης αυτής. Είναι δε πιο πιθανό η κινάση αυτή να διατηρεί την απόκριση του συστήματος γενικού ελέγχου όταν η έλλειψη είναι παρατεταμένη, παρά να σχετίζεται με την αντίληψη της. Σε κάτι τέτοιο συνηγορεί και η κινητική της μεταγραφικής της επαγωγής από την Gcn4 πρωτεΐνη. Πράγματι τα επίπεδα του GCN2 mRNA είναι ελάχιστα κατά την έναρξη της έλλειψης και η πλήρης μεταγραφική του επαγωγή επιτυγχάνεται μόνο μετά από τουλάχιστον έξι ώρες⁷¹. Ποιός είναι λοιπόν ο μηχανισμός που εκκινεί την απόκριση του γενικού ελέγχου και πώς το κύτταρο αντιλαμβάνεται την έλλειψη αμινοξέων από το θρεπτικό μέσο;

Το γεγονός ότι μια κινάση του eIF2 όπως η Gcn2 δε φαίνεται να συμμετέχει στη διαδικασία εκκίνησης της απάντησης στη πείνα για αμινοξέα, δεν αποκλείει τη συμμετοχή του ίδιου του eIF2 σ' αυτήν. Είναι όμως απαραίτητη αυτή η συμμετοχή και πιο ειδικά είναι απαραίτητη η φωσφορυλίωση της α υπομονάδας στην ίδια θέση, ενδεχομένως από μια άλλη κινάση;

Ένα από τα πρωταρχικά ερωτήματα που προέκυψαν από τη μελέτη του συστήματος του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων στο σακχαρομήκητα, παραμένει αναπάντητο. Δεν είναι γνωστό το πώς σηματοδοτείται ενδοκυτταρικά η εξωκυτταρική απουσία έστω και ενός αμινοξέως. Υπάρχουν αρκετές αποχρώσεις ενδείξεις σχετικά με το τί μπορεί να συμβαίνει. Τέτοιες ενδείξεις προέρχονται από την γενετική μελέτη των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα που είναι

υπεύθυνα για τη σύνδεση των tRNAs με τα αντίστοιχα αμινοξέα, των tRNA συνθετασών. Μεταλλαγές που μειώνουν ή καταργούν την ικανότητα για διεκπεραίωση αυτής της αντίδρασης σε κατάλληλες συνθήκες, από τα ένζυμα αυτά, έχουν ως αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση ασύνδετων με αμινοξέα tRNAs. Στελέχη που φέρουν τις παραπάνω μεταλλαγές εμφανίζουν στις συνθήκες αυτές, αύξηση της έκφρασης του GCN4, ακόμα και όταν το θρεπτικό μέσο είναι πλήρες αμινοξέων. Μάλιστα το γονίδιο για μια από τις συνθετάσες αυτές, την tRNA συνθετάση της Λυσίνης, απομονώθηκε ως γονίδιο τύπου GCD. Πρόκειται για το GCD5¹⁷⁵.

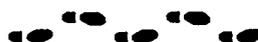
Μέσω ανεξάρτητης προσέγγισης διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση tRNA ψευδογονιδίων όπως αυτά της Βαλίνης, που δεν έχουν την ικανότητα να συνδεθούν με αμινοξύ λόγω μεταλλαγών που φέρουν, οδηγεί στην ανεξέλεγκτη επαγωγή του GCN4^{287, 302}. Φαίνεται λοιπόν ότι τα ασύνδετα tRNAs που μάλλον αποτελούν φυσική συνέπεια της έλλειψης αμινοξέων, έχουν ρόλο αρχικού τουλάχιστον ενδοκυτταρικού σήματος για την έναρξη της απόκρισης του γενικού ελέγχου¹⁷¹. Είναι όμως αυτή η υποβοηθούμενη άποψη, σωστή; Να σημειωθεί ότι δεν έχει γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ασύνδετων tRNAs σε διάφορες θρεπτικές συνθήκες και ότι τα ενδοκυτταρικά αποθέματα αμινοξέων δε μεταβάλλονται δραματικά κατά τη μετάβαση από θρεπτικό μέσο πλούσιο σε αμινοξέα, σε φτωχό.

Μέχρι τώρα ο γενικός έλεγχος της βιοσύνθεσης των αμινοξέων εμφανίζεται να επεμβαίνει μόνο σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων ή και κάποιων νουκλεοτιδίων. Είναι δυνατό άλλες μεταβολικές αποκρίσεις όπως η προσαρμογή στην έλλειψη πηγών άνθρακα και η είσοδος σε στατική φάση ανάπτυξης^{111, 293, 324} να επιρροεάζουν τον έλεγχο αυτό; Η ελεγχόμενη από cAMP, κινάση PKA που συμμετέχει στις διαδικασίες αυτές και μάλιστα εμφανίζει ομοιότητα με κινάσες του eIF2, μήπως παρεμβάλεται και στο σύστημα γενικού ελέγχου;

Τέλος αναφύεται και το εξής ζήτημα: Η απόκριση του συστήματος του γενικού ελέγχου εμφανίζεται ως συντονισμένη διεξαγωγή δυο γεγονότων. Το ένα είναι η πτώση της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης και το άλλο η επαγωγή του GCN4. Τα δύο αυτά συμβαίνουν παράλληλα στα αρχικά στάδια της προσαρμογής στην έλλειψη αμινοξέων που είναι ανεξάρτητα από την κινάση Gcp2²⁹⁸. Κατά τα επόμενα στάδια της διατήρησης της επαγωγής του GCN4 που εξαρτώνται από την κινάση αυτή, η γενική πρωτεϊνοσύνθεση εμφανίζεται να έχει ανακάμψει κατά ένα μεγάλο μέρος τουλάχιστον.

Όμως η φωσφορυλίωση του eIF2 συνεχίζει απο την κινάση Gcn2. Γιατί δεν επιρροάζεται και η γενική πρωτεϊνοσύνθεση ανάλογα, απο το γεγονός αυτό; Μήπως τελικά η δράση της κινάσης Gcn2 αφορά μόνο τη μετάφραση του μηνύματος GCN4;

Τα πειράματα που περιγράφονται και συζητούνται στα τρία επόμενα κεφάλαια σχεδιάστηκαν προς την κατεύθυνση της αντιμετώπισης των παραπάνω ερωτημάτων.



3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

α) Η ανεξάρτητη από την κινάση Gcn2, ενεργοποίηση του GCN4

Όταν υπερεκφραστούν κάποια tRNAs

Η μεθοδολογία της υπερέκφρασης γονιδίων στο σακχαρομύκητα έχει χρησιμοποιηθεί, αρκετές φορές με επιτυχία, για τον χαρακτηρισμό βιοχημικών μονοπατιών. Έτσι είναι δυνατό, προβλήματα στο μεταβολισμό που προκαλούνται από μεταλλαγές σε κάποια γονίδια, να ξεπεραστούν με υπερέκφραση και άλλων εκτός του μεταλλαγμένου, γονιδίων. Το γεγονός αυτό οδηγεί τελικά στη απομόνωση και άλλων γονιδίων που έχουν σχέση με τη συγκεκριμένη βιοχημική διαδικασία¹⁴⁷.

Ένα παράδειγμα που αφορά το σύστημα γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων είναι η περίπτωση του γονιδίου HIS3. Μια βλάβη σε οποιοδήποτε γονίδιο τύπου GCN προκαλεί αδυναμία επαγωγής των γονιδίων για τα βιοσυνθετικά ένζυμα μεταξύ των οποίων και του HIS3. Στελέχη gcn δεν αναπτύσσονται παρουσία της ουσίας 3-ΑμινοΤριαζόλη (3-AT), η οποία λόγω δομικής ομοιότητας με το προϊόν της βιοχημικής αντίδρασης που καταλύει η πρωτεΐνη His3 (Δευδρατάση του Ιμιδαζολ-Γλυκερινο-Φωσφορικού οξέος), αναστέλλει τη βιοσύνθεση της Ιστιδίνης δημιουργώντας συνθήκες έλλειψης του αμινοξέως αυτού. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό απαιτείται να επαχθεί μεταγραφικά το γονίδιο HIS3, πράγμα που δεν είναι δυνατό να συμβεί σε gcn στελέχη. Παρόλα αυτά αν το γονίδιο αυτό υπερεκφραστεί μέσω πλασμιδίου υψηλής αντιπροσώπευσης σε στελέχη gcn, αυτά αποκτούν τη δυνατότητα να επιβιώνουν παρουσία της ουσίας 3-AT.

Η απομόνωση γονιδίων που όταν υπερεκφραστούν παρακάμπτεται η αναγκαιότητα για την κινάση Gcn2, θεωρήθηκε ότι θα οδηγούσε στη αναγνώριση και άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία της απόκρισης του συστήματος γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων. Έγινε λοιπόν επιλογή κλώνων σε πλασμίδια υψηλής αντιπροσώπευσης, που καταστέλλουν την ευαισθησία στην 3-AT που εμφανίζει το στέλεχος gcn2. Σε αρχικά πειράματα που έγιναν απομονώθηκε το γονίδιο HIS3, το γονίδιο ATR1 και ένα ψευδογονίδιο για tRNA Βαλίνης (Η επιλογή έγινε από το Γιώργο Θηραίο και τη Monica Driscoll). Η απομόνωση του HIS3 ήταν αναμενόμενη σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν. Το γονίδιο ATR1 είναι πιθανά μια μεμβρανική πρωτεΐνη που απαλλάσσει το κύτταρο από τοξικούς μεταβολίτες όπως η 3-AT (Η ονομασία του: Amino-Triazole Resistance)¹⁴⁷.

Η απομόνωση του ψευδογονιδίου tRNA Βαλίνης δεν είναι το ίδιο προφανές με αυτή των δύο προηγούμενων γονιδίων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1, η υπερέκφραση

Πίνακας 3.1:

Τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης των γονιδίων που σημειώνονται:

A				
Min				
Στέλεχος.	htRNA ^{val*}	hSUP61	hNMEI	vector
wt	+++	+++	+	+++
gcn2	+++	+++	+	+++
sui2-ala	+++	+++	+	+++
3-AT				
wt	+++	+++	+	+++
gcn2	++	+	+	-
sui2-ala	++	+	+	-

B				
Min				
Στέλεχος.	htRNA ^{val*}	hSUP61	hNMEI	vector
wt	17.4	11.7	25.3	4.6
gcn2	12.2	9.3	20.2	2.9
sui2-ala	13.4	7.1	17.4	2.1
3-AT				
wt	46.2	48.4	49.7	45.3
gcn2	11.9	8.2	18.3	2.5
sui2-ala	10.1	7.9	16.4	1.8

A. Η ανάπτυξη των στελεχών **wt**, **gcn2**, **sui2-ala** όταν μετασχηματιστούν με κατασκευές που υπερέκφραζουν (**h**, high) τα παραπάνω γονίδια, σε πλούσιο ή φτωχό σε αμινοξέα, θρεπτικό μέσο (**Min** ή **3-AT**, Οι ορισμοί αυτοί του θρεπτικού μέσου εφαρμόζονται εδώ κατά σύμβαση, όπως αναφέρεται στις σελίδες των εξήγησεων).

B. Η έκφραση του γονιδίου GCN4 στα μετασχηματισμένα αυτά στελέχη που επίσης φέρουν το γονίδιο μάρτυρα GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

του γονιδίου αυτού προκαλεί τη μεταφραστική αποκαταστολή του GCN4 mRNA χωρίς να υφίσταται ανάγκη εφ' όσον δεν υπάρχει έλλειψη αμινοξέων. Αυτό συμβαίνει και σε στελέχη φυσικού τύπου αλλά και σε στελέχη *gcn2*. Επόμενα πειράματα (Απο τη Δέσποινα Αλεξανδράκη) έδειξαν ότι το tRNA αυτό δεν έχει την ικανότητα να συνδέεται με Βαλίνη λόγω μιας σημειακής μεταλλαγής που φέρει στο άκρο εκείνο που γίνεται η σύνδεση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η υπερέκφραση ενός τέτοιου tRNA πιθανά μιμείται την κατάσταση που ίσως επικρατεί μέσα στο κύτταρο κατά την έλλειψη αμινοξέων. Δηλαδή την περίσσεια ασύνδετων με αμινοξέα, tRNAs.

Η κινάση *Gcn2* δε συμμετέχει στη αντίληψη της μεταβολής που δημιουργεί η υπερέκφραση του tRNA αυτού, αφού οι επιδράσεις του επιμένουν και σε *gcn2* στελέχη. Για να διαπιστωθεί αν η κινάση αυτή υποκαθίσταται από άλλη η οποία επίσης φωσφορυλιώνει την α υπομονάδα του eIF2, το tRNA αυτό υπερεκφράστηκε σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγή στο γονίδιο *SUI2* για την α υπομονάδα, τέτοια που να μην επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της (Εικόνα 3.5Γ, Κατά Southern ανάλυση της μορφής του γονιδίου *SUI2*). Τα στελέχη αυτά είναι όπως αναμένεται, ευαίσθητα στην 3-AT, αφού για την ενεργοποίηση της μετάφρασης του GCN4 mRNA, είναι απαραίτητη αυτή η φωσφορυλίωση.

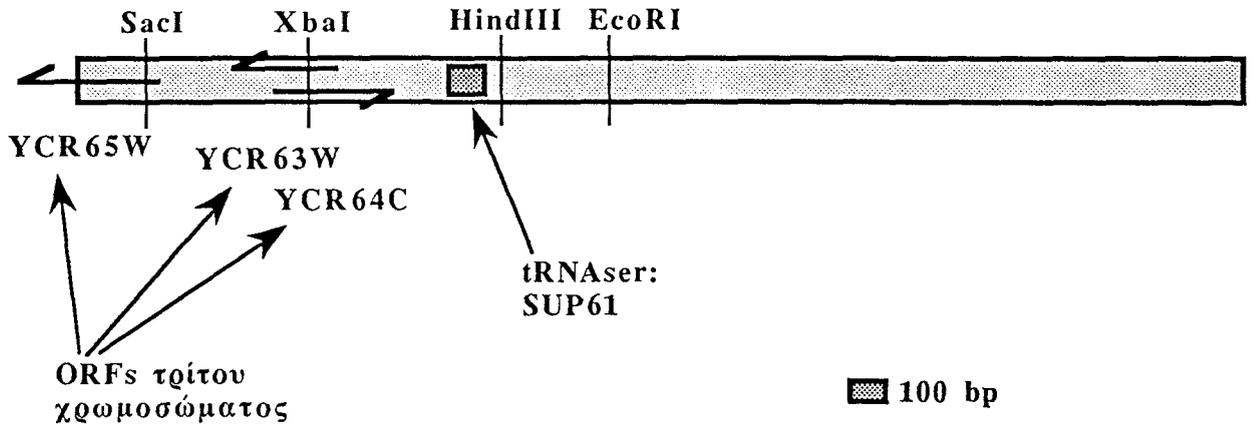
Τα αποτελέσματα που καταγράφονται στον πίνακα 3.1, δείχνουν ότι και σε τέτοια τα στελέχη, η υπερέκφραση του tRNA αυτού εξακολουθεί να επάγει την μετάφραση του GCN4 mRNA. Συνεπώς ο μηχανισμός που ευθύνεται για την επίδραση που έχει το ψευδο-tRNA, όχι μόνο είναι ανεξάρτητος της κινάσης *Gcn2* αλλά δεν περιλαμβάνει φωσφορυλίωση του eIF2 τουλάχιστον στη χαρακτηριστική θέση της Σερίνης 51 (το πεντηκοστό πρώτο αμινοξύ της α υπομονάδας).

Η προσπάθεια εμπλουτισμού της συλλογής γονιδίων που σε υπερέκφραση καταστέλουν την ευαισθησία στελεχών *gcn2* στην 3-AT, απέδωσε και ένα άλλο tRNA, αυτή τη φορά ένα φυσικού τύπου tRNA Σερίνης. Ένας χάρτης περιοριστικών ενζύμων της περιοχής του γονιδίου *SUP61*, που αντιστοιχεί στο tRNA αυτό και εντοπίζεται στο τρίτο χρωμόσωμα του *Saccharomyces*, φαίνεται στην εικόνα 3.1Α. Η ανάλυση που περιγράφηκε παραπάνω για το ψευδο-tRNA Βαλίνης επαναλήφθηκε και όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1, τα αποτελέσματα ήταν ποιοτικά όμοια με αυτά που αφορούν το ψευδο-tRNA. Η διαφορά εντοπίστηκε στην ένταση των επιδράσεων που τη φορά αυτή ήταν λιγότερο εκτεταμένες.

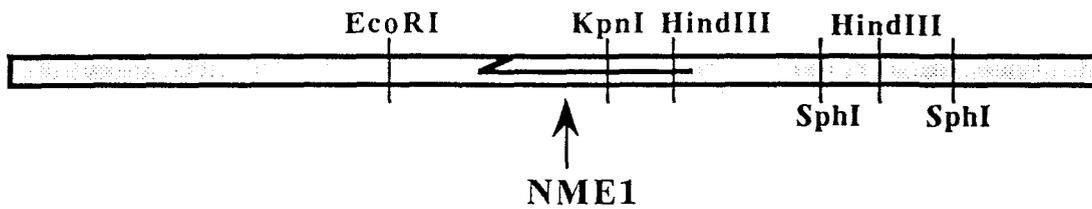
Το δεύτερο αυτό tRNA επειδή είναι φυσικού τύπου, θε πρέπει να συνδέεται με Σερίνη χωρίς πρόβλημα^{124, 298}. Γιατί τότε η υπερέκφραση του να έχει επίδραση στη μετάφραση του GCN4 mRNA; Μερικές πιθανές εξηγήσεις δίνονται στο πέμπτο κεφάλαιο. Η ανεξάρτητη της κινάσης *Gcn2*, ενεργοποίηση της μετάφρασης του GCN4

Χάρτες των γονιδίων SUP61 και NME1.

A



B



Εικόνα 3.1:

A. Χάρτης περιοριστικών ενζύμων της περιοχής του τρίτου χρωμοσώματος που περιέχει το γονίδιο SUP61 για ένα από τα tRNAs Σερίνης.

B. Χάρτης της γενωμικής περιοχής του γονιδίου NME1.

mRNA, δεν είναι κοινό χαρακτηριστικό όλων των tRNAs. Για παράδειγμα δε συμβαίνει κάτι τέτοιο όταν υπερεκφραστούν τα tRNA Αργινίνης, Γλυκίνης και το φυσικού τύπου tRNA Βαλίνης (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2:

Μερικά τουλάχιστον tRNAs δεν τροποποιούν την έκφραση του γονιδίου GCN4, όταν υπερεκφραστούν.

A	wt		gcn2	
	Min	3-AT	Min	3-AT
htRNA ^{Arg}	+++	+++	+++	-
htRNA ^{Gly}	+++	+++	+++	-
htRNA ^{Val}	+++	+++	+++	-
vector	+++	+++	+++	-

B	Min	3-AT	Min	3-AT
	htRNA ^{Arg}	3.8	39.5	2.1
htRNA ^{Gly}	3.6	37.8	2.3	2.1
htRNA ^{Val}	4.1	33.4	1.9	2.2
vector	3.7	35.2	2.2	2.2

- A.** Η υπερέκφραση των tRNAs **Αργινίνης**, **Γλυκίνης** καθώς και του φυσικού τύπου, **tRNA Βαλίνης** δεν επιδρά στην ανάπτυξη των στελεχών **φυσικού τύπου** και **gcn2** στις συνθήκες θρέψης που σημειώνονται.
- B.** Ούτε η έκφραση του γονιδίου GCN4 επιρεάζεται από τα γονίδια αυτά. Μετρήθηκε η ενεργότητα β-Γαλακτοσιδάσης με χρήση του γονιδίου μάρτυρα GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση <10%.

Όταν υπερέκφραστεί το μικρό RNA που κωδικοποιείται από το γονίδιο NME1

Στο ίδιο πείραμα επιλογής γονιδίων που καταστέλλουν την ευαισθησία των στελεχών *gcn2* στην 3-AT, όταν υπερέκφραστούν, απομονώθηκε το γονίδιο NME1. Ένας φυσικός χάρτης του κλώνου φαίνεται στην εικόνα 3.1B. Το γονίδιο αυτό μεταγράφεται από την Πολυμεράση II και κωδικοποιεί για ένα μικρό RNA το οποίο αποτελεί τμήμα της Ριβονουκλεάσης MRP (Mitochondrial RNA Processing)^{46, 264, 265}.

Η Ριβονουκλεάση αυτή αναγνωρίστηκε αρχικά ως ένζυμο που εμπλέκεται στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA, αποικοδομώντας τους RNA εκκινητές (Primers) της αντιγραφής. Επόμενες μελέτες έδειξαν ότι συμμετέχει και στην ωρίμανση των ριβοσωμικών RNAs και συγκεκριμένα στη δημιουργία του 5.8S ριβοσωμικού RNA²⁶⁶. Το γονίδιο για το πρωτεϊνικό τμήμα της Ριβονουκλεάσης αυτής δεν έχει ακόμα απομονωθεί. Η καταστροφή του γονιδίου NME1 είναι θνησιγόνος, γεγονός που συνηγορεί στο ότι η δράση του ενζύμου δεν περιορίζεται στα μιτοχόνδρια.

Και για την περίπτωση του γονιδίου αυτού εφαρμόστηκε η ανάλυση που περιγράφηκε στη προηγούμενη ενότητα για τα γονίδια των tRNAs. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συνοψίζονται στον πίνακα 3.1. Όπως μπορεί να διαπιστωθεί, η εικόνα που εμφανίστηκε ήταν ποιοτικά όμοια και μόνο η έκταση των επιδράσεων διέφερε. Η υπερέκφραση του γονιδίου NME1 είχε ως συνέπεια εντονότερη αύξηση της ανεξάρτητης από την κινάση Gcn2, μετάφρασης του GCN4 mRNA, από αυτήν που προκαλούν τα δυο tRNAs. Αντίστοιχα εκτεταμένη ήταν και η πτώση της γενικότερης πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου, η οποία εκδηλώθηκε ως μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους (Εικόνα 3.2). Αντιθέτως, η υπερέκφραση του ψευδογονιδίου για το tRNA Βαλίνης, δεν προκάλεσε κάποια προφανή παρόμοια μείωση.

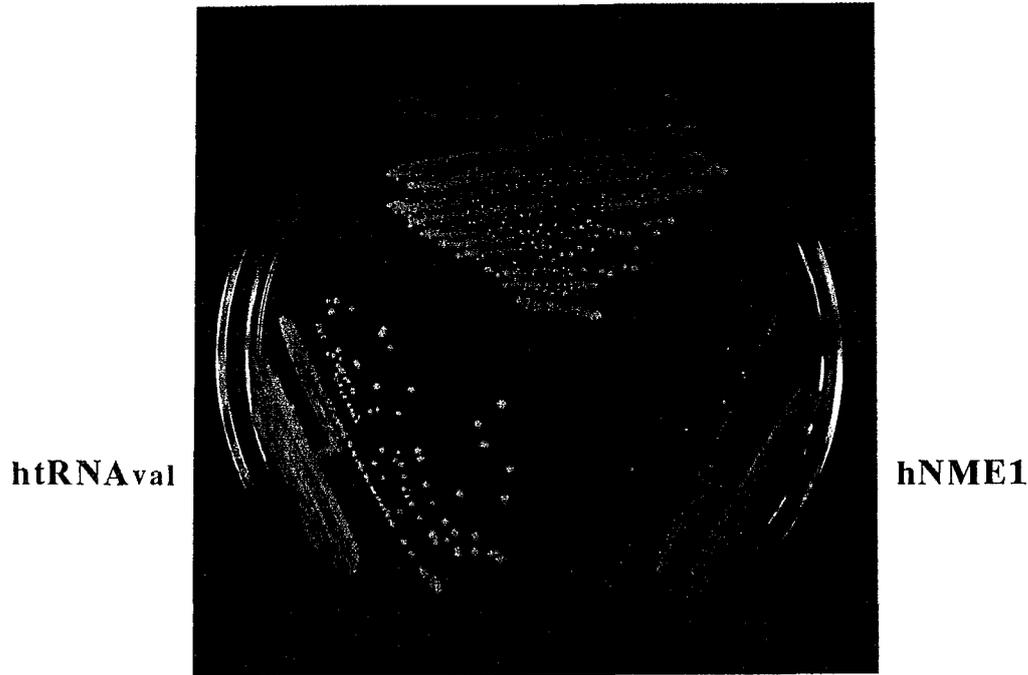
Τα παραπάνω παρατηρησιακά δεδομένα εφ' όσον συνδυαστούν με τη συμμετοχή της Ριβονουκλεάσης MRP στην ωρίμανση των ριβοσωμικών RNAs, προτείνουν ότι ανωμαλία στη βιογένεση του ριβοσώματος συνεπάγεται πτώση του ρυθμού μεταφραστικής έναρξης και επομένως ευνόηση της μετάφρασης του μηνύματος του γονιδίου GCN4.

Το ερώτημα που αναφέρεται στο σημείο αυτό είναι αν η υπερέκφραση του γονιδίου NME1 είναι ικανή συνθήκη για να προκληθεί πρόβλημα στην ωρίμανση των ριβοσωμικών RNAs. Τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα μέχρι τώρα αφορούν καταστάσεις είτε μείωσης της έκφρασης του είτε θερμοευαίσθητων μεταλλαγών σε αυτό. Για να προσεγγιστεί το ερώτημα αυτό μελετήθηκε η ωρίμανση των ριβοσωμικών RNAs σε στελέχη φυσικού τύπου, είτε μετασχηματισμένα με μια πλασμιδιακή κατασκευή που

Η υπερέκφραση του γονιδίου NME1 συνεπάγεται αργή ανάπτυξη των στελεχών φυσικού τύπου του σακχαρομύκητα.

WT

vector

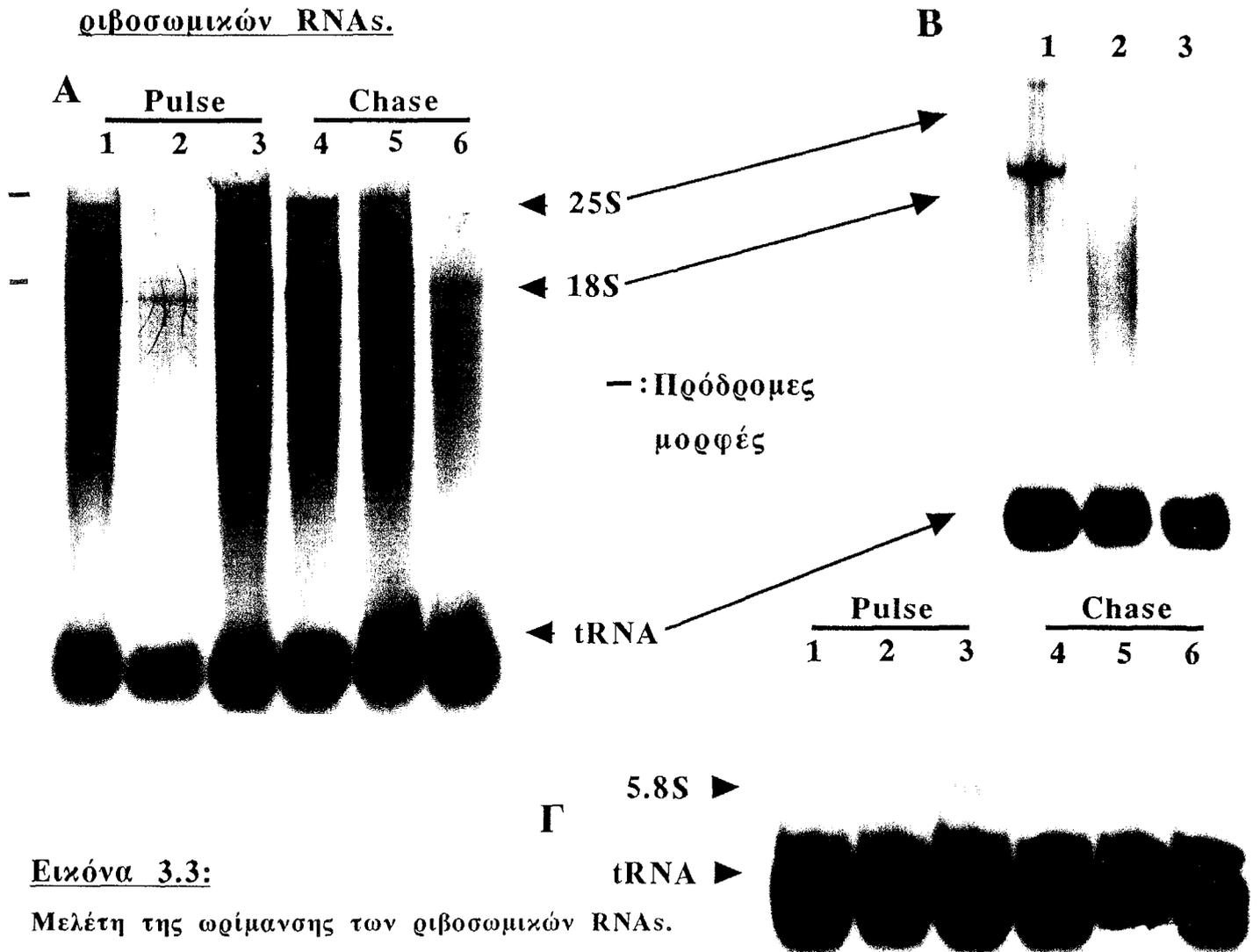


Εικόνα 3.2:

Η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου NME1 και του ψευδο-tRNAval στον πολλαπλασιασμό κυττάρων φυσικού τύπου.

Στελέχος φυσικού τύπου (WT) μετασηματίστηκε είτε με το πλασμίδιο φορέα (vector), είτε με πλασμίδιο που υπερέκφραζε το ψευδο-tRNAval (htRNAval), είτε τέλος με πλασμίδιο που υπερέκφραζε το γονίδιο NME1 (hNME1). Από το μέγεθος των αποικιών φαίνεται ότι ενώ η υπερέκφραση του ψευδο-tRNAval δεν είχε επίδραση στον πολλαπλασιασμό, η υπερέκφραση του NME1 μείωσε δραματικά τον ρυθμό του.

Η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου NME1 στην επεξεργασία των ριβοσωμικών RNAs.



Εικόνα 3.3:

Μελέτη της ωρίμανσης των ριβοσωμικών RNAs.

A. Προσδιορισμός του ρυθμού κατεργασίας των ριβοσωμικών RNAs **25S** και **18S** σε στέλεχος φυσικού τύπου μετασηματισμένο είτε με πλασμίδιο φορέα (θέσεις **1** και **4**), είτε με πλασμίδιο για την υπερέκφραση του ψευδο-tRNA^{val} (θέσεις **2** και **5**), είτε τέλος με πλασμίδιο για την υπερέκφραση του γονιδίου **NME1** (θέσεις **3** και **6**). Για χρονικό διάστημα πέντε λεπτών επέδρασε σε καλλιέργειες κυττάρων, ραδιενεργά σημασμένη Μεθειονίνη (**Pulse**) και στην συνέχεια στις καλλιέργειες αυτές προστέθηκε περίσσεια μη σημασμένης Μεθειονίνης (**Chase**). Στο πείραμα αυτό διαπιστώνεται ελατωμένη συσσώρευση του **25S** ριβοσωμικού RNA στα στελέχη που είναι μετασηματισμένα με πλασμίδιο για την υπερέκφραση, είτε του ψευδο-tRNA^{val}, είτε του γονιδίου **NME1**. Σημειώνονται οι πρόδρομες μορφές των ριβοσωμικών RNAs καθώς και τα **tRNAs**.

B. Επιβεβαίωση της μείωσης σε στέλεχος φυσικού τύπου στην συσσώρευση του ριβοσωμικού RNA **25S**, από την υπερέκφραση του ψευδο-tRNA^{val} και του γονιδίου **NME1** (θέσεις **2** και **3** αντίστοιχα) σε σχέση με στέλεχος φυσικού τύπου μετασηματισμένο με το πλασμίδιο φορέα (θέση **1**). Η σήμανση των RNAs αυτών έγινε όπως στο **A**.

Gamma. Μελέτη της ωρίμανσης του **5.8S** ριβοσωμικού RNA. Η ανάλυση έγινε όπως στο **A** (**Pulse, Chase**). Επίσης οι θέσεις στο πήκτωμα είναι αντίστοιχες των μετασηματισμένων στελεχών που αναφέρονται στο **A** (**1-4, 2-5, 3-6**).

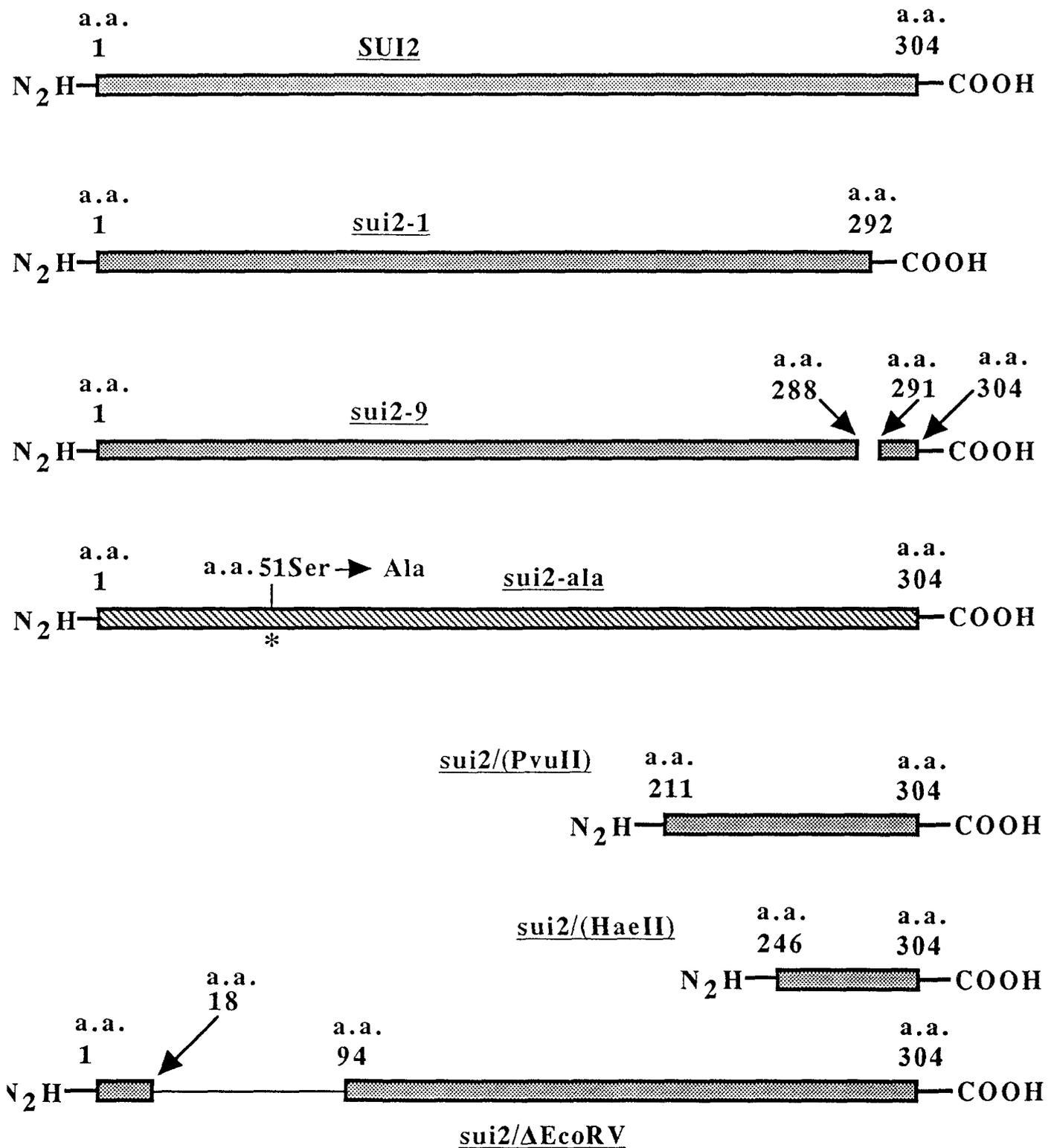
Όταν προκληθούν μεταλλάγες στη α υπομονάδα του eIF2 και όταν υπερεκφραστεί η β υπομονάδα

Το φυσιολογικό υπόστρωμα της κινάσης Gcn2 είναι ο γενικός μεταφραστικός παράγοντας έναρξης eIF2. Το σημείο στο οποίο τροποποιείται αυτός από την κινάση είναι η πεντηκοστή πρώτη Σερίνη, η οποία φωσφορυλιώνεται σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων. Το γεγονός ότι η καταστροφή του γονιδίου GCN2 δεν καταργεί τη μεταφραστική ενεργοποίηση του GCN4 mRNA σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν αποκλείει τη συμμετοχή του eIF2 στα φαινόμενα αυτά. Είναι πιθανή η τροποποίηση του παράγοντα αυτού σε διαφορετική θέση, από άλλη πρωτεΐνη εκτός της Gcn2. Για να εντοπιστούν τέτοιες, ενδεχομένως θέσεις πάνω στη α υπομονάδα, έγινε τυχαία μεταλλαξογένεση του αντίστοιχου γονιδίου SUI2⁴⁸.

Η μεταλλαξογένεση αυτή απέδωσε δυο είδη μεταλλαγών (sui2-1, sui2-9) που και οι δυο αφορούσαν την περιοχή του καρβοξυτελικού της α υπομονάδας (Εικόνα 3.4). Το ένα είδος (sui2-1) προκαλούσε την αυξημένη σύνθεση πρωτεΐνης Gcn4 ακόμα και χωρίς να υπάρχει έλλειψη αμινοξέων και το άλλο (sui2-9) δυσχέρωνε την αποκαταστολή του γονιδίου GCN4 όταν οι θρεπτικές συνθήκες επέβαλαν κάτι τέτοιο. Οι φαινότυποι αυτοί παρατηρήθηκαν μετά από υπερέκφραση των μεταλλαγμένων γονιδίων SUI2 σε στελέχη φυσικού τύπου και επέμειναν σε στελέχη gcn2 (Πίνακας 3.3). Όταν τα μεταλλαγμένα γονίδια αντικατέστησαν (Εικόνα 3.5B, 3.5Γ. Ανάλυση κατά Southern) τα κανονικά, τόσο σε στελέχη φυσικού τύπου όσο και σε gcn2, τα αποτελέσματα στην έκφραση του GCN4 ήταν ποιοτικά όμοια, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.4. Το γονίδιο SUI2 δεν είναι δυνατό να καταστραφεί παντελώς γιατί κάτι τέτοιο είναι θνησιγόνο για τα κύτταρα. Το γεγονός ότι στελέχη που φέρουν τις παραπάνω μεταλλαγμένες μορφές του γονιδίου στη θέση των κανονικών, σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες που προκύπτουν έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν έστω και με μειωμένη απόδοση. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να ερμηνεύσει το φαινότυπο της μεταλλαγής sui2-1. Πραγματικά, τέτοια στελέχη παρουσιάζουν το τυπικό πρότυπο κατανομής ριβοσωμάτων που είναι ενδεικτικό μειωμένης πρωτεΐνοσύνθεσης (Εικόνα 3.6A). Επιπρόσθετα το GCN4 mRNA μετατοπίζεται σε βαρύτερα πολυσώματα (Εικόνα 3.6B και 3.6Γ).

Όμως στελέχη που φέρουν την άλλη μεταλλαγή, εμφανίζουν κανονικά επίπεδα γενικής πρωτεΐνοσύνθεσης και μάλιστα τα επίπεδα αυτά δεν μεταβάλλονται σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα. Αντίστοιχα δεν επέρχεται πλήρης μεταφραστική ενεργοποίηση του GCN4 mRNA στις ίδιες συνθήκες, όπως καταγράφεται στους πίνακες 3.3 και 3.4. Το γεγονός αυτό όχι μόνο δεν συμβιβάζεται με την άποψη ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εμφανίζει μειωμένη λειτουργικότητα, αλλά επιπρόσθετα δεν μπορεί να τροποποιηθεί

Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες eIF2α.



Εικόνα 3.4:

Σύνοψη των μεταλλαγμένων μορφών της α υπομονάδας του eIF2. Αναφέρονται τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του γονιδίου **SUI2** που τους αντιστοιχούν. Το γονίδιο **sui2-ala** προσφέρθηκε από τον Thomas Donahue (Αναφορά 48).

Πίνακας 3.3:

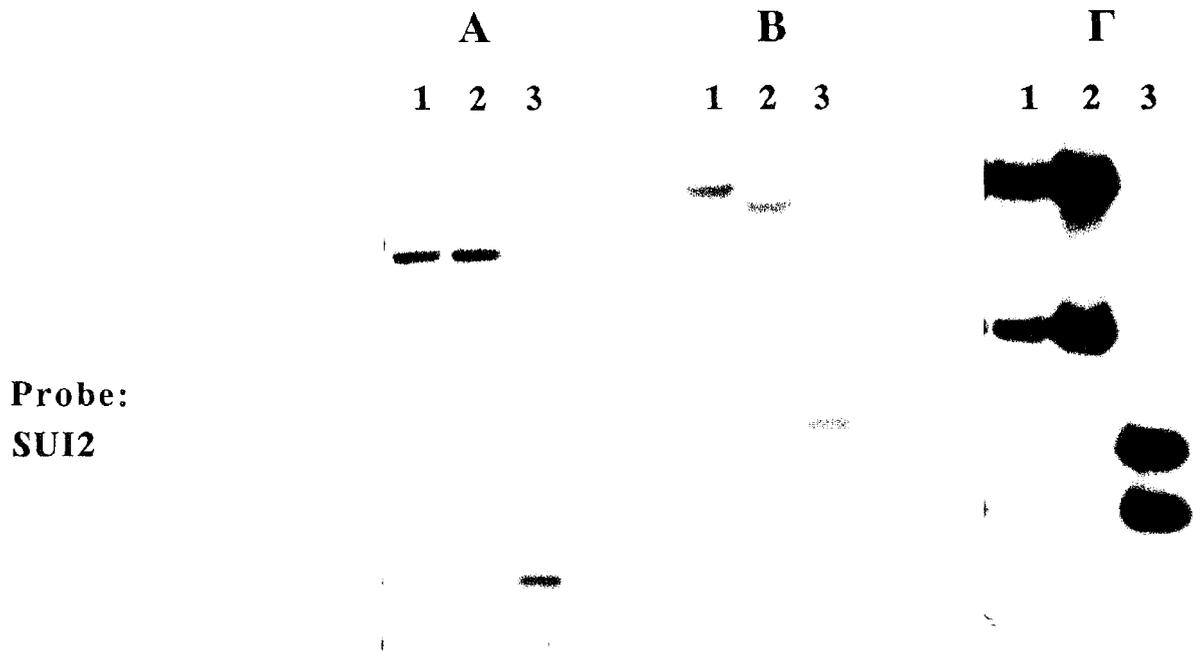
Τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της α και β υπομονάδας του eIF2 (SUI2 και SUI3, αντίστοιχα), καθώς και μεταλλαγών του γονιδίου SUI2.

A	Min		3-AT	
	wt	gcn2	wt	gcn2
Στέλεχος.				
hSUI2	+++	+++	++	-
hSU3	+++	+++	+++	+++
hsui2-1	+++	+++	+++	++
hsui2-9	+++	+++	+	-
hsui2/ Δ EcoRV	+++	+++	+++	++
hsui2/(PvuII)	+++	+++	+++	+/-
hsui2/(HaeII)	+++	+++	+++	+/-
vector	+++	+++	+++	-

B	Min		3-AT	
	wt	gcn2	wt	gcn2
Στέλεχος.				
hSUI2	2.5	2.1	29.7	1.9
hSU3	18.6	15.3	47.2	14.8
hsui2-1	15.2	13.4	41.4	10.5
hsui2-9	2.2	2.1	22.1	1.5
hsui2/ Δ EcoRV	14.7	14.2	39.7	15.7
hsui2/(PvuII)	6.1	4.8	37.6	4.1
hsui2/(HaeII)	5.6	3.9	37.2	3.2
vector	3.8	2.5	35.1	2.7

- A.** Η ανάπτυξη των στελεχών **wt** και **gcn2** μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια που φέρουν τα αναγραφόμενα γονίδια σε διάφορα θρεπτικά μέσα (**Min**, **3-AT**).
- B.** Η έκφραση του γονιδίου GCN4 στα παραπάνω μετασχηματισμένα στελέχη. Τα στελέχη αυτά φέρουν το γονίδιο μάρτυρα GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

Αντικαταστάσεις γονιδίων σε στελέχη φυσικού τύπου και *gcn2*.



Εικόνα 3.5:

Η αντικατάσταση του φυσικού τύπου γονιδίου **SUI2** με μεταλλαγμένες μορφές του.

A. Ανάλυση κατά Southern, στελέχους *sui2-1* (θέση **1**), *sui2-1/gcn2* (θέση **2**) καθώς και φυσικού τύπου στελέχους (θέση **3**). Φαίνεται η αλλαγή στο πρότυπο ζώνωσης που προκαλείται από το γεγονός της αντικατάστασης.

B. Η ίδια ανάλυση επαναλήφθηκε αυτήν την φορά για επιβεβαίωση της αντικατάστασης του ενδογενούς γονιδίου **SUI2** από το παράγωγο *sui2-9*. Στην θέση **3** αναλύεται γενωμικό DNA από στέλεχος φυσικού τύπου, ενώ στην θέση **2** από στέλεχος *sui2-9/gcn2* και στη θέση **1** γενωμικό DNA από στέλεχος *sui2-9*.

Γ. Φαίνεται η ανάλυση κατά Southern γενωμικού DNA που προέρχεται από στέλεχος *sui2-ala* (θέση **1**) και *sui2-ala/gcn2* (θέση **2**) σε αντιπαράθεση με αυτήν γενωμικού DNA προερχόμενου από κύτταρα φυσικού τύπου (θέση **3**).

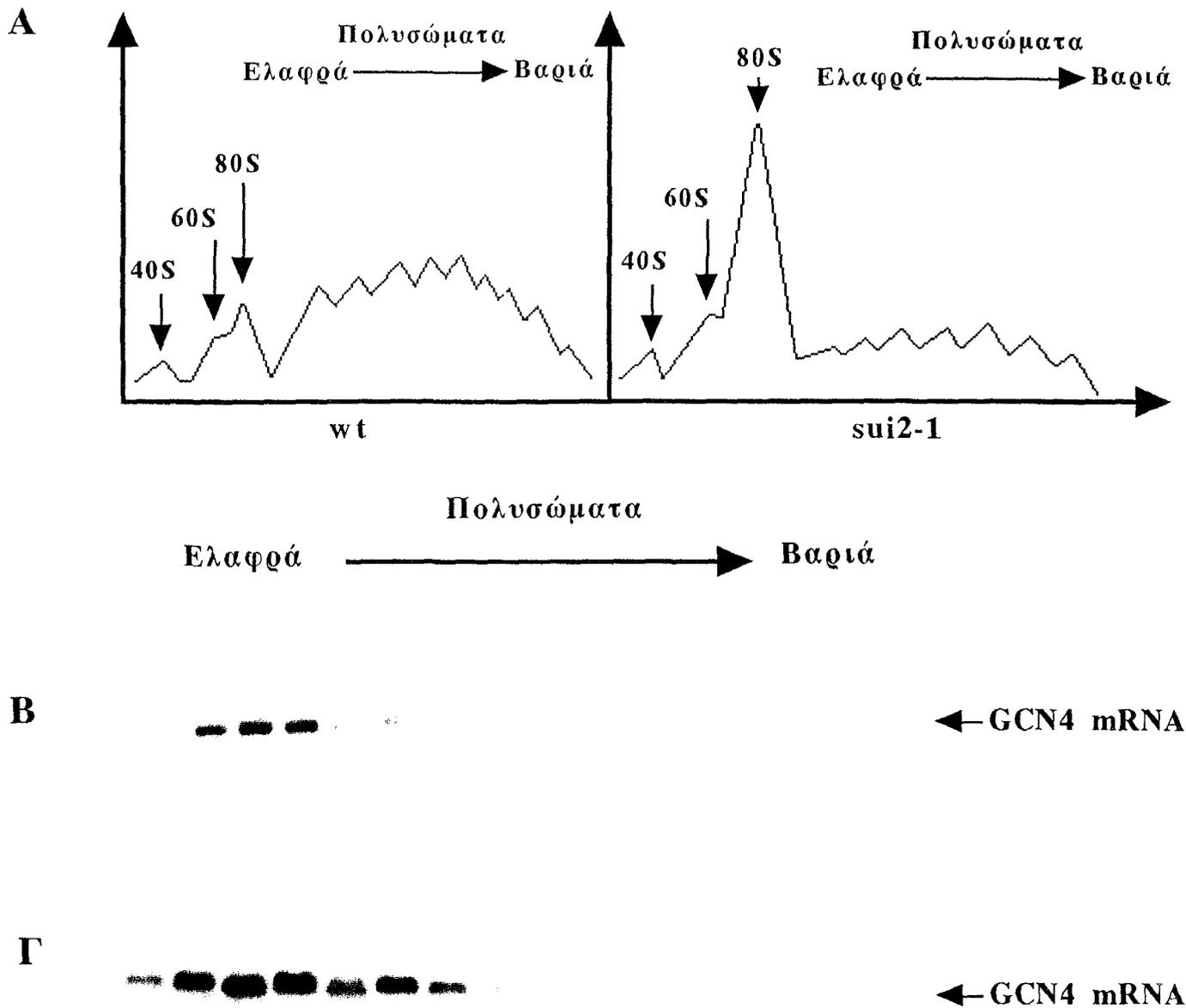
Ως ανιχνευτής στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε τμήμα του γονιδίου **SUI2**.

Πίνακας 3.4:

Τα αποτελέσματα των μεταλλαγών στην α υπομονάδα του eIF2 όταν τα αντίστοιχα γονίδια αντικαταστήσουν το φυσικού τύπου γονίδιο σε στελέχη φυσικού τύπου και *gcn2*.

Στέλεχος.	A		B	
	Min	3-AT	Min	3-AT
wt	+++	+++	3.7	38.2
<i>gcn2</i>	+++	-	2.3	2.1
<i>sui2-ala</i>	+++	-	1.9	2.2
<i>gcn2/sui2-ala</i>	+++	-	1.8	2.1
<i>sui2-1</i>	++	+++	17.6	46.3
<i>gcn2/sui2-1</i>	++	++	17.1	12.8
<i>sui2-9</i>	+++	+	2.9	20.1
<i>gcn2/sui2-9</i>	+++	-	1.9	1.9

- A.** Η ανάπτυξη των στελεχών που αναγράφονται κάτω από συνθήκες καταστολής (Min) ή αποκαταστολής (3-AT) του συστήματος του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων.
- B.** Η έκφραση του γονιδίου GCN4 στα ίδια στελέχη κάτω από τις παραπάνω συνθήκες. Τα στελέχη έφεραν το γονίδιο μάρτυρα GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.



Εικόνα 3.6:

Η κατανομή του GCN4 mRNA στα πολυσώματα σε στελέχη φυσικού τύπου καθώς και sui2-1.

A. Πολυσωμική κατατομή στελεχών φυσικού τύπου (wt) και sui2-1 (sui2-1), κάτω από συνθήκες παροχής όλων των αμινοξέων.

B. Σε στελέχη φυσικού τύπου κάτω από συνθήκες καταστολής της μετάφρασης του GCN4 mRNA, αυτό κατανέμεται σε σχετικά ελαφριά πολυσώματα (δίσωμα, τρίσωμα και ίσως τετράσωμα).

Γ. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στο στέλεχος sui2-1 παρατηρείται μια ελαφριά μετατόπιση της κατανομής του GCN4 mRNA προς βαρύτερα πολυσώματα (δίσωμα, τρίσωμα, τετράσωμα και ίσως πεντάσωμα).

αυτή η λειτουργικότητα προς το χειρότερο με φωσφορυλίωση, όπως κανονικά συμβαίνει προκειμένου να υλοποιηθεί η απόκριση του συστήματος γενικού ελέγχου.

Η ύπαρξη της συγκεκριμένης αυτής μεταλλαγής προσδίδει στη καρβοξυτελική περιοχή της α υπομονάδας του eIF2 ένα ρόλο ειδικό στη ρύθμιση της δράσης της πρωτεΐνης αυτής. Αυτό δε σημαίνει απαραίτητα ότι στη περιοχή αυτή εδράζεται κάποιο ρυθμιστικό στοιχείο. Είναι εξ' ίσου πιθανό να συμμετέχει αυτή στην αποκατάσταση των αλληλεπιδράσεων που θα οδηγήσουν στη τροποποίηση της πρωτεΐνης σε άλλο σημείο, ίσως στην ήδη γνωστή Σερίνη. Αν ισχύει η τελευταία υπόθεση τότε είναι δυνατό με υπερέκφραση μόνο της καρβοξυτελικής περιοχής να εμποδιστεί η επαφή της κανονικής πρωτεΐνης με αλλά μόρια μέσω της περιοχής αυτής, σε στελέχη φυσικού τύπου.

Στον πίνακα 3.3 φαίνεται η επίδραση της υπερέκφρασης τριών διαφορετικών μορφών της καρβοξυτελικής περιοχής στα στελέχη φυσικού τύπου και *gcn2*. Και για τις τρεις μορφές τα αποτελέσματα ήταν ποιοτικά όμοια και διέφερε μόνο η ένταση τους. Πρόκειται για αύξηση της έκφρασης του GCN4 η οποία είναι πιο εκτεταμένη για την περίπτωση της πρώτης κατασκευής που περιλαμβάνει μεγαλύτερο μέρος της α υπομονάδας όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.4. Πιθανά αυτό να οφείλεται στο ότι το μεγαλύτερο αυτό πεπτίδιο να έχει τη δυνατότητα να αποκτήσει δομή πιο όμοια με αυτή της κανονικής πρωτεΐνης και συνεπώς να μπορεί να αλληλεπιδράσει πιο αποτελεσματικά με τις άλλες πρωτεΐνες. Η επίδραση αυτή της έκφρασης των καρβοξυτελικών πεπτιδίων, ενδυναμώνει την άποψη ότι η περιοχή αυτή συμμετέχει στη λειτουργία και τη ρύθμιση της ενεργότητας του παράγοντα eIF2. Είναι δεν δυνατό η παρέμβαση στη δομή της περιοχής αυτής να οδηγήσει σε ανεξάρτητη από την κινάση *gcn2* αύξηση της μετάφρασης του GCN4 mRNA.

Ο παράγοντας eIF2 είναι ετεροτρομερής. Αποτελείται από τις υπομονάδες α , β και γ . Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη β υπομονάδα είναι το SUI3⁶⁷. Με σκοπό να μελετηθεί η πιθανή συμμετοχή της υπομονάδας αυτής στην ρύθμιση του GCN4 απομονώθηκε και υπερεκφράστηκε το παραπάνω γονίδιο. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.3 μια τέτοια υπερέκφραση προκαλεί την ακατάσχετη μετάφραση του GCN4 mRNA, ανεξάρτητα θρεπτικών συνθηκών, σε αντίθεση με την υπερέκφραση του γονιδίου για την α υπομονάδα που εμποδίζει την πλήρη αποκαταστολή της μετάφρασης, όταν απαιτείται από τη έλλειψη αμινοξέων (Πίνακας 3.3). Το τελευταίο είναι δυνατό να ερμηνευτεί ως ανεπάρκεια της κινάσης Gcn2 να φωσφορυλιώσει την αυξημένη ποσότητα α υπομονάδας στις συνθήκες αυτές. Πρόκειται για “διαλυτοποίηση” της δράσης του ενζύμου αυτού.

Η αύξηση της μετάφρασης που προκαλεί η υπερέκφραση του γονιδίου SUI3, συμβαίνει και σε στελέχη *gcn2* (Πίνακας 3.3). Είναι πιθανό η πληθώρα β υπομονάδων που συντίθεται να προκαλεί πρόβλημα στη συγκρότηση του λειτουργικού ετεροτρομερούς,

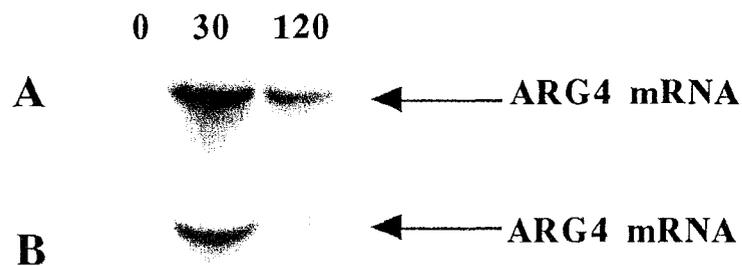
εξ' αιτίας διατάραξης της φυσιολογικής αναλογίας των τριών υπομονάδων. Και πάλι επομένως η δυσλειτουργία της μεταφραστικής μηχανής του κυττάρου επιδρά στη έκφραση του γονιδίου GCN4 ανεξάρτητα από την παρουσία της κινάσης Gcn2.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 2, η έντονη και παροδική ενεργοποίηση της μετάφρασης του GCN4 mRNA στα αρχικά στάδια της έλλειψης αμινοξέων, είναι ανεξάρτητη της παρουσίας της κινάσης Gcn2. Είναι όμως ανεξάρτητη και της φωσφορυλίωσης της α υπομονάδας του eIF2, στη θέση 51 (Σερίνη), ή υπάρχει άλλη κινάση που δρα κατά την περίοδο εκείνη και φωσφορυλιώνει επίσης την α υπομονάδα στο ίδιο σημείο;

Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό έγινε προσδιορισμός της συσώρευσης του mRNA του γονιδίου ARG4 σε τρία χρονικά σημεία (Εικόνα 3.7) μετά την επιβολή έλλειψης αμινοξέων σε στελέχη gcn2 και sui2-ala, τα οποία αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο με όλα τα αμινοξέα. Η έκφραση του γονιδίου ARG4 ακολουθεί την παροδική μεταφραστική ενεργοποίηση του GCN4 mRNA. Σε στελέχη gcn2 τα οποία διεξάγουν την ενεργοποίηση αυτή, έχει δείχθει⁷¹ ότι το ποσό του ARG4 mRNA αυξάνει μέχρι τα τριάντα λεπτά της αλλαγής θρεπτικού μέσου (Μεταφορά σε μέσο χωρίς αμινοξέα), και κατόπιν ελατώνεται. Η παροδική αυτή αύξηση είναι συνέπεια της απότομης μεταφραστικής ενεργοποίησης του GCN4 mRNA.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.7 η παροδική αύξηση του ARG4 mRNA παρατηρείται και στο στέλεχος sui2-ala. Αν η αντιστοιχία των δυο φαινομένων είναι σωστή, θα πρέπει να συμβαίνει παροδική μεταφραστική ενεργοποίηση του GCN4 mRNA στο στέλεχος sui2-ala. Επομένως το φαινόμενο αυτό δεν απαιτεί γεγονότα φωσφορυλίωσης στη θέση 51. Δεν αποκλείεται βέβαια να συμβαίνουν φωσφορυλιώσεις σε άλλες θέσεις της α υπομονάδας του eIF2, κατά την περίοδο της απότομης μεταφραστικής ενεργοποίησης.

Χρήση του ARG4 mRNA για την προσέγγιση της παροδικής μεταφραστικής ενεργοποίησης του GCN4 mRNA.



Εικόνα 3.7:

Η παροδική ενεργοποίηση του γονιδίου GCN4.

A. Αποτέλεσμα της παροδικής ενεργοποίησης του γονιδίου GCN4 είναι η άμεση επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου ARG4. Στην παραπάνω εικόνα εμφανίζεται η συσσώρευση του mRNA του γονιδίου ARG4 στα χρονικά διαστήματα 0, 30 και 120 λεπτών (0', 30', 120') μετά την έναρξη της κατάστασης έλλειψης αμινοξέων σε στέλεχος *gcn2*.

B. Εικονίζεται η συσσώρευση του ARG4 mRNA στα ίδια χρονικά διαστήματα σε στέλεχος *sui2-ala*.

Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε τμήμα του γονιδίου ARG4.

Όταν παρεμποδιστεί η αμινοακυλίωση των tRNAs της Ιστιδίνης και όταν μειωθούν τα επίπεδα των ενδογενών αμινοξέων του κυττάρου

Η ελλειψη έστω και ενός αμινοξέος από το θρεπτικό μέσο σηματοδοτεί την απόκριση του συστήματος γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων του σακχαρομύκητα. Αν πράγματι η άμεση συνέπεια της έλλειψης αυτής είναι η αναποτελεσματική σύνδεση των διαφορών tRNAs με τα αντίστοιχα τους αμινοξέα, τότε θα πρέπει η παρεμπόδιση της διαδικασίας αυτής με άλλο τρόπο να έχει το ίδιο αποτέλεσμα στην έκφραση του γονιδίου GCN4. Θερμοευαίσθητες μεταλλαγές στα γονίδια των tRNA συνθετασών που είναι τα ένζυμα που διεξάγουν τη σύνδεση αμινοξέος με tRNA, ασκούν τέτοια επίδραση στο σύστημα γενικού ελέγχου. Αν η πληθώρα ασύνδετων μορίων tRNA σκανδαλίζει την κινάση Gcn2, η επίδραση αυτή θα πρέπει να είναι εξαρτημένη από την ύπαρξη της. Συμβαίνει όμως κάτι τέτοιο;

Για να δοθεί απάντηση στο παραπάνω ερώτημα χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος *hts1* που φέρει θερμοευαίσθητη μεταλλαγή στο γονίδιο HTS1 που κωδικοποιεί για την tRNA συνθετάση της Ιστιδίνης²¹⁴. Η μεταλλαγή αυτή δημιουργεί ενδοκυττάρια περίσσεια ασύνδετων tRNAs Ιστιδίνης λόγω αναποτελεσματικής λειτουργίας του ενζύμου. Το παραπάνω στέλεχος εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GCN4 ακόμα και στη σχετικά χαμηλή θερμοκρασία των 30°C. Στην απαγορευτική για ανάπτυξη θερμοκρασία των 37°C, η αποκαταστολή του GCN4 είναι ακόμα μεγαλύτερη (Πίνακας 3.5A). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται ακόμα και όταν δεν υφίσταται έλλειψη αμινοξέων. Στο στέλεχος αυτό καταστράφηκε το γονίδιο GCN2 όπως φαίνεται στην εικόνα 3.8. Στη συνέχεια μετρήθηκε η μεταφραστική επαγωγή του GCN4 στο νέο στέλεχος *hts1Δgcn2* που προέκλειψε. Τα αποτελέσματα που καταγράφονται στον πίνακα 3.5A, δείχνουν ότι η έκταση της αποκαταστολής είναι αρκετά μειωμένη στο στέλεχος αυτό. Όμως παραμένει ένα υπολογίσιμο μέρος της έκφρασης του γονιδίου GCN4, το οποίο και επομένως είναι ανεξάρτητο της κινάσης Gcn2 (Πίνακας 3.5Γ). Μάλιστα θα πρέπει αυτό το ποσοστό που παραμένει να οφείλεται στη μη αποτελεσματική λειτουργία της συνθετάσης. Αυτό γιατί ανιχνεύεται μείωση του ποσοστού αυτού, κατά την προσθήκη στα κύτταρα, περίσσειας του αμινοξέως Ιστιδίνης ή του αναλόγου της, TRA. Η περίσσεια των δυο αυτών οδηγεί σε αύξηση των συνδεμένων με αμινοξύ, tRNAs Ιστιδίνης (Πίνακας 3.5B. Και το ανάλογο TRA (Triazolamine: Τριαζολ-αμίνη) έχει την ικανότητα σύνδεσης).

Και πάλι δηλαδή ο ρόλος της κινάσης αυτής εμφανίζεται ενισχυτικός μάλλον παρά εμπλέκεται αυτή στην αντίληψη της περίσσειας ασύνδετων tRNAs.

Πίνακας 3.5:

Οι επιπτώσεις της καταστροφής του γονιδίου GCN2, στους φαινότυπους των στελεχών *hts1* και *gcn4*. Εξετάζονται οι φαινότυποι που σχετίζονται με το σύστημα γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων.

A

Στέλεχος.	Min (30°C)	3-AT (30°C)	Min (34°C)	3-AT (37°C)
<i>wt</i>	3.8	30.1	-	-
Δ <i>gcn2</i>	2.8	2.9	-	-
<i>gcn4</i>	22.3	28.5	-	-
<i>hts1</i>	150.0	185.0	205.0	238.0
Δ <i>gcn2/hts1</i>	31.7	33.1	68.7	95.9
Δ <i>gcn2/gcn4</i>	13.9	14.5	-	-

B

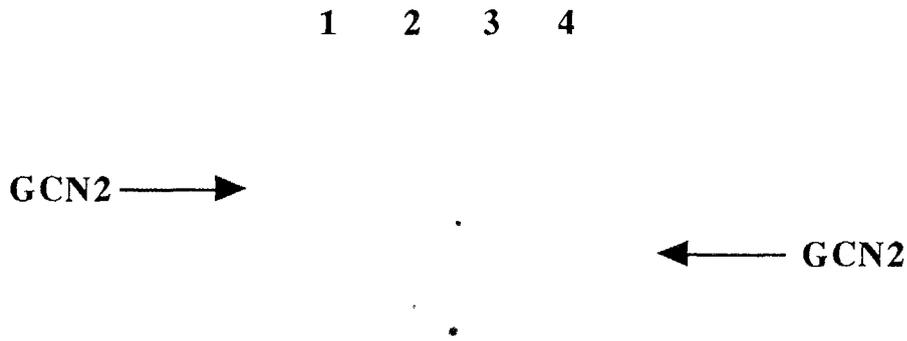
Στέλεχος.	30°C			37°C		
	Min	+His	+Tra	Min	+His	+Tra
<i>hts1</i>	162.0	91.5	120.0	222.0	208.0	217.0
Δ <i>gcn2/hts1</i>	35.1	12.8	17.2	91.7	85.1	92.7

Γ

Στέλεχος.	Ανάπτυξη			Χρώμα	
	Min	3-AT(30°C)	3-AT(34°C)	XGAL(30°C)	XGAL(34°C)
<i>hts1</i>	+++	++	++	+++	+++
Δ <i>gcn2/hts1</i>	++	+/-	+	+	++
Δ <i>gcn2</i>	+++	-	-	-	-

- A.** Η έκφραση του γονιδίου GCN4 στα στελέχη και τις συνθήκες που αναγράφονται. Το γονίδιο μάρτυρας ήταν το GCN4-LacZ.
- B.** Η έκφραση του γονιδίου GCN4 στα στελέχη *hts1* και Δ *gcn2/hts1* όταν παρέχονται οι μεταβολίτες Ιστισίνη (**His**) και Τριαζολ-αμίνη (**Tra**), σε θερμοκρασία 30°C ή 37°C. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.
- Γ.** Καταγράφεται η ανάπτυξη των αναγραφόμενων στελεχών στις συνθήκες που αναφέρονται, καθώς και η ένταση του μπλέ χρώματος που προκύπτει από τη δράση του ενζύμου β-Γαλακτοσιδάση πάνω στο υπόστρωμα **XGAL**. Το ένζυμο προέρχεται από την έκφραση του γονιδίου μάρτυρα GCN4-LacZ που φέρουν τα στελέχη.

Δημιουργία διπλά μεταλλαγμένων στελεχών *hts1/Δgcn2* και *gcn4/Δgcn2*.



Εικόνα 3.8:

Καταστροφή του γονιδίου *GCN2* σε στελέχη φυσικού τύπου, *hts1* και *gcn4*.

Εγινε ανάλυση κατά Southern, στελεχών στα οποία έχει καταστραφεί το γονίδιο *GCN2* μέσω αντικατάστασης εκτεταμένου τμήματος του από το γονίδιο *URA3*. Στην θέση **1** φαίνεται το πρότυπο ζώνωσης για φυσικού τύπου στέλεχος στο οποίο το γονίδιο *GCN2* είναι άθικτο. Στην θέση **2** φαίνεται το αντίστοιχο πρότυπο ενός στελέχους φυσικού τύπου, το οποίο φέρει κατεστραμένο γονίδιο *GCN2*. Στην θέση **3** εμφανίζεται το πρότυπο ενός στελέχους *hts1* στο οποίο έχει καταστραφεί το γονίδιο *GCN2*. Τέλος στην θέση **4**, η ανάλυση αυτή αφορά στέλεχος *gcn4* στο οποίο το γονίδιο *GCN2* έχει καταστραφεί με τον ίδιο τρόπο.

Ως ανιχνευτής στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε τμήμα του γονιδίου *GCN2*.

Τα στελέχη *gcn4* στα οποία ο μεταγραφικός παράγοντας Gcn4 δεν είναι λειτουργικός έχουν μειωμένα επίπεδα συσσώρευσης ενδογενών αμινοξέων. Αυτό γιατί η απουσία της πρωτεΐνης αυτής δεν επιτρέπει την έστω και βασική, χαμηλή έκφραση των γονιδίων για τα βιοσυνθετικά ένζυμα των αμινοξέων. Το γεγονός αυτό ερμηνεύει την μερική αποκαταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου μάρτυρα που φέρει τις *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες του GCN4. Για να εξεταστεί αν μέρος της αποκαταστολής αυτής είναι επίσης ανεξάρτητο της κινάσης Gcn2, καταστράφηκε το γονίδιο GCN2 σε στέλεχος *gcn4* (Εικόνα 3.8). Ακολούθησε η ίδια ανάλυση που περιγράφηκε για το στέλεχος *hts1Δgcn2*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.5A και μόνο σε έκταση υπολείπονται των προηγούμενων. Συνεπώς, συσσωρεύονται οι ενδείξεις ότι η κινάση Gcn2 δεν είναι το μόριο που πρωταρχικά ανιχνεύει την κατάσταση έλλειψης αμινοξέων.

Καταστολή των συνεπειών που έχουν μεταλλάξεις του eIF2α

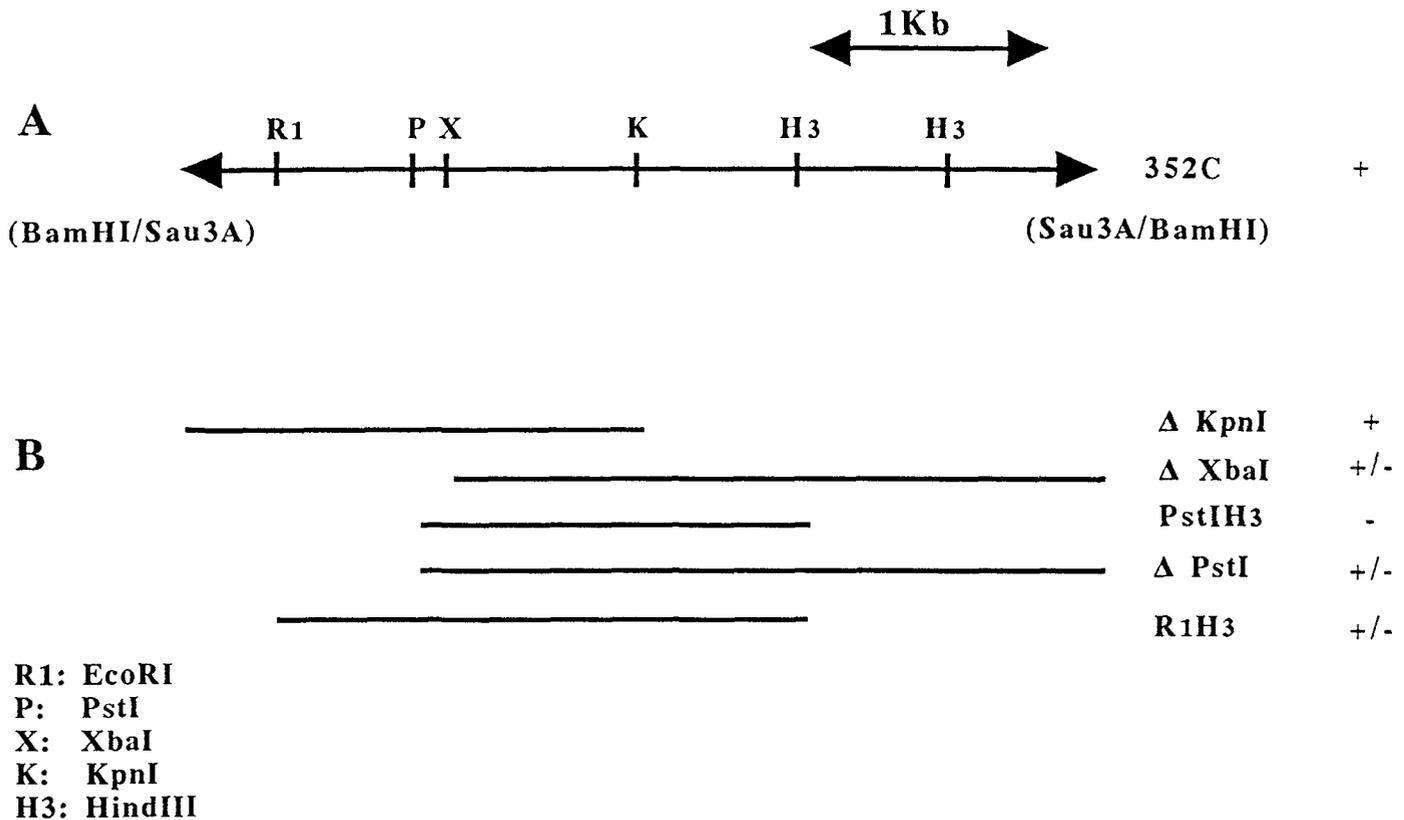
Οι μεταλλάξεις στην α υπομονάδα του eIF2 που εξετάστηκαν, υπογραμμίζουν τη σημασία του καρβοξυτελικού άκρου για τη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν αρκετά αμινοξέα που αποτελούν πιθανούς στόχους για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Με σκοπό την αναγνώριση άλλων πρωτεϊνών που είτε αλληλεπιδρούν με την περιοχή αυτή είτε σχετίζονται με τη λειτουργία της, έγινε προσπάθεια καταστολής των συνεπειών μιας μετάλλαξης σ' αυτήν που προκαλεί ακατάσχετη ενεργοποίηση της μετάφρασης του GCN4 mRNA (Πρόκειται για την *sui2-1*). Χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση της καταστολής μέσω υπερέκφρασης γονιδίων που προσφέρει και τη δυνατότητα απομόνωσης παραγόντων που δρουν σε στάδια επόμενα του eIF2.

Η στρατηγική αυτή απέδωσε ένα κλώνο (352C) του οποίου ο χάρτης των περιοριστικών ενζύμων φαίνεται στην εικόνα 3.9A. Στην ίδια εικόνα φαίνονται και οι ελλείψεις που έγιναν ώστε να εντοπιστεί με περισσότερη ακρίβεια το σχετικό γονίδιο (Εικόνα 3.9B). Ο κλώνος αυτός κατέστειλε ειδικά τις επιδράσεις της μετάλλαξης *sui2-1*, χωρίς η υπερέκφραση του να έχει κάποιο μετρήσιμο αποτέλεσμα σε στελέχη φυσικού τύπου, *gcn2* και *gcd1* (Εικόνα 3.9Γ). Είναι ενδιαφέρον ότι κατέστειλε επίσης και την επίδραση στη μετάφραση του GCN4 mRNA που είχε η υπερέκφραση των καρβοξυτελικών πεπτιδίων της α υπομονάδας του eIF2 (Αναφέρεται μόνο η περίπτωση του γονιδίου *sui2/ΔEcoRV*, για ένα από τα τρία τέτοια πεπτίδια). Τα αποτελέσματα καταγράφονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 3.6. Στην εικόνα 3.10A επίσης, εμφανίζεται η μείωση στη μεταγραφή του ελεγχόμενου από την πρωτεΐνη Gcn4 γονιδίου *HIS3*, που αποτελεί συνέπεια της πτώσης της έκφρασης του GCN4 σε στελέχη *sui2-1*, από τον κλώνο 352C. Το τελευταίο φαινόμενο καταστολής υποδεικνύει ότι πιθανά το προϊόν του γονιδίου που περιέχεται στον κλώνο 352C, αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή της α υπομονάδας του eIF2.

Εγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός τμήματος της μικρότερης έλλειψης που όμως εξακολουθούσε να έχει ικανότητα καταστολής. Με έλεγχο στη βάση δεδομένων για νουκλεοτιδικές αλληλουχίες σακχαρομύκητα, διαπιστώθηκε ότι η αλληλουχία του κλώνου 352C είναι ταυτόσημη με αυτή της εκφραζόμενης αλληλουχίας (EST, Expressed Sequence Tag), V86 (Εικόνα 3.11). Το προϊόν του γονιδίου αυτού είναι μιτοχονδριακής εντόπισης, όπως προέκυψε μετά από μελέτη της EST V86³¹.

Είναι δύσκολο να συμβιβαστεί η ιδέα σχετικά με την αλληλεπίδραση της α υπομονάδας του eIF2 με το προϊόν του κλώνου 352C, με το γεγονός ότι το προϊόν αυτό εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο²⁹¹. Είναι πιθανό παρόλα αυτά μια τροποποίηση της

Χαρτογράφηση και περιορισμός του κλώνου 352C. Η επίδραση του κλώνου αυτού είναι ειδική.



Γ

Στέλεχος.	-	352C	+
wt	3.2		3.3
sui2-1	19.7		8.9
gcn2	2.1		1.9
gcd1	43.7		46.4

Εικόνα 3.9:

Η πρωτοταγής δομή του κλώνου 352C και οι επιδράσεις του.

A. Ο χάρτης περιοριστικών ενζύμων του κλώνου 352C και η κλίμακα μεγέθους.

B. Οι ελλείψεις που κατασκευάστηκαν από τον κλώνο αυτό καθώς και η ικανότητα τους να αναπαράγουν το φαινότυπο ολόκληρου του κλώνου (+, +/-, -).

Γ. Η επίδραση του κλώνου 352C είναι ειδική για το στέλεχος *sui2-1*. Γονίδιο μάρτυρας ήταν το GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

Πίνακας 3.6:

Οι επιδράσεις της υπερέκφρασης του κλώνου 352C σε διάφορα γενετικά υπόβαθρα.

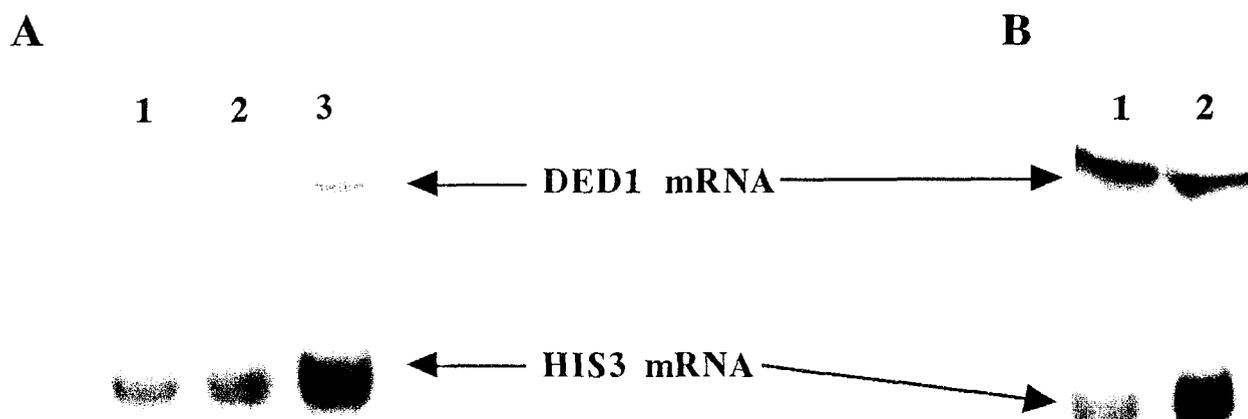
A	Min		3-AT	
	-	352C	+	
wt	+++	+++	+++	+++
gcn2	+++	+++	-	-
sui2-1	+++	+++	+++	+/-
gcn2+sui2/RV	+++	+++	++	+/-

B	-	352C	+	-	352C	+
	wt	4.3	4.1	42.7	40.6	
gcn2	2.7	2.4	1.9	2.1		
sui2-1	19.6	7.2	54.7	23.3		
gcn2+sui2/RV	18.3	7.4	14.1	5.3		

A. Ο κλώνος 352C, όταν υπερεκφράζεται, καταστέλει σημαντικά την ικανότητα του στελέχους *sui2-1* να αναπτύσσεται κατά την παρουσία 3-AT. Το ίδιο καταστέλεται και η αντίστοιχη ικανότητα ενός στελέχους *gcn2* μετασχηματισμένου με πλασμίδιο για την υπερέκφραση του καρβόξυτελικού πεπτιδίου της α υπομονάδας του eIF2 που κωδικοποιείται από το αλληλόμορφο *sui2/ΔEcoRI* (*sui2/RV*, στον πίνακα).

B. Προσδιορίζονται τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου GCN4 στα παραπάνω στελέχη κάτω από αντίστοιχες συνθήκες. Μετρήθηκε η ενεργότητα β -Γαλακτοσιδάσης με χρήση του γονιδίου μάρτυρα GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση <10%.

Πως επιρεάζεται η έκφραση του γονιδίου HIS3 από την υπερέκφραση του κλώνου 352C και του γονιδίου TRK2.



Εικόνα 3.10:

Ανάλυση Northern της έκφρασης του γονιδίου HIS3.

A. Προσδιορίστηκε η συσσώρευση του **HIS3 mRNA** σε στέλεχος φυσικού τύπου (θέση **1**), κάτω από θρεπτικές συνθήκες καταστολής της έκφρασης του γονιδίου GCN4 (παρουσία αμινοξέων). Κάτω από αντίστοιχες συνθήκες έγινε προσδιορισμός του ίδιου mRNA σε στέλεχος *sui2-1* μετασχηματισμένου με το πλασμίδιο που υπερεκφράζει τον κλώνο 352C (θέση **2**), καθώς και στο ίδιο στέλεχος μετασχηματισμένο με τον πλασμιδιακό φορέα (θέση **3**). Φαίνεται η μείωση της έκφρασης του γονιδίου HIS3 που προκαλείται στο στέλεχος *sui2-1* από την υπερέκφραση του κλώνου 352C.

B. Ανάλυση της συσσώρευσης του **HIS3 mRNA** σε στέλεχος *gcn2* μετασχηματισμένο με πλασμίδιο φορέα (θέση **1**) ή στο ίδιο στέλεχος αλλά μετασχηματισμένο με πλασμίδιο για την υπερέκφραση της κινάσης Trk2 (θέση **2**). Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες θρεπτικές συνθήκες με αυτές του **A**.

Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε τμήμα της γενωμικής περιοχής των γονιδίων **DED1** και **HIS3**. Η έκφραση του γονιδίου **DED1** δεν μεταβάλλεται όπως φαίνεται κατά τα πειράματα αυτά.

Ταύτιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του κλώνου 352C με αυτή της EST, v86.

	1		50		
352C	TGTTTAAACT	TATCAGAGGT	GACTACATTA	GGGCAACCTT	TGGAGGTTGT
v86.	TGTTTAAACT	TATCAGAGGT	GACTACATTA	GGGCAACCTT	TGGAGGTTGT
	51		100		
352C	TAAGACCACA	ATGGCTGCAA	ACAGAAACTT	CACATTTTTA	GAATCTGTTA
v86.	TAAGACCACA	ATGGCTGCAA	ACAGAAACTT	CACATTTTTA	GAATCTGTTA
	101		150		
352C	AGCATGTCTG	GTCAAGAGGT	GGTATCTTGG	GTTACTACCA	AGGTTTATTC
v86.	AGCATGTCTG	GTCAAGAGGT	GGTATCTTGG	GTTACTACCA	AGGTTTATTC
	151	161			
352C	CATGGGCATG	G			
v86.	CATGGGCATG	G			

Εικόνα 3.11:

Με χρήση κατάλληλων υπολογιστικών αλγόριθμων αποκαλήφθηκε η ταυτότητα ανάμεσα στην αλληλουχία του κλώνου 352C και της εκφραζόμενης αλληλουχίας του σακχαρομύκητα, EST (Expressed Sequence Tag), v86.

πρωτεϊνοσύνθεσης που διεξάγεται στο μιτοχόνδριο να έχει γενικότερη επίδραση στο μεταβολισμό του κυττάρου και τελικά στην έκφραση του γονιδίου GCN4. Εξ' άλλου η έκφραση αυτή, όπως διαπιστώνεται είναι ευαίσθητη σε ποικίλες διαταραχές. Η όποια ερμηνεία τελικά δοθεί θα πρέπει βέβαια να συμβιβάζεται και με το γεγονός της ειδικής καταστολής του φαινότυπου του στελέχους *sui2-1* και μόνο.

β) Υπάσχει σύνδεση ανάμεσα στην ελεγχόμενη από cAMP κινάση Trk2 και τη ρύθμιση της έκφρασης του GCN4;

Ενεργοποίηση της Trk2 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του GCN4 χωρίς τη ανάγκη Gen2

Με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών αλγορίθμων έχει προβλεφθεί ότι η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4 mRNA εμφανίζει εκτεταμένη δευτεροταγή δομή (Εικόνα 3.12Α). Έχει η δομή αυτή κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης του μηνύματος αυτού¹⁶³; Προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αυτό, τοποθετήθηκε μετά το τέταρτο μικρό αναγνωστικό πλαίσιο του mRNA (Εικόνα 3.12Γ), μια αλληλουχία με δυνατότητα να σχηματίζει σταθερή δευτεροταγή δομή²³³. Η αλληλουχία αυτή προερχόταν από τον ιό HIV1 (TAR loop, Εικόνα 3.12Β). Η αλληλουχία αυτή μείωνε δραστηρίως τη μετάφραση του μηνύματος εφόσον εμπόδιζε τη διαδικασία σάρωσης από την 40S ριβοσωμική υπομονάδα^{14, 15}, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.7Α. Η λογική πίσω από την στρατηγική της εισαγωγής μιας τέτοιας αλληλουχίας ήταν η ακόλουθη:

Αν κάποια πρωτεΐνη εμπλέκεται στην διευκόλυνση της σάρωσης, μέσω χαλάρωσης της δευτεροταγούς δομής του mRNA, τότε η ισχυροποίηση της δομής αυτής θα απαιτούσε αυξημένα επίπεδα μιας τέτοιας πρωτεΐνης για να διεξαχθεί η σάρωση²⁷². Επομένως μέσω της υπερέκφρασης γονιδίων θα ήταν δυνατή η απομόνωση ενός τέτοιου παράγοντα. Εφαρμόζοντας το σχήμα αυτό επιλέχτηκαν πλασμίδια από μια γενωμική βιβλιοθήκη υψηλής αντιπροσώπευσης στο σακχαρομύκητα τα οποία να προκαλούν αυξημένη σύνθεση του ενζύμου β-Γαλακτοσιδάση που παράγεται από ένα γονίδιο μάρτυρα που φέρει το cis ρυθμιστικά στοιχεία του GCN4 και επιπρόσθετα την ισχυρή δευτεροταγή δομή μετά το τέταρτο αναγνωστικό πλαίσιο (Σχήμα 3.1).

Απομονώθηκε έτσι το γονίδιο για την κινάση Trk2 που είναι ένα από τα τρία που διαθέτει ο σακχαρομύκητας για την καταλυτική υπομονάδα της ρυθμιζόμενης από cAMP, κινάσης. Ένας χάρτης του κλώνου που απομονώθηκε, φαίνεται στον πίνακα 3.8Γ. Τα αλλά δύο είναι τα TRK1 και TRK3. Και τα τρία αυτά γονίδια, είχαν αναγνωρισθεί προηγουμένως από άλλους¹²⁵. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.7Α η υπερέκφραση της κινάσης αυτής είχε την ικανότητα εκτός του αρχικού γονιδίου μάρτυρα, να επάγει την έκφραση και του φυσικού τύπου γονιδίου GCN4. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η επαγωγή των γονιδίων για τα βιοσυνθετικά ένζυμα που φαίνεται στη εικόνα 3.10Β, για την περίπτωση του HIS3. Επιπρόσθετα, η παραπάνω υπερέκφραση οδηγεί σε δραματική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Εικόνα 3.13 και Πίνακας 3.7Β).

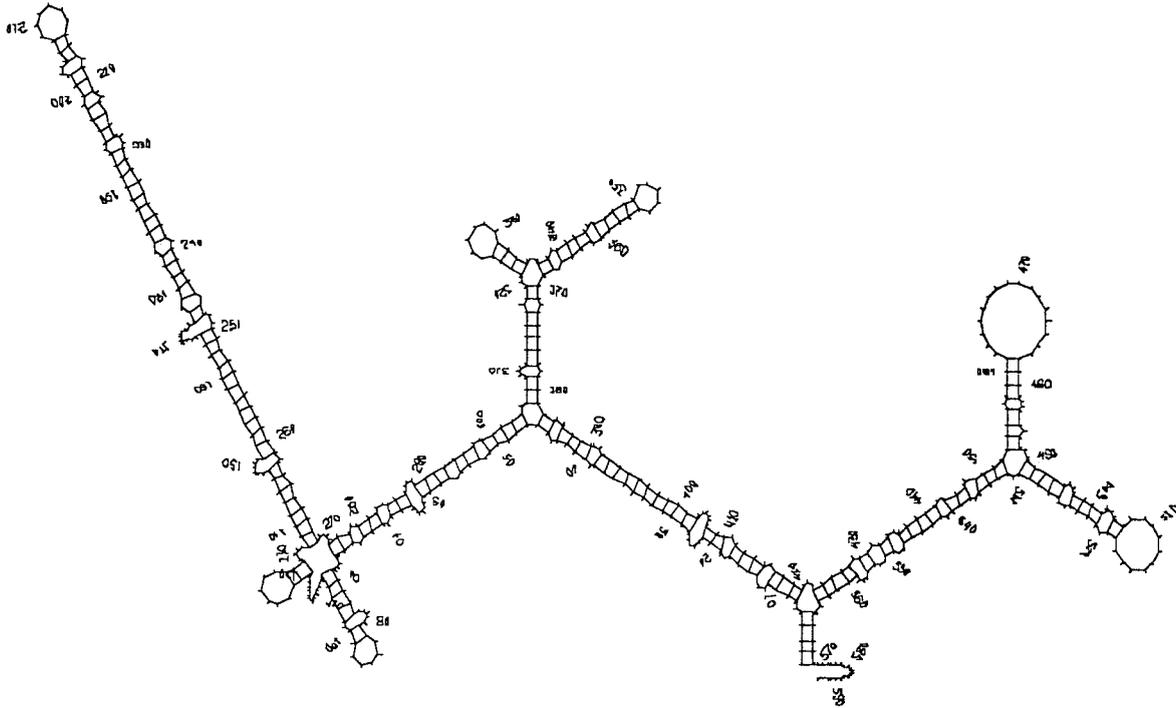
Δομές RNAs (Εικόνα 3.12).

A και B:

SCUIGLES of: GON4UTR.CONNECT;1 February 25, 1995 01:44

FOLDRNA of: GON4UTR.SEQ;3 Check: 394 from: 1 to: 594 January 25, 1995 14:01

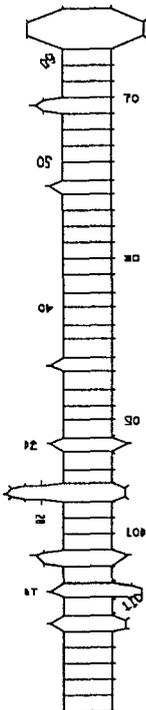
Length: 594 Energy: -78.1



SCUIGLES of: TAR.CONNECT;1 February 25, 1995 01:42

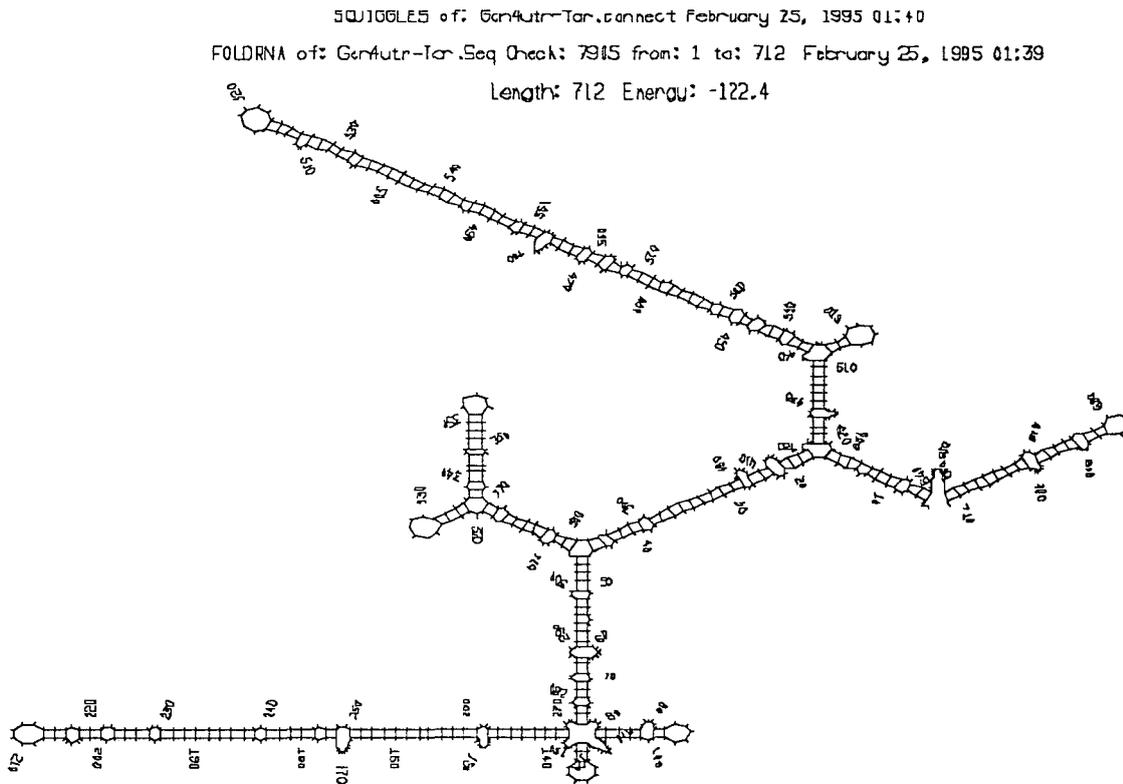
FOLDRNA of: tar.seq Check: 9517 from: 1 to: 118 February 25, 1995 01:24

Length: 118 Energy: -41.5



Δομές RNAs (συνέχεια).

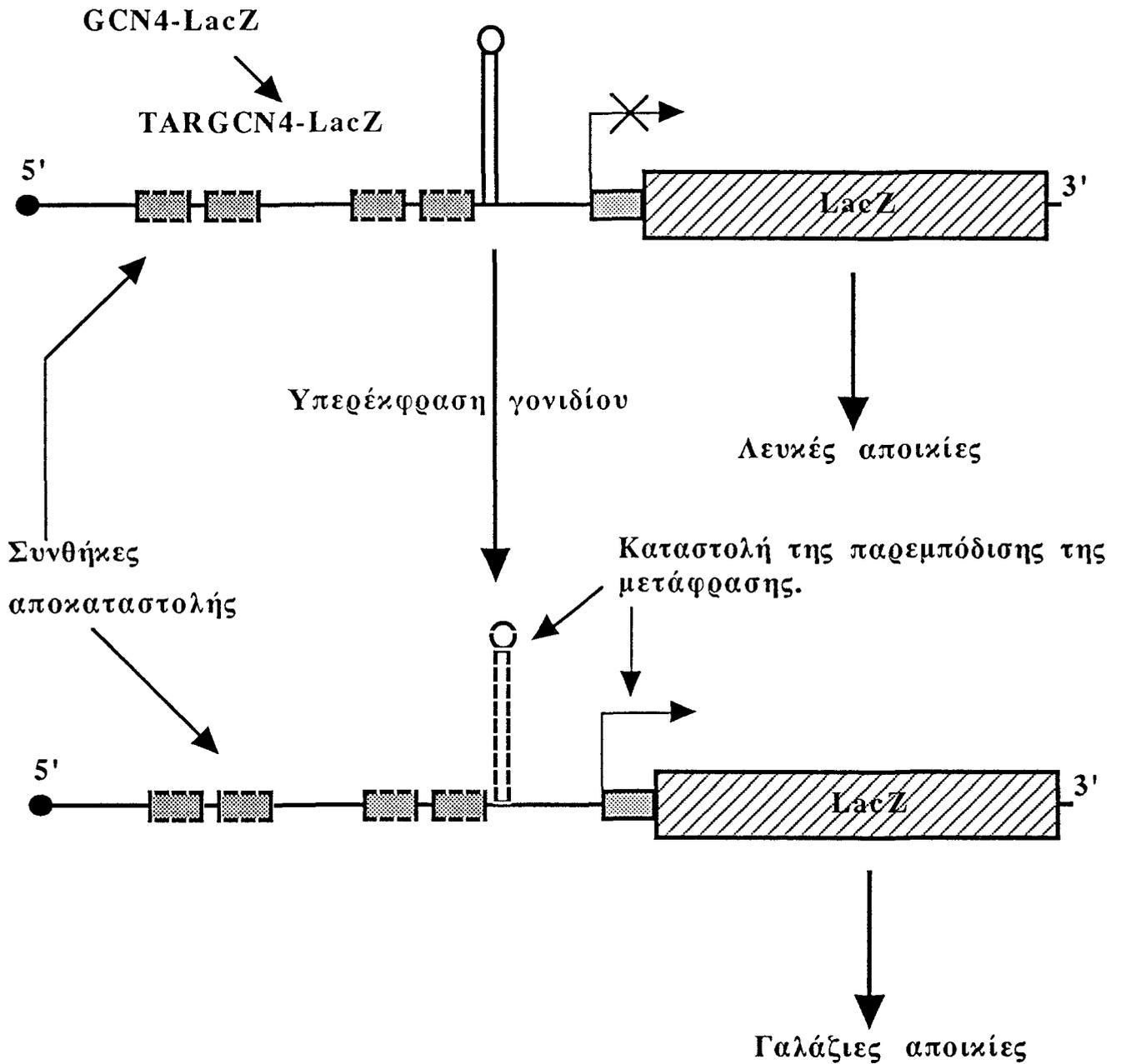
Γ:



Εικόνα 3.12:

- A. Πρόβλεψη της δομής της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του GCN4 mRNA.
- B. Πρόβλεψη της δομής της ριβονουκλεοτιδικής αλληλουχίας TAR του ιού HIV1.
- Γ. Πρόβλεψη της δομής της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του GCN4 mRNA στην οποία έχει εντεθεί η αλληλουχία TAR.

Διαφανοποίηση μιας δευτεροταγούς δομής.



Σχήμα 3.1:

Στρατηγική για την επιλογή γονιδίων που αναιρούν τη μεταφραστική καταστολή που προκαλούν δευτεροταγείς δομές στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου μάρτυρα GCN4-LacZ. Η επιλογή έγινε κάτω από συνθήκες αποκαταστολής της μετάφρασης του GCN4 mRNA, ώστε να ξεπεραστεί το εμπόδιο των μικρών αναγνωστικών πλαισίων.

Πίνακας 3.7:

Η υπερέκφραση της κινάσης *Trk2* ενεργοποιεί τη μετάφραση του *GCN4* mRNA και μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων σακχαρομύκητα.

A	Min					
	-		hTPK2		+	
Γονίδιο μάρτυρας.	-	hTPK2	+	-	hGCN2	+
<i>GCN4-LacZ</i>	5.2		60.7	5.2		24.3
<i>TARGGCN4-LacZ</i>	0.2		2.5	0.2		1.9

B	3-AT					
	-		hTPK2		+	
Γονίδιο μάρτυρας.	-	hTPK2	+	-	hGCN2	+
<i>GCN4-LacZ</i>	49.7		74.8	49.7		58.6
<i>TARGGCN4-LacZ</i>	1.5		3.1	1.5		2.4

- B**
- | | Min | 3-AT |
|--------|-------|-------|
| -hTPK2 | +++ | +++ |
| +hTPK2 | + | + |
| -hGCN2 | +++ | +++ |
| +hGCN2 | +++/- | +++/- |
- A. Η επαγωγή της έκφρασης των δύο γονιδίων μαρτύρων που αναγράφονται, όταν υπερεκφράζεται η κινάση *Trk2* ή η κινάση *Gcn2*. Οι συνθήκες ήταν είτε επάρκεια αμινοξέων είτε έλλειψη (*Min* και *3-AT* αντίστοιχα). Το γονίδιο μάρτυρας *TARGCN4-LacZ* φέρει στην 5' μή μεταφραζόμενη περιοχή του, την νουκλεοτιδική αλληλουχία *TAR* του HIV1. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.
- B. Η αναστολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προκαλεί η υπερέκφραση των δύο κινασών σε διάφορες θρεπτικές συνθήκες.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα αυτό ήταν φυσικού τύπου.

Πίνακας 3.8:

Η δράση της κινάσης *Trk2* είναι ανεξάρτητη της κινάσης *Gcn2*, αλλά εμποδίζεται από μεταλλαγές στην α υπομονάδα του *eIF2*.

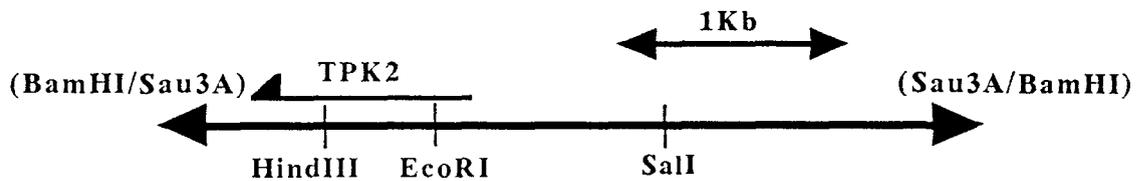
A

Στέλεχος.	Min		3-AT	
	-	hTPK2 +	-	hTPK2 +
wt	+++	+	+++	+
<i>gcn2</i>	+++	+	-	+
<i>sui2-ala</i>	+++	+	-	-

B

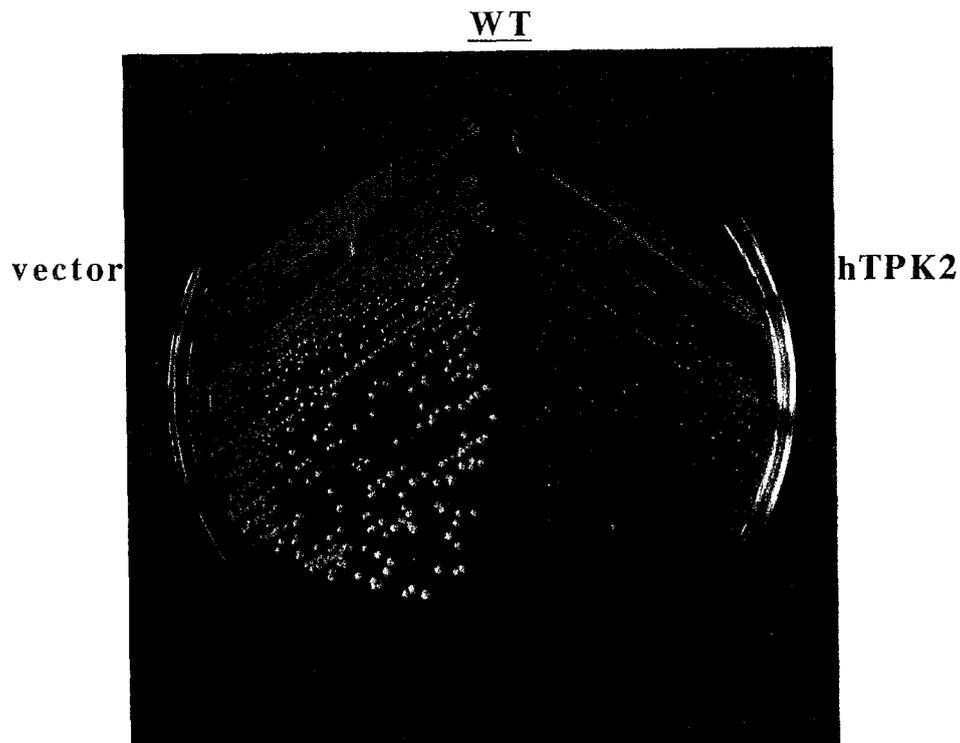
Στέλεχος.	Min		3-AT	
	-	hTPK2 +	-	hTPK2 +
wt	4.1	56.7	40.6	68.3
<i>gcn2</i>	2.4	5.8	1.8	5.2
<i>sui2-ala</i>	1.9	1.2	1.1	1.2

Γ



- A.** Η επίδραση της υπερέκφρασης της κινάσης *Trk2* στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μελετήθηκαν οι επιδράσεις στα αναγραφόμενα στελέχη κάτω από τις γνωστές συνθήκες επάρκειας (*Min*) και έλλειψης (*3-AT*) αμινοξέων.
- B.** Φαίνεται η έκφραση του *GCN4* κάτω από τις ίδιες παραμέτρους (Στελέχη, Συνθήκες) Γονίδιο μάρτυρας ήταν και πάλι το *GCN4-LacZ*. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.
- Γ.** Ο χάρτης περιοριστικών ενζύμων του γενωμικού κλώνου που περιεχί το γονίδιο *TPK2*.

Η ενεργοποίηση της κινάσης Trk2 έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα.



Εικόνα 3.13:

Η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου TPK2 στον πολλαπλασιασμό κυττάρων φυσικού τύπου.

Όπως διαπιστώνεται από την σύγκριση του τομέα που φέρει την καλλιέργεια των κυττάρων που είναι μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο που υπερεκφράζει το γονίδιο (**hTPK2**) και του τομέα των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο φορέα (**vector**), το γονίδιο αυτό επιδρά αρνητικά στον ρυθμό πολλαπλασιασμό όταν υπερεκφραστεί.

Η παρατήρηση αυτή συμβιβάζεται με παρέμβαση στη γενική πρωτεϊνοσύνθεση. Πως όμως προκύπτουν οι φαινότυποι αυτοί; Διαφαίνεται ότι η κινάση Trk2 δεν είναι ότι πιο αναμενόμενο θα μπορούσε να προκύψει από την στρατηγική επιλογής που ακολουθήθηκε. Μια ελικάση που καταστρέφει δευτεροταγείς δομές, για παράδειγμα δεν θα αποτελούσε έκπληξη^{84, 86, 57, 139}. Η Trk2 όταν δεν υφίσταται λόγος ενεργοποίησης της είναι παροπλισμένη εξ' αιτίας σύνδεσης της με τη ρυθμιστική υπομονάδα Bcy1. Η παρουσία cAMP, αποσυνδέει την καταλυτική υπομονάδα η οποία στη συνέχεια τροποποιεί τα υποστρώματα της¹²⁵.

Η στοιχειομετρία ρυθμιστικών προς καταλυτικές υπομονάδες είναι τέτοια ώστε η υπερέκφραση της Trk2 να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία περίσσειας της υπομονάδας αυτής η οποία δεν μπορεί να παροπλιστεί πλέον από την πρωτεΐνη Bcy1 και επομένως είναι ενεργή. Εστω ότι αυτή η κινάση επεμβαίνει στην πρωτεϊνοσύνθεση με τρόπο τέτοιο που να τροποποιείται η διαδικασία σάρωσης ώστε περισσότερες 40S ριβοσωμικές υπομονάδες να καταφτάνουν στη περιοχή μετά το τέταρτο αναγνωστικό πλαίσιο της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του γονιδίου GCN4, όπου βρίσκεται η ισχυρή δευτεροταγής δομή. Κάτω από τέτοιες συνθήκες μερικές ριβοσωμικές υπομονάδες διαπερνούν τη δομή αυτή οδηγώντας σε αύξηση της μετάφρασης του πέμπτου, κύριου αναγνωστικού πλαισίου.

Παρόλο που έκταση των επιδράσεων της υπερέκφρασης της Trk2 είναι μεγαλύτερη σε στελέχη φυσικού τύπου, εν' τούτοις δεν καταργείται σε στελέχη gcn2 (Πίνακας 3.8). Το ποιοτικό αποτέλεσμα της αύξησης της έκφρασης του GCN4 και της πτώσης της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης, παραμένει και συνεπώς πρόκειται για φαινόμενο κατά βάση ανεξάρτητο από την κινάση Gcn2, το οποίο ενισχύεται περαιτέρω από την παρουσία της. Ποιό είναι όμως το μόριο που τροποποιείται από την δράση της κινάσης Trk2 έτσι ώστε να προκληθούν οι παραπάνω επιδράσεις;

Είναι η Trk2 μια ακόμα κινάση του eIF2;

Η κινάση Trk2 είναι δυνατό να προκαλεί τις επιδράσεις που παρατηρήθηκαν επειδή ίσως διαθέτει περιορισμένη ικανότητα φωσφορυλίωσης της α υπομονάδας του eIF2. Με ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης αυτής διαπιστώνεται ότι έχει ομοιότητα με άλλες κινάσες του eIF2 και μάλιστα στην περιοχή αναγνώρισης του υποστρώματος (Εικόνα 3.14). Προκειμένου να διαπιστωθεί πειραματικά κάτι τέτοιο επαναλήφθηκε η γενετική μελέτη που εφαρμόστηκε στην περίπτωση των γονιδίων για τα tRNAs και του NME1.

Τα αποτελέσματα που καταγράφονται στον πίνακα 3.8, δείχνουν σαφώς ότι η δράση της κινάσης Trk2 πάνω στην έκφραση του GCN4 είναι ανεξάρτητα στο μεγαλύτερο μέρος τους από την κινάση Gcn2. Ομως δε συμβαίνει το ίδιο και για την α υπομονάδα του eIF2. Εδώ μεταλλαγή στη θέση 51 που μετατρέπει τη Σερίνη που κανονικά καταλαμβάνει τη θέση αυτή, σε Αλανίνη που είναι ένα δομικά όμοιο αμινοξύ αλλά δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί, καταργεί τους φαινότυπους της υπερέκφρασης της κινάσης Trk2, που αφορούν την έκφραση του GCN4 αλλά και την καθυστέρηση στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η Trk2 προκαλεί τα αποτελέσματα της στη έκφραση του GCN4 και στη γενικότερη πρωτεϊνοσύνθεση μέσω φωσφορυλίωσης της α υπομονάδας στη θέση της Σερίνης 51. Έχει δηλαδή και μια περιορισμένη ικανότητα να διεξαγεί αυτή τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση σε συνθήκες υπερέκφρασης της. Σε αντίθεση με την κινάση Gcn2 η υπερέκφραση της Trk2 μειώνει γενικότερα τη πρωτεϊνοσύνθεση χωρίς να περιορίζεται στη μετάφραση του GCN4 mRNA.

Η συμμετοχή της κινάσης Trk2 στη ρύθμιση της έκφρασης του GCN4 έχει διαπιστωθεί και για το φαινόμενο της έντονης και παροδικής ενεργοποίησης της μετάφρασης του GCN4 mRNA, στα αρχικά στάδια της απόκρισης στην έλλειψη αμινοξέων⁷⁴. Πιθανώς η κινάση αυτή να είναι ο τελεστής της οποίας τροποποίησης προκαλεί αυτή την απόκριση. Ομως στην περίπτωση αυτή έχει δείχτει ότι η τροποποίηση στην α υπομονάδα του eIF2 δεν γίνεται στη γνωστή Σερίνη αλλά αλλού πάνω στη πρωτεΐνη αυτή. Ακόμα κι έτσι, παρόλα αυτά το τελικό συμπέρασμα είναι ότι η κινάση Trk2 που είχε αναγνωριστεί ως τμήμα του μονοπατιού RAS, έχει ως υπόστρωμα και την α υπομονάδα του eIF2. Εστω και κάτω από ειδικές συνθήκες. Ενδεχομένως μάλιστα να αποτελεί το μόριο που είναι υπεύθυνο για το φαινόμενο της έντονης και παροδικής έκφρασης του GCN4, φαινόμενο που όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ανεξάρτητο της λειτουργίας της κινάσης Gcn2 και συνοδεύεται από σαφή πτώση της πρωτεϊνοσύνθεσης πράγμα που όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι τυπικό της δράσης της κινάσης αυτής.

Οι κινάσες έχουν ομοιότητες.

Gcn2p	ELLPMKFLRT	NIDSTINRFN	LUSESUNSNS	LELTPGDTIT	URGNGGRTLS
P68	TLASESSSEG	DFSADTSEIN	SNSDSLNSSS	LLMN....G	LRNNQRKA..
Tpk2	EFVAERAQPU	GQTIQQQNUN	TYGQGV....	..LQPHHDLQ	QRQQQQQQRQ
Gcn2p	QSSIRRRSFN	UGSRFSSINP	...ATRSRYA	SDFEEIAVLG	QGAFGQUVKA
P68KRSLA	PRFDLPDMKE	TKYTUDKRFG	MDFKEIELIG	SGGFGQUFKA
Tpk2	HQQLLTSQLP	QKSLUSKGGY	TLH.....	.DFQIMRTLQ	TGSFGRUHLU
Gcn2p	RNALDSRYYA	IKKIRHTE..	..EKLSTILS	EUMLLASLNH	QYUURYAAW
P68	KHRIDGKTYU	IKRUKYNN..	..EKAE...R	EUKALAKLDH	UNIVHYNGCW
Tpk2	RSUHNGRYYA	IKULKKQQUU	KMKQUEHTND	ERRMLKLVEH	PFLIRMWGTG
Gcn2p	LEEDSMDENU	FESTDEESDL	SESSSDFEEN	DLLDQSSIFK	NRTNHDLDNS
P68DG	FDYDPETSDD	SLESSDY...DPENS
Tpk2
Gcn2p	NWDFISGSGY	PDIUFENSSR	DDENEDLDHD	TSSTSSSESQ	DDTDKESKSI
P68	K.....NSSR
Tpk2
Gcn2p	QNUPRRRNFU	KPMTAVKKKS	TLFIQMEYCE	NRTLVDLI..	.HSENLNQQR
P68SKTK	CLFIQMEFCD	KGTLEQWIEK	RRGEKLDKVL
Tpk2QDAR	NIFMUMDYIE	GGELFSL..	RKSQRFPNPU
Gcn2p	DEYWRLFRQI	LEALSYIHSQ	GIIHRDLKPM	NIFIDESRNU	KIGDFGLAKN
P68	A..LELFEQI	TKGUDYIHSK	KLIHRDLKPS	NIFLUDTKQU	KIGDFGL...
Tpk2	AKFYA..AEU	ILALEYLHAH	NIIYRDLKPE	NILLDRNGHI	KITDFGL...
Gcn2p	VHRSLDILKL	DSQNLPGSSD	NLTSAI.GTA	MYUATEVLDG	TGHYNEKIDM
P68UTSLKN	DGKR.....	..TRSK.GTL	RYMSPEQI.S	SQDYGKEVDL
Tpk2RQRGT	NVTWTLGTP	DYIAPEVI.T	TKPYNKSUDW
Gcn2p	YSLGIFFEM	IYPFSTGMER	V..NILKKLR	SUSIEFPPDF	DDNKMKVEKK
P68	YALGLILAEI	LHUCDTAFET	S..KFFTDLR	DGII...SDI	FDKK...EKT
Tpk2	WSLGULIYEM	LUGYTPFYDT	TPMKTYEKIL	QGKUUYPYF	HPDUUDLLSK
Gcn2p	II.RLLIDHD	PNKRPGARTL	LNSGWLPUKH	QDEUIKEALK	SLSNPSSPWQ
P68	LL.QKLLSKK	PEDRPNTSEI	LRT..LTUWK	KSPEKNERHT	C.....
Tpk2	LITADLTRRI	GNLQSGSRDI	KAHPWF....	.SEUWERLL	AKDIETPYEP

Εικόνα 3.14:

Οι ομοιότητες των τριών κινάσων (P68: DAI/P68), εντοπίζονται στις περιοχές αναγνώρισης του υποστρώματος. Εδώ φαίνεται η ομοιότητα των περιοχών αυτών.

Το γεγονός ότι δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμη μεταλλαγές στην κινάση αυτή που να δημιουργούν ανικανότητα απόκρισης στη έλλειψη αμινοξέων, ίσως είναι ένδειξη ότι τελικά το σύστημα γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων μπορεί να σκανδαλιστεί ποικιλοτρόπως και είναι πληθωρικό όσον αφορά τους μηχανισμούς που τελικά συγκλίνουν στη αποκαταστολή της έκφρασης του γονιδίου GCN4.



4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η σχέση της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης και του μεταφραστικού ελέγχου του GCN4

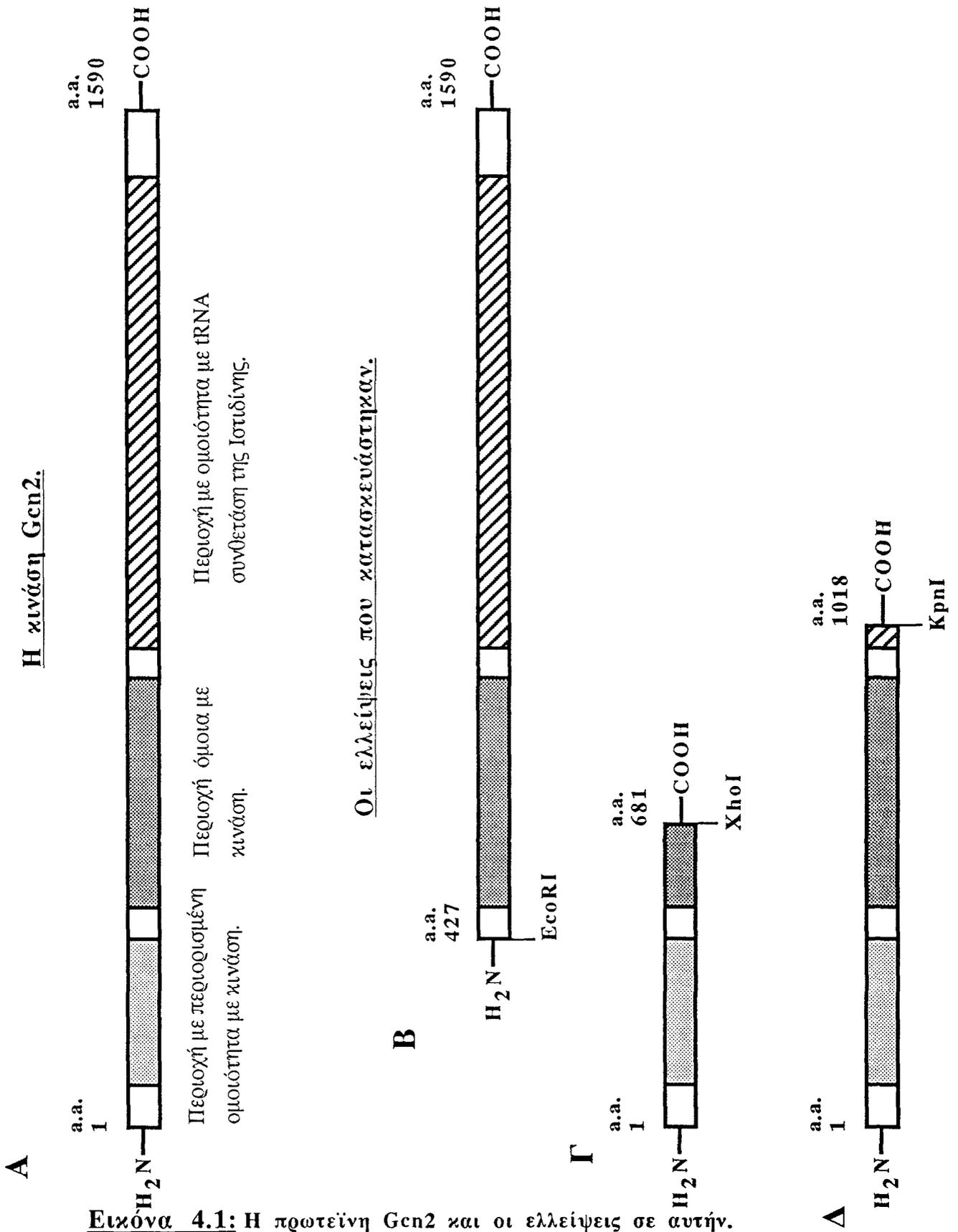
Μια περιορισμένη δομική-λειτουργική ανάλυση του γονιδίου GCN2

Η κινάση Gcn2 έχει ασυνήθιστη πρωτοταγή δομή. Εκτός από το κεντρικό της τμήμα εκείνο που εμφανίζει ομοιότητα με άλλες κινάσες πρωτεϊνών, περιέχει και μια εκτεταμένη περιοχή προς το καρβοξυ-τελικό άκρο της η οποία είναι σημαντικά όμοια με περιοχές που απαντούν σε tRNA συνθετάσες τάξης II και πιο συγκεκριμένα στην συνθετάση της Ιστιδίνης. Εκτός αυτών, η πρωτεΐνη Gcn2 είναι εξοπλισμένη και με μια άλλη περιοχή που εντοπίζεται στο ακραίο αμινο-τελικό τμήμα της και επίσης είναι όμοια με κινάσες πρωτεϊνών. In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι η κινάση Gcn2 είναι ικανή να αυτοφωσφορυλιώνεται και να φωσφορυλιώνει γενικά υποστρώματα όπως η καζεΐνη, καθώς και να φωσφορυλιώνει την α υπομονάδα του eIF2³¹². Οι άλλες περιοχές της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει ακόμα δείχτει ότι εμπλέκονται σε κάποιες διαδικασίες, εκτός από το καρβοξυ-τελικό άκρο που φαίνεται ότι είναι υπεύθυνο για τον εντοπισμό της στα ριβοσώματα.

Με σκοπό να διαπιστωθεί η λειτουργική αναγκαιότητα των περιοχών της κινάσης Gcn2 έγινε περιορισμένη δομική-λειτουργική ανάλυση του αντίστοιχου γονιδίου GCN2. Κατασκευάστηκαν για το σκοπό αυτό ελλείψεις του γονιδίου αυτού που να περιέχουν συγκεκριμένα τμήματα τέτοια ώστε οι αντίστοιχα παραγόμενες πρωτεΐνες να αποτελούνται από το καθένα από τα τρία χαρακτηριστικά κομμάτια της συνολικής πρωτεΐνης (ΔEcoRI, ΔXhoI, ΔKpnI). Οι ελλείψεις αυτές απεικονίζονται σχηματικά στην εικόνα 4.1. Στη συνέχεια τα τροποποιημένα αυτά γονίδια υπερέκφράστηκαν σε στελέχη φυσικού τύπου καθώς και σε στελέχη gcn2. Εξετάστηκε πως επηρεάζεται η ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου GCN4 κάτω από θρεπτικές συνθήκες που κινητοποιούν ή καταστέλουν την έκφραση του, με την παρουσία των γονιδίων αυτών. Όπως είναι γνωστό η υπερέκφραση του φυσικού τύπου γονιδίου GCN2, τόσο σε στελέχη φυσικού τύπου όσο και σε στελέχη gcn2, συνεπάγεται την ανεξέλεγκτη υψηλή έκφραση του GCN4, που δεν εξαρτάται από θρεπτικές συνθήκες.

Η υπερέκφραση τμημάτων του GCN2 επέδρασε στην ανάπτυξη των στελεχών αυτών όπως φαίνεται στον πίνακα 4.1. Όπως διαπιστώθηκε, δεν υπάρχει κάποιο προφανές αποτέλεσμα από την υπερέκφραση των δυο ελλείψεων που περιλαμβάνουν

Η κινάση Gcn2.



Εικόνα 4.1: Η πρωτεΐνη Gcn2 και οι ελλείψεις σε αυτήν.

A. Η δομή της φυσικού τύπου πρωτεΐνης.

B. Η πρώτη έλλειψη απομακρύνει την αμινοτελική περιοχή (Δ EcoRI).

Γ. Στη δεύτερη έλλειψη παραμένει άθικτο μόνο το αμινοτελικό τμήμα με περιορισμένη ομοιότητα με κινάση (Δ XhoI).

Δ. Η έλλειψη αυτή απομακρύνει την περιοχή με ομοιότητα με tRNA συνθετάση (Δ KpnI).

Πίνακας 4.1: Υπερέκφραση των ελλείψεων του γονιδίου GCN2.

A

Στέλεχος:	Wt		gcn2	
Γονίδιο.	Min	3-AT	Min	3-AT
GCN2	++	++	++	++
ΔEcoRI	+++	+	+++	+/-
ΔXhoI	+++	+++	+++	-
ΔKpnI	+++	+++	+++	-
vector	+++	+++	+++	-

B

Στέλεχος:	Wt		gcn2	
Γονίδιο.	Min	3-AT	Min	3-AT
GCN2	18.9	44.7	16.3	43.9
ΔEcoRI	3.1	19.7	6.8	8.4
ΔXhoI	3.6	37.8	2.1	2.3
ΔKpnI	3.8	39.2	2.4	2.5
vector	4.1	38.7	2.7	2.2

- A. Καταγράφονται τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης του γονιδίου GCN2 καθώς και των τριών ελλείψεων σε αυτό (**ΔEcoRI**, **ΔXhoI**, **ΔKpnI**), στον πολλαπλασιασμό κυττάρων φυσικού τύπου καθώς και **gcn2**. Χρησιμοποιήθηκαν συνθήκες καταστολής του συστήματος ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων (**Min**) καθώς και συνθήκες αποκαταστολής του με χρήση του συναγωνιστικού αναστολέα του προϊόντος του γονιδίου HIS3 (**3-AT**).
- B. Στα ίδια μετασηματισμένα στελέχη και κάτω από τις ίδιες συνθήκες μετρήθηκε η μεταφραστική ενεργοποίηση του GCN4. Αυτό έγινε με προσδιορισμό της ενεργότητας β-Γαλακτοσιδάσης που παράγεται από το χμαιοικό γονίδιο μάρτυρα GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι μονάδες Miller και αποτελούν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων μετρήσεων με απόκλιση < 10%.

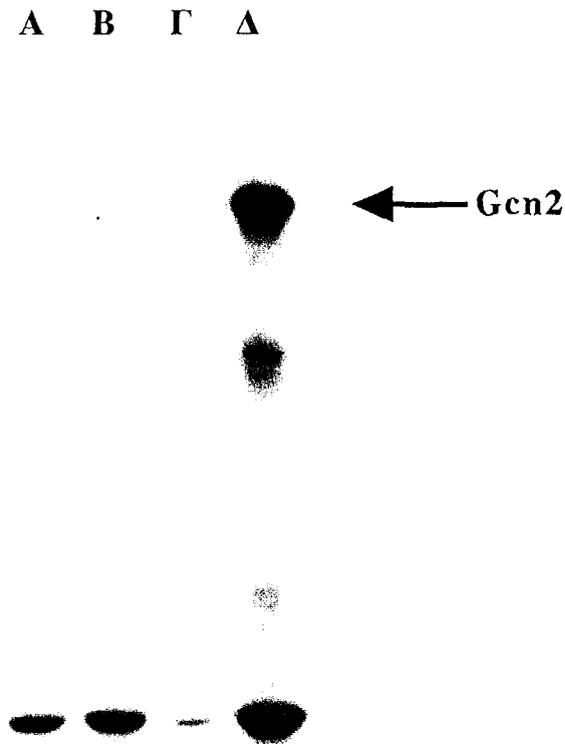
είτε μόνο το όμοιο με κινάση, αμινο-τελικό τμήμα, είτε το ίδιο αυτό μαζί με το κεντρικό, επίσης όμοιο με κινάση ($\Delta XhoI$, $\Delta KpnI$). Η συμπεριφορά της τρίτης έλλειψης ($\Delta EcoRI$), που δεν περιελάμβανε μοναχα το ακραιο αμινο-τελικο τμημα, ήταν ιδιαζουσα. Σε καμιά περίπτωση δεν φάνηκε ότι το ελλειματικό αυτό γονίδιο θα μπορούσε να υποκαταστήσει το φυσικού τύπου. Παρόλα αυτά προσέδιδε σε στελέχη *gcn2* που είναι ανίκανα να αναπτυχθούν σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων, μια περιορισμένη ικανότητα ανάπτυξης στις συνθήκες αυτές (Πίνακας 4.1). Στον ίδιο όμως πίνακα φαίνεται ότι το τροποποιημένο αυτό γονίδιο υπερεκφραζόμενο σε φυσικού τύπου στελέχη τα οποία δεν αντιμετωπίζουν πρόβλημα ανάπτυξης στις παραπάνω συνθήκες, οδηγούσε σε μείωση της ικανότητας τους να επιβιώνουν της έλλειψης αμινοξέων.

Με στόχο την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου GCN4 στα παραπάνω στελέχη, μετασχηματισμένα με τις κατασκευές που αφορούν τα τροποποιημένα γονίδια GCN2, συνεκφράστηκε σε αυτά ένα χειμερικό γονίδιο μάρτυρα β Γαλακτοσιδάσης που έφερε τις *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου GCN4. Οι μετρήσεις της έκφρασης του γονιδίου μάρτυρα ($GCN4-LacZ$)²⁹⁶ επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις που αφορούσαν την ικανότητα ανάπτυξης όπως φαίνεται στον πίνακα 4.1. Και πάλι η συμπεριφορά της τρίτης έλλειψης διαφοροποιήθηκε μειώνοντας την έκταση της αποκαταστολής του GCN4 σε στελέχη φυσικού τύπου, και αυξάνοντας την έκφραση του σε στελέχη *gcn2* ακόμα και παρουσία αμινοξέων.

Παρόλη την έλλειψη της αμινο-τελικής περιοχής που εμφανίζει την περιορισμένη ομοιότητα με κινάση, η πρωτεΐνη που προκύπτει από την τρίτη έλλειψη πιθανώς να έχει την ικανότητα να εξακολουθεί να δρά ως κινάση μέσω του κεντρικού τμήματος της, που έχει παραμείνει. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν συμβαίνει κάτι τέτοιο, έγινε ανοσοκατακρίμηση και έλεγχος για *in vitro* αυτοφωσφορύλιωση της κινάσης Gcn2. Η ικανότητα για αυτοφωσφορύλιωση θεωρείται κριτήριο για τη λειτουργικότητα μιας κινάσης. Για να μην υπάρχει αλλοίωση του αποτελέσματος από τη δράση της ενδογενούς κινάσης, χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *gcn2* μετασχηματισμένα με κατασκευές ελλείψεων του γονιδίου GCN2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2, ούτε το γονίδιο με έλλειψη του ακραίου αμινο-τελικού τμήματος, ούτε αυτό με έλλειψη της περιοχής με ομοιότητα με tRNA συνθεάση, παράγουν πρωτεΐνες με ικανότητα αυτοφωσφορύλιωσης. Επομένως το κεντρικό τμήμα που περιέχεται και στις δυο κατασκευές και είναι αυτό που εμφανίζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με άλλες κινάσες πρωτεϊνών, δεν είναι αρκετό για αυτοφωσφορύλιωση.

Γιατί η υπερέκφραση της τρίτης έλλειψης έχει την ικανότητα να μειώνει την έκταση της επαγωγής του GCN4, σε στελέχη φυσικού τύπου όταν αυτά αναπτύσσονται κάτω από την απουσία αμινοξέων; Είναι δυνατόν να δοθούν διάφορες εξηγήσεις του

Ικανότητα αυτοφωσφορύλιωσης των παραγώγων της πρωτεΐνης Gcn2.



Εικόνα 4.2: Δοκιμασία αυτοφωσφορύλιωσης.

Για δύο από τις ελλειμματικές πρωτεΐνες **Gcn2** (Δ EcoRI, Δ KpnI) εξετάστηκε η δυνατότητα αυτοφωσφορύλιωσης, *in vitro*. Όπως φαίνεται στις θέσεις **A** και **B** (Δ EcoRI και Δ KpnI, αντίστοιχα), δεν έχει ανοσοκατακρίμνησεί κάποιο φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο, με αντίσωμα ειδικό για τη όμοια με κινάση, κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης Gcn2. Για λόγους ελέγχου το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με στελέχη *gcn2* μετασχηματισμένα είτε με το πλασμίδιο φορέα (Γ), είτε με πλασμίδιο υπερέκφρασης του φυσικού τύπου γονιδίου GCN2 (Δ). Στην τελευταία περίπτωση είναι φανερό η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης **Gcn2**.

φαινομένου:

- α) Αν η όμοια με συνθετάση περιοχή της Gcn2 αλληλεπιδρά με κάποιου είδους μόριο και αυτή η αλληλεπιδράση σκανδαλίζει την απόκριση του συστήματος γενικού ελέγχου, τότε η υπερέκφραση του τμήματος αυτού θα τιτλοδοτήσει το μόριο αυτό μη επιτρέποντας στην ενδογενή πρωτεΐνη Gcn2 να ενεργοποιηθεί. Υπενθυμίζεται ότι το ελλειματικό γονίδιο δεν είναι λειτουργικό.
- β) Στην όμοια με tRNA συνθετάση, περιοχή του καρβοξυ-τελικού άκρου εντοπίζεται μια κανονική επανάληψη αμινοξικών κατάλοιπων Λευκίνης (Leucine Zipper), η οποία αποτελεί μοτίβο διμερισμού. Μάλιστα οι ίδιες οι συνθετάσες αυτές εμφανίζονται ως διμερείς ή και τετραμερείς και μια πρώτη βιοχημική ανάλυση έδειξε το ίδιο και για την κινάση Gcn2^{63, 214}. Θα ήταν δυνατό κατά συνέπεια, η υπερέκφραση του τμήματος αυτού να οδηγεί στο σχηματισμό ετεροδιμερών με τη φυσικού τύπου ενδογενή πρωτεΐνη, τα οποία δεν θα ήταν λειτουργικά. Κάτι τέτοιο θα παρόπλιζε αρκετό ποσοστό λειτουργικής πρωτεΐνης ώστε τελικά να μην αρκεί αυτή για να διεξαχθεί κανονική επαγωγή του GCN4.
- γ) Τέλος αν η καρβοξυ-τελική περιοχή είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στην κατάλληλη για δράση, θέση μέσα στο κύτταρο, η υπερέκφραση της πιθανά θα εμπόδιζε τον εντοπισμό της λειτουργικής ενδογενούς πρωτεΐνης και συνεπώς τη δράση της³¹¹.

Η έκταση της επιδρασης της υπερέκφρασης της τρίτης έλλειψης σε στελέχη gcn2 που είναι μικρή, μπορεί να αποδοθεί στην έστω ελάχιστη δραστηριότητα της πρωτεΐνης που παράγεται απο αυτή. Η εικασία αυτή δεν έρχεται σε αντίθεση με τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω.

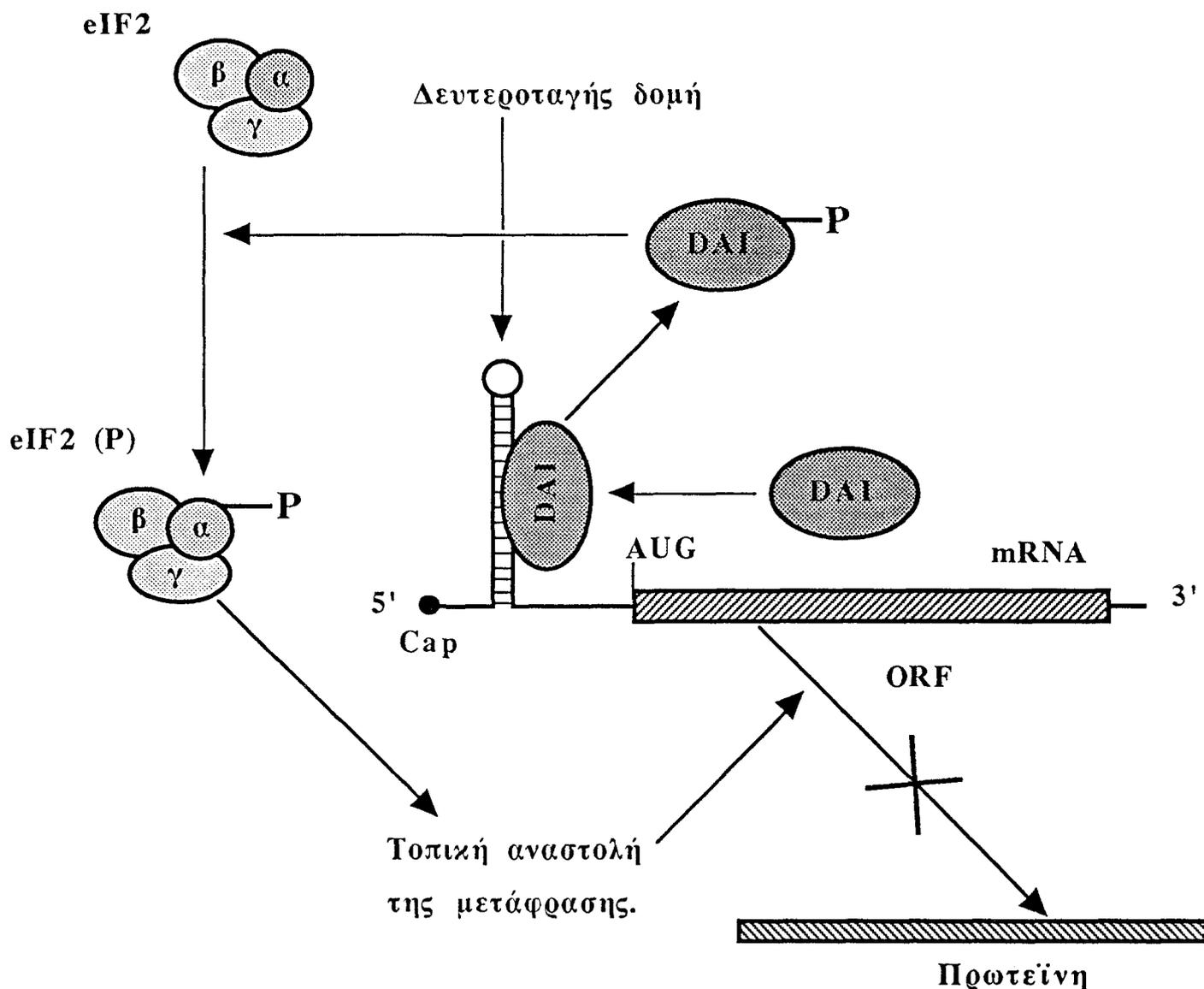
Είναι η κινάση Gcn2 ειδική μόνο για τη ρύθμιση του GCN4;

Έχει αναφερθεί ότι η κινάση Gcn2 είναι μια κινάση του eIF2. Χαρακτηριστική και καλά μελετημένη περίπτωση τέτοιας κινάσης είναι η DAIp68. Πρόκειται για μια κινάση η οποία αποτελεί μέρος του μηχανισμού απόκρισης στην Ιντερφερόνη μετά από μόλυνση κυττάρων θηλαστικών από RNA ιούς³²⁷. Το γονίδιο για την κινάση αυτή επάγεται μεταγραφικά από την παρουσία Ιντερφερόνης και η ίδια ενεργοποιείται με αλληλεπίδραση με κατάλληλου μήκους δίκλωνες περιοχές RNA. Η πρωτεΐνη αυτή διαθέτει στο αμινο-τελικό της άκρο, τρεις περιοχές δέσμησης σε δίκλωνο RNA. Η δέσμηση της με RNA, την ενεργοποιεί και η επακόλουθη φωσφορυλίωση του eIF2 από αυτήν ελαττώνει τη μετάφραση μεταξύ άλλων και ικών mRNAs. Λεπτομερής ανάλυση των επιδράσεων στη μετάφραση, της κινάσης αυτής έδειξε ότι η δράση της εντοπίζεται και αφορά κατά κύριο λόγο τα mRNAs εκείνα που φέρουν δευτεροταγείς δομές. Έχει μάλιστα προταθεί ότι η DAIp68 το επιτυγχάνει αυτό φωσφορυλιώνοντας τοπικά τον eIF2⁹⁷ εμπλέκεται στη μετάφραση των mRNAs αυτών και μόνο αφήνοντας ανεπηρέαστο τον κύριο όγκο των κυτταρικών mRNAs. Ένα απλοϊκό μοντέλο για μια τέτοια κατάσταση φαίνεται στο σχήμα 4.1.

Η κινάση Gcn2 εμφανίζεται να ενεργοποιεί τη μετάφραση του GCN4 mRNA, χωρίς να επιδρά σημαντικά, αρνητικά στη γενική πρωτεϊνοσύνθεση. Στη περίπτωση του GCN4 mRNA η φωσφορυλίωση του eIF2 έχει θετικό παρά αρνητικό αποτέλεσμα λόγω της δομής του μηνύματος. Όπως έχει αναφερθεί η διάταξη των μικρών αναγνωστικών πλαισίων είναι τέτοια που να ευνοείται η μετάφραση του μεγάλου αναγνωστικού πλαισίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Gcn4, σε συνθηκες έλλειψης αμινοξέων¹⁶⁴. Μήπως η εξειδίκευση αυτή της κινάσης Gcn2 προέχεται από όμοια με την DAIp68 συμπεριφορά; Είναι δηλαδή η δράση της εντοπισμένη έτσι ώστε να αφορά μόνο το μήνυμα του GCN4; Αν ισχύει κάτι τέτοιο τότε πώς εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εντοπισμός της πρωτεΐνης αυτής¹¹²;

Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4 mRNA έχει προβλεφτεί ότι εμφανίζει εκτεταμένη δευτεροταγή δομή, με την εφαρμογή κατάλληλων αλγόριθμων^{165, 166, 167} (Κεφάλαιο 3). Η πρόβλεψη φαίνεται επίσης στην εικόνα 4.3. Στην περιοχή γύρω από το πρώτο και δεύτερο αναγνωστικό πλαίσιο μάλιστα, είναι όμοια με διάφορα tRNAs όπως αυτά της Γλυκίνης και της Σερίνης (Εικόνα 4.3). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και επίσης το ότι έχει δείχτει ότι η κινάση Gcn2 εντοπίζεται στα ριβοσώματα, διατυπώθηκε το εξής υποθετικό σχήμα:

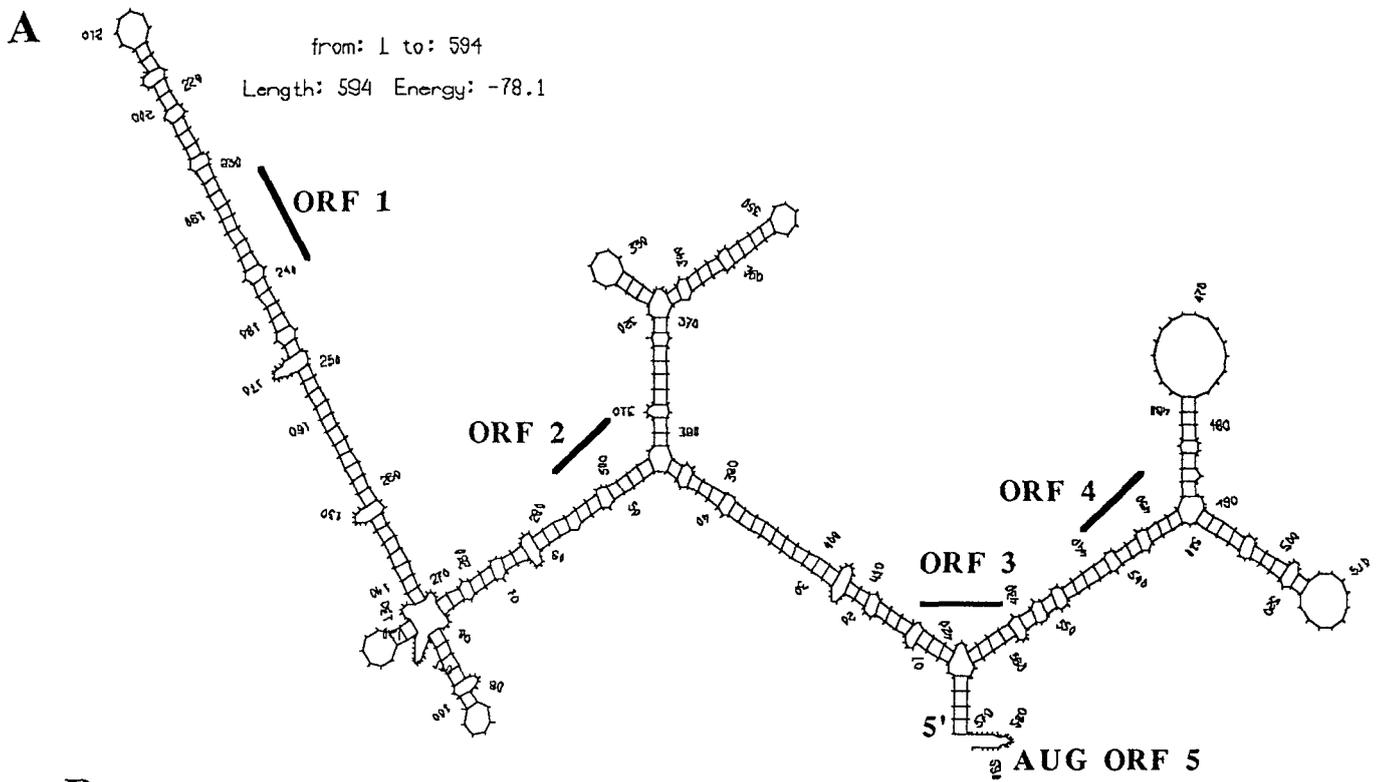
Εντοπισμένη δράση της κινάσης DAIp68.



Σχήμα 4.1:

Μοντέλο για την ειδική δράση της κινάσης DAI πάνω στη μετάφραση συγκεκριμένων mRNAs.

Το μοντέλο αυτό έχει προταθεί από τον Nahum Sonenberg και τους συνεργάτες του (72). Προβλέπει αλλά και ερμηνεύει, πειραματικά αποτελέσματα όπου η κινάση αυτή αναστέλει επιλεκτικά τη μετάφραση μόνο των mRNAs εκείνων που φέρουν δευτεροταγείς δομές στη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή τους.



B

	51		100
	Tyr:	CAGTTAATTG ACTCTTGGTA GCCAAGTTGG TTTAAGGCCGC AAGACTGTAA	
	Ser:CTCTCGGTA GCCAAGTTGG TTTAAGGCCGC AAGACTGT..	
tRNAs	Phe:GCGGATTTA GCTCAGTTGG GAGAGCGC..	
	Leu:GGGAGTTT GGCCGAGTGG TTTAAGGCCGT CAGATTTA..	
	Val: GGTTTCGTGG TCTAGTCGGT TATGGCAT..	
GCN4 Leader	GCN4L:	AGGTTACTCT CCCCCCTAAA TTCAAATTT TTTTGCCCAT CAGTTTCACT	
	101		150
	Tyr:	TTTACCACCTA CGAATCTTG AGATCGGGCG TTCGACTCGC CCCCAGGAGA	
	Ser:AATCTTG AGATCGGGCG TTCGACTCGC CCCCAGGAGA	
tRNAs	Phe:	...CAGACT GAAGATCTGG AGGTCCTGTG TTCGATCCAC AGAATTCGCA	
	Leu:	...GGCTCT GATATCTTCG GATGCAAGGG TTCGAATCCC TTAGCTCTCA	
	Val:	...CTGCTT GACACGCAGA ACGTCCCCAG TTCGATCCTG GGCGAATCA	
GCN4 Leader	GCN4L:	AGCGAATTAT ACRACTCACC AGCCACACAG CTCACTCATC TACTTCGCA	
	151		200
	Tyr:	TT.....	
	Ser:	CCA.....	
tRNAs	Phe:	CCA.....	
	Leu:	CCA.....	
	Val:	CCA.....	
GCN4 Leader	GCN4L:	TCAAAACAAA ATATTTTATT TTAGTTCAGT TTATTAAGTT ATTATCAGTA	

Εικόνα 4.3: Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4 mRNA (Leader).

A. Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της περιοχής.

B. Στίχηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της με αυτές κάποιων tRNAs.

Υπόθεση: Η όμοια με tRNA συνθετάση περιοχή της κινάσης Gcn2, αλληλεπιδρά με την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του μηνύματος του γονιδίου GCN4 με τρόπο τέτοιο που να φωσφορυλιώνει την α υπομονάδα του eIF2⁴⁴ τοπικά, και ειδικότερα την α υπομονάδα εκείνη που εμπλέκεται στη μετάφραση του μηνύματος αυτού. Η υπόθεση αυτή συμβιβάζεται με την ριβοσωμική εντόπιση της κινάσης Gcn2. Η αλληλεπίδραση με το μήνυμα θα μπορούσε βέβαια να είναι το γεγονός που παρασύρει την πρωτεΐνη αυτή στα ριβοσώματα, αλλά επίσης η ίδια αυτή αλληλεπίδραση θα μπορούσε να συμβαίνει στα ριβοσώματα εκείνα που μεταφράζουν το GCN4 mRNA και που φέρουν την κινάση.

Με βάση την υπόθεση αυτή μπορεί να διατυπωθεί μια ελέγξιμη πρόβλεψη: Αν η κινάση Gcn2 αλληλεπιδρά με το μήνυμα του γονιδίου GCN4 στη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του τότε η υπερέκφραση αυτής της περιοχής θα παρόπλιζε μεγάλο ποσοστό της κινάσης μειώνοντας τη διαθεσιμότητα της για τα κανονικά mRNAs, των οποίων η μετάφραση θα μειωνόταν. Πραγματικά η εισαγωγή μιας κατασκευής που εκφράζει την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4 μηνύματος, κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του γονιδίου ADH1, σε στελέχη φυσικού τύπου, μείωσε την ικανότητα τους να επάγουν πλήρως τη μετάφραση του GCN4 mRNA σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων. Ο αντίστοιχος πλασμιδιακός κλώνος εικονίζεται στο παράρτημα (από το σημείο έναρξης της μεταγραφής έως και μετά το τέταρτο αναγνωστικό πλαίσιο, μέχρι τη θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BstEII, του γονιδίου GCN4). Όπως φαίνεται στον πίνακα 4.2 η ελάττωση αυτή της έκτασης της επαγωγής έχει ως συνέπεια την δυσχέρεια ανάπτυξης σε φτωχά για αμινοξέα θρεπτικά μέσα καθώς επίσης και την ελλιπή έκφραση του γονιδίου μάρτυρα GCN4-LacZ.

Στην προηγούμενη ενότητα του κεφαλαίου αυτού αναφέρθηκε ότι η υπερέκφραση της όμοιας με tRNA συνθετάση περιοχής της κινάσης Gcn2, είχε τα ίδια αποτελέσματα σε κύτταρα φυσικού τύπου. Στο πλαίσιο της υπόθεσης που διατυπώθηκε εδώ, θα ήταν δυνατό να προκύπτει το αποτέλεσμα αυτό από την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της λειτουργικής κινάσης με το GCN4 μήνυμα όταν μονάχα η περιοχή αυτή υπερεκφράζεται. Αν κάτι τέτοιο συνέβαινε, τότε η συν-υπερέκφραση των δυο δηλαδή της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του GCN4 mRNA καθώς και της όμοιας με συνθετάση περιοχής της κινάσης Gcn2, θα οδηγούσε σε μερική αλληλοαναιρέση των επιδράσεων που έχει η υπερέκφραση του καθενός χωριστά⁸. Πραγματικά, στελέχη φυσικού τύπου μετασχηματισμένα και με τις δύο κατασκευές αντιμετωπίζουν αποτελεσματικότερα την έλλειψη αμινοξέων (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Υπερέκφραση της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του GCN4 mRNA σε συνδιασμό με την έλλειψη του αμινοτελικού άκρου της κινάσης Gcn2.

A

Πλασμίδιο.	Min	3-AT
Leader(s)	+++	+
Leader(as)	+++	+++
ΔEcoRI	+++	+
Leader(s)/ΔEcoRI	+++	++
Leader(as)/ΔEcoRI	+++	+
vector	+++	+++

B

Πλασμίδιο.	Min	3-AT
Leader(s)	3.7	20.1
Leader(as)	3.2	35.6
ΔEcoRI	2.8	17.9
Leader(s)/ΔEcoRI	3.5	31.6
Leader(as)/ΔEcoRI	2.5	18.2
vector	3.7	34.5

A. Φαίνονται τα αποτελέσματα που επιφέρουν στον πολλαπλασιασμό κυττάρων φυσικού τύπου τα πλασμίδια που υπερεκφράζουν την 5' μή μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου GCN4 είτε στην κανονική κατεύθυνση μεταγραφής [**leader(s)**], και στην αντίστροφη [**leader(as)**]. Επίσης φαίνονται και οι επιπτώσεις της συν-υπερέκφρασης της έλλειψης ΔEcoRI του γονιδίου GCN4 πάνω στα αποτελέσματα αυτά. Χρησιμοποιήθηκαν συνθήκες καταστολής του συστήματος ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων (**Min**) καθώς και συνθήκες αποκαταστολής του με χρήση του συναγωνιστικού αναστολέα του προϊόντος του γονιδίου HIS3 (**3-AT**).

B. Η ενεργοποίηση της μετάφρασης του γονιδίου GCN4 στα παραπάνω μετασχηματισμένα στελέχη. Εγινε προσδιορισμός της ενεργότητας β-Γαλακτοσιδάσης που παράγεται από το χιμαιρικό γονίδιο μάρτυρα GCN4-LacZ. Οι τιμές είναι μονάδες Miller και αποτελούν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων μετρήσεων με απόκλιση < 10%.

Τα αποτελέσματα αυτά σε καμιά περίπτωση δεν αποδεικνύουν το αληθές της υπόθεσης. Αποτελούν βέβαια αποχρώσεις γενετικές ενδείξεις που δεν έρχονται σε αντίθεση μ' αυτήν. Η διεξοδική βιοχημική ανάλυση θα δείξει αν τελικά ισχύει κάτι τέτοιο.



5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συζήτηση των αποτελεσμάτων που καταγράφονται στα Κεφάλαια 3 και 4. Συμπεράσματα, και προοπτική

Η μετάφραση του GCN4 mRNA εμφανίζεται ευαίσθητη σε μεταβολές που αφορούν την πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή του κυττάρου

Το μήνυμα του γονιδίου GNC4 μεταφράζεται απο την ίδια συσκευή που είναι υπεύθυνη για τη μετάφραση όλων των υπόλοιπων mRNAs του κυττάρου. Είναι λοιπόν αναμενόμενο, οποιαδήποτε τροποποίηση της συσκευής αυτής να εκδηλώνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις. Δηλαδή να επηρεάζεται και η γενική πρωτεϊνοσύνθεση αλλά και η μετάφραση του GCN4 mRNA. Δεν είναι βέβαια απαραίτητο μια τροποποίηση να προέρχεται μόνο απο τη δράση της κινάσης Gcn2. Κατά την πειραματική προσέγγιση που περιγράφηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι τρόποι για να προκληθούν μεταβολές στη πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή του κυττάρου. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αλλαγή στο πρότυπο της μεταφραστικής επαγωγής του GCN4.

Η υπερέκφραση του ψευδογονιδίου για το tRNA Βαλίνης, καθώς και ενός απο τα φυσικού τύπου γονίδια για tRNA Σερίνης, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μετάφρασης του GCN4, ακόμα και όταν δεν υπήρχε πίεση για κάτι τέτοιο απο έλλειψη κάποιου αμινοξέως. Η έκταση της επαγωγής σε στελέχη φυσικού τύπου είναι της τάξης της φυσιολογικής απόκρισης που συμβαίνει σε συνθήκες πείνας για κάποιο αμινοξύ και επιμένει, παρόλο που ελαττώνεται, σε στελέχη gcn2. Η ελάττωση αυτή είναι επακόλουθο της απουσίας της κινάσης Gcn2 στα στελέχη αυτά, γεγονός που δεν επιτρέπει την ενίσχυση της μεταφραστικής ενεργοποίησης μέσω της θετικά αναδραστικής σχέσης στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων GCN4 και GCN2. Το είδος αυτό της ανεξάρτητης απο Gcn2 ενεργοποίησης του GCN4, δεν αποτελεί γενική ιδιότητα της υπερέκφρασης tRNAs, παρόλα αυτά. Έτσι, τα tRNAs για τη Γλυκίνη και την Αργινίνη, καθώς και το φυσικού τύπου tRNA Βαλίνης, δεν επιφέρουν τέτοια ενεργοποίηση όταν υπερεκφραστούν.

Το γεγονός ότι συμβαίνει ενεργοποίηση από την υπερέκφραση κάποιων tRNAs, υποβάλλει την υπόθεση οτι τα μόρια αυτά έχουν ρόλο σηματοδότη της έλλειψης αμινοξέων. Η απόφαση αυτή ισχύει, τουλάχιστον in vitro¹⁷¹. Κατά τον τρόπο αυτό,

όταν τα αντίστοιχα γονίδια υπερέκφράζονται, η συγκέντρωση των tRNAs μέσα στο κύτταρο φτάνει σε τέτοια επίπεδα που η δράση των ενζύμων που τα συνδέουν με αμινοξέα να μην αρκεί για να γίνει ολοκληρωτική σύνδεση τους. Ένα ποσοστό, επομένως παραμένει ασύνδετο σκανδαλίζοντας το σύστημα γενικού ελέγχου. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στην παραδοχή ότι όντως τα αφόρτιστα tRNAs είναι απο τη μία φυσιολογική συνέπεια της έλλειψης αμινοξέων και απο την άλλη σηματοδοτούν τη σχετική απόκριση. Τα ερωτήματα που δημιουργούνται είναι γιατί η ενεργοποίηση του GCN4 απο υπερέκφραση tRNAs, δεν αποτελεί κοινή ιδιότητα για όλα τα tRNAs, και γιατί μόνο το μεταλλαγμένο tRNA Βαλίνης και όχι το φυσικού τύπου, προκαλεί αυτή την απόκριση. Οσον αφορά το δεύτερο ζήτημα, είναι εύκολο να προταθεί ότι το μεταλλαγμένο είναι ανίκανο να συνδεθεί με αμινοξύ^{218, 262}, σε αντίθεση με το φυσικού τύπου το οποίο ακόμα και όταν υπερέκφραστεί είναι δυνατό να συνδεθεί με αμινοξύ απο την αντίστοιχη συνθετάση⁵. Αυτή όμως η αντιμετώπιση αδυνατεί να συμβιβαστεί με το γεγονός ότι υπάρχει τουλάχιστον ένα tRNA φυσικού τύπου, αυτό της Σερίνης το οποίο σε υπερέκφραση διεγείρει την απόκριση τού γενικού ελέγχου. Μια επιπλέον υπόθεση που μπορεί να εισαχθεί για να περισσωθεί το προτεινόμενο σχήμα, είναι ότι οι διάφορες tRNA συνθετάσες έχουν ποικίλη αποτελεσματικότητα στο να διεξάγουν την σύνδεση αμινοξέως με tRNA, και κάποιες δεν καλύπτουν όλο το ποσοστό tRNA όταν υπάρχει περίσσεια, όπως σε συνθήκες υπερέκφρασης ώστε τότε να παραμένουν και κάποια ασύνδετα.

Εκτός απο τα tRNAs, ανάλογη ενεργοποίηση του GCN4, ανεξάρτητα από την κινάση Gcn2, προκαλείται απο την υπερέκφραση του γονιδίου NME1. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τι μικρό RNA συστατικό της ριβονουκλεάσης MRP1^{46, 264, 265}. Η ριβονουκλεάση αυτή αναγνωρίστηκε αρχικά ως μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA, αλλά στη συνέχεια της αποδόθηκε και ρόλος στη κατεργασία του πρώιμου ριβοσωμικού RNA. Εντοπίστηκε δε και στον πυρινίσκο²⁶⁶. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το πρωτεϊνικό μέρος της ριβονουκλεάσης, δεν έχει ακόμα απομονωθεί. Πάντως η υπερέκφραση του γονιδίου NME1 και μόνο έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί ανωμαλία στην ωρίμανση του ριβοσωμικού RNA²⁶⁶.

Πως συμβαίνει αυτό; Δυο θέσεις μπορούν να προταθούν. Είτε, όταν το γονίδιο NME1 υπερέκφράζεται δημιουργείται περίσσεια του NME1 RNA το οποίο δεν ενσωματώνεται ολοκληρωτικά στη ριβονουκλεάση, οπότε δρά ως RNA, είτε υπερπαγωγή του γονιδίου αυτού συνεπάγεται και αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων του ολοενζύμου της ριβονουκλεάσης. Το δεύτερο θα μπορούσε να συμβαίνει λόγω συνεπακόλουθης αύξησης της έκφρασης του γονιδίου για το πρωτεϊνικό κομμάτι του ενζύμου. Δυστυχώς

δεν είναι δυνατή η διάκριση ανάμεσα στις δυο περιπτώσεις, εφ' όσον δεν έχει αναγνωρισθεί το γονίδιο για το πεπτίδιο του ενζύμου αυτού.

Η επίδραση που έχει η υπερέκφραση του γονιδίου NME1 στην έκφραση του GCN4, σε συσχέτιση με το γεγονός ότι αυτή προκαλεί μεταβολές στη συσσώρευση του 25S ριβοσωμικού RNA, προτείνει ότι οποιαδήποτε τροποποίηση της μεταφραστικής μηχανής επηρεάζει και τη μετάφραση του μηνύματος του γονιδίου αυτού. Έχει μάλιστα αναφερθεί ότι προβλήματα στη βιογένεση του ριβοσώματος δυσχερύνουν τη διαδικασία της σάρωσης ενός RNA^{123, 276, 300, 254, 258}. Επειδή η μεταφραστική ενεργοποίηση του GCN4 ουσιαστικά επιτυγχάνεται με ρυθμιζόμενη μεταβολή της διαδικασίας αυτής, είναι αναμενόμενο να έχει το αποτέλεσμα αυτό η υπερέκφραση του γονιδίου NME1. Εκτός αυτού υπάρχει κάτι κοινό αμάνεσα στο RNA αυτό και τα tRNAs όπως αναφέρθηκαν προηγούμενως. Όλα εντοπίζονται στον πυρινίσκο τουλάχιστον σε κάποια φάση της βιογένεσής τους. Μήπως λοιπόν με βάση αυτό, αλλά και επιπρόσθετα επειδή αυτά τα RNAs είναι μικρά και εμφανίζουν έντονα χαρακτηριστικά δευτεροταγούς δομής, να μπορεί να προταθεί ένα ενοποιητικό σχήμα ερμηνείας της δράσης τους στη μετάφραση του GCN4 mRNA; Χωρίς να υπάρχουν δεδομένα αλλά από αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί αλλά και χωρίς προσπάθεια περαιτέρω εννόρασης προτείνονται τα εξής:

α) Τα tRNAs και το NME1 RNA, όταν υπερεκφράζονται, συσσωρεύονται στον πυρινίσκο επιδρώντας στη βιογένεση του ριβοσώματος και μέσω αυτής της επίδρασης τελικά μεταβάλλουν τη γενική πρωτεϊνοσύνθεση και τη μετάφραση του GCN4 mRNA. Για την περίπτωση του NME1 μάλιστα, το αποτέλεσμα στη γενική πρωτεϊνοσύνθεση είναι ορατό λόγω της καθυστέρησης που προκαλεί στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

β) Λόγω του ότι τα RNAs αυτά εμφανίζονται δίκλωνα, θα ήταν δυνατό να ενεργοποιούν μια κινάση του eIF2 ανάλογη της DA1p68 των θηλαστικών οργανισμών^{40, 44, 72, 98, 199} αλλά διαφορετική της Gcn2, ώστε να αυξάνει η μετάφραση του GCN4 mRNA. Κάτι τέτοιο όμως δε φαίνεται να συμβαίνει, γιατί τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης αυτών των RNAs επιμένουν και όταν η α υπομονάδα του eIF2 φέρει μεταλλαγές που δεν της επιτρέπουν να φωσφορυλιωθεί από τις κινάσες αυτές. Πάντα βέβαια θα υπάρχει το ενδεχόμενο να είναι άλλη η θέση φωσφορυλίωσης πάνω στον eIF2, από την υποθετική κινάση^{152, 226}.

Τα γεγονότα που θεωρείται ότι έπονται της απομάκρυνσης αμινοξέων από το θρεπτικό μέσο είναι αρχικά η μείωση της συγκέντρωσής τους ενδοκυτταρικά και στη συνέχεια η αύξηση των επιπέδων ασύνδετων με αμινοξέα, tRNAs. Τα δύο αυτά γεγονότα μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση του GCN4 ανεξάρτητα από την κινάση Gcn2;

Για να μιμηθούμε τη μείωση της συγκέντρωσης των αμινοξέων ενδοκυτταρικά χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *gcn4* που επειδή δε φέρει το γονίδιο GCN4 το οποίο απαιτείται και για τα βασικά επίπεδα έκφρασης κάποιων βιοσυνθετικών ενζύμων για αμινοξέα, εμφανίζει χαμηλά επίπεδα ενδογενών αμινοξέων⁷¹. Μάλιστα στο στέλεχος αυτό παρατηρείται μόνιμη ενεργοποίηση ενός χειμερικού γονιδίου β-Γαλακτοσιδάσης που φέρει τις *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες του GCN4, δηλαδή την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή⁷¹. Η επαγωγή του γονιδίου αυτού στο στέλεχος *gcn4*, μειώνεται δραστικά με την απομάκρυνση του γονιδίου GCN2. Παρόλα αυτά δεν καταργείται εντελώς.

Στελέχη τα οποία φέρουν θερμοευαίσθητες μεταλλάξεις σε γονίδια tRNA συνθετασών, επίσης εμφανίζουν μόνιμη ενεργοποίηση του GCN4, μάλιστα ανάλογη της θερμοκρασίας⁴³. Στα στελέχη αυτά έχει δείχτει ότι υπάρχει συσσώρευση ασύνδετων, σχετικών tRNAs²¹⁴. Η έλλειψη της κινάσης Gcn2 εδώ ελαττώνει μεν την παραπάνω ενεργοποίηση αλλά αυτή εξακολουθεί να υφίσταται σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Ο κοινός συνδετικός κρίκος για όλα τα φαινόμενα που συζητούνται εδώ, είναι ότι η κινάση Gcn2 φαίνεται να ενισχύει και να συντηρεί την επαγωγή του GCN4, παρά να την εκκινεί. Στις δυο τελευταίες περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, η εκκίνηση θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα μεταβολών στη φυσιολογία του κυττάρου, που και πάλι να καταλήγουν άμεσα ή έμμεσα στη πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή^{267, 268} τροποποιώντας κατά συνέπεια και τη μεταφραστική κατάσταση του μηνύματος του GCN4. Σε όλες τις περιπτώσεις επομένως, η μετάφραση του γονιδίου αυτού εμφανίζεται ευαίσθητη σε οτιδήποτε επηρεάζει το μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης¹⁶.

Δεν είναι γνωστό ποια ακολουθία μοριακών γεγονότων πυροδοτεί την έναρξη της απόκρισης του συστήματος γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων. Η τρέχουσα άποψη που έχει προταθεί, δεν είναι πλέον συμβατή με μια σωρεία πειραματικών δεδομένων. Η κινάση Gcn2 δεν είναι απαραίτητη σε πολλές περιπτώσεις ενεργοποίησης του GCN4 από τεχνητά προκαλούμενες ανισορροπίες αλλά και κατά την φυσιολογική παροδική επαγωγή του γονιδίου αυτού κατά τις πρώτες φάσεις της μετάβασης σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων. Ποιόν άλλο ρόλο εκτός από τη διατήρηση και την ενίσχυση της επαγωγής αυτής, έχει λοιπόν η Gcn2; Γιατί η κινάση αυτή είναι εξοπλισμένη με περιοχή που μοιάζει με tRNA συνθετάση; Στα δυο αυτά ερωτήματα προτείνεται μια πιθανή απάντηση στις επόμενες παραγράφους.

Τέλος το ερώτημα του τί σηματοδοτεί την έλλειψη αμινοξέων παραμένει ανοικτό και μόνο εικασίες μπορούν να διατυπωθούν. Ίσως το προϊόν του γονιδίου GCN1 να συμμετέχει στη διαδικασία, δεδομένης της πιθανής του εντόπισης στην περιοχή του κενотоπίου όπου φυλάσσεται το μεγαλύτερο μέρος των αποθεμάτων των αμινοξέων του

κυττάρου. Θα μπορούσε η πρωτεΐνη Gcn1 να αποτελεί το συνδετικό κρίκο της έλλειψης αμινοξέων με την πρωτεΐνοσυνθετική μηχανή. Η περιγραφή του ομοιοστατικού μηχανισμού της προσαρμογής στη διαθεσιμότητα αμινοξέων δεν θα είναι πλήρης μέχρι να αποκαληφθεί ο τρόπος με τον οποίο το κύτταρο αντιλαμβάνεται τις μεταβολές της αμινοξικής σύστασης του περιβάλλοντος του.

Συμμετέχει ο eIF2 στη διαδικασία παροδικής ενεργοποίησης του GCN4;

Η παροδική ενεργοποίηση του GCN4 δέν απαιτεί, όπως έχει αναφερθεί, την παρουσία της κινάσης Gcn2. Πρόκειται για μια έντονη και απότομη αύξηση της σύνθεσης Gcn4 που ακολουθεί αμέσως μετά τη μετάβαση απο πλήρες αμινοξέων θρεπτικό μέσο, σε φτωχό. Το μοναδικό αναγνωρισμένο υπόστρωμα για την κινάση αυτή είναι η α υπομονάδα του eIF2. Εάν υπήρχε μια διαφορετική κινάση του eIF2 που εκκινεί την απόκριση στην πείνα για αμινοξέα φωσφορυλιώνοντας την α υπομονάδα στη ίδια θέση-αμινοξύ όπως η κινάση Gcn2, τότε μετάλλαξη στη θέση αυτή που να οδηγεί σε άλλο αμινοξύ που να μη φωσφορυλιώνεται, θα παρεμπόδιζε και αυτή την παροδική επαγωγή του GCN4. Η ανάλυση του φαινομένου αυτού σε στελέχη που αντί για Σερίνη στη θέση 51 της α υπομονάδας του eIF2 φέρουν το αμινοξύ Αλανίνη που ενώ δομικά είναι όμοιο δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί³¹⁶, δεν έδειξε καμιά διαφορά σε σχέση με στελέχη φυσικού τύπου. Επομένως η παροδική ενεργοποίηση δεν πραγματοποιείται μέσω αυτής της συγκεκριμένης φωσφορυλίωσης.

Το ίδιο ανεξάρτητα απο τέτοια μεταμεταφραστική τροποποίηση είναι και τα φαινόμενα ενεργοποίησης απο υπερέκφραση των tRNAs και του NME1 που περιγράφηκαν προηγουμένως. Και πάλι δηλαδή οτιδήποτε εμφανίζεται ανεξάρτητο απο την παρουσία της κινάσης Gcn2, δε διαμεσολαβείται απο τη φωσφορυλίωση του eIF2. Το γεγονός αυτό ενισχύει τον ένα προς ένα συσχετισμό ανάμεσα στην Gcn2 και την συγκεκριμένη τροποποίηση της α υπομονάδας του eIF2. Είναι όμως αυτό αρκετό για να απορριφθεί εντελώς η συμμετοχή του eIF2 σε οποιαδήποτε ανεξάρτητη της Gcn2, ενεργοποίηση του GCN4; Το ερώτημα αυτό μπορεί να διατυπωθεί διαφορετικά: Υπάρχουν μεταλλαγές στον eIF2 που να επηρεάζουν την έκφραση του GCN4, ανεξάρτητα απο την παρουσία της κινάσης Gcn2;

Με το γενετικό σχήμα που εφαρμόστηκε απομονώθηκαν μεταλλαγές στη α υπομονάδα του eIF2, τέτοιες ώστε όταν το μεταλλαγμένο γονίδιο *su12* που κωδικοποιεί για την υπομονάδα αυτή, υπερεκφραστεί ή αντικαταστήσει το φυσικού τύπου γονίδιο, να επηρεάζεται η έκφραση τού γονιδίου GCN4 με δύο τρόπους:

- α) Να αυξάνει η μετάφραση του ανεξάρτητα απο τις θρεπτικές συνθήκες και ανεξάρτητα απο την κινάση Gcn2.
 - β) Να μπλοκάρεται η πλήρης αποκαταστολή του σε συνθήκες απουσίας αμινοξέων.
- Και τα δύο είδη των μεταλλαγών εντοπίζονται στο καρβοξύ-τελικό άκρο της α υπομονάδας και αφορούν ελλείψεις συγκεκριμένων αμινοξέων. Το άκρο αυτό της

πρωτεΐνης εμφανίζει εξαιρετικά πολικό, υδρόφιλο χαρακτήρα εξ αιτίας συσσώρευσης όξινων αμινοξέων. Μάλιστα στην περιοχή αυτή υπάρχει και μια διάταξη Σερινών που πιθανά να αποτελεί υπόστρωμα για φωσφορυλίωση από κάποιες κινάσες¹⁵². Ο πολικός χαρακτήρας του άκρου αυτού υποδεικνύει ότι πιθανά αποτελεί σημείο αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, αφού μάλλον βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης.

Η υπόθεση αυτή οδηγεί στη πρόβλεψη ότι αν αυτό το άκρο και μόνο υπερεκφραστεί στο κύτταρο, θα παρεμποδίσει την αλληλεπίδραση της φυσικού τύπου πρωτεΐνης, μεταβάλλοντας το ρυθμό έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης και επιδρώντας τελικά στη μετάφραση του GCN4 mRNA. Πραγματικά, στελέχη μετασχηματισμένα με πλασμιδιακές κατασκευές που υπερεκφράζουν το άκρο αυτό, εμφανίζουν συνεχώς υψηλά επίπεδα έκφρασης του GCN4, ανεξάρτητα από την παρουσία της κινάσης Gcn2. Είναι λοιπόν πιθανό η περιοχή αυτή να αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο και μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση της να επεμβαίνει σε αλληλεπιδράσεις κρίσιμες για την ενεργοποίηση του GCN4. Το ενδεχόμενο αυτό ενισχύεται ιδιαίτερα από την ύπαρξη μεταλλαγών που παρεμποδίζουν τη πλήρη μεταφραστική αποκαταστολή του γονιδίου αυτού. Αυτό γιατί οι άλλες μεταλλαγές στη περιοχή αυτή που προκαλούν τη συνεχή του έκφραση, θα μπορούσαν να ερμηνευτούν με τον πιο συντηρητικό τρόπο της απλής μείωσης της αποτελεσματικότητας της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής που τελικά ευνοεί τη έκφραση του GCN4.

Η τελευταία αυτή ερμηνεία ισχύει μάλλον για τη περίπτωση της υπερέκφρασης της β υπομονάδας του eIF2 η οποία προκαλεί την επίσης ανεξάρτητη από Gcn2 συνεχή αποκαταστολή της μετάφρασης του GCN4.

Με σκοπό την αποκάλυψη των μορίων που αλληλεπιδρούν με το καρβοξύ-τελικό άκρο της α υπομονάδας του eIF2, έγινε επιλογή γονιδίων που σε υπερέκφραση καταστέλουν το αποτέλεσμα που έχει η έλλειψη του άκρου αυτού στη μετάφραση του GCN4 mRNA. Δηλαδή της συνεχούς αυξημένης μετάφρασης που αυτό το γεγονός, προκαλεί. Η μερική νουκλεοτιδική ανάλυση του κλώνου που απομονώθηκε έδειξε ότι πρόκειται για πυρηνικό γονίδιο του οποίου το προϊόν εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Η μερική αλληλουχία του γονιδίου αυτού έχει κατατεθεί στη βάση δεδομένων για νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και φέρει το όνομα v86³¹. Είναι δέ καταχωρημένη ως προερχόμενη από εκφραζόμενο γονίδιο (EST: Expressed Sequence Tag). Η πλήρης αλληλουχία δεν είναι γνωστή.

Η σχέση που μπορεί να έχει μια πρωτεΐνη μιτοχονδριακής εντόπισης με τον eIF2, δεν είναι προφανής. Παρόλα αυτά ο καταστολέας v86 είναι ειδικός μόνο για μεταλλαγές στο καρβοξύ-τελικό άκρο της α υπομονάδας του eIF2 και όχι για άλλες που

και αυτές επηρεάζουν την έκφραση του GCN4 όπως μεταλλαγές στα γονίδια τύπου GCN ή GCD.

Απο όσα αναφέρθηκαν εδώ, προκύπτει ότι η παρέμβαση στο ρυθμό έναρξης της μετάφρασης όπως επιτυγχάνεται μέσω μεταλλαγών που αφορούν τον eIF2, στην έκφραση του GCN4. Δεν είναι όμως δυνατό να καθοριστεί αν το φαινόμενο της παροδικής, έντονης έκφρασης του γονιδίου αυτού οφείλεται σε τροποποίηση του eIF2 σε θέση διαφορετική αυτής που έχει ως στόχο η κινάση Gcn2. Πώς θα μπορούσε να διευκρινιστεί κάτι τέτοιο; Μια γενετική προσέγγιση στο θέμα είναι η εξέταση της παροδικής έκφρασης του GCN4 σε στελέχη που υπερεκφράζουν την α υπομονάδα. Σε τέτοια στελέχη, ήδη δυσχερένεται η πλήρης αποκαταστολή της μετάφρασης του γονιδίου αυτού, σε συνθήκες απουσίας αμινοξέων, επειδή πέφτει η σχετική αναλογία φωσφορυλιωμένης/μη φωσφορυλιωμένης μορφής της υπομονάδας. Η δράση δηλαδή της κινάσης Gcn2 διαλυτοποιείται από την περίσσεια της α υπομονάδας. Ανάλογη διαλυτοποίηση θα συμβαίνει και σε οποιαδήποτε άλλη τροποποίηση συμβαίνει, ακόμα και σ' αυτή που πιθανά αφορά την παροδική ενεργοποίηση. Αν συμβαίνει κάτι τέτοιο, θα πρέπει να μειώνεται ή να καταργείται η παροδική απόκριση, όταν υπερεκφράζεται η α υπομονάδα. Με βιοχημική ανάλυση και εφ' όσον η υποτιθέμενη μεταβολή κατά την παροδική ενεργοποίηση στην υπομονάδα αυτή, είναι φωσφορυλλίωση, θα ήταν δυνατό να προσδιοριστεί ο βαθμός της φωσφορυλλίωσης της όταν απουσιάζει η κινάση Gcn2, κατά την περίοδο αυτή.

Παρόλο που είναι πιθανό να συμμετέχει ο eIF2 στη διαδικασία της παροδικής επαγωγής, η φύση και η έκταση της δεν ευνοεί τέτοιου είδους μηχανισμό. Η παροδική ενεργοποίηση είναι τόσο έντονη ώστε μόνο κατά τη διάρκεια της είναι δυνατό να ανιχνευτεί ανοσολογικά η πρωτεΐνη Gcn4 που είναι ασυνήθιστα ασταθής²⁹⁸. Για να γίνει κάτι τέτοιο, η ανασταλτική 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4 mRNA θα πρέπει να γίνεται εντελώς διαφανής στις 40S ριβοσωμικές υπομονάδες που τη σαρώνουν και φυσιολογικά παρεμποδίζονται από τα μικρά αναγνωστικά πλαίσια. Μάλιστα ίσως ούτε αυτό να μην είναι αρκετό: Θα πρέπει η μεταφρασιμότητα του GCN4 mRNA όχι μόνο να φτάσει αλλά να ξεπεράσει εκείνη των κοινών mRNAs. Το γεγονός αυτό προσομοιάζεται από τη διάταση ενός συσπειρωμένου ελατηρίου. Κάτι τέτοιο μπορεί να γίνει εφικτό με διαδικασίες ανάλογες με αυτή της πρωΐμης, έντονης απόκρισης (Stringent Response) που έχει παρατηρηθεί στην *E. coli* αλλά και στο σακχαρομύκητα²⁰³.

Η ευαισθησία του GCN4 σε μεταβολές της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής του κυττάρου όπως αυτές που προκύπτουν από την υπερέκφραση tRNAs και του γονιδίου

NME1, υποδεικνύει τη βιογένεση του ριβοσώματος ως ένα στόχο υπεύθυνο για την παροδική ενεργοποίηση.

Εναλλακτικά, είναι πιθανό να συμβαίνουν γεγονότα εσωτερικής έναρξης της μετάφρασης^{142, 210, 257} στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4 mRNA κατά την περίοδο μετάβασης από επαρκές σε αμινοξέα θρεπτικό μέσο, σε μέσο με έλλειψη έστω και ενός αμινοξέως.

Είναι εντοπισμένη η δράση της κινάσης Gcn2;

Η κινάση Gcn2 συγκεντρώνει μερικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που την συσχετίζουν πιο στενά με τη ρύθμιση της έκφρασης του GCN4 παρά με γενικότερη παρεμβολή στη γενική πρωτεϊνοσύνθεση που συνεπάγεται μια φωσφορυλίωση του γενικού παράγοντα eIF2. Επιπλέον η ομοιότητα της με άλλες κινάσες του eIF2 υποβάλλει κάτι παρόμοιο. Ας δούμε αναλυτικά τα στοιχεία αυτά:

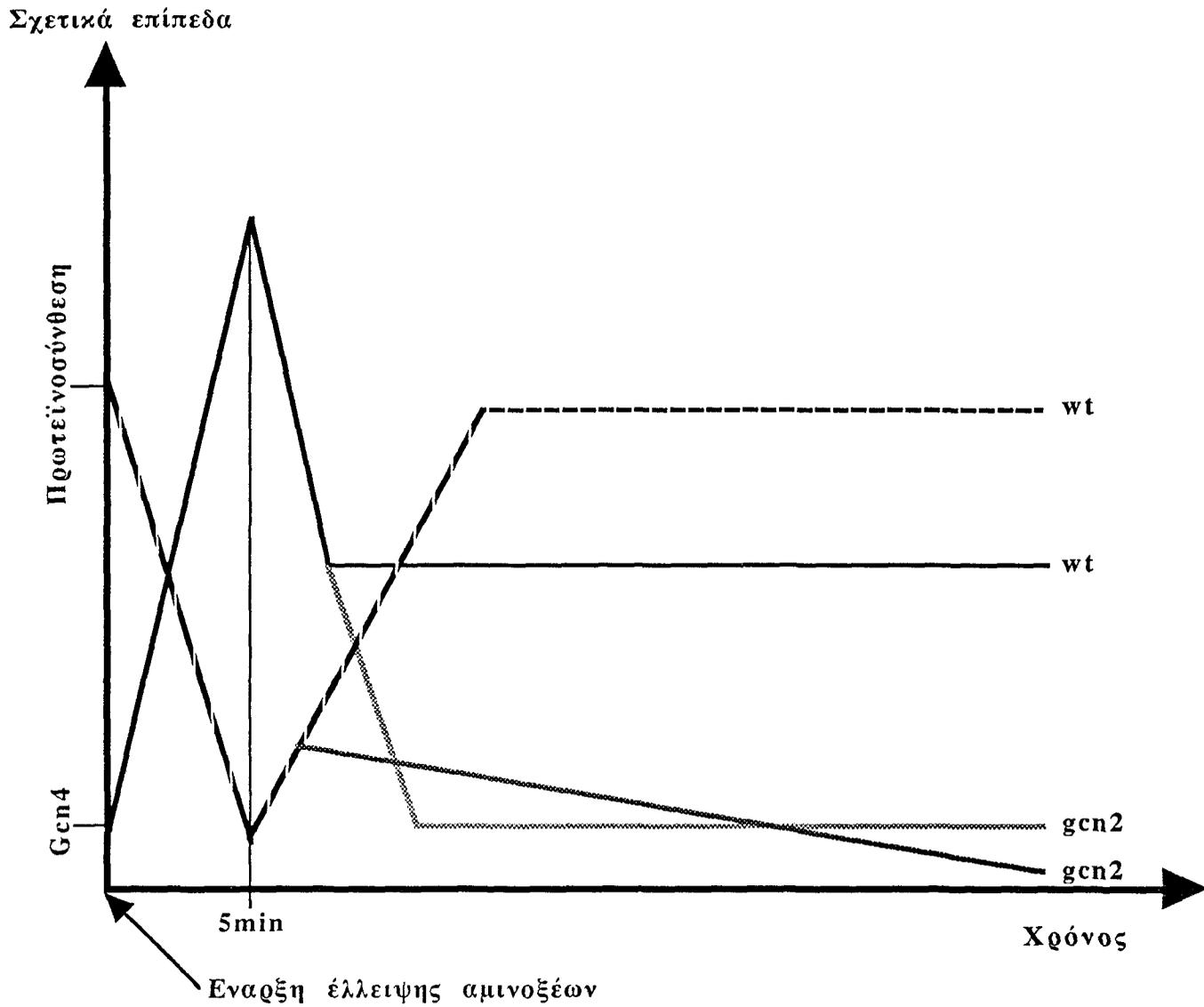
α) Η κινάση Gcn2 δε συμμετέχει στη φάση της αρχικής παροδικής ενεργοποίησης του GCN4, και επομένως δεν εμπλέκεται στην αντίληψη της έλλειψης αμινοξέων. Κατά τη φάση αυτή έχει δείχτει ότι υπάρχει στενή συσχέτιση ανάμεσα στη γενική πρωτεϊνοσύνθεση και στη μετάφραση του GCN4 mRNA. Τα επίπεδα της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης βυθίζονται ενώ αυξάνει η επαγωγή του γονιδίου αυτού. Στη συνέχεια και ενώ ο ρυθμός μετάφρασης του GCN4 σταθεροποιείται σε σχετικά υψηλά επίπεδα, η γενική πρωτεϊνοσύνθεση ανακάμπτει σχεδόν ολοκληρωτικά. Είναι στη φάση αυτή που εμφανίζεται απαραίτητη η δράση της κινάσης (Σχήμα 5.1).

β) Το γονίδιο GCN2 επάγεται μεταγραφικά απο την πρωτεΐνη Gcn4^{71, 255}. Η κινητική της επαγωγής είναι τέτοια ώστε η συσσώρευση του GCN2 mRNA να φτάνει σε υψηλά επίπεδα μόνο μετά απο 4 με 5 ώρες απο την έναρξη της ανεπάρκειας σε αμινοξέα. Κατά την αρχική φάση της έλλειψης, το μήνυμα είναι μόλις ανιχνεύσιμο. Συνεπώς όχι μόνο δε συμμετέχει η κινάση Gcn2, αλλά και δεν υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα μέσα στο κύτταρο, κατά τη φάση αυτή.

γ) Η παρουσία των μοτίβων που έχουν ομοιότητα με αυτά των τάξης II tRNA συνθετασών⁵¹, στο εκτεταμένο καρβοξύ τελικό άκρο, απαιτεί εξήγηση. Αφού δεν είναι πιθανή η συμμετοχή της στην αντίληψη της πείνας για αμινοξέα, ο ρόλος της περιοχής αυτής θα πρέπει να είναι διαφορετικός απο το να ανιχνεύει ασύνδετα tRNAs που ίσως συσσωρεύονται στις συνθήκες αυτές.

δ) Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4 εμφανίζει περιορισμένη ομοιότητα γύρω απο τα αναγνωστικά πλαίσια 1 και 2 με tRNA Σερίνης. Με κατάλληλους αλγόριθμους έχει επίσης προβλεφθεί ότι η περιοχή αυτή αναδιπλώνεται δημιουργώντας εκτεταμένες δευτεροταγείς δομές. Επιπλέον το μήνυμα GCN4 συσσωρεύεται σε μεγάλες ποσότητες όταν σε συνθήκες παρατεινόμενης ανεπάρκειας αμινοξέων, απουσιάζει το γονίδιο GCN2⁷¹. Το φαινόμενο αυτό δεν μπορεί να ερμηνευτεί ως σταθεροποίηση του mRNA λόγω μη μετάφρασης του²³⁴, γιατί δεν παρατηρείται σε ανάλογες περιπτώσεις όταν έχουν καταστραφεί τα γονίδια GCN1 και GCN3, όπου και πάλι δεν μεταφράζεται.

Η απόκριση στην έλλειψη αμινοξέων.



Σχήμα 5.1:

Γραφική αναπαράσταση των μεταβολών στη έκφραση του γονιδίου GCN4 και στη γενική πρωτεϊνοσύνθεση.

Απεικονίζεται η απόκριση στελεχών φυσικού τύπου καθώς και *gcn2*.

ε) Μια άλλη κινάση του eIF2 η DAIp68, των θηλαστικών ενεργοποιείται απο δίκλωνα RNAs³²⁷ και φωσφορυλιώνοντας τον eIF2, επιδρά αρνητικά στη μετάφραση συγκεκριμένων mRNAs που φέρουν δευτεροταγείς δομές^{60, 44, 72}. Έχει δηλαδή εντοπισμένη δράση. Αυτό γίνεται επειδή η κινάση αυτή αντιλαμβάνεται την ύπαρξη τέτοιων δομών και δεσμεύεται σε δίκλωνες περιοχές των μηνυμάτων⁸⁸, με τη βοήθεια κατάλληλων μοτίβων που φέρει στο αμινο-τελικό άκρο της⁹⁸. Τελικά φαίνεται οτι η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει τοπικά τον eIF2 που εμπλέκεται στη μετάφραση ορισμένων μόνο mRNAs^{148, 149, 210}.

στ) Η υπερέκφραση του γονιδίου GCN2, παρόλο που αυξάνει την μετάφραση του GCN4 mRNA ανεξάρτητα απο θρεπτικές συνθήκες, δεν έχει σημαντική επίδραση στη γενική πρωτεϊνοσύνθεση όπως διαπιστώνεται απο το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Μια άλλη κινάση του σακχαρομύκητα, η Trk2 που ρυθμίζεται απο cAMP, αλλά διαθέτει μοτίβα αναγνώρισης του eIF2, προκαλεί σημαντική πτώση του ρυθμού αυτού αυξάνοντας ταυτόχρονα τα επίπεδα έκφρασης του GCN4. Οι επιδράσεις αυτές είναι ανεξάρτητες της παρουσίας της κινάσης Gcn2, αλλά καταργούνται απο μεταλλαγές στην α υπομονάδα του eIF2 που δεν επιτρέπουν φωσφορυλίωση. Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν οτι πρόκειται για μια κινάση που έχει ως υπόστρωμα και αυτή, την α υπομονάδα. Γιατί όμως υπάρχει αυτή η διαφορά επίδρασης στο ρυθμό πολλαπλασιασμού ανάμεσα στις δυο, την Gcn2 και την Trk2; Μήπως η απουσία μοτίβου ανάλογου με αυτό της tRNA συνθετάσης που φέρει η Gcn2, δεν εξειδικεύει τη δράση της Trk2 και της επιτρέπει να φωσφορυλιώνει ανεξέλεγκτα τον eIF2, επιδρώντας έτσι και στη διαδικασία της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης;

ζ) Υπερέκφραση της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής και μόνο, του GCN4, εμποδίζει την πλήρη αποκαταστολή της μετάφρασης ολόκληρου του μηνύματος κατά την απουσία αμινοξέων. Το ίδιο και η υπερέκφραση της περιοχής και μόνο, της κινάσης Gcn2, που εμφανίζει ομοιότητα με την tRNA συνθετάση της Ιστιδίνης. Η συν-υπερέκφραση των δυο αναιρεί μερικώς την επίδραση αυτή.

η) Η κινάση Gcn2 βρίσκεται συνδεδεμένη με ριβοσώματα και υπάρχουν δεδομένα που την τοποθετούν είτε στη 40S, είτε στην 60S υπομονάδα⁶³. Η εντόπιση της αυτή δεν εξαρτάται απο θρεπτικές συνθήκες και εξασφαλίζεται απο το όμοιο με tRNA συνθετάση, καρβοξυ-τελικό άκρο της²⁴⁵.

Υπάρχει μια θεώρηση που να συμβιβάζεται με όλα τα παραπάνω; Προτείνεται οτι η κινάση Gcn2 φωσφορυλιώνει κατά κύριο λόγο τον eIF2 που εμπλέκεται στη μετάφραση του mRNA του GCN4, χωρίς να επηρεάζει έντονα τη μετάφραση άλλων μηνυμάτων. Ο εντοπισμός αυτός της δράσης της κινάσης Gcn2, πιθανά να

εξασφαλίζεται από την αλληλεπίδραση της μέσω της όμοιας με tRNA συνθετάση περιοχής της, με την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του μηνύματος του GCN4. Το μοντέλο αυτό δεν είναι ελκυστικό μόνο γιατί είναι συμβατό με όλα τα παραπάνω. Αν έστω κάτι τέτοιο συμβαίνει, υποδεικνύεται ότι η βιοχημικές κυταροπλασματικές διεργασίες δεν πραγματοποιούνται διάχυτα στο εσωτερικό του κυττάρου αλλά υπάρχει σαφής διαμερισματοποίηση που διασφαλίζει την περαιτέρω εξειδίκευση και απομόνωση των διεργασιών αυτών.

Εαν διαχωρίζονται οι φάσεις έναρξης και διατήρησης της απόκρισης του συστήματος γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων, στην απουσία τους απο το θρεπτικό μέσο, παραμένει το ερώτημα του πώς τερματίζεται η απόκριση αυτή όταν αποκατασταθεί η συγκέντρωσή τους. Θα πρέπει ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για κάτι τέτοιο να μην σκανδαλίζεται απο τα ενδοκυτταρικά επίπεδα αμινοξέων τα οποία ελάχιστα μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της απόκρισης. Ας μη ξεχνάμε ότι ο σακχαρομύκητας μπορεί να βιοσυνθέσει όλα τα αμινοξέα και αφού αποκατασταθεί το γονίδιο GCN4, δεν υφίσταται πρόβλημα στη διαθεσιμότητα τους ενδοκυτταρικά γι αυτό εξ άλλου και επανέρχετε στα φυσιολογικά επίπεδα η γενική πρωτεϊνοσύνθεση. Το γεγονός αυτό όμως δε συματοδοτεί τη λήξη της επαγωγής της μετάφρασης του GCN4. Μονο όταν στο περιβάλλον υπάρχουν αμινοξέα συμβαίνει κάτι τέτοιο. Είναι άγνωστο το πως το κύτταρο διαχωρίζει την κυταροπλασματική διαθεσιμότητα αμινοξέων απο την εξωκυττάρια και επανακαταστέλει τη μετάφραση του GCN4 mRNA αφού αποκατασταθεί η τελευταία. Κάποιες εικασίες είναι δυνατό να διατυπωθούν με βάση τη διαμερισματοποίηση των tRNA συνθετασών⁵¹. Τα ένζυμα αυτά φαίνεται να είναι ετσι διαταγμένα στο εσωτερικό του κυττάρου ώστε να δείχνουν προτίμηση για αμινοξέα προερχόμενα απο το εξωτερικό περιβάλλον και όταν αυτά λείψουν απο εκεί δυσχερύνεται η αμινο-ακυλίωση των tRNAs. Ισως σε ανάλογη διάκριση να βασίζεται και η λήξη της ομοιοστατικής απόκρισης του σακχαρομύκητα στην έλλειψη αμινοξέων. Δεν υπάρχει παρόλα αυτά κανένα πειραματικό δεδομένο σχετικό με το ζήτημα αυτό.



6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Η δομή της πρωτεΐνης Gcn4

Η πρωτεΐνη Gcn4 που κωδικοποιείται από το γονίδιο GCN4 του σακχαρομύκητα, έχει λειτουργία μεταγραφικού ενεργοποιητή¹²⁸. Η παρουσία της είναι αναγκαία για την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων, όταν αυτά δεν είναι διαθέσιμα στο μέσο καλλιέργειας¹⁴⁵. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μήκος 281 αμινοξέα και είναι δυνατό να αναγνωριστούν σ' αυτή, τόσο με δομικά όσο και με λειτουργικά κριτήρια, δυο κύριες περιοχές^{85, 128, 129, 130}

Ένα κεντρικό τμήμα μήκους περίπου 50 αμινοξέων (προσεγγιστικά, από το αμινοξύ 100 ως το 150), είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Πρόκειται για μια περιοχή όπου είναι συσσωρευμένα αρκετά όξινα αμινοξικά κατάλοιπα, προσδίδοντας της αρνητικό φορτίο. Εξ' αιτίας του γεγονότος αυτού, η πρωτεΐνη Gcn4 κατατάσσεται στην κατηγορία των μεταγραφικών ενεργοποιητών με σχετικά όξινη περιοχή ενεργοποίησης^{58, 130}. Δεν έχει γίνει κρυσταλλογραφική μελέτη της περιοχής ενεργοποίησης ώστε να είναι γνωστή η ακριβής δομή της. Παρόλα αυτά υπάρχουν αρκετές εικασίες και έμμεσα δεδομένα-ενδείξεις για τη δομή περιοχών ενεργοποίησης με όξινο χαρακτήρα¹⁸⁷. Έτσι σύμφωνα με μια θεώρηση τέτοιες περιοχές έχουν δομή αμφιπαθικής α έλικας^{28, 243} ενώ σύμφωνα με μια άλλη, πιθανά να μην είναι καθόλου δομημένες περιοχές αλλά μάλλον να αποτελούν απλώς ένα συσσωμάτωμα όξινων αμινοξικών κατάλοιπων (acid blot)^{144, 150}. Σχετικά πρόσφατα πειραματικά δεδομένα που αποκτήθηκαν με εφαρμογή της τεχνικής του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) πάνω σε πεπτίδια που προέρχονται από την περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4, υποδεικνύουν ότι η περιοχή αυτή λαμβάνει δομή β πτυχωτής επιφάνειας σε συνθήκες όπου το pH είναι όξινο³⁰¹. Ανάλογες είναι και οι ενδείξεις για τη δομή της επίσης όξινης περιοχής ενεργοποίησης ενός άλλου μεταγραφικού ενεργοποιητή, του Gal4¹⁷⁸.

Το ερώτημα που παραμένει σχετικά με τη δομή της περιοχής ενεργοποίησης των όξινων ενεργοποιητών γενικότερα, είναι το αν για την λειτουργία τους απαιτείται συγκεκριμένη αμινοξική σύσταση, η συγκεκριμένη δομή^{22, 33}. Η περιοχή ενεργοποίησης δρά ως τέτοια, προφανώς αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες κατά τρόπο που να προωθεί τη συγκρότηση του νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου που θα διεξάγει την έναρξη της μεταγραφής⁴⁵. Είναι επομένως σημαντικό να έχει τέτοιες δομικές ιδιότητες που να διασφαλίζουν τις αλληλεπιδράσεις αυτές^{45, 232, 241}.

Η δεύτερη δομική αλλά και λειτουργική οντότητα μέσα στην πρωτεΐνη Gcn4, εντοπίζεται το καρβοξύ-τελικό άκρο της και πρόκειται για την περιοχή δέσμευσης στο DNA^{128, 244}. Δομικά, είναι δυνατό να διακριθεί σε τρεις υποπεριοχές (Εικόνα 6.1B):

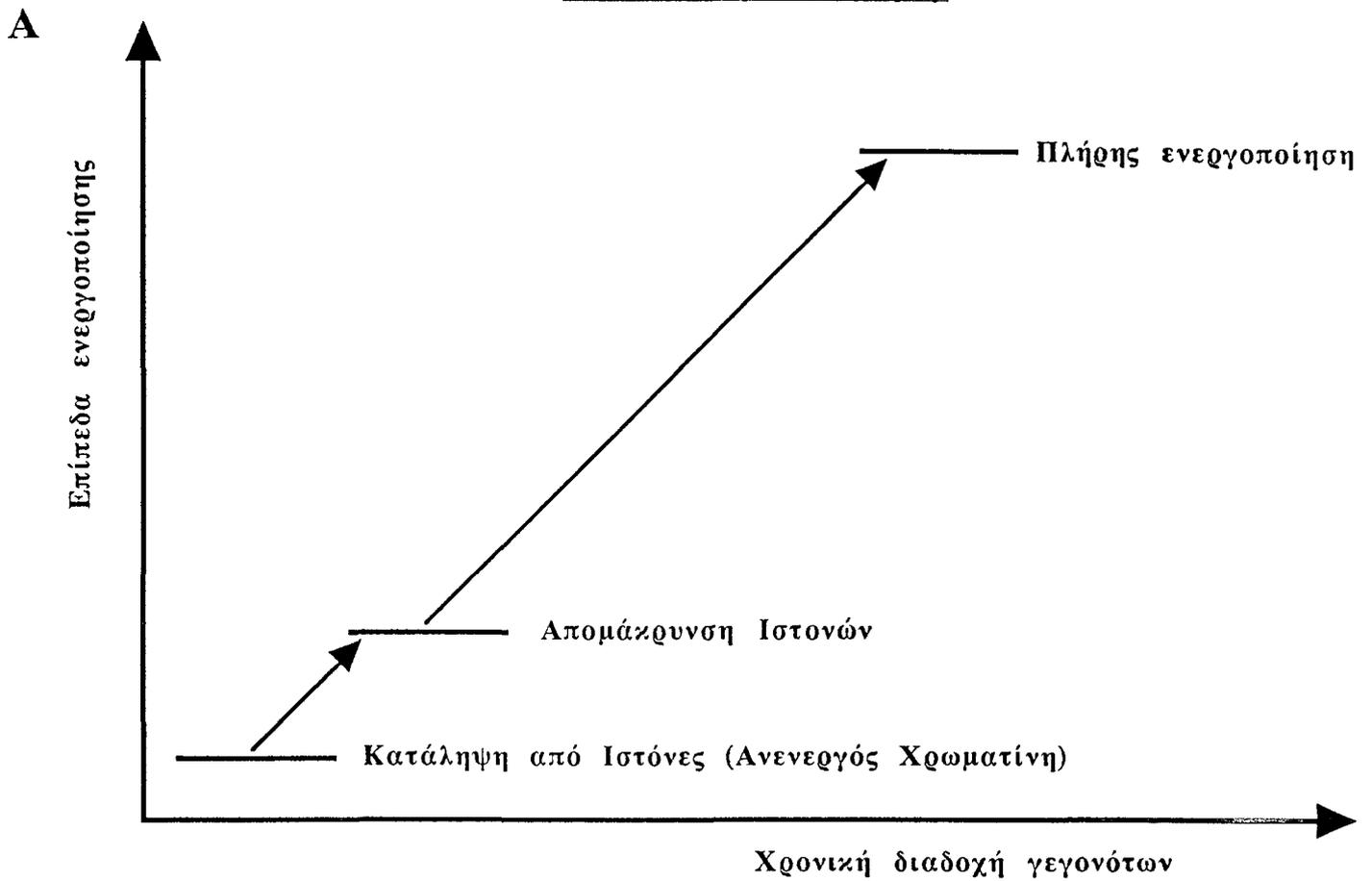
- α) Την περιοχή βασικού χαρακτήρα με αρκετά βασικά αμινοξικά κατάλοιπα που της προσδίδουν θετικό φορτίο¹⁵⁴,
- β) Μια ενδιάμεση συνδετική περιοχή και τέλος,
- γ) Το ακραίο καρβοξύ-τελικό άκρο όπου βρίσκεται η χαρακτηριστική τακτή επανάληψη καταλοίπων Λευκίνης που θα μπορούσε να αποδοθεί από τα Αγγλικά ως Φερμουάρ Λευκινών (Leucine Zipper)^{74, 220}.

Η ύπαρξη της τελευταίας αυτής περιοχής καθώς και η βασική περιοχή που προηγείται κατατάσσουν την πρωτεΐνη Gcn4 στην κατηγορία bZIP των όξινων ενεργοποιητών (basic Zipper)^{143, 228, 229}. Η αμινοξική ακολουθία του εκτεταμένου καρβοξύ-τελικού άκρου έχει σημαντική ομοιότητα με την αντίστοιχη της κατηγορίας των ενεργοποιητών αυτών που περιλαμβάνει τις ογκοπρωτεΐνες Jun και Fos^{3, 59, 308}. Η βασική περιοχή είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση με το DNA και μαζί με την ενδιάμεση συνδετική περιοχή προσδίδουν στην πρωτεΐνη τη ειδικότητα για συγκεκριμένες αλληλουχίες δέσμευσης^{68, 75, 230}. Η τελευταία περιοχή επανάληψης Λευκινών αποτελεί το σημείο διμερισμού^{143, 219, 309, 317}. Η πρωτεΐνη Gcn4 δεσμεύεται στο DNA ως διμερές^{52, 129}. Η δομή του συμπλόκου DNA-εκτεταμένου καρβοξύ-τελικού άκρου της πρωτεΐνης Gcn4 έχει αναλυθεί κρυσταλλογραφικά και με ανεξάρτητη γενετική ανάλυση έχουν αποκαλυφθεί οι επαφές ανάμεσα στο DNA και την πρωτεΐνη²⁴⁴. Αυτή η πληροφορία αντλήθηκε από, αλλά και έδωσε τη δυνατότητα να κατασκευαστούν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn4 που να μπορούν να δεσμεύονται σε διαφορετικούς DNA στόχους²⁸⁰.

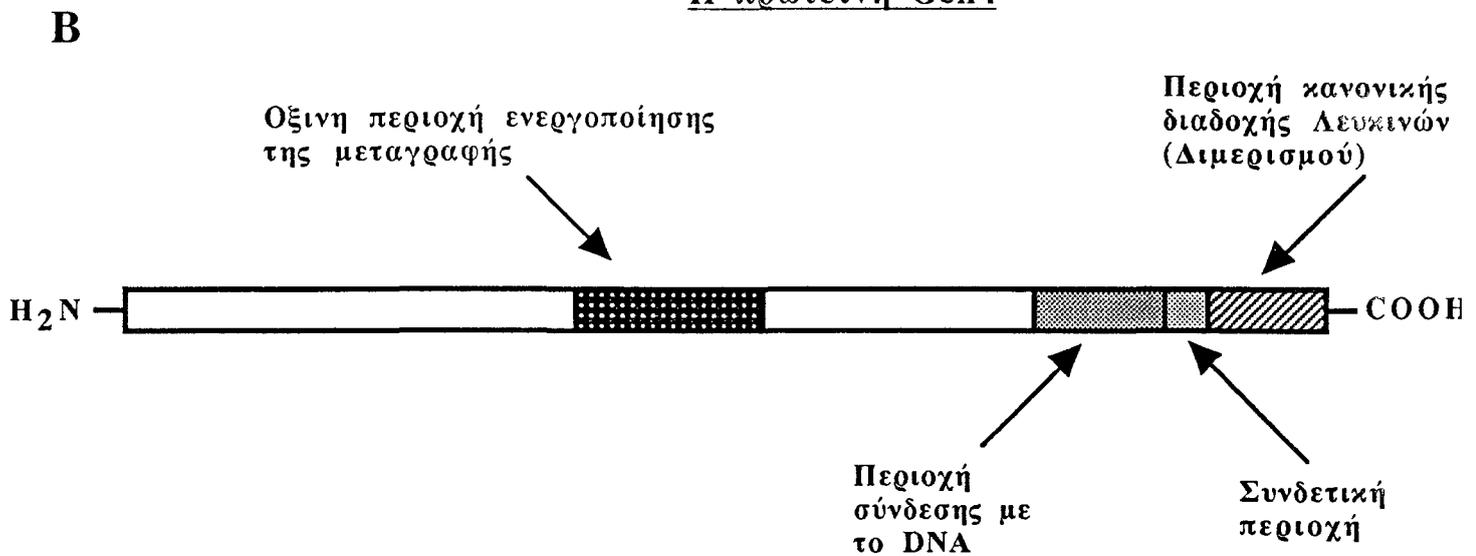
Μια τελευταία επισήμανση σχετικά με τις δύο περιοχές που περιγράφηκαν εδώ: Πρόκειται για ανεξάρτητες λειτουργικά και δομικά οντότητες που δεν παύουν να λειτουργούν ακόμα και όταν συγχωνευθούν με άλλα, ετερόλογα πεπτίδια. Αποτελούν δηλαδή διάκριτα τμήματα (Modules) που μάλιστα συνδέονται μεταξύ τους με μια χαλαρά δομημένη ακολουθία αμινοξικών κατάλοιπων⁸⁵.

Τέλος τα 50 πρώτα (άμινο-τελικά) αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης, δε φαίνεται να είναι απαραίτητα για τη λειτουργία της, τουλάχιστον με τις προσεγγίσεις που εφαρμόστηκαν για να διαπιστωθεί κάτι τέτοιο^{128, 130}.

Κατάσταση υποκινητή.



Η πρωτεΐνη Gen4



Εικόνα 6.1:

A. Οι φάσεις ενεργοποίησης ενός τυπικού υποκινητή *in vivo*, που αρχικά είναι ενεργός και κατηλμένος από Ιστόνες.

B. Η δομή του μεταγραφικού ενεργοποιητή Gen4.

Οι DNA στόχοι: Διαφορές ανάμεσα στα γονίδια που ελέγχονται από την πρωτεΐνη Gcn4

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η πρωτεΐνη Gcn4 είναι ο κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων αλλά και κάποιων πουρινών^{122, 81, 145}. Μέχρι τώρα έχει βρεθεί ότι η Gcn4 πρωτεΐνη ελέγχει την έκφραση περισσότερων από 30 γονιδίων του σακχαρομύκητα μεταξύ των οποίων είναι τα εξής:

- 1) Τα TRP2, 3, 4 και 5 και το ARO3, για τη βιοσύνθεση της Τρυπτοφάνης.
- 2) Τα ARG2, 3, 4, 5, 6, και 8 και τα CPA1 και 2, για τη βιοσύνθεση της Αργινίνης.
- 3) Τα HIS1, 2, 3, 4A, 4C και 5, για τη βιοσύνθεση της Ιστιδίνης.
- 4) Το LYS1, 2 και 9 για τη βιοσύνθεση της Λυσίνης.
- 5) Τα ILV1, 2 και 5, για τη βιοσύνθεση της Ισολευκίνης και Βαλίνης.
- 6) Το LEU3 και 4, για τη βιοσύνθεση της Λευκίνης.
- 7) Το GLN1, για τη βιοσύνθεση της Γλουταμίνης.
- 8) Το ADE2, για τη βιοσύνθεση της Αδενίνης.
- 9) Το KRS1 για την tRNA συνθετάση της Λυσίνης (αλλιώς GCD5¹⁷⁵).
- 10) Το GCN2 για την eIF2α κινάση, Gcn2.

Τα γονίδια που ελέγχονται από την Gcn4 πρωτεΐνη φέρουν στον υποκινητή τους, εγγύς ρυθμιστικά στοιχεία που τον θέτουν κάτω από τον έλεγχο της πρωτεΐνης αυτής¹²². Εκτός από τα ρυθμιστικά αυτά στοιχεία, σε αρκετές περιπτώσεις ο υποκινητής φέρει και αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από διαφορετικούς από την Gcn4, μεταγραφικούς ενεργοποιητές¹¹⁶. Οι ενεργοποιητές αυτοί συνήθως έχουν να κάνουν με τον καθορισμό των βασικών επιπέδων έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του γονιδίου HIS4 που φέρει στον υποκινητή του αλληλουχία δέσμευσης για της πρωτεΐνες-ενεργοποιητές Bas1 και Bas2¹⁸³. Σε άλλα, παρόλα αυτά, γονίδια ακόμα και αυτά τα επίπεδα βασικής έκφρασης εξαρτώνται από την πρωτεΐνη Gcn4. Τέτοια γονίδια είναι αυτά που αφορούν τη βιοσύνθεση της Αργινίνης^{69, 70}. Ελλειψη της πρωτεΐνης Gcn4 σχεδόν καταργεί την έκφραση των γονιδίων αυτών σε βαθμό τέτοιο που το κύτταρο να καταντά αυξότροφο για Αργινίνη. Μάλιστα μια από τις πρώτες μεταλλαγές gcn4 είχε την ονομασία arg⁹^{69, 70, 71}, αφού το στέλεχος που την έφερε συμπεριφερόταν ως αυξότροφο για Αργινίνη. Σε μερικές περιπτώσεις γονιδίων που κωδικοποιούν για βιοσυνθετικά ένζυμα, στη ρύθμιση συμμετέχουν επίσης και μεταγραφικοί παράγοντες ειδικοί για το συγκεκριμένο μονοπάτι βιοσύνθεσης. Κάτι τέτοιο συμβαίνει για παράδειγμα στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της Λευκίνης⁸¹. Υπάρχουν τέλος και βιοσυνθετικά ένζυμα αμινοξέων, των οποίων τα αντίστοιχα

γονίδια δεν ελέγχονται απο την πρωτεΐνη Gcn4, όπως είναι αυτά για τη σύνθεση της Μεθειονίνης¹²².

Είναι γνωστό οτι έλλειψη έστω και ενός αμινοξέως απο το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είναι ικανή να αποτελέσει το έναυσμα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων του σακχαρομύκητα¹²². Το χρονικό πρότυπο της μεταγραφικής επαγωγής όμως, καθώς και η έκταση της, για κάθε περίπτωση ελεγχόμενου απο την πρωτεΐνη Gcn4 γονιδίου, διαφέρει δραματικά⁸¹. Δύο ακραία παραδείγματα για το γεγονός αυτό, είναι το γονίδιο HIS4 του οποίου η επαγωγή έχει σχεδόν ολοκληρωθεί 15 λεπτά μετά την έναρξη της περιόδου στέρωσης αμινοξέων, φτάνοντας σε πολύ υψηλά σχετικά επίπεδα έκφρασης, και το γονίδιο GCN2 για το οποίο απαιτούνται 9 ώρες προκειμένου να ολοκληρωθεί η επαγωγή, χωρίς ακόμα και τότε, τα επίπεδα έκφρασης να είναι ιδιαίτερα υψηλά^{69, 70, 71}.

Τι προσδίδει αυτό το ιδιαίτερο πρότυπο έκφρασης σε κάθε γονίδιο που ελέγχεται απο την πρωτεΐνη Gcn4; Οι διαφορετικοί απο την Gcn4 πρωτεΐνη, παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του γονιδίου, σίγουρα αποτελούν ένα απο τους λόγους γι' αυτό το γεγονός. Ένας άλλος, ίσως καθοριστικότερος λόγος, είναι η μορφή του στοιχείου του υποκινητή μέσω του οποίου δρά το Gcn4. Πράγματι η χωροταξική του τοποθέτηση στον υποκινητή όσο και η καθεαυτό αλληλουχία του διαφέρουν για κάθε γονίδιο.

Με *in vitro* πειράματα έχει καθοριστεί η ιδανικότερη DNA αλληλουχία δέσμευσης για την πρωτεΐνη Gcn4^{116, 239}. Πρόκειται για το ψευδοπαλίνδρομο εννεαμερές 5'-ATGACTCAT-3' που αναγνωρίζεται απο μεταγραφικούς παράγοντες της κατηγορίας AP1 όπως οι Jun και Fos^{59, 188, 273}. Η αλληλουχία αυτή ονομάστηκε GCRE (G-less C AMP Regulated Element, λόγω ομοιότητας με στοιχείο 5'-ATGACGTCAT-3', CRE:C AMP Regulated Element)¹⁷⁷ και δεν έχει ακόμα εντοπιστεί στον υποκινητή κάποιου γονιδίου που ελέγχεται απο το Gcn4. Οι συνήθεις DNA στόχοι για την πρωτεΐνη αυτή προσεγγίζουν μόνο την παραπάνω αλληλουχία. Ας δούμε μερικές χαρακτηριστικές περιπτώσεις:¹²²

<u>Αλληλουχία</u>	<u>Θέση</u>	<u>Συγγένεια Δέσμευσης</u>	<u>Γονίδιο/Στοχος</u>
1) ATGACTCAT	—	100%	GCRE
2) GTGACTCAC	-136	49%	HIS4
3) ATGACTCTT	-99	38%	HIS3
4) ATGACTCTT	-88	22%	ILV1
5) ATGATTCAT	-150	25%	ILV2

Εκτός απο διαφορές στην αλληλουχία και τη θέση του DNA στόχου για τα διάφορα γονίδια, είναι επίσης δυνατό να ποικίλλει και ο αριθμός των στοιχείων που φέρει ο κάθε υποκινητής. Ενώ ο υποκινητής του HIS4 φέρει πέντε διαφορετικά τέτοια στοιχεία²⁰³, ο υποκινητής του ARG3 μόνο ένα¹²².

Τελευταίο θα αναφερθεί το στοιχείο TATA ως ένας επιπλέον παράγοντας που διαμορφώνει το τελικό αποτέλεσμα της επίδρασης της πρωτεΐνης Gcn4 με τον υποκινητή. Στο γονίδιο HIS3 έχουν εντοπιστεί δυο αλληλουχίες που προσομοιάζουν το στοιχείο αυτό²⁷². Στη θέση -60 υπάρχει η αλληλουχία TATAA και στη θέση -45 η αλληλουχία TATATAA. Αντίστοιχα, ανιχνεύονται δυο είδη mRNA αυτού του γονιδίου: Αυτό που αρχίζει στη θέση +1 και αντιστοιχεί στο TATA της θέσης -60, και αυτό που αρχίζει στο +12 και αντιστοιχεί στο TATA της θέσης -45. Μόνο το mRNA που ξεκινά απο το +12 εμφανίζεται αυξημένο απο την παρουσία του Gcn4. Αντίθετα το άλλο mRNA δεν επάγεται σχεδόν καθόλου απο την πρωτεΐνη αυτή. Για το λόγο αυτό στα αντίστοιχα στοιχεία TATA δόθηκαν τα ονόματα T_R (Regulated) και T_C (Constitutive)¹⁸⁹.

Η αναγκαιότητα για πρωτεΐνες διαμεσολαβητές. Οι πρωτεΐνες Gen5, Ada2 και Ada3

Η παρουσία του μεταγραφικού ενεργοποιητή είναι τις περισσότερες φορές απαραίτητη για την επαγωγή της μεταγραφής ενός γονιδίου-στόχου^{157, 181, 292}. Υπάρχουν βέβαια και περιπτώσεις όπου ένα γονίδιο μπορεί να ενεργοποιηθεί και χωρίς την ύπαρξη του υπεύθυνου για το γεγονός αυτό, ενεργοποιητή^{10, 17}. Έτσι έχει αναφερθεί ότι μείωση, έως και κατάργηση της έκφρασης των ιστονών στο σακχαρομύκητα είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει ένα σύνολο γονιδίων^{37, 108, 290, 291, 304}. Τυπικό παράδειγμα τέτοιου γονιδίου είναι το PHO1 που φυσιολογικά ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη Pho4^{76, 281}. Πειραματικά δεδομένα όπως αυτό οδήγησαν στη διαμόρφωση μιας άποψης σχετικά με τη λειτουργία των μεταγραφικών ενεργοποιητών. Σύμφωνα μ'αυτήν, το φυσιολογικό υπόστρωμα για τη διαδικασία έναρξης της μεταγραφής, είναι η χρωματίνη¹⁷. Δηλαδή η δομή που έχει το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Όταν η περιοχή αυτή καταλαμβάνεται από ιστόνες τότε δυσχερύνεται η δημιουργία του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής με συνεπακόλουθο μειωμένη ή και καθόλου μεταγραφή^{55, 96}. Ο ρόλος του μεταγραφικού ενεργοποιητή, σύμφωνα πάντα με την άποψη αυτή, είναι να εκτοπίζει ιστόνες από την περιοχή του υποκινητή επιτρέποντας έτσι τη συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής¹⁷².

Στις περισσότερες παρόλα αυτά περιπτώσεις ούτε μια τεχνητή απαλλαγή του υποκινητή από τις ιστόνες, είναι ικανή να τον ενεργοποιήσει ή έστω να κάνει κάτι τέτοιο φτάνοντας στο φυσιολογικό μέγεθος της επαγωγής. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι πέρα από την πιθανή λειτουργία του ενεργοποιητή ως διαμορφωτή της δομής της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή, θα πρέπει αυτός να εμπλέκεται και ενεργά στη δημιουργία του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής^{202, 132}. Διακρίνονται λοιπόν δυο μηχανισμοί υπεύθυνοι για την έναρξη:

- α)** Καλάρωση της δομής της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή που επιτρέπει πλέον την αυτόματη δημιουργία του συμπλόκου έναρξης³⁰³.
- β)** Ενεργητική πρόκληση της δημιουργίας του συμπλόκου αυτού¹⁴⁶.

Έχουν αναφερθεί παραδείγματα ενεργοποιητών που δρούν κυρίως εξασφαλίζοντας το **α**. Φαίνεται όμως ότι στην πλειοψηφία τους οι ενεργοποιητές είτε σχεδόν αποκλειστικά επεμβαίνουν μέσω του **β**, είτε συνδυάζουν και τις δυό ιδιότητες^{180, 295}. Συνοψίζοντας τα παραπάνω, είναι δυνατό να διακριθούν τρία στάδια στη διαδικασία ενεργοποίησης:

- i) Αρχικά τα επίπεδα μεταγραφής από τον υποκινητή είναι κατασταλμένα λόγω της κατάληψης του απο ιστόνες που δημιουργούν μια τέτοια δομή στη χρωματίνη ώστε να είναι αδύνατη η σύνδεση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων³⁰³.
- ii) Ο υποκινητής απελευθερώνεται από τις ιστόνες είτε με τη βοήθεια ενός ενεργοποιητή είτε λόγω αντιγραφής του DNA είτε τέλος γιατί ποτέ δεν ήταν ιδιαίτερα κατειλημμένος. Είναι δυνατή τώρα η συγκρότηση συμπλόκων έναρξης της μεταγραφής από τους γενικούς παράγοντες και τα επίπεδα της μεταγραφής αυξάνουν¹³⁴.
- iii) Η μεταγραφή επάγεται σημαντικά λόγω παρέμβασης του ενεργοποιητή οποίος ενεργά πλέον συμβάλλει στην αυξημένη συχνότητα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μεταγραφής (Εικόνα 6.1A)^{45, 306}.

Η πρωτεΐνη Gcn4 στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται να δρα έτσι ώστε να προκαλεί την ενεργητική συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης^{28, 38}. Σε πειράματα προσομοίωσης της διαδικασίας της μεταγραφικής ενεργοποίησης *in vitro* όπου ο υποκινητής φέρει DNA αλληλουχία στην οποία δεσμεύεται η πρωτεΐνη αυτή, η παρουσία της στο διάλυμα είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση^{129, 130, 279}. Αυτό, ανεξάρτητα από το γεγονός ότι στις συνθήκες αυτές ο υποκινητής δεν είναι καλυμμένος από ιστόνες²⁸. Ανάλογα, *in vivo*, η περιοχή ενεργοποίησης της Gcn4 πρωτεΐνης έχει την ικανότητα να αυξάνει το ρυθμό πρόσδεσης του γενικού παράγοντα έναρξης της μεταγραφής, TFIID, στο στοιχείο TATA, γεγονός απαραίτητο για την έναρξη^{157, 192}.

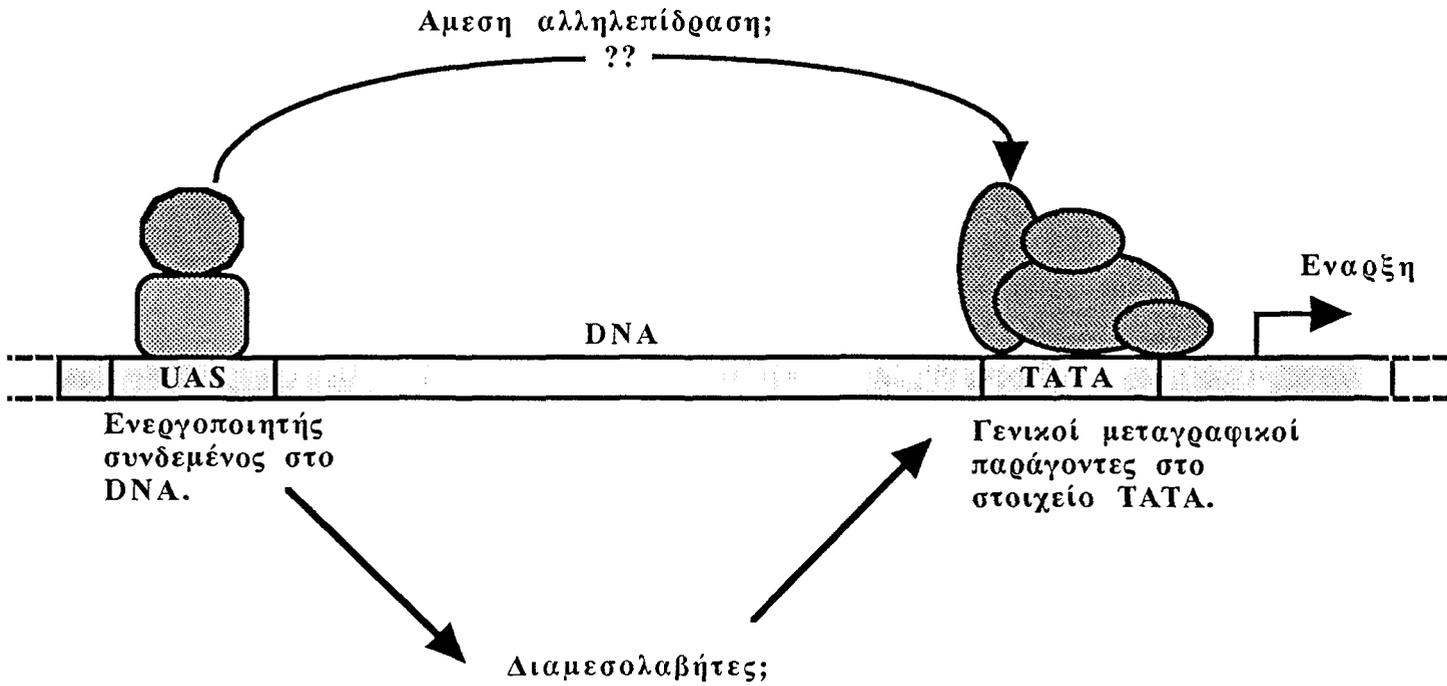
Ακόμα και στις περιπτώσεις των ενεργοποιητών που ενεργά προκαλούν την δημιουργία του συμπλόκου έναρξης, η παρουσία τους και μόνο ενώ είναι αναγκαία δεν είναι πάντα ικανή να εξασφαλίσει την πλήρη ενεργοποίηση της μεταγραφής ενός γονιδίου-στόχου⁷. Αυτό σημαίνει ότι για να φτάσει η επαγωγή στα φυσιολογικά επίπεδα, χρειάζονται και άλλες πρωτεΐνες εκτός του ίδιου του ενεργοποιητή και βέβαια των γενικών παραγόντων της έναρξης της μεταγραφής²⁰. Η αναγκαιότητα για τέτοιες πρωτεΐνες αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα²⁸⁹. Πρόκειται για πρωτεΐνες που δεν συνδέονται με το DNA και απαιτούνται για την πλήρη λειτουργία αρκετών διαφορετικών ενεργοποιητών, χωρίς παρόλα αυτά να είναι δυνατό να καταταχθούν στην κατηγορία των γενικών παραγόντων έναρξης^{32, 41, 87}. Ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών αυτών είναι, είτε να συνδέουν την περιοχή ενεργοποίησης του ενεργοποιητή με τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, είτε να σταθεροποιούν μια απ' ευθείας σύνδεση^{170, 174}.

Και στις δύο περιπτώσεις οι πρωτεΐνες αυτές βοηθούν στη διάδοση της επίδρασης του ενεργοποιητή προς το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής ώστε η έναρξη να συμβεί αποτελεσματικά (Εικόνα 6.2)^{92, 94}. Για το λόγο αυτό οι πρωτεΐνες αυτές ονομάστηκαν διαμεσολαβητές (Mediators, Adaptors, Co-factors) της δράσης των μεταγραφικών ενεργοποιητών, δρουν δηλαδή σαν κρίκοι που τους συνδέουν με τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες^{113, 133, 156, 299, 323}.

Φαίνεται ότι οι διαμεσολαβητές συγκροτούν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμμετέχουν στην διαδικασία της ενεργοποίησης, ενδυναμώνοντας την δράση του ενεργοποιητή. Σύμπλοκα με τέτοιες ιδιότητες είναι το σύμπλοκο των πρωτεϊνών SWI/SNF, το σύμπλοκο SRB και το ADA/GCN5^{21, 32, 89, 133, 176, 191, 206}. Ιδιότητες διαμεσολαβητή έχει επίσης αναφερθεί ότι έχει ένα τμήμα του ολοένζυμου της RNA πολυμεράσης II^{158, 179, 320} καθώς και το σύμπλοκο των συνδεόμενων με τον γενικό παράγοντα TFIID (TBP: TATA Binding Protein), πρωτεϊνών (TAFs: TBP Associated Factors)^{77, 92, 140, 193, 269, 289}. Η ύπαρξη διαμεσολαβητών φανερά μεγαλώνει το ρεπερτόριο των δυνατοτήτων ρύθμισης που παρέχονται από ένα συγκεκριμένο ενεργοποιητή^{248, 274}. Δηλαδή η ενεργοποίηση απ' αυτόν, κάποιου υποκινητή ίσως να απαιτεί διαμεσολάβηση, ενώ άλλου υποκινητή, όχι.

Κατά την επιλογή των μεταλλαγών *gcn* στο σακχαρομύκητα, απομονώθηκε η μεταλλαγή *gcn5*^{69, 70, 71} η οποία δεν επέτρεπε την πλήρη επαγωγή των βιοσυνθετικών ενζύμων των αμινοξέων, σε συνθήκες έλλειψης, παρόλο που τα επίπεδα της πρωτεΐνης *Gcn4* έφταναν σε κανονικά επίπεδα στα στελέχη που έφεραν τη μεταλλαγή αυτή. Επόμενη μελέτη έδειξε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης *Gcn5* είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτραπεί η πλήρης ενεργοποίηση υποκινητών που ελέγχονται όχι μόνο από το *Gcn4* αλλά και από μια σειρά άλλους μεταγραφικούς παράγοντες⁸⁹. Τέτοιοι είναι ο *Gal4*, ο τριμερικός *Hap2/Hap3/Hap4*³²⁵, και ο προερχόμενος από τον ιό HSV (Herpes Simplex Virus) ενεργοποιητής *VP16* (Viral Protein 16). Οι ενεργοποιητές αυτοί ελέγχουν γονίδια τα οποία δεν έχουν καμιά σχέση μεταξύ τους. Ο παράγοντας *Gal4* ενεργοποιεί τα γονίδια που εμπλέκονται στην χρήση της Γαλακτόξης ως πηγή άνθρακα για το κύτταρο^{212, 215}, ο *Hap2/Hap3/Hap4*, γονίδια αναπνευστικών λειτουργιών και ο *VP16* που δεν είναι καν πρωτεΐνη του σακχαρομύκητα αλλά έχει την ικανότητα να λειτουργεί σ' αυτόν, συμμετέχει στη διαδικασία πολλαπλασιασμού του ιού HSV. Υπάρχει, παρόλα αυτά ένα κοινό στοιχείο ανάμεσα σ' αυτούς τους παράγοντες: Διαθέτουν περιοχή ενεργοποίησης όξινου χαρακτήρα.

Πως ενεργοποιεί τη μεταγραφή ένας μεταγραφικός παράγοντας;



Εικόνα 6.2:

Πως επιδρά ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής στους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Άμεσα, υποβοηθούμενος από διαμεσολαβητές, ή και με τους δύο τρόπους;

Τα χαρακτηριστικά αυτά της πρωτεΐνης Gcn5 είναι τα αναμενόμενα ενός διαμεσολαβητή της δράσης των παραπάνω ενεργοποιητών.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης VP16 στο σακχαρομύκητα προκαλεί δραματική πτώση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων^{20, 21}. Θα πρέπει να διευκρινιστεί εδώ ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν είναι “πλήρης” μεταγραφικός παράγοντας, δηλαδή δεν έχει περιοχή δέσμευσης στο DNA, αλλά μόνο περιοχή ενεργοποίησης⁵³. Είναι όμως δυνατό να συντηχθεί με μια περιοχή δέσμευσης, αποκτώντας τη δυνατότητα να ενεργοποιεί υποκινητές που φέρουν τις αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης. Για παράδειγμα, σύντηξη της με την περιοχή δέσμευσης στο DNA, του Gal4, δίνει την ικανότητα στη χείμερα GAL4-VP16 να ενεργοποιεί υποκινητές ελεγχόμενους από Gal4²⁰. Είναι αυτή η χείμερα που όταν υπερεκφραστεί, προκαλεί το φαινόμενο της αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Η ανάλυση του φαινομένου έδειξε ότι αυτό προέρχεται από την τιτλοδότηση-παροπλισμό βασικών παραγόντων της μεταγραφής από τον ενεργοποιητή όταν αυτός υπεραράγεται, στις περιοχές των υποκινητών που αυτός δεσμεύεται¹⁸⁷. Η έμμεση συνέπεια είναι ότι η διαθεσιμότητα των παραγόντων αυτών σε άλλους υποκινητές πέφτει, μη επιτρέποντας απρόσκοπτη μεταγραφή από αυτούς. Η συνδυασμένη πτώση της μεταγραφής ενός εκτεταμένου εύρους γονιδίων, θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για τον αργό πολλαπλασιασμό που παρατηρείται. Η τιτλοδότηση αυτή θα μπορούσε να συμβαίνει είτε με απ' ευθείας αλληλεπίδραση του ενεργοποιητή με τους γενικού μεταγραφικούς παράγοντες, είτε μέσω διαμεσολαβητών^{18, 20}. Στην τελευταία περίπτωση, η απουσία του διαμεσολαβητή δεν θα επέτρεπε πλέον την τιτλοδότηση βασικών παραγόντων, αναιρώντας το πρόβλημα στον πολλαπλασιασμό. Βασισμένη στη λογική αυτή, ήταν μια επιλογή μεταλλαγών που να αναιρούν το πρόβλημα στο πολλαπλασιασμό που προκύπτει από υπερέκφραση του ενεργοποιητή GAL4-VP16. Η προσέγγιση αυτή οδήγησε στην αποκάλυψη των πρωτεϊνών Ada2 και Ada3^{20, 29, 236}. Μεταλλαγές στα αντίστοιχα γονίδια έχουν στη μεταγραφή, αποτελέσματα παρόμοια με αυτά μεταλλαγών στο γονίδιο GCN5.

Γενετική και βιοχημική ανάλυση έδειξε ότι οι τρεις πρωτεΐνες, Gcn5, Ada2 και Ada3⁴², εντοπίζονται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο αποκαθιστά επαφή ανάμεσα στον ενεργοποιητή και τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Η έλλειψη ενός από τα τρία γονίδια ή η συνδυασμένη απουσία δυο ή και των τριών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της επαγόμενης από την πρωτεΐνη Gcn4 μεταγραφής, περίπου στο μισό. Δεν είναι ίδια η επίδραση της απουσίας των πρωτεϊνών αυτών όμως, στη δράση των άλλων ενεργοποιητών που εξαρτώνται απ'αυτές. Έτσι η

ενεργοποίηση απο την VP16 εμφανίζεται να απαιτεί την παρουσία τους σχεδόν στο σύνολο της, ενώ η ενεργοποίηση απο Gal4 και Har2/Har3/Har4 σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό, περίπου 70%.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης της μεταγραφής που οφείλεται στην πρωτεΐνη Gcn4

Η πρωτεΐνη Gcn4 κατέχει καθοριστική θέση μέσα στο πλαίσιο του ομοιοστατικού μηχανισμού του γενικού ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων, στο σακχαρομύκητα. Αποτελεί κόμβο της απόκρισης στην έλλειψη των αμινοξέων και κατευθύνει την ενορχηστρωμένη επαγωγή των βιοσυνθετικών ενζύμων. Πρόκειται για ένα μόριο που έχει μελετηθεί διεξοδικά, τόσο γενετικά όσο και βιοχημικά. Η διαθέσιμη πληροφορία διευκολύνει τη χρήση του ως πρότυπου μεταγραφικού ενεργοποιητή για τη μελέτη του μηχανισμού της ενεργοποίησης. Επιπλέον τα όποια αποτελέσματα αποκτηθούν, εύκολα γενικεύονται σε άλλους ενεργοποιητές αφού το Gcn4 ανήκει στην ευρεία κατηγορία των όξινων, bZIP ενεργοποιητών που περιλαμβάνει και αρκετούς ενεργοποιητές που ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η οντογένεση, η αντίληψη και η προσαρμογή στο περιβάλλον, ή κωδικοποιούνται απο ογκογονίδια.

Παρόλο τον όγκο της πληροφορίας που έχει συσσωρευτεί για το Gcn4, υπάρχουν αρκετά ερωτήματα που θεωρούμε σημαντικό να απαντηθούν για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης του. Το θεμελιώδες ερώτημα του πώς τελικά η πρωτεΐνη Gcn4, αλλά και οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές εν γένει προάγουν τη διαδικασία συγκρότησης του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής, μόλις τώρα αρχίζει να προσεγγίζεται. Όπως αναφέρθηκε οι διαμεσολαβητές Gcn5, Ada2 και Ada3, απαιτούνται για να διεξαχθεί αυτό στην κανονική του έκταση. Όμως η απουσία τους δεν καταργεί την ενεργοποίηση, απλώς τη μειώνει στο μισό. Για το υπόλοιπο ποσοστό θα πρέπει προφανώς ο μηχανισμός να είναι διαφορετικός και να μην συμπεριλαμβάνει τους συγκεκριμένους διαμεσολαβητές. Μήπως λοιπόν συμμετέχουν και άλλοι που δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμα;

Ο μεταγραφικός ενεργοποιητής Gcn4 λειτουργεί ως διμερές. Αυτό αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό για το σύνολο των πρωτεϊνών αυτών. Μάλιστα οι μονομερείς ή οι πολυμερείς ενεργοποιητές είναι μάλλον μειοψηφία. Γιατί όμως να συμβαίνει αυτό; Ποιά αναγκαιότητα δηλαδή, υπαγορεύει αυτή τη διάταξη; Το διμερές Gcn4 που δεσμεύεται στον ψευδοπαλίνδρομο DNA στόχο, διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης που προέρχονται απο το κάθε διμερές. Απο μελέτες αντίστοιχων περιοχών άλλων διμερών παραγόντων όπως ο CREB^{18, 25, 79} (C AMP Regulated Element Binding factor), έχει διαπιστωθεί οτι είναι απίθανο αυτές οι δυο περιοχές να συγκροτούν, στα πλαίσια του διμερούς, μια ενιαία, τουλάχιστον λειτουργικά, περιοχή³⁰⁵. Αντίθετα, φαίνεται να διατηρούν τη λειτουργική αλλά και δομική αυτοτέλεια τους. Εάν και τέτοιο ισχύει και για την πολύ όμοια πρωτεΐνη Gcn4, είναι τα δύο μονομερή που

απαρτίζουν το διμερές, λειτουργικά ισοδύναμα; Χρησιμοποιούν οι δυο περιοχές ενεργοποίησης τους ίδιους διαμεσολαβητές για να αποκαταστήσουν επαφή με τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, προκειμένου να επάγουν τη μεταγραφή απο ενα συγκεκριμένο υποκινητή; Η μήπως οι δυο αυτές περιοχές δεν λειτουργούν ταυτόχρονα αλλά σε κάποιους υποκινητές συμμετέχει η μια περιοχή ενώ σε άλλους η άλλη^{322, 326};

Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που αφορούν τη δομή που έχει το σύμπλοκο DNA-περιοχή δέσμησης στο DNA του Gcn4, αποκαλύπτουν τη συμμετρία που έχει το διμερές στη διεύθυνση του DNA, στο χώρο. Η συμμετρία αυτή δεν θέτει κανένα εμπόδιο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής και προς τις δύο κατευθύνσεις του DNA εάν τηρηθούν φυσικά οι απαιτήσεις για άλλα στοιχεία όπως το TATA. Το ίδιο μάλιστα το DNA στοιχείο δέσμησης του Gcn4, είναι συμμετρικό. Υπάρχει παρόλα αυτά η περίπτωση του γενετικού τόπου που περιέχει τα γονίδια PET56 και HIS3¹⁸⁹. Τα γονίδια αυτά μεταγράφονται σε αντίθετες κατευθύνσεις, τα κωδικά μεταφραστικής τους έναρξης τα χωρίζουν περίπου 180 νουκλεοτιδικές βάσεις και περίπου στη μέση της απόστασης υπάρχει μια αλληλουχία σύνδεσης του Gcn4. Παρόλα αυτά η πρωτεΐνη Gcn4 επάγει τη μεταγραφή μόνο του HIS3 χωρίς να έχει καθόλου επίδραση στη ρύθμιση του PET56. Πως λοιπόν ένας καθ' όλα συμμετρικός παράγοντας προάγει τη μεταγραφή προς τη μια μόνο κατεύθυνση;

Τέλος, γιατί υπάρχει αυτή η ποικιλία DNA στόχων σύνδεσης του Gcn4, στα γονίδια που αυτό ελέγχει; Για κάποια απ' αυτά τα γονίδια είναι απαραίτητη η ύπαρξη του διαμεσολαβητή Gcn5 ώστε να επιτευχθεί πλήρης επαγωγή. Για άλλα αυτό δε φαίνεται αναγκαίο. Το ερώτημα που προκύπτει είναι που οφείλονται οι διαφορές αυτές. Μήπως την εξάρτηση απο ενα συγκεκριμένο διαμεσολαβητή, διαμορφώνει η φύση του DNA στόχου¹⁸²; Είναι δηλαδή δυνατόν να επηρεάσει η αλληλουχία δέσμησης τη δράση ενός ενεργοποιητή; Πως θα μπορούσε να συμβεί κάτι τέτοιο;

Με τη φιλοδοξία να προσεγγίσουμε κάποια απ' αυτά τα ερωτήματα, σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν τα πειράματα που περιγράφονται και συζητούνται στα τρία επόμενα κεφάλαια.



7^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

α) Όταν η πρωτεΐνη Gcn4 υπερπαράγεται.....

Το φαινόμενο της τιτλοδότησης

Οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές επάγουν την έκφραση των γονιδίων επιτρέποντας να συμβαίνουν πιο συχνά γεγονότα έναρξης της μεταγραφής στον υποκκινητή των γονιδίων αυτών. Αυτό επιτυγχάνεται ακόμα και όταν οι ενεργοποιητές αυτοί δεσμευτούν σε πολύ μεγάλες αποστάσεις πάνω στο DNA από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Η ερώτηση που προκύπτει είναι, πώς οι πρωτεΐνες αυτές επιδρούν στο σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης. Αρκετοί μηχανισμοί έχουν προταθεί και αρκετοί από αυτούς εμπλέκουν μια κοινή διαδοχή αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους ενεργοποιητές που είναι δεσμευμένοι σε κατάλληλες θέσεις δέσμευσης (UASs: Upstream Activating Sequences), και τους γενικούς παράγοντες της μεταγραφής που συνήθως βρίσκονται δεσμευμένοι πάνω στο στοιχείο TATA. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις τελικά επιτρέπουν την σωστή, παραγωγική συγκρότηση ενός συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής.

Εχουν συσσωρευτεί αρκετά πειραματικά δεδομένα, τα οποία υποστηρίζουν την άποψη αυτή και τα οποία προτείνουν ότι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής μπορεί να παρεβληθεί στην δράση ενός άλλου και *in vitro* και *in vivo*²⁰. Μια τέτοια αλληλοπαρεμβολή ανάμεσα στους ενεργοποιητές έχει προταθεί ότι συμβαίνει όταν η υπερέκφραση κάποιων ενεργοποιητών όπως ο Gal4, GAL4-VP16 και ο GAL4-HAP4 προκαλεί πτώση στην έκφραση κάποιων μη σχετιζόμενων ρυθμιστικά απ' αυτούς, γονιδίων^{242, 243}. Σε όλες τις περιπτώσεις η παρεμβολή ενός μεταγραφικού παράγοντα στην λειτουργία ενός άλλου ήταν συνάρτηση της ικανότητας του να ενεργοποιεί. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια άμεση συσχέτιση δύο ποιοτικά διαφορετικών δεδομένων. Δηλαδή της μεταγραφικής ενεργοποίησης από έναν παράγοντα γονιδίων που ρυθμίζονται από αυτόν και της μείωσης της μεταγραφής μη σχετιζόμενων με αυτόν γονιδίων, όταν αυτός υπερεκφραστεί. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην κατηγορία των όξινων ενεργοποιητών επιφέρει μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα⁹⁰. Το γεγονός αυτό υποδικνύει, ότι η υπερέκφραση αυτή έχει μια γενικότερη επίδραση στην μεταγραφή, η οποία μπορεί να αποδοθεί στον παροπλισμό γενικών μεταγραφικών παραγόντων από τον όξινο ενεργοποιητή, είτε άμεσα, είτε μέσω πρωτεϊνικών γεφυρών. Η άμεση αλληλεπίδραση υποστηρίζεται από μελέτες που δείχνουν ότι υπάρχει επαφή ανάμεσα

στην περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης VP16 και των γενικών παραγόντων TBP και TFIIIB^{36, 56, 58}.

Ο ενεργοποιητής Gcn4 έχει την ικανότητα να τιλοδοτεί; Ας δούμε πώς η υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης Gcn4 έχει ως αποτέλεσμα την παρεμβολή στη μεταγραφική ενεργοποίηση υποκινητών που φέρουν τα στοιχεία GAL4 και dA:dT.

Ένα παράγωγο του γονιδίου GCN4, με έλλειψη της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής που περιέχει τα τέσσερα μικρά αναγνωστικά πλαίσια (ΔORFGCN4), εκφράζει σχετικά υψηλά επίπεδα Gcn4²⁹⁶. Παρατηρήθηκε, ότι στελέχη που φέρουν αυτό το παράγωγο πολλαπλασιάζονται με αργό ρυθμό όπως φαίνεται στην εικόνα 7.1A. Αυτοί οι φαινότυποι έγιναν πιο έντονοι όταν το γονίδιο ΔORFGCN4 τέθηκε υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή ADH1. Για να καθοριστεί η αιτία αυτής της επίδρασης εξετάστηκαν αρχικά οι συνέπειες της υπερπαραγωγής της πρωτεΐνης Gcn4 πάνω στην έκφραση γονιδίων μαρτύρων, Lac Z που ρυθμίζονται από διαφορετικά DNA στοιχεία.

Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου GCN4, παρουσία γαλακτόξης ως πηγής άνθρακα (συνθήκες αποκαταστολής του γονιδίου GAL1 που ελέγχεται από τον μεταγραφικό ενεργοποιητή Gal4), είχε ως αποτέλεσμα μια μεγάλη μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου μάρτυρα GAL1-LacZ. Παρομοίως, η έκφραση του γονιδίου μάρτυρα DED1-LacZ, που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του DNA στοιχείου dA:dT μειώθηκε στα ίδια χαμηλά επίπεδα. Αντίθετα δεν υπήρχε καμία σημαντική πτώση στην έκφραση του γονιδίου ΔORFGCN4-LacZ (Εικόνα 7.2).

Όπως ήταν αναμενόμενο, η έκφραση των γονιδίων LacZ που ήταν υπό τον έλεγχο του στοιχείου πρόσδεσης της πρωτεΐνης Gcn4 στο DNA (GCRE) αυξήθηκε όταν η Gcn4p υπερεκφράστηκε. Συμπερασματικά, τα υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης Gcn4 επιτρέπουν την παρεμβολή της στη μεταγραφική ρύθμιση μέσω των στοιχείων GAL4 και dA:dT.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί περισσότερο η αναστολή από τη Gcn4 έγινε προσπάθεια εντοπισμού των περιοχών της πρωτεΐνης που ευθύνονται για αυτή την επίδραση. Γι αυτό το λόγο συντήχθηκε η περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4 με την περιοχή σύνδεσης με το DNA της βακτηριακής πρωτεΐνης LexA και υπερεκφράστηκε αυτός ο τεχνητός μεταγραφικός ενεργοποιητής σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Αυτή η υπερέκφραση έδωσε επίσης ένα φαινότυπο αργής ανάπτυξης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7.3A η αυξημένη έκφραση αυτού του χιμαιρικού ενεργοποιητή έδωσε υψηλά επίπεδα μεταγραφής από ένα υποκινητή που έφερε έξι σημεία πρόσδεσης για την πρωτεΐνη LexA αλλά μείωσε τη μεταγραφή από τους υποκινητές των γονιδίων GAL1 και DED1. Συνεπώς η αναστολή της μεταγραφής που παρατηρήθηκε δεν ήταν συνέπεια ενός έμμεσου αποτελέσματος της υπερέκφρασης της Gcn4 αλλά μάλλον μια πραγματική

Εικόνα 7.1:

Φαινότυποι σε τρυβλία, που επάγονται από την υπερπαραγωγή της Gcn4p σε διαφορετικά στελέχη.

Τα τρυβλία επωάσθησαν στους 30°C για 4 ημέρες στα τμήματα **A** και **D** και για 3 ημέρες στα **B** και **C**.

A: Η Gcn4p όταν υπερπαράγεται, δημιουργεί πρόβλημα πολλαπλασιασμού στα κύτταρα φυσικού τύπου.

Κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο που φέρει το παράγωγο ΔORFGCN4 (+ΔORFGCN4), μεγαλώνουν αργά σε σύγκριση με τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν μόνο με τον πλασμιδιακό φορέα (-ΔORFGCN4).

B: Η απουσία των πρωτεϊνών Ada2 ή Gcn5 ή και των δύο δεν μειώνει την τοξικότητα της υπερπαραγωγής της Gcn4.

Τα προσδιορισμένα στον πίνακα στελέχη είτε μετασχηματίστηκαν μόνο με τον πλασμιδιακό φορέα (-ΔORFGCN4, άνω επίπεδο) είτε με το πλασμίδιο που υπερπαράγει τη Gcn4 (+ΔORFGCN4, κάτω επίπεδο).

C: Η υπερπαραγωγή του TFIIIB αναιρεί εντελώς τις τοξικές επιδράσεις της υπερπαραγωγής της Gcn4.

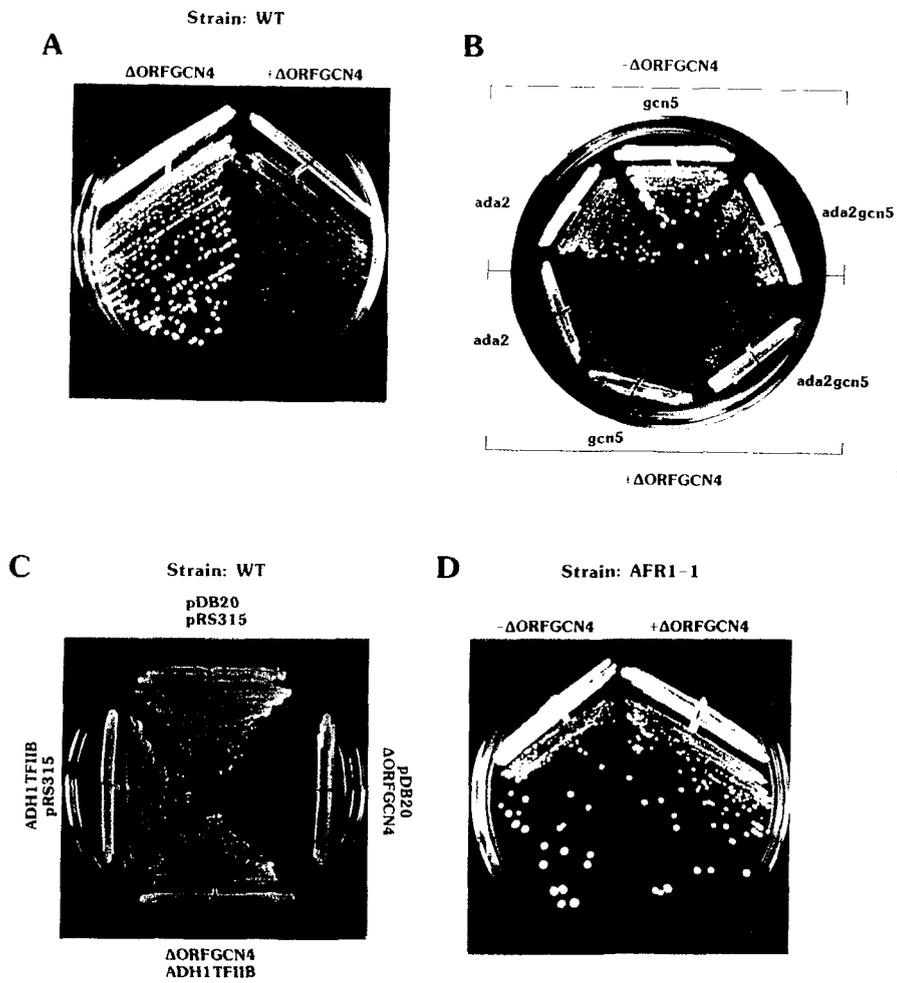
Πλασμίδια που έφεραν τα προσδιορισμένα παράγωγα γονιδίων εισάχθηκαν σε στελέχη φυσικού τύπου. Ο συν-μετασχηματισμός με ένα πλασμίδιο που υπερέκφραζε τον TFIIIB (ΔORFGCN4, ADH1TFIIIB) αναστρέφει το φαινότυπο αργής ανάπτυξης ενός στελέχους φυσικού τύπου που φέρει το παράγωγο ΔORFGCN4 (ΔORFGCN4/pDB20). Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην ανάπτυξη μετά από υπερέκφραση μονάχα του TFIIIB (ADH1TFIIIB/pRS315, σε σύγκριση με pDB20/pRS315).

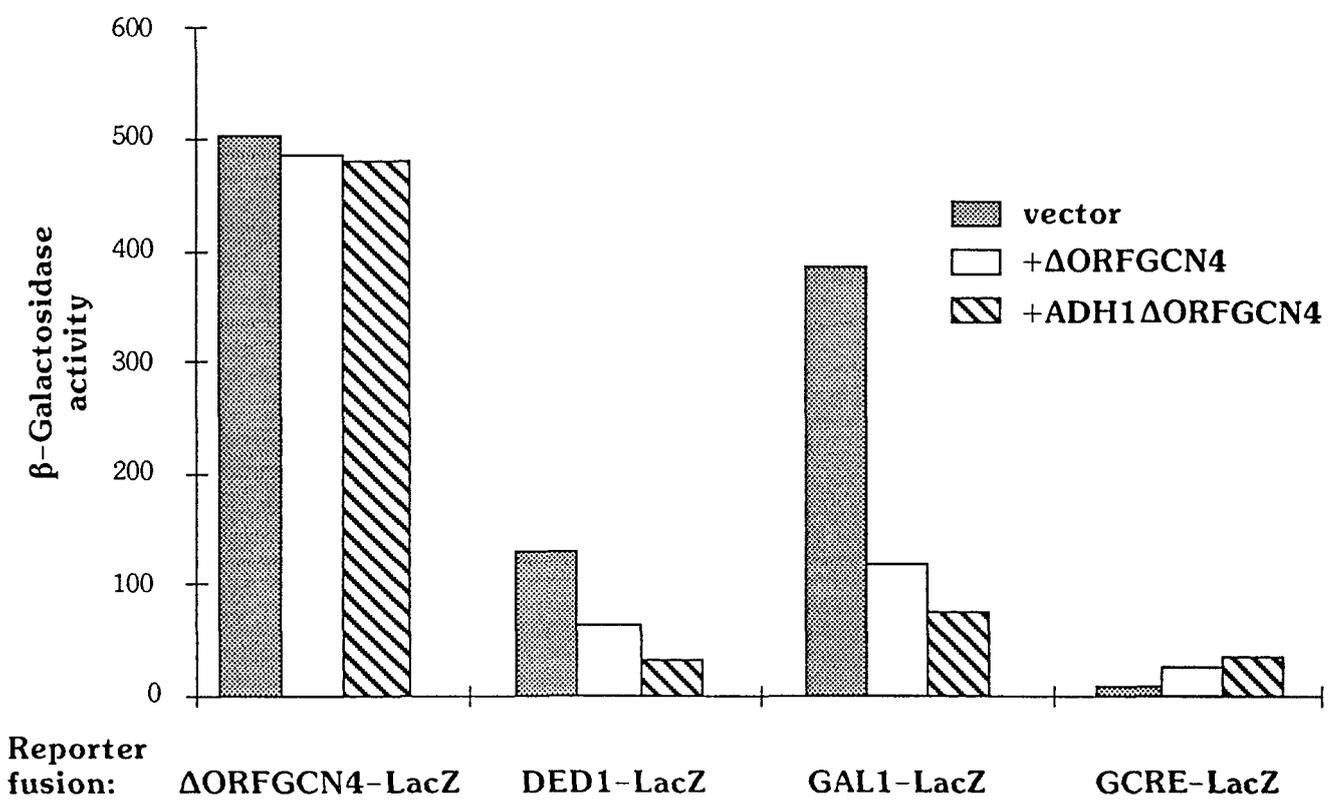
D: Το μεταλλαγμένο στέλεχος AFR1-1 δεν είναι ευαίσθητο στα τοξικά επίπεδα της πρωτεΐνης Gcn4.

Δεν παρατηρήθηκε καμία αναστολή ανάπτυξης μετά από εισαγωγή σ' ένα μεταλλαγμένο στέλεχος AFR1-1 του πλασμιδίου που φέρει το παράγωγο ΔORFGCN4 (+ΔORFGCN4), σε σύγκριση με τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα (-ΔORFGCN4). Το στέλεχος AFR1-1 δε δείχνει να έχει κανένα μειονέκτημα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο Min στους 30°C σε σύγκριση με το πατρικό στέλεχος φυσικού τύπου (-ΔORFGCN4 του **A**, σε σύγκριση με -ΔORFGCN4 του **D**).

Εικόνα 7.1

Φαινότυποι στελεχών σχετικά με το ρυθμό πολλαπλασιασμού.





Εικόνα 7.2:

Γραφική αναπαράσταση των επιδράσεων-αποτελεσμάτων αυξημένης ποσότητας της πρωτεΐνης Gcn4 στην έκφραση των γονιδίων μαρτυρων.

Διαφορετικά επίπεδα ενδοκυτταρικής παραγωγής της πρωτεΐνης Gcn4 επιτεύχθηκαν εισάγωντας στα κύτταρα είτε το πλασμίδιο φορέα (**vector**), είτε το κεντρομερικό πλασμίδιο που φέρει το παράγωγο Δ ORFGCN4 (**+ Δ ORFGCN4**). Για ακόμη μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης του GCN4, χρησιμοποιήθηκε ένα πλασμίδιο υψηλής αντιπροσώπευσης που έφερε το παράγωγο Δ ORFGCN4 υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή ADH1 (**+ADH1 Δ ORFGCN4**). Η παραγωγή της πρωτεΐνης Gcn4 μετρήθηκε έμμεσα χρησιμοποιώντας ένα γονίδιο μάρτυρα όπου στον υποκινητή του έφερε ένα μόνο στοιχείο GCN4 (**GCRE-LacZ**).

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο Min με όλα τα αμινοξέα (Min-AA). Οι τιμές εκφράζονται σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

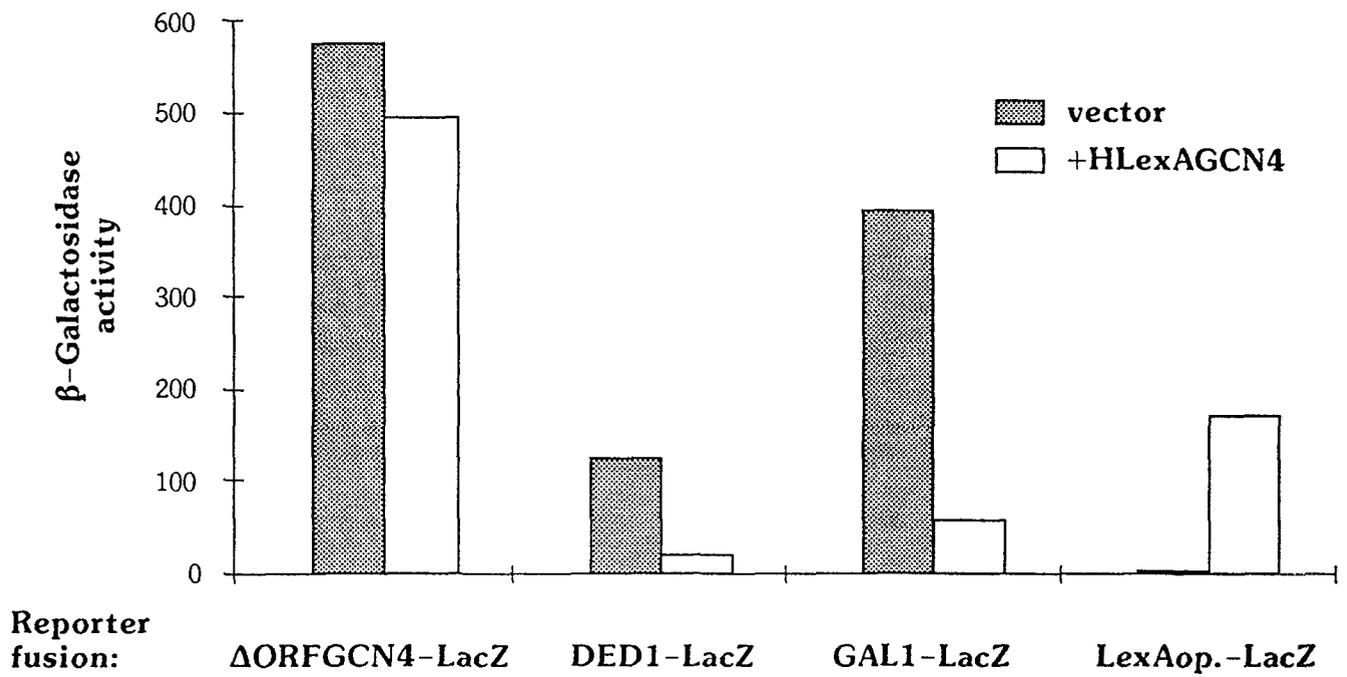
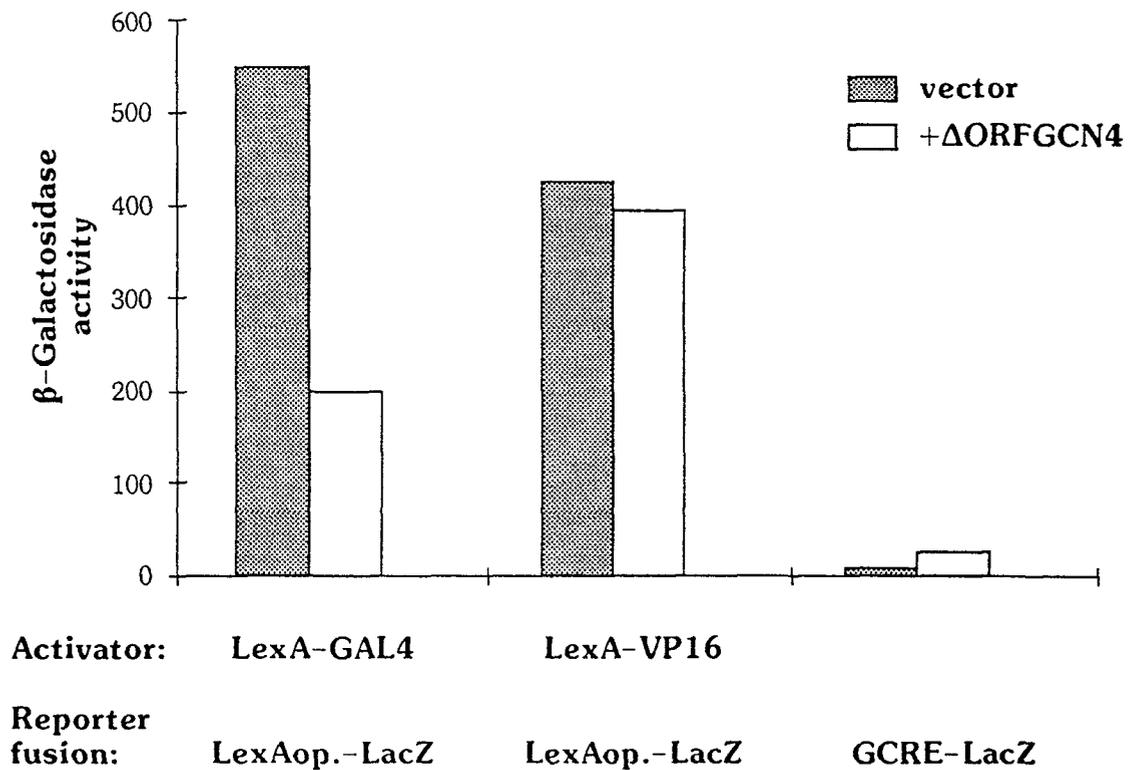
Εικόνα 7.3:

A. Γραφική αναπαράσταση των επιδράσεων-αποτελεσμάτων της υπερέκφρασης ενός χιμαιρικού ενεργοποιητή.

Ο ενεργοποιητής αυτός αποτελείται από την περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4, συντηγμένη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της βακτηριακής LexA, στην έκφραση των προσδιορισμένων γονιδίων μάρτυρων. Κύτταρα σακχαρομύκητα μετασχηματίστηκαν είτε με τον πλασμιδιακό φορέα (**vector**) είτε με ένα πλασμίδιο υψηλής αντιπροσώπευσης που έφερε τη σύντηξη LexA-GCN4 (**+HLexAGCN4**). Τα στελέχη και οι συνθήκες ανάπτυξης ήταν όμοιες με αυτές της εικόνας 7.2.

B. Η υπερέκφραση της Gcn4p μειώνει τη λειτουργία της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gal4p αλλά όχι τη λειτουργία της περιοχής ενεργοποίησης της VP16.

Κύτταρα σακχαρομύκητα φυσικού τύπου που φέρουν τα προσδιορισμένα γονίδια μάρτυρες και χιμαιρικούς ενεργοποιητές μετασχηματίστηκαν είτε με τον πλασμιδιακό φορέα είτε με το πλασμίδιο που έφερε το παράγωγο Δ ORFGCN4 (**+ Δ ORFGCN4**). Τα επίπεδα της παραγωγής πρωτεΐνης Gcn4 προσδιορίστηκαν έμμεσα όπως στην Εικόνα 7.2. Οι τιμές εκφράζονται σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

A**B**

επίδραση τιτλοδότησης που οφείλεται στην περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης αυτής. Η υπερέκφραση μονάχα της περιοχής ενεργοποίησης δεν είχε το ίδιο αποτέλεσμα και συνεπώς θα πρέπει αυτή να είναι συνδεδεμένη με μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA για να παροπλίσει βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Για να καθοριστεί ο στόχος της επίδρασης αυτής της Gcn4, έγινε μια σύντηξη μεταξύ της περιοχής πρόσδεσης της πρωτεΐνης LexA με το DNA και της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gal4. Το χιμαιρικό αυτο γονίδιο συνεκφράστηκε σε στελέχη φυσικού τύπου μαζί με το γονίδιο μάρτυρα, LacZ υπό τον έλεγχο υποκινητή με έξι θέσεις σύνδεσης για LexA. Η μεταγραφική ενεργοποίηση αυτού του γονιδίου από τη πρωτεΐνη LexA-Gal4 μετρήθηκε κάτω από χαμηλά και υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GCN4.

Παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας της β-Γαλακτοσιδάσης όταν το GCN4 υπερεκφράστηκε (Εικόνα 7.3B), πράγμα που δείχνει ότι η ενεργοποιητική λειτουργία της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gal4 ελαττώθηκε από την υπερπαραγωγή Gcn4. Η ικανότητα της περιοχής ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα VP16 να διεγείρει τη μεταγραφή από του ίδιου γονιδίου μάρτυρα ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας μια σύντηξη LexA-VP16. Σε αντίθεση με την ελάτωση της ενεργοποίησης μέσω της πρωτεΐνης Gal4, δεν παρατηρήθηκε καμιά σημαντική επίδραση στη λειτουργία του VP16 από την υπερέκφραση του γονιδίου GCN4, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.3B. Επομένως κάτω από συνθήκες υπερέκφρασης του GCN4, επηρεάζεται η λειτουργία μερικών μόνο όξινων περιοχών ενεργοποίησης εφ' όσον η περιοχή ενεργοποίησης του Gcn4 εμποδίζει την λειτουργία της αντίστοιχης περιοχής του παράγοντα Gal4 αλλά όχι του VP16.

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση του γονιδίου GCN4 είναι τοξική για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σ' αυτήν την μελέτη δείχτηκε ότι η τοξικότητα αυτή συνδέεται με παρεμβολή στη μεταγραφή. Εξετάστηκαν τα αποτελέσματα που είχε η υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης Gcn4 πάνω στην μεταγραφή δύο μή ρυθμιζόμενων από αυτή γονιδίων του GAL1 και του DED1. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζονται από διαφορετικούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές. Η ανάλυση αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη Gcn4 μπορεί να παρεβληθεί στην λειτουργία του παράγοντα Gal4 και του συνδεδεμένου με το DNA στοιχείο dA:dT υποθετικού παράγοντα που ρυθμίζουν τα γονίδια αυτά. Η παρεμβολή έχει ως συνέπεια την μείωση του δυναμικού ενεργοποίησης των παραγόντων αυτών. Η παρεμβολή αυτή χαρτογραφείται στην περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4. Κατά συνέπεια η πρωτεΐνη Gcn4 προστίθεται στο οπλοστάσιο των ισχυρών μεταγραφικών παραγόντων όπως η Gal4, GAL4-VP16 και GAL4-HAP4^{20, 21, 241} που έχει δειχθεί ότι επίσης έχουν ικανότητα παρεμβολής στην μεταγραφή μή σχετιζόμενων γονιδίων όταν υπερεκφραστούν.

Τιτλοδότηση και απουσία διαμεσολαβητών;

Σχετικά πρόσφατα πειραματικά δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον ενεργοποιητή και σε βασικούς παράγοντες της μεταγραφής γεφυρώνεται ή έστω σταθεροποιείται από πρωτεΐνες που οι ίδιες δεν συνδέονται με το DNA. Η προσομοίωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης *in vitro* απαιτεί την παρουσία ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο εμφανίζεται να διαμεσολαβεί για την λειτουργία του ενεργοποιητή. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι για την λειτουργία των μεταγραφικών ενεργοποιητών απαιτούνται και βοηθητικές πρωτεΐνες, διαμεσολαβητές. Στρατηγικές γενετικής επιλογής, οι οποίες σχεδιάστηκαν με σκοπό την απομόνωση τέτοιων διαμεσολαβητών οδήγησαν στην αναγνώριση των πρωτεϊνών Ada2 και Ada3²¹ με ιδιότητες όπως αυτές που αναμένεται να έχουν οι διαμεσολαβητές. Μεταλλάξεις στα αντίστοιχα γονίδια, οι οποίες οδηγούν στην σύνθεση μη λειτουργικών πρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα τα στελέχη σακχαρομύκητα που τις φέρουν, να μην ανταποκρίνονται στην υπερέκφραση του ενεργοποιητή GAL4-VP16 που σε κανονικές συνθήκες θα είχε ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού τους²⁰.

Σε μια ακόμα παλαιότερη επιλογή μεταλλαγών, οι οποίες οδηγούν σε ανικανότητα των κυττάρων να επιβιώσουν σε συνθήκες έλλειψης αμινοξένων απομονώθηκε το γονίδιο GCN5, το οποίο σε επόμενη ανάλυση αποδείχθηκε ότι κωδικοποιούσε για μια πρωτεΐνη διαμεσολαβητή της δράσης μεταγραφικών ενεργοποιητών⁸⁹. Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι το προϊόν του γονιδίου αυτού, η πρωτεΐνη Gcn5 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Ada2 και Ada3 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο το οποίο χρησιμοποιούν για την αλληλεπίδραση τους με τη βασική μεταγραφική μηχανή, αρκετοί ενεργοποιητές, μεταξύ των οποίων και η πρωτεΐνη Gcn4. Με τα πειράματα που καταγράφονται εδώ, αποκαλύπτεται ότι η παρεμβολή του μεταγραφικού ενεργοποιητή Gcn4, όταν υπερεκφραστεί, στην μεταγραφή μη σχετιζόμενων με αυτό γονιδίων δεν αναιρείται κατά την απουσία των πρωτεϊνών Ada2 και Gcn5.

Παρ' όλο που έχουν αποδειχθεί βιοχημικά οι άμεσες επαφές των περιοχών ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων με τον TFIIB ή τον TBP^{56, 73}, πρόσφατες ενδείξεις υποστηρίζουν την αναγκαιότητα ύπαρξης διαμεσολαβητικών μορίων που να συνδέουν τέτοιες περιοχές με τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Τα προϊόντα των γονιδίων ADA2 και GCN5 είναι απαραίτητα για σημαντικό ποσοστό της λειτουργίας των πρωτεϊνών Gcn4, Gal4 και VP16 και καθορίζουν ένα μονοπάτι για μια τέτοια μεταγραφική μεσολάβηση. Η αναστολή που ασκείται από την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης Gcn4, γίνεται μέσω αυτού του μονοπατιού;

Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, επαναλήφθηκε η ανάλυση που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη ενότητα, χρησιμοποιώντας στελέχη όπου τα γονίδια ADA2 ή GCN5 ή και τα δύο, είχαν απενεργοποιηθεί. Η πρώτη παρατήρηση ήταν ότι η υπερπαραγωγή της Gcn4 μπορούσε ακόμη να προκαλέσει ένα πρόβλημα ανάπτυξης σε στελέχη *ada2*, *gcn5* και *ada2 gcn5* (Εικόνα 7.1B).

Κατα δεύτερο, παρ' όλο που η έκφραση των γονιδίων μαρτύρων που ελέγχονται από τους υποκινητές των γονιδίων GAL1 και DED1 μειώθηκε σ' αυτά τα στελέχη, η υπερέκφραση της Gcn4 επέφερε μια επιπλέον μείωση στην έκφραση τους (Πίνακας 7.1).

Όλα αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επίδραση της Gcn4 στη λειτουργία των ενεργοποιητών Gal4 και του *dA:dT* συνδεδεμένου υποθετικού παράγοντα¹⁸⁶, δε γίνεται μόνο μέσω της πρωτεΐνης Ada2 ή της Gcn5. Ένα ενδιαφέρον σημείο είναι ότι στα στελέχη που έχουν έλλειψη του γονιδίου ADA2 ή του GCN5 ή και των δύο, η μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω του VP16 έγινε ευαίσθητη στην υπερέκφραση του γονιδίου GCN4. (Πίνακας 7.1). Σε ένα παράλληλο πείραμα το γονίδιο HIS3 ενός στελέχους σακχαρομύκητα, είχε τεθεί υπό τον έλεγχο υποκινητή που έφερε θέσεις δέσμησης της πρωτεΐνης LexA (L9FT5, Προσφορά του Δημήτρη Τζαμαρία). Η έκφραση του χιμερικού ενεργοποιητή LexA-VP16 καθιστούσε το στέλεχος αυτό ανθεκτικό στην 3-AT. Η ανθεκτικότητα αυτή δεν μειώθηκε ύστερα από υπερέκφραση του GCN4 (Εικόνα 7.5B). Όμως η καταστροφή του γονιδίου ADA2 (Εικόνα 7.4B, Ανάλυση κατά Southern) στο στέλεχος αυτό έκανε την προσδιδόμενη από την LexA-VP16 ανθεκτικότητα στην 3-AT, ευπρόσβλητη στην υπερπαραγωγή πρωτεΐνης Gcn4. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζεται στην εικόνα 7.5A. Οι λειτουργικές συνέπειες αυτής της επίδρασης θα συζητηθούν.

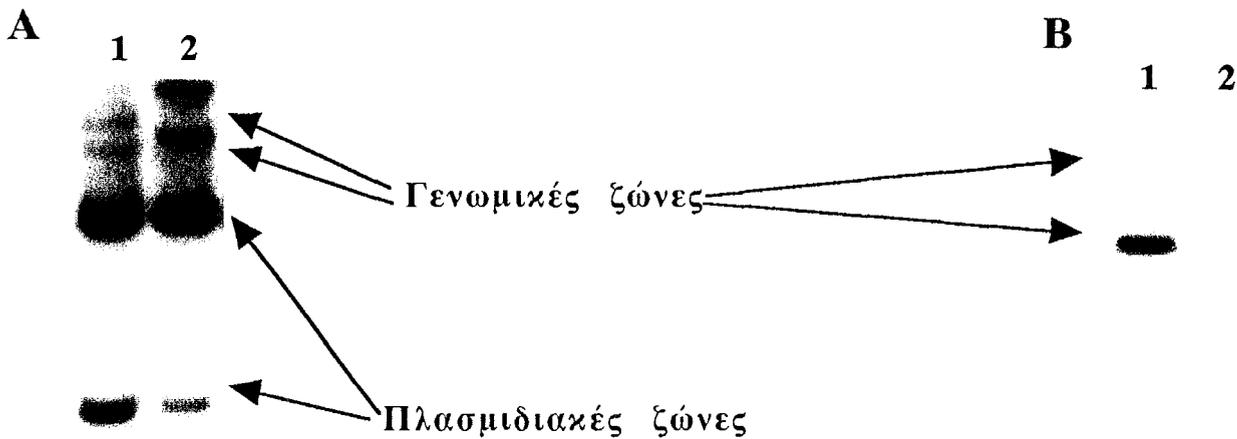
Πίνακας 7.1:

Αναστολή της μεταγραφικής ενεργοποίησης από την υπερπαραγωγή *Gcn4p* σε στελέχη φυσικού τύπου, *ada2*, *gcn5* και *ada2gcn5*.

Στέλεχος	Ενεργότητα β-Γαλακτοσιδάσης							
	<i>wt</i>		<i>ada2</i>		<i>gcn5</i>		<i>ada2gcn5</i>	
	$\Delta ORFGCN4$		$\Delta ORFGCN4$		$\Delta ORFGCN4$		$\Delta ORFGCN4$	
Fusion	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>$\Delta ORFGCN4$-LacZ</i>	308.6	282.2	291.1	269.3	250.1	232.3	294.6	282.3
<i>DED1</i> -LacZ	215.6	98.7	88.7	42.2	65.0	41.2	94.2	38.9
<i>GAL1</i> -LacZ	351.9	186.3	203.4	69.1	170.3	72.8	163.7	71.3
<i>GCRE</i> -LacZ	6.3	17.4	3.9	7.3	2.6	14.1	3.5	7.8
<i>LexAop</i> -LacZ/ <i>LexA</i> - <i>GAL4</i>	451.4	263.8	110.6	63.7	98.3	42.5	101.6	61.9
<i>LexAop</i> -LacZ/ <i>LexA</i> - <i>VPI6</i>	395.3	352.6	173.4	68.7	212.3	108.7	162.2	55.6
<i>LexAop</i> -LacZ/ <i>LexA</i> - <i>GCN4</i>	110.4	34.2	48.3	12.1	44.0	14.8	37.4	12.1

Η ενεργότητα της β-Γαλακτοσιδάσης μετρήθηκε σε στελέχη φυσικού τύπου (*wt*), *ada2*, *gcn5* και *ada2gcn5* μετασχηματισμένα με τα προσδιορισμένα στον πίνακα, συντηγμένα γονίδια είτε μαζί με το πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο $\Delta ORFGCN4$ (+ $\Delta ORFGCN4$) είτε χωρίς αυτό (- $\Delta ORFGCN4$). Στις τρεις τελευταίες περιπτώσεις συντήξεων, ένα γονίδιο μάρτυρας υπό τον έλεγχο υποκινητή με έξι θέσεις σύνδεσης για την πρωτεΐνη LexA χρησιμοποιήθηκε για να μετρηθεί η ικανότητα για ενεργοποίηση από τους προσδιορισθέντες χημειοκινητές, κάτω από συνθήκες χαμηλής και υψηλής έκφρασης GCN4 (- ή + $\Delta ORFGCN4$ αντίστοιχα). Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

Καταστροφές γονιδίων.



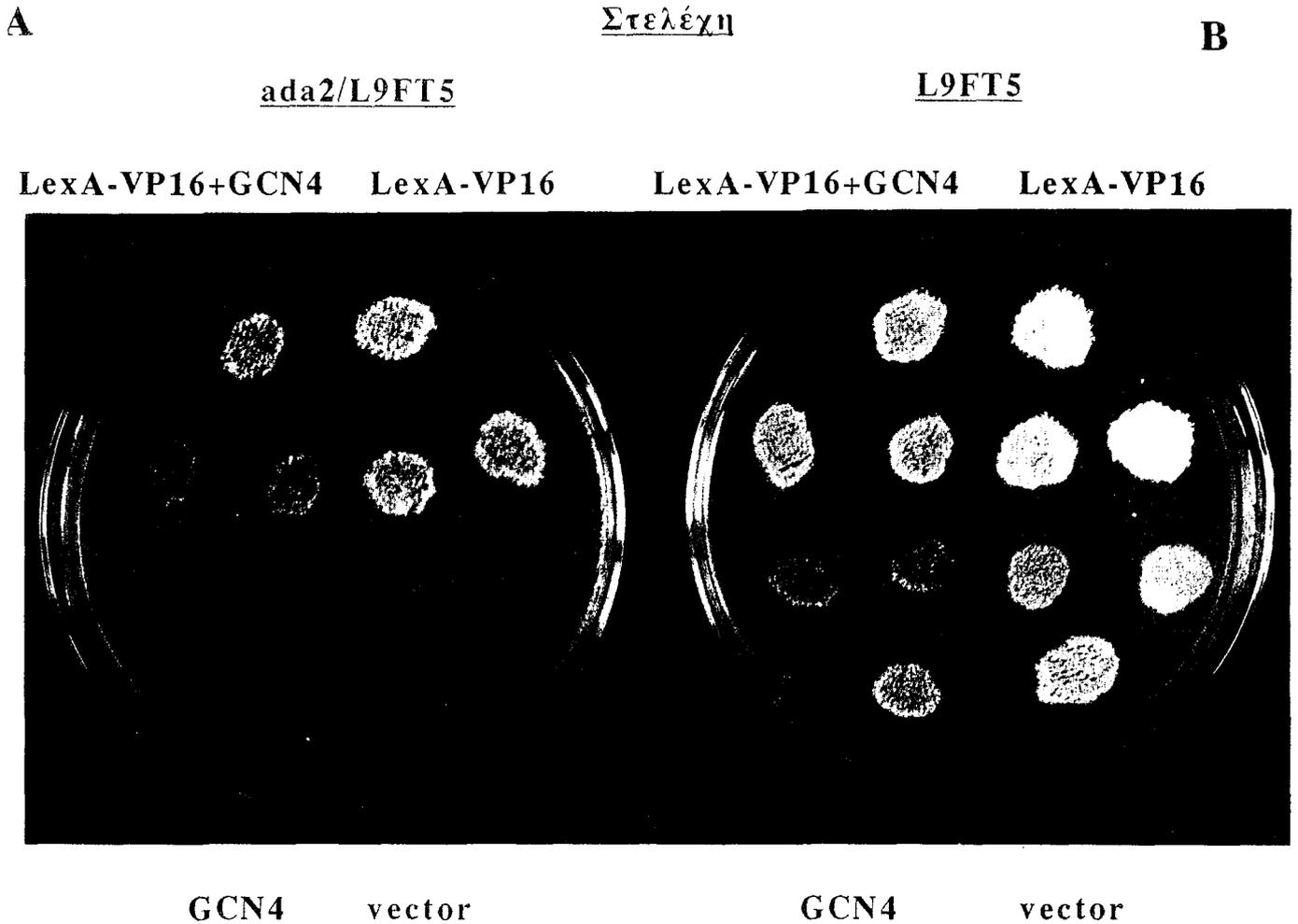
Εικόνα 7.4:

Ανάλυση κατά Southern, γενωμικού DNA των στελεχών AFR1-1 και L9FT5.

A. Αναλύθηκε μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού γενωμικό DNA που προέρχεται από στέλεχος AFR1-1 μετασχηματισμένου με πλασμίδιο που φέρει το λειτουργικό γονίδιο GCN5. Η διαδικασία αυτή έγινε αφού προηγήθηκε μετασχηματισμός του στελέχους αυτού με ένα γραμμικό τμήμα DNA, το οποίο φέρει ανάμεσα σε μικρές περιοχές προερχόμενες από το γονίδιο GCN5, το γονίδιο URA3. Όπως φαίνεται στην θέση **2** υπάρχει αλλαγή της κινητικότητας των δύο πάνω ζωνών DNA λόγω της ενσωμάτωσης του τμήματος αυτού στην θέση του ενδογενούς γονιδίου GCN5 (το πρότυπο ζώνωσης για ένα στέλεχος που φέρει του φυσικού τύπου γονίδιο εικονίζεται στην θέση **1**). Οι δύο εντονότερες ζώνες που δείχνονται στην εικόνα προέρχονται από το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο GCN5. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ειδικός για αλληλουχίες προερχόμενες από το γονίδιο αυτό.

B. Ανάλυση κατά Southern με ανιχνευτή τμήμα του γονιδίου ADA2, έγινε και για να διαπιστωθεί η καταστροφή του ενδογενούς γονιδίου ADA2 στο στέλεχος L9FT5. Το στέλεχος αυτό μετασχηματίστηκε με ένα τμήμα γραμμικού DNA που έφερε ανάμεσα σε πλευρικές αλληλουχίες προερχόμενες από το γονίδιο ADA2, το γονίδιο URA3. Μετά τον μετασχηματισμό ελέγχθηκε η μετατόπιση της ζώνης που ανιχνεύεται μέσω χρήσης αλληλουχιών ειδικών για το γονίδιο ADA2. Όπως φαίνεται στην εικόνα (θέση **2**) αλλάζει το πρότυπο ζώνωσης στελεχών, τα οποία φέρουν το κατεστραμένο γονίδιο ADA2, σε σχέση με αυτά στα οποία δεν έχει καταστραφεί (θέση **1**).

Παρεμβολή του Gcn4 στη λειτουργία του VP16.



Εικόνα 7.5:

Η έλλειψη του γονίδιου ADA2 επιτρέπει την τιτλοδότηση της δράσης του μεταγραφικού ενεργοποιητή VP16 από τον Gcn4.

A. Στελέχη **ada2/L9FT5** μετασηματίστηκαν είτε με πλασμίδιο φορέα (**vector**), είτε με πλασμίδιο που έφερε το χημειοκτικό ενεργοποιητή LexA-VP16 (**LexA-VP16**), είτε συν-μετασηματίστηκαν με το προηγούμενο πλασμίδιο και άλλο που υπερέκφραζε το γονίδιο GCN4 (**LexA-VP16 + GCN4**), είτε τέλος μόνο με το πλασμίδιο για την υπερέκφραση του GCN4 (**GCN4**). Φαίνεται η μείωση στην ανθεκτικότητα ενός στελέχους **ada2/L9FT5** μετασηματισμένου με πλασμίδιο που φέρει το χημειοκτικό ενεργοποιητή LexA-VP16, που προκαλείται από την συν-υπερέκφραση του γονιδίου GCN4. Τέτοιο στέλεχος που δεν είναι μετασηματισμένο, δεν εμφανίζει ανθεκτικότητα στην παρουσία 3-AT

B. Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε για λόγους ελέγχου σε στέλεχος **L9FT5** που έφερε άθικτο το γονίδιο ADA2. Εδώ δεν διαπιστώνεται παρεμβολή μεταξύ των ενεργοποιητών VP16 και Gcn4. Οι καλλιέργειες που φαίνονται στους τομείς, αντιστοιχούν με αυτές του **A.**

Ο TFIIIB δεν επαρκεί σε συνθήκες υπερέκφρασης του GCN4.

Έχει προταθεί ότι οι αρνητικές επιδράσεις που προέρχονται από ισχυρούς ενεργοποιητές αντανάκλουν την τιτλοδότηση ενός βασικού μεταγραφικού παράγοντα, γεγονός που επηρεάζει έτσι την έκφραση ενός μεγάλου συνόλου από γονίδια που δεν σχετίζονται με τον ενεργοποιητή. Αυτά τα φαινόμενα τιτλοδότησης αντανάκλουν μηχανιστικά χαρακτηριστικά της διαδικασίας μεταγραφικής ενεργοποίησης και είναι συμβατά με δύο μοντέλα.

- α) Οποιοδήποτε ζευγάρι παραγόντων που παρεμβάλλονται ο ένας στην λειτουργία του άλλου, θα μπορούσε να χρησιμοποιεί κοινούς διαμεσολαβητές, οι οποίοι να τιτλοδοτούνται όποτε ο ένας υπερεκφράζεται.
- β) Οι υπερεκφραζόμενοι μεταγραφικοί ενεργοποιητές πιθανόν να εγκλοβίζουν γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες στους υποκινητές που ρυθμίζουν, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα τους σε άλλους υποκινητές. Ο παροπλισμός αυτός θα μπορούσε να επιτυγχάνεται είτε με την βοήθεια άμεσης αλληλεπίδρασης του ενεργοποιητή με μόρια του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού είτε μέσω πρωτεϊνικών γεφυρών.

Η αλληλεπίδραση του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIIB με τους συνδεδεμένους με το DNA στοιχείο TATA παράγοντες, είναι ένα κρίσιμο αρχικό βήμα στη δημιουργία ενός παραγωγικού συμπλόκου έναρξης, το οποίο υποβοηθείται από ένα ενεργοποιητή^{131, 157}. Αν το πρόβλημα στην ανάπτυξη των κυττάρων που παρατηρείται μετά από υπερέκφραση ενός ενεργοποιητή οφείλεται στην ελάττωση της διαθεσιμότητας του TFIIIB, αυτή η αναστολή θα έπαυε με συν-υπερέκφραση του γονιδίου για τον TFIIIB.

Προς επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, η εισαγωγή ενός πλασμιδίου υψηλής αντιπροσώπευσης που έφερε την κωδική περιοχή του γονιδίου SUA7 για τον TFIIIB, υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή ADH1, ανέστρεψε εντελώς τη δηλητηριώδη επίδραση του ΔORFGCN4 στην ανάπτυξη των κυττάρων (Εικόνα 7.1C). Ανάλογη συν-υπερέκφραση του γονιδίου SPT15 που κωδικοποιεί για έναν άλλο βασικό μεταγραφικό παράγοντα, τον TBP (TATA Binding Protein)^{80, 91, 105}, δεν είχε την ίδια επίδραση. Αυτό το αποτέλεσμα υποστηρίζει την άποψη ότι ο TFIIIB αναμιγνύεται στη διαδικασία της μεταγραφικής αναστολής που προκαλείται από την υπερέκφραση του γονιδίου GCN4 και πιθανά αποτελεί το τιτλοδοτούμενο μόριο. Η παρεμβολή που προκαλεί η περίσσεια της πρωτεΐνης Gcn4, αναιρείται, όταν μαζί με το γονίδιο GCN4 συνυπερεκφραστεί και το γονίδιο SUA7 το οποίο κωδικοποιεί για τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIIB⁹⁵.

Για την περίπτωση του παράγοντα Gcn4 λοιπόν, η υπερέκφραση του TFIIIB

αναιρεί το πρόβλημα στην ανάπτυξη που προκαλεί η αυξημένη ποσότητα της πρωτεΐνης Gcn4. Αυτή η παρατήρηση ευνοεί το δεύτερο μοντέλο και προτείνει ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να τιτλοδοτήσει τον TFIIIB είτε απ' ευθείας είτε μέσω πρωτεϊνικών γεφυρών. Τελικά φαίνεται ότι ένα στάδιο της συγκρότησης παραγωγικού συμπλόκου έναρξης, στο οποίο εμπλέκεται ο TFIIIB, παρεμποδίζεται από αυξημένη ποσότητα Gcn4.

Ενεργοποίηση χωρίς Ada2 και Gcn5. Υπάρχουν και άλλοι διαμεσολαβητές;

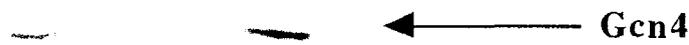
Η υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης Gcn4 σε κύτταρα σακχαρομύκητα είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής από υποκινητές που ενεργοποιούνται από τα DNA στοιχεία GAL4 ή dA:dT, καθώς και καθυστέρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Δείχτηκε ότι αυτό γίνεται μέσω της περιοχής ενεργοποίησης της Gcn4p και ότι η λειτουργία του μεταγραφικού ενεργοποιητή στον επηρεαζόμενο υποκινητή εξασθενεί. Η αρνητική επίδραση της Gcn4 σ' αυτούς τους υποκινητές εξακολουθεί να υφίσταται σε στελέχη με μεταλλαγές στα γονίδια ADA2 και GCN5, των οποίων τα προϊόντα είναι απαραίτητα για ένα μόνο μέρος του δυναμικού μεταγραφικής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4 και άλλων ενεργοποιητών. Αν αυτή η επίδραση της υπερπαραγωγής της πρωτεΐνης Gcn4 δεν αναιρείται από την απουσία των πρωτεϊνών Ada2 ή Gcn5 ή και των δύο, μήπως ούτε η επαγωγή μέσω της πρωτεΐνης αυτής μηδενίζεται όταν απουσιάζουν οι παραπάνω διαμεσολαβητές;

Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.1, η ενεργοποίηση της μεταγραφής που προκαλείται από τη δράση των διαφόρων περιοχών ενεργοποίησης, επηρεάζεται αρνητικά από την έλλειψη των πρωτεϊνών Ada2 και Gcn5. Η έκταση της πτώσης διαφέρει κατά περίπτωση. Εκτός από την VP16, της οποίας η ενεργότητα ελατώνεται σημαντικά, για τους άλλους ενεργοποιητές η απουσία των δυο πρωτεϊνών διαμεσολαβητών, δεν είχε ως συνέπεια την κατάργηση της λειτουργίας τους¹⁸⁵. Επομένως το υπόλοιπο της επίδρασης στη μεταγραφή θα πρέπει να διαμεσολαβείται με μηχανισμό ανεξάρτητο των Ada2 και Gcn5. Για την υλοποίηση του μηχανισμού αυτού πιθανά να συμμετέχουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις του ενεργοποιητή με βασικούς παράγοντες της μεταγραφής ή εναλλακτικά ένα διαφορετικό σύνολο πρωτεϊνών διαμεσολαβητών. Οι δύο αυτοί τρόποι υλοποίησης δεν είναι αναγκαστικά αλληλοαποκλειόμενοι.

Με τη χρήση συντήξεων της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4 με την S Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης, ανιχνεύθηκε ασθενική αλλά ειδική αλληλεπίδραση της περιοχής αυτής με τον παράγοντα TFIIIB, *in vitro* (Εικόνα 7.6). Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει την περίπτωση, η αλληλεπίδραση αυτή να εξασφαλίζεται ή να σταθεροποιείται *in vivo* μέσω βοηθητικών πρωτεϊνών¹⁹⁰ που για το λόγο αυτό εντάσσονται στη κατηγορία των διαμεσολαβητών. Υπάρχουν τελικά τέτοιες πρωτεΐνες;

Αλληλεπίδραση Gcn4 και TFIIIB.

A B Γ Δ



Εικόνα 7.6:

Αλληλεπίδραση της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4 με τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIIB.

Το γονίδιο για τον παράγοντα TFIIIB συντήχθηκε με την περιοχή του ενζύμου GST (S-Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης), που δεσμεύεται στην Γλουταθειόνη. Το χιμαιρικό γονίδιο που προέκυψε εκφράστηκε σε βακτήρια *E. coli* και η πρωτεΐνη απομονώθηκε και ακινητοποιήθηκε πάνω σε σφαιρίδια Σεφαρόζης που έφεραν Γλουταθειόνη. Τα σφαιρίδια αυτά αναμίχθηκαν είτε με πρωτεΐνη **Gcn4**, η οποία συντέθηκε και σημάνθηκε ραδιενεργά *in vitro* (θέση **Δ**), είτε με ένα παράγωγο που συντέθηκε και σημάνθηκε με τον ίδιο τρόπο αλλά δεν έφερε περιοχή ενεργοποίησης (θέση **Γ**). Για έλεγχο κατά την ανάλυση σε πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης συμπεριλήφθηκε και ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη **Gcn4** στην ίδια ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε για την σύνδεση με τον TFIIIB (θέση **A**) καθώς επίσης και μια αντίδραση σύνδεσης της πρωτεΐνης αυτής με τα σφαιρίδια που έφεραν Γλουταθειόνη χωρίς όμως να έχει ακινητοποιηθεί πάνω της ο παράγοντας TFIIIB (θέση **B**).

β) Παρόλο που η πρωτεΐνη Gcn4 υπεραρτάγεται.....

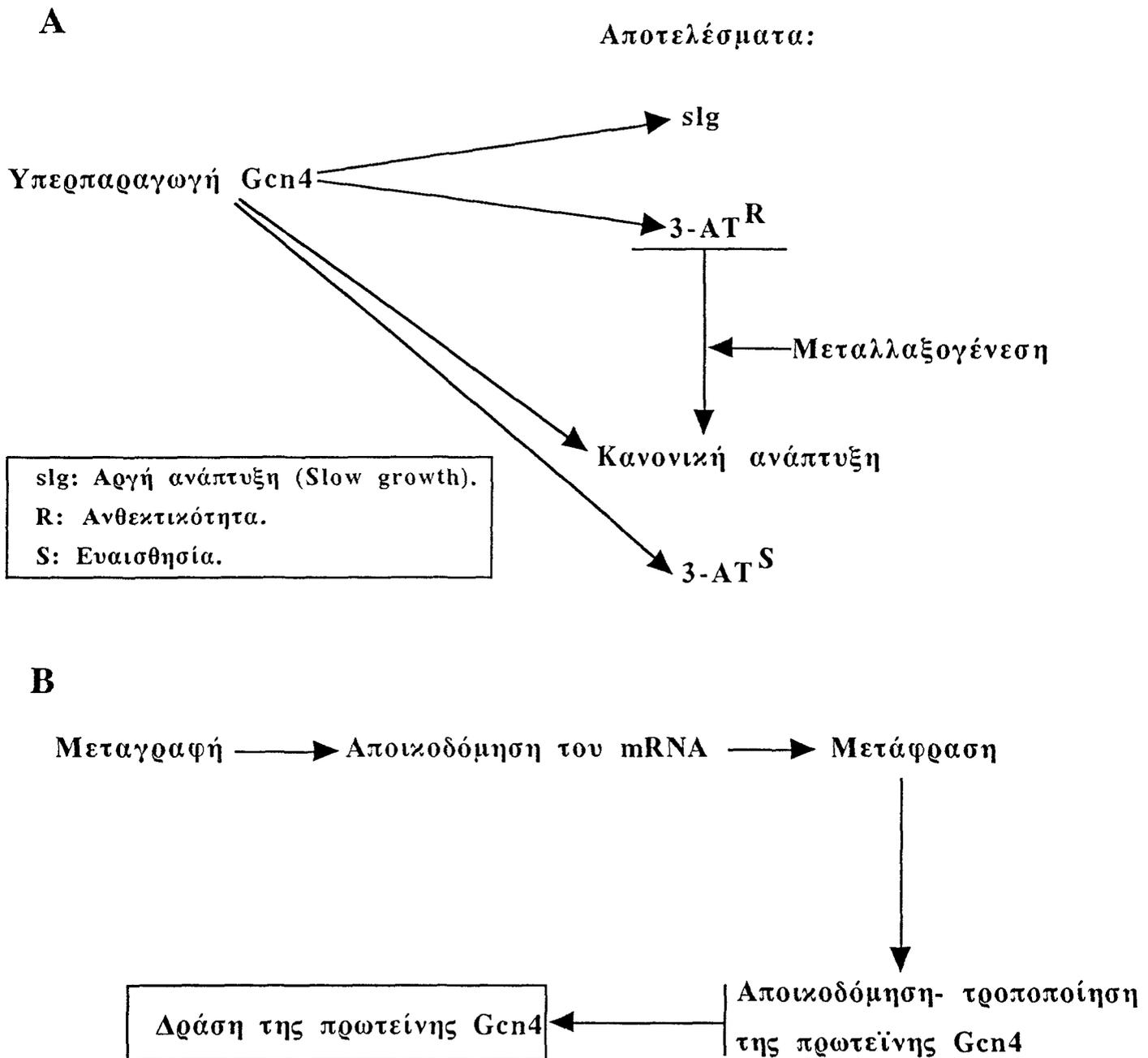
Κατάργηση της τιτλοδότησης.

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες, συγκλίνουν στην ύπαρξη ενός επιπλέον μηχανισμού μέσω του οποίου διαμεσολαβείται η δράση του Gcn4. Ο μηχανισμός αυτός συμβάλλει παράλληλα με αυτόν στον οποίο εμπλέκονται οι πρωτεΐνες Ada2, Ada3 και Gcn5, στην συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής, σε στάδιο στο οποίο πιθανά στρατολογείται και ο παράγοντας TFIIB. Με σκοπό την απομόνωση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μηχανισμό αυτό επιλέχθηκαν μεταλλάξεις, οι οποίες αναιρούν το πρόβλημα στον πολλαπλασιασμό που προκαλεί η υπερέκφραση του γονιδίου GCN4.

Το δηλητηριώδες αποτέλεσμα στον πολλαπλασιασμό που έχει η υπερέκφραση του γονιδίου GCN4¹⁷³, αναιρείται με συν-υπερέκφραση του γονιδίου SUA7 που κωδικοποιεί για τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIB. Αυτό το αποτέλεσμα υποστηρίζει την υπόθεση ότι μειώνεται η διαθεσιμότητα των γενικών μεταγραφικών παραγόντων σε μερικούς υποκινητές όταν ένας ενεργοποιητής υπερεκφράζεται και υποδικνύουν την ύπαρξη ενός ανεξάρτητου από τις πρωτεΐνες διαμεσολαβητές Ada2 και Gcn5, μονοπατιού επικοινωνίας ανάμεσα σε όξινους ενεργοποιητές και το βασικό μεταγραφικό μηχανισμό.

Μέσω ενός γενετικού σχήματος ελέγχου (Σχήμα 7.1) απομονώθηκε μια μεταλλαγή η οποία εξουδετερώνει τη αρνητική επίδραση της πρωτεΐνης Gcn4. Αυτή η AFR1-1 (Activation Function Reduced) μεταλλαγή είναι επικρατής, επηρεάζει τις ιδιότητες μεταγραφικής ενεργοποίησης ορισμένων ενεργοποιητών και είναι θνησιγόνος όταν συνδυάζεται με μια έλλειψη του γονιδίου GCN5. Τα αποτελέσματα αυτά που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια, υποδηλώνουν ότι το προϊόν του γονιδίου AFR1 είναι ένας διαμεσολαβητής της μεταγραφικής ενεργοποίησης και πιθανά λειτουργεί παράλληλα και όχι σειριακά με τις πρωτεΐνες Ada2 και Gcn5.

Στα πλαίσια του μηχανισμού που προτείνεται για την ερμηνεία των φαινομένων αναστολής από ισχυρούς ενεργοποιητές, η πρωτεΐνη Gcn4p θα μπορούσε να εγκλωβήσει απαραίτητους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο TFIIB δια μέσου συνδέσμων που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες διαφορετικές από τις Ada2 και Gcn5²⁰.



Σχήμα 7.1:

A. Το γενετικό σχήμα για την επιλογή στελεχών στα οποία καταργούνται τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης του GCN4.

Η επιλογή βασίστηκε στις δύο επιδράσεις που αναφέρονται.

B. Πιθανές διαδικασίες κατά την έκφραση του γονιδίου GCN4 των οποίων κατάλληλη μεταβολή θα είχε ως συνέπεια την κατάργηση των επιδράσεων αυτών. Σημειώνεται η διαδικασία η οποία ενδιέφερε να τροποποιηθεί.

Η γενωμική μεταλλαγή AFR1-1.

Μετά από EMS μεταλλαξογένεση, επιλέχθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη, ανθεκτικά στα τοξικά για τον πολλαπλασιασμό, επίπεδα της πρωτεΐνης Gcn4. Περίπου εκατό χιλιάδες κύτταρα υπέστησαν τη μεταλλαξογένεση και απομονώθηκαν αρχικά 16 ανθεκτικά στελέχη. Απ' αυτά, για τα 14 η ανθεκτικότητα ως χαρακτηριστικό ήταν συνδεδεμένη με το πλασμίδιο και για δύο ήταν συνδεδεμένη με το γενωμικό DNA. Αυτή η μεθοδολογία μεταλλαξογένεσης λοιπόν, απέδωσε μια υπολειπόμενη και μια μη συνδεδεμένη με αυτή, επικρατή μεταλλαγή, που ονομάστηκε AFR1-1 (Activation Function Reduced, Εικόνα 7.1D) και επηρέαζε την ενεργότητα αρκετών μεταγραφικών παραγόντων όπως θα φανεί στη συνέχεια. Πριν όμως γίνει αυτό θα αναφερθεί η στρατηγική της μεταλλαξογένεσης. Η επαγόμενη από EMS, μεταλλαξογένεση που οδήγησε στην απομόνωση του στελέχους AFR1-1, εφαρμόστηκε ως εξής:

Απλοειδή κύτταρα σακχαρομύκητα φυσικού τύπου μετασχηματίστηκαν αρχικά με δυο πλασμίδια, το ένα των οποίων έφερε το παραγωγό του γονιδίου GCN4 χωρίς τα μικρά ανασταλτικά αναγνωστικά πλαίσια της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής (ΔORFGCN4). Το άλλο πλασμίδιο έφερε το γονίδιο μάρτυρα DED1-LacZ¹⁸⁴. Λόγω της υπερέκφρασης του GCN4 που προκαλεί το παραγωγό ΔORFGCN4, το στέλεχος που προέκυψε από τον μετασχηματισμό, εμφάνιζε αργό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν με χρήση των γονιδίων LEU2 και URA3, που έφεραν τα πλασμίδια και μεταλλάχθηκαν με EMS όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των πειραματικών μεθόδων. Η επίδραση του μεταλλαξογόνου ρυθμίστηκε έτσι ώστε μετά τη διαδικασία να επιβιώσει ένα ποσοστό κυττάρων γύρω στο 10%. Μετά την μεταλλαξογένεση ακολούθησε επιλογή των στελεχών εκείνων στα οποία:

- α) Είχε αποκατασταθεί ο κανονικός ρυθμός πολλαπλασιασμού (Εικόνα 7.1D)
- β) Δεν είχε συμβεί μεταλλαγή στο πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο ΔORFGCN4, ώστε να μειωθεί ή να καταργηθεί η υπερέκφραση του GCN4. Κάτι τέτοιο αποκλείστηκε με το να απαλλαχθούν αρχικά τα στελέχη από το πλασμίδιο αυτό και στη συνέχεια να επαναμετασχηματιστούν με νέο. Επομένως τα στελέχη τα οποία εξακολουθούσαν να πολλαπλασιάζονται κανονικά, έφεραν μεταλλαγή στο γένωμα.
- γ) Η έκφραση του γονιδίου μάρτυρα DED1-LacZ δεν ήταν πλέον ευαίσθητη στα επίπεδα της πρωτεΐνης Gcn4. Αυτό διαπιστώθηκε με προσδιορισμό της ενεργότητας της β-Γαλακτοσιδάσης που παρήγαγαν τα στελέχη αυτά είτε παρουσία είτε απουσία του ΔORFGCN4.

Μέσω αυτών των χαρακτηριστικών αναζητήθηκε δηλαδή η αναίρεση του φαινομένου της τιτλοδότησης από την πρωτεΐνη Gcn4.

Τα στελέχη AFR1-1 εμφάνιζαν επιπλέον φαινότυπους: Περιορισμένη ικανότητα ανάπτυξης κάτω από συνθήκες έλλειψης αμινοξέων, έντονο πρόβλημα ανάπτυξης σε γαλακτόζη και ανικανότητα ανάπτυξης σε μη ζυμώσιμες πηγές άνθρακα. Επιπλέον η δυνατότητα επιβίωσης των στελεχών αυτών μετά από θερμικό πλήγμα (Heat Shock), εμφανίζεται δραστικά μειωμένη. Στα στελέχη αυτλα η μεταλλαγή AFR1-1 είναι επικρατής για όλους τους παραπάνω φαινότυπους (Πίνακας 7.2). Οι φαινότυποι αυτοί συν-μεταβιβάζονται (co-segregate) μετά από 3 κύκλους διασταύρωσης με το πατρικό στέλεχος φυσικού τύπου και επακόλουθη τυχαία ανάλυση σποριών, πράγμα το οποίο είναι ενδεικτικό μιας μεταλλαγής σε ένα και μοναδικό γονίδιο.

Οι ιδιότητες της ανάπτυξης που αναφέρθηκαν, ήταν σύμφωνες με το γεγονός ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω των υποκινητών GCRE και GAL1 μειώθηκε σ' αυτά τα στελέχη (Πίνακας 7.3). Επιπλέον, η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός CYC1-LacZ γονιδίου μάρτυρα που βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή που φέρει μόνο το στοιχείο UAS2 επίσης μειώθηκε σε ένα στέλεχος AFR1-1 (Πίνακας 7.4). Το UAS2 είναι το DNA στοιχείο στόχος του ετεροτρομερούς μεταγραφικού ενεργοποιητή Har2/Har3/Har4 που συμμετέχει στη ρύθμιση των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διεξάγουν αναπνευστικές λειτουργίες. Εκτός των παραπάνω ενεργοποιητών, η λειτουργία των παραγόντων Yap1 και Cad1, επίσης εμφανίστηκε σοβαρά μειωμένη όπως φαίνεται στον πίνακα 7.5. Η μεταλλαγή AFR1-1, συνεπώς έχει πλειοτροπικό χαρακτήρα εφ' όσον δυσχερύνει την λειτουργία αρκετών μή σχετιζόμενων μεταγραφικών ενεργοποιητών.

Για να καθοριστεί η επηρεαζόμενη λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων, στα μεταλλαγμένα στελέχη AFR1-1 χρησιμοποιήθηκαν συντήξεις με την περιοχική σύνδεσης με το DNA της βακτηριακής πρωτεΐνης LexA με τις περιοχές ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Gcn4, Gal4 και VP16. Εκτός από τη χίμαιρα LexA-VP16 που είχε την ικανότητα ακόμη να λειτουργήσει σε κανονικά επίπεδα, οι άλλες δύο συντήξεις εμφάνισαν το μισό της φυσιολογικής τους ενεργότητας σε στελέχη AFR1-1 (Πίνακας 7.3). Το σημαντικό γεγονός είναι εδώ, ότι αντίθετα με την περίπτωση των στελεχών *ada2* και *gcn5*, υψηλά επίπεδα Gcn4 σ'ένα στέλεχος AFR1-1 δεν επηρεάζουν πλέον περαιτέρω τη μεταγραφή μέσω των υποκινητών των γονιδίων GAL1 και DED1 ούτε την ενεργότητα της χίμαιρας LexA-GAL4 (Πίνακας 7.3).

Το γονίδιο GCN2 ελέγχεται μεταγραφικά από την πρωτεΐνη Gcn4 όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια. Τα στελέχη AFR1-1 δεν αποκαταστέλουν πλήρως τη μετάφραση του GCN4 mRNA όπως φαίνεται στην εικόνα 7.7A. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε αδυναμία μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου GCN2.

Πίνακας 7.2:

Σύνοψη των φαινοτύπων του στελέχους **AFR1-1** και του διπλοειδούς **WTxAFR1-1**. Η μεταλλαγή **AFR1-1** είναι επικρατής.

Συνθήκη.	Στέλεχος		
	WT	AFR1-1	WTxAFR1-1
Γλυκόζη	+++	+++	+++
Γαλακτόζη	+++	+	+
Αιθανόλη	++	+/-	+/-
Γλυκερόλη	++	+/-	+/-
3-AT	+++	+/-	+/-
Κυκλοεξιμίδη (+Yap1)	+++	-	-
slg (+ΔORFGCN4)	+++	-	-
ts	-	+	+
Th. T.	+++	-	-

Τα τρία στελέχη που σημειώνονται υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες συνθηκών ανάπτυξης. Ως πηγές Ανθρακα χρησιμοποιήθηκαν η **Γλυκόζη**, η **Γαλακτόζη**, η **Γλυκερόλη** και η **Αιθανόλη**. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η **3-AT** ως κριτήριο για την ικανότητα μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου **HIS3**.

Εξετάστηκε η ικανότητα της πρωτεΐνης **Yap1** να προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό **Κυκλοεξιμίδη**, στα τρία παραπάνω στελέχη. Τέλος μελετήθηκαν τα εξής χαρακτηριστικά ανάπτυξης:

slg (+ΔORFGCN4): Πρόκληση αργού ρυθμού πολλαπλασιασμού λόγω υπερέκφρασης του γονιδίου **GCN4**.

ts: Θερμοευαισθησία (Temperature sensitivity).

Th. T: Ανθεκτικότητα σε θερμικό σοκ αν προηγηθεί περίοδος προσαρμογής (Acquired Thermo-Tolerance).

Πίνακας 7.3:

Μεταγραφική αναστολή από υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GCN4 σε στέλεχος AFR1-1.

Στέλεχος	Ενεργότητα β-Γαλακτοσιδάσης	
	AFR1-1	
	-ΔORFGCN4	+ΔORFGCN4
Fusion		
<i>ΔORFGCN4-LacZ</i>	311.3 (308.6)	298.4
<i>DED1-LacZ</i>	58.1 (215.6)	59.4
<i>GAL1-LacZ</i>	93.6 (351.9)	88.4
<i>GCRE-LacZ</i>	3.1 (6.3)	6.9
<i>LexAop-LacZ/LexA-GAL4</i>	89.7 (451.4)	79.6
<i>LexAop-LacZ/LexA-VPI6</i>	415.6 (395.3)	410.3
<i>LexAop-LacZ/LexA-GCN4</i>	58.7 (110.4)	55.6

Η ανάλυση που παρουσιάζεται στον πίνακα 1 επαναλήφθηκε για τα μεταλλαγμένα στελέχη **AFR1-1**. Οι απόλυτες τιμές σ' αυτόν τον πίνακα μπορούν να συγκριθούν με τις αντίστοιχες τιμές των στελεχών στον πίνακα 1 αφού οι μετρήσεις έγιναν ταυτόχρονα και τα στελέχη ήταν κατά τα άλλα ισογενή. Οι αντίστοιχες τιμές ενός στελέχους φυσικού τύπου κάτω από χαμηλή έκφραση GCN4 (-ΔORFGCN4) παρουσιάζονται σε παρένθεση. Οι τιμές εκφράζονται σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

Πίνακας 7.4:

Μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου μάρτυρα που φέρει στον υποκινητή το DNA στοιχείο UAS2, (CYC1-LacZ) κάτω από αυστηρά αερόβιες συνθήκες σε στελέχη φυσικού τύπου και στελέχη AFR1-1.

Στέλεχος	Ενεργότητα β-Γαλακτοσιδάσης			
	wt		AFR1-1	
	Glucose	Lactate	Glucose	Lactate
Fusion				
UAS2(CYC1)-LacZ	5.2	40.4	2.4	14.6

Χρησιμοποιήθηκε γαλακτικό οξύ για να επιβληθεί αυστηρά αερόβια ανάπτυξη. Η ενεργότητα της β-Γαλακτοσιδάσης μετρήθηκε κατά από ανάπτυξη των στελεχών που αναφέρονται για 15 ώρες στους 30°C σε Min-γλυκόζη (**Glucose**) ή για 10 ώρες σε Min-γλυκόζη και μεταφορά σε Min-lactate για 5 ώρες (**Lactate**). Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

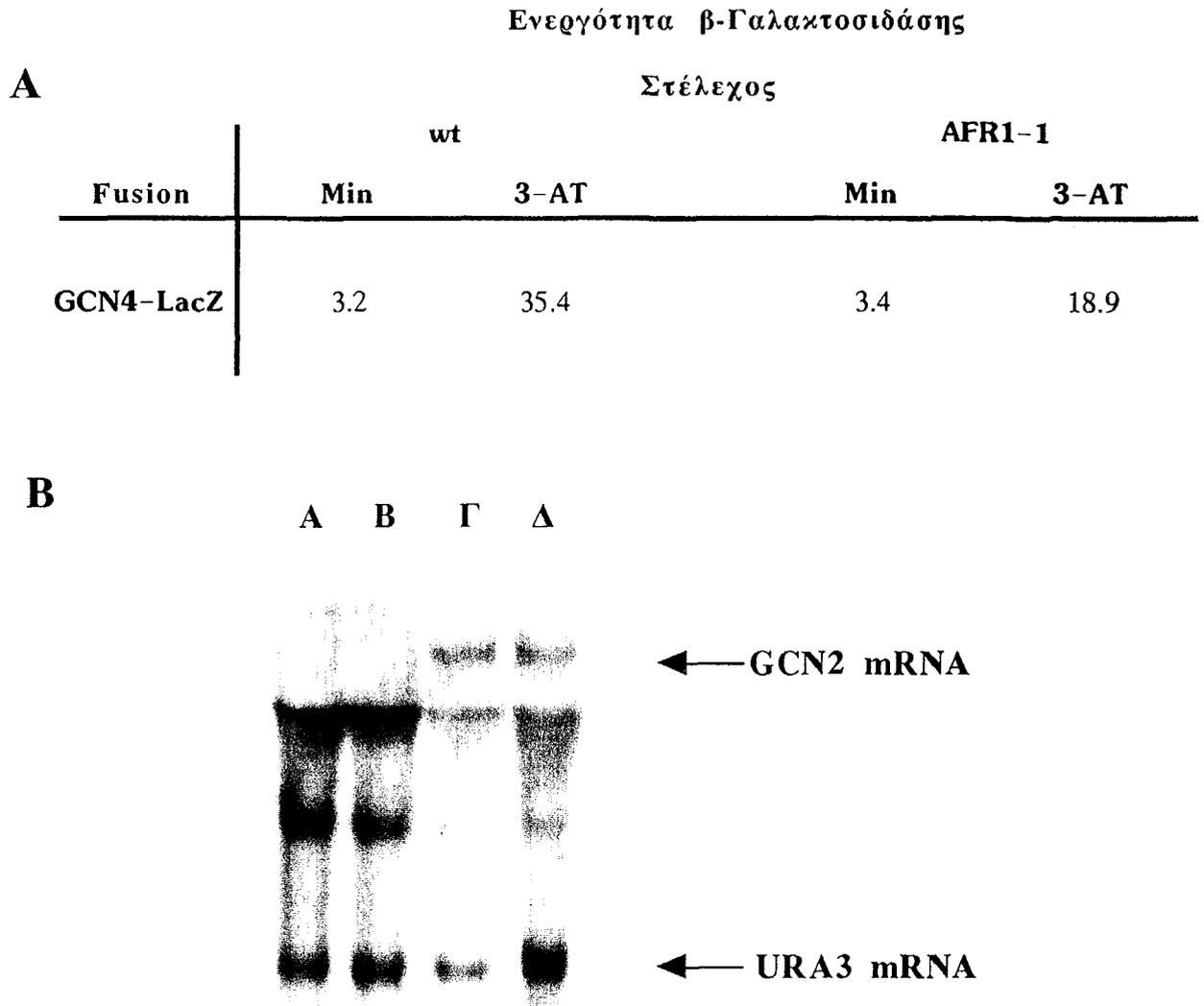
Πίνακας 7.5:

Μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου μάρτυρα που φέρει στον υποκινητή το DNA στοιχείο AP1, (AP1-LacZ) από τους παράγοντες Yap1 και Cad1 σε στελέχη φυσικού τύπου και στελέχη AFR1-1.

Στέλεχος	Ενεργότητα β-Γαλακτοσιδάσης					
	wt			AFR1-1		
	—	Yap1	+	—	Yap1	+
Fusion						
AP1-LacZ	1.2		3.9	1.4		1.3
Fusion	—	Cad1	+	—	Cad1	+
AP1-LacZ	0.9		3.1	0.8		0.7

Το γονίδιο μάρτυρας AP1-LacZ φέρει στον υποκινητή του, τον DNA στόχο AP1 (5'-CTGACTAAT-3') στον οποίο έχουν την ικανότητα να προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες Yap1 και Cad1. Εξετάστηκαν τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης (+) τους στη μεταγραφή του παραπάνω γονιδίου μάρτυρα σε στελέχη φυσικού τύπου και AFR1-1. Καταγράφονται και οι τιμές ενεργότητας όταν δεν υπερεκφράζονται αυτοί (-). Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

Οι συνέπειες των επιπτώσεων της μεταλλάξης **AFR1-1**, στην έκφραση του γονιδίου **GCN2**.



Εικόνα 7.7:

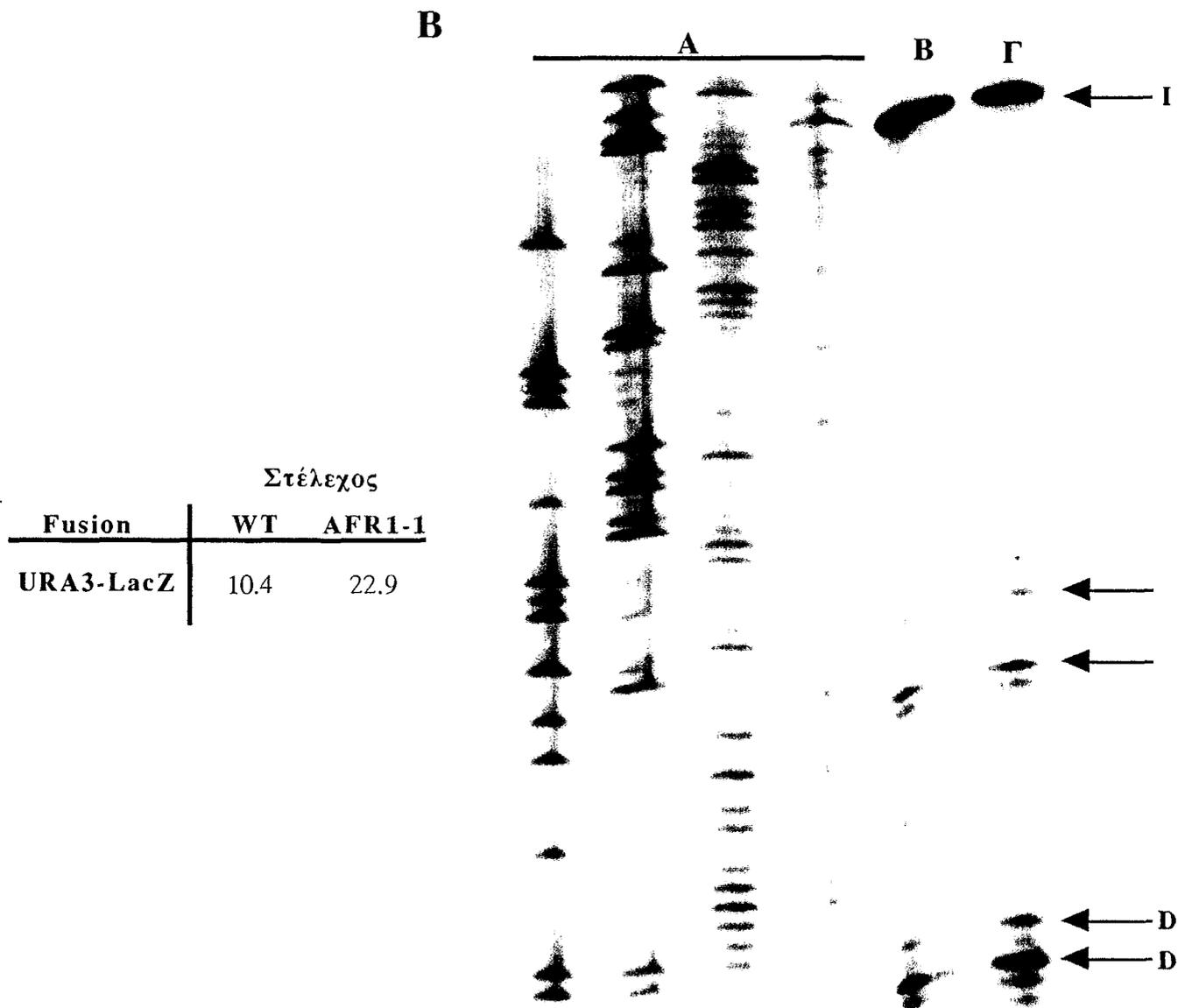
Το κύκλωμα θετικής ανάδρασης GCN2-GCN4, σχεδόν διακόπτεται στο στέλεχος **AFR1-1**.

A. Προσδιορισμός της έκτασης στην αποκαταστολή της μετάφρασης του GCN4 mRNA στο στέλεχος **AFR1-1**. Γονίδιο μάρτυρας ήταν το **GCN4-LacZ**. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

B. Στις θέσεις **A** και **B** φαίνεται η έκφραση των γονιδίων **GCN2** και **URA3** σε στέλεχος **AFR1-1** κάτω από συνθήκες αποκαταστολής (3-AT, **A**) και καταστολής (Min, **B**) της μετάφρασης του GCN4 mRNA. Η ίδια ανάλυση επαναλήφθηκε για έλεγχο σε στέλεχος φυσικού τύπου κάτω από αντίστοιχες συνθήκες (**Γ**, **Δ**). Οπως φαίνεται η επαγωγή του γονιδίου GCN4 είναι αισθητά μειωμένη σε στελέχη **AFR1-1**. Αντίθετα δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου **URA3**.

Ως ανιχνευτές στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τμήματα των γονιδίων **GCN2** και **URA3**.

Η περίπτωση του γονιδίου URA3.



Εικόνα 7.8:

Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου URA3.

A. Η έκφραση ενός γονιδίου μάρτυρα (URA3-LacZ) με τα cis ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου URA3, αυξάνει σε στέλεχος AFR1-1. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

B. Εγινε ανάλυση της επέκτασης ενός εκκινητή (primer extension analysis), ειδικού για το γονίδιο URA3 του σακχαρομύκητα (UPE1). Η ανάλυση έγινε σε στελέχη φυσικού τύπου (**B**) και AFR1-1 (**Γ**). Παράλληλα έγινε και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής με χρήση του ίδιου εκκινητή (**A**). Φαίνεται για την περίπτωση του στελέχου AFR1-1 η αύξηση της μεταγραφής από σημεία κοντινότερα στον εκκινητή που συνδέεται με αλληλουχίες του γονιδίου URA, αμέσως μετά το εναρκτήριο κωδικό ATG (**D**). Επίσης φαίνεται η συχνότερα χρησιμοποιούμενη θέση έναρξης της μεταγραφής (**I**).

Πράγματι η ανάλυση Northern που παρουσιάζεται στην εικόνα 7.7B επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση.

Ισως η μόνη περίπτωση γονιδίου του οποίου η έκφραση αυξάνει στο στέλεχος AFR1-1 είναι αυτή του URA3 (Εικόνα 7.8A). Όμως η ενεργοποίηση του δεν είναι μεταγραφική, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.7B. Το γονίδιο αυτό έχει το χαρακτηριστικό πολλαπλών σημείων έναρξης της μεταγραφής και η πλειοψηφία των mRNAs που παράγονται φέρει ένα μικρό αναγνωστικό πλαίσιο πριν από αυτό του προϊόντος του γονιδίου²⁵³. Σε ένα περιορισμένο αριθμό mRNAs δεν υπάρχει αυτό το αναγνωστικό πλαίσιο επειδή η μεταγραφή έχει ξεκινήσει μετά από το εναρκτήριο κωδικό του. Σε στελέχη AFR1-1 η μεταγραφή του γονιδίου URA3 ενισχύεται από αυτά τα σημεία όπως φαίνεται στην εικόνα 7.8B. Τα mRNAs που παράγονται από τα σημεία αυτά μεταφράζονται αποτελεσματικότερα λόγω απουσίας του ανασταλτικού για την μετάφραση του κανονικού, αναγνωστικού πλαισίου. Στην αύξηση του πληθυσμού των mRNAs αυτών στο στέλεχος AFR1-1 μπορεί να αποδοθεί η τελική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου URA3 στο στέλεχος αυτό.

Τα παραπάνω δεδομένα συγκλίνουν στην άποψη ότι το προϊόν του γονιδίου AFR1 συμμετέχει στη διαμεσολάβηση της λειτουργίας μεταγραφικής ενεργοποίησης ενός αριθμού ρυθμιστών. Επιπρόσθετα, αποτελεί τουλάχιστον ένα παράγοντα που διοχετεύει την ικανότητα παροπλισμού γενικών μεταγραφικών παραγόντων, που διαθέτει η πρωτεΐνη Gcn4.

Με βάση τις παρατηρήσεις που αφορούν την μείωση της ενεργότητας διαφόρων περιοχών ενεργοποίησης σε στελέχη AFR1-1 ή *ada2* και *gcn5* προτείνουμε ότι αυτές οι περιοχές εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια για κάθε μονοπάτι στο οποίο οι πρωτεΐνες Afr1 ή Ada2 και Gcn5, συμμετέχουν. Οι παράγοντες Gcn4, Gal4 και ο συνδεδεμένος με το στοιχείο dA:dT παράγοντας διοχετεύουν την δράση τους σχεδόν ισοδύναμα μέσω των δύο αυτών μονοπατιών. Αντίθετα η οφειλόμενη στην πρωτεΐνη VP16 μεταγραφική ενεργοποίηση εξαρτάται κυρίως από το μονοπάτι στο οποίο εμπλέκονται οι πρωτεΐνες Ada2 και Gcn5. Η πρόταση αυτή συμβιβάζεται με την παρατήρηση ότι η αρνητική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης GAL4-VP16 αναιρείται σε στελέχη *ada2* ενώ η αντίστοιχη επίδραση που προκαλείται από την πρωτεΐνη Gcn4 επιμένει στα στελέχη αυτά. Η διαφορετική συμμετοχή των δύο μηχανισμών στην ενεργοποίηση από VP16 εξηγεί το γεγονός ότι τα φαινόμενα τιτλοδότησης που επιβάλλει η Gcn4 στην VP16 είναι προφανή μόνο σε *ada2* στελέχη. Εκεί η απουσία του κύριου διαμεσολαβητή της δράσης της VP16 επιτρέπει στην παρεμβολή μέσω της πρωτεΐνης Gcn4 να βγει στην επιφάνεια.

Τα γενετικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν υποστηρίζουν εν γένει την άποψη ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση *in vivo* εξασφαλίζεται από μια πλειάδα αλληλεπιδράσεων, η κοινή συνιστώσα των οποίων, καθορίζει την συχνότητα των γεγονότων έναρξης της μεταγραφής. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις πιθανά να διεξάγονται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο ή να απαιτούν διαφορετικούς διαμεσολαβητές. Αυτές οι απόψεις μπορούν να ελεγχθούν περαιτέρω με την απομόνωση του γονιδίου AFR1 και των καθορισμό των βιοχημικών αλληλεπιδράσεων, στις οποίες η αντίστοιχη πρωτεΐνη συμμετέχει. Το γεγονός ότι η μεταλλαγή AFR1-1 θα διευκολύνει τέτοιου είδους μελέτες επειδή υποδικνύει ενίσχυση μή παραγωγικών αλληλεπιδράσεων. Αυτή η ανάλυση ίσως τελικά να βοηθήσει να αποκαλυφθεί ο τρόπος με τον οποίο προκαλείται η συγκρότηση ενός μεταγραφικού συμπλόκου έναρξης.

Η έλλειψη του γονιδίου GCN5 σε γενετικό υπόβαθρο AFR1-1 είναι θανατηφόρα

Με βάση τους φαινότυπους της μεταλλαγής AFR1-1, εισάγεται η υπόθεση ότι το αντίστοιχο γονιδιακό προϊόν θα μπορούσε να καθορίζει μια λειτουργία ανάλογη με αυτή που αποδίδεται στις πρωτεΐνες Gcn5 και Ada2: Δηλαδή της σύνδεσης ενεργοποιητών με το βασικό μεταγραφικό μηχανισμό. Ένα διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *gcn5ada2* δεν εμφανίζει επιπρόσθετα προβλήματα στη μεταγραφή από αυτά που παρατηρούνται σε στελέχη *ada2* ή *gcn5*. Η διαπίστωση αυτή υποδικνύει ότι οι πρωτεΐνες Ada2 και Gcn5 λειτουργούν στο ίδιο μονοπάτι διαμεσολάβησης. Το ερώτημα που τίθεται είναι αν το προϊόν του γονιδίου AFR1 λειτουργεί στο ίδιο ή σε παράλληλο μονοπάτι με αυτό που καθορίζουν μεταξύ άλλων και οι πρωτεΐνες Ada2 και Gcn5.

Για να δοθεί απάντηση στο ερώτημα αυτό ερευνήθηκαν οι επιπτώσεις μιας έλλειψης του γονιδίου GCN5 σε ένα απλοειδές στέλεχος AFR1-1. Επειδή οι αρχικές προσπάθειες απ' ευθείας καταστροφής του γονιδίου αυτού στο απλοειδές στέλεχος AFR1-1 απέτυχαν, εξετάστηκε το ενδεχόμενο ο συνδυασμός των μεταλλαγών να είναι θνησιγόνος για απλοειδή κύτταρα. Η μεταλλαγή AFR1-1 έχει επιπτώσεις στη σποριοποίηση των διπλοειδών στελεχών που τη φέρουν, τέτοιες που να την κάνουν εξαιρετικά αναποτελεσματική. Συνεπώς δεν ήταν δυνατό να εφαρμοστεί ο κλασικός τρόπος δημιουργίας διπλά μεταλλαγμένων απλοειδών στελεχών μέσω σποριοποίησης διπλοειδών. Εναλλακτικά εφαρμόστηκε η παρακάτω στρατηγική:

Αρχικά, ένα πλασμίδιο που έφερε το φυσικού τύπου γονίδιο GCN5, εισήχθη σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος AFR1-1. Δημιουργήθηκε έτσι ένα ψευδοδιπλοειδές στέλεχος μόνο για το GCN5. Σε αυτό το στέλεχος καταστράφηκε το χρωμοσωμικό αντίτυπο του γονιδίου GCN5. Αναλυτικά: Ένα στέλεχος AFR1-1, *ura3-52, leu2-2* μετασχηματίστηκε με ένα πλασμίδιο που έφερε ως γονίδιο επιλογής το LEU2 καθώς και το λειτουργικό γονίδιο GCN5 (*pRS315-GCN5*). Το ψευδο-διπλοειδές για το GCN5, στέλεχος που δημιουργήθηκε, μετασχηματίστηκε με ένα γραμμικό τμήμα DNA που έφερε στα άκρα αλληλουχίες του γονιδίου GCN5 οι οποίες περιέβαλαν το γονίδιο επιλογής URA3 που είχε αντικαταστήσει το μεγαλύτερο μέρος του αναγνωστικού πλαισίου για την πρωτεΐνη Gcn5. Μετά το δεύτερο μετασχηματισμό επιλέχθηκαν στελέχη που δεν ήταν δυνατό να απαλαχτούν από τις πρωτοτροφίες για Λευκίνη και Ουρακίλη ταυτόχρονα, μέσω απομάκρυνσης του πλασμιδίου *pRS315-GCN5*. Η αδυναμία αυτή είναι ενδεικτική της ενσωμάτωσης του γονιδίου URA3 στο γένωμα των στελεχών αυτών και όχι στο πλασμίδιο. Η σωστή ενσωμάτωση του γονιδίου αυτού στην θέση του γονιδίου GCN5 στην οποία οδηγήθηκε από τις περιβάλλουσες αλληλουχίες, επιβεβαιώθηκε με ανάλυση κατά

Southern (Εικόνα 7.4Α). Επιπρόσθετα, προέκλειψε ότι το πλασμίδιο pRS315-GCN5 που ανακτήθηκε από τα στελέχη αυτά, ήταν άθικτο.

Από τα στελέχη που προέκυψαν δεν ήταν δυνατόν να απομακρυνθεί πλέον το πλασμίδιο που έφερε το λειτουργικό γονίδιο GCN5 ενώ κάτι τέτοιο ήταν εύκολα εφικτό για στελέχη AFR1-1 όπου δεν είχε καταστραφεί το ενδογενές GCN5. Επιπλέον, η βιωσιμότητα των στελεχών αυτών κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες για το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο GCN5 (δηλαδή συμπλήρωση της αυξοτροφίας με παροχή του μεταβολίτη), μειώθηκε σε σύγκριση με τα αρχικά στελέχη φυσικού τύπου.

Αυτό το αποτέλεσμα είναι μια ισχυρή ένδειξη για το ότι ένα διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος AFR1-1gcn5 δεν είναι βιώσιμο. Αυτή η συνθετική θνησιμότητα υποδικνύει ότι η πρωτεΐνη Afr1 βρίσκεται σε ένα παράλληλο μονοπάτι με αυτό των πρωτεϊνών Ada2/Ada3/Gcn5, και ότι αχράστευση και των δύο μονοπατιών παρενοχλεί τη μεταγραφή σε τέτοιο βαθμό ώστε να μην είναι δυνατή η επιβίωση.

Ένα γονίδιο καταστολέας της μεταλλαγής AFR1-1

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μεταλλαγή AFR1-1 είναι επικρατής. Επομένως δεν θα ήταν δυνατό το αντίστοιχο γονίδιο να κλωνοποιηθεί με τη γνωστή μέθοδο της αναιρέσης-συμπλήρωσης του ή των φαινότυπων του μεταλλαγμένου στελέχους, μέσω μετασχηματισμού με μια γενωμική βιβλιοθήκη που προέρχεται από στελέχη φυσικού τύπου. Αρχικά, με σκοπό την απομόνωση γονιδίων που σχετίζονται με τους παρατηρούμενους φαινότυπους της μεταλλαγής, έγινε προσπάθεια καταστολής των φαινότυπων αυτών με χρήση γενωμικής βιβλιοθήκης φυσικού στελέχους σε φορέα υψηλής αντιπροσώπευσης στο σακχαρομύκητα. Η προσέγγιση αυτή θεωρήθηκε ότι θα ήταν δυνατό να οδηγήσει στην κλωνοποίηση και του ίδιου του γονιδίου AFR1. Η λογική πίσω απ' αυτή την απόπειρα ήταν ότι η υπερέκφραση του φυσικού τύπου γονιδίου AFR1 ίσως αποκαθιστούσε μερικώς την λειτουργία που παρεμπόδιζε η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Afr1-1, αφού η αναλογία Afr1/Afr1-1 θα ευνοούσε πλέον τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη. Θα συνέβαινε δηλαδή “διαλυτοποίηση” της μεταλλαγμένης¹³⁷.

Η προσέγγιση αυτή απέδωσε ένα κλώνο (hc26) που σε υψηλή έκφραση κατέστειλε μερικώς την ευαισθησία του στελέχους AFR1-1 στην έλλειψη αμινοξέων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι είχε αποκατασταθεί στον ίδιο βαθμό η ικανότητα της πρωτεΐνης Gcn4 να ενεργοποιεί τα γονίδια των βιοσυνθετικών ενζύμων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.6 η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου μάρτυρα που φέρει στον υποκινητή του την αλληλουχία δέσμευσης της Gcn4 αυξήθηκε σε στελέχη AFR1-1, μετασχηματισμένα με τον κλώνο αυτό. Οι επιδράσεις αυτές ήταν ειδικές για στελέχη AFR1-1 και δεν παρατηρήθηκαν σε στελέχη gcn5, ada2 ή gcn4. Είναι λοιπόν πιθανό ο κλώνος hc26 να περιέχει γονίδιο άμεσα σχετιζόμενο με το AFR1 και ίσως το ίδιο το AFR1.

Μια περιορισμένη χαρτογράφηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού και ο καθορισμός της αλληλουχίας τμήματος του κλώνου αυτού φαίνονται στην εικόνα 7.9A. Από την ανάλυση αυτή διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για μια περιοχή του δέκατου τετάρτου χρωμοσώματος της οποίας είχε ήδη καθοριστεί η πρωτοταγής δομή στα πλαίσια του προγράμματος καθορισμού της αλληλουχίας του γενώματος του σακχαρομύκητα (Yeast Sequencing). Η αλληλουχία του hc26 ταυτίστηκε με αυτήν μέρους του αναγνωστικού πλαισίου NO320 της περιοχής αυτής (Εικόνα 7.9B). Επιπρόσθετα, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.9C, εντοπίστηκε ομοιότητα (Περίπου 33%, συνολικά), του προϊόντος του αναγνωστικού αυτού πλαισίου με την πρωτεΐνη Rox1 του σακχαρομύκητα. Η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται στη ρύθμιση γονιδίων για ένζυμα του μεταβολισμού των σακχάρων²⁹.

Πίνακας 7.6:

Οι επιδράσεις του καταστολέα **hc26** είναι ειδικές μόνο για το στέλεχος **AFR1-1**.

A

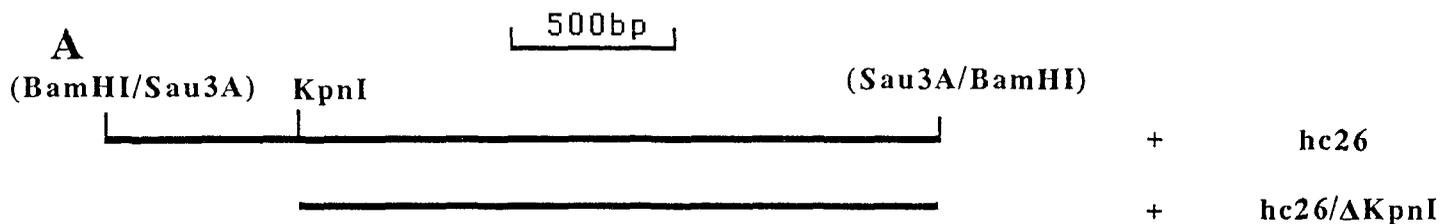
Στέλεχος.	hc26			
	-		+	
	Min	3-AT	Min	3-AT
wt	+++	+++	+++	+++
AFR1-1	+++	+	+++	++
gcn5	+++	+	+++	+
ada2	++	+/-	+++	+/-
gcn4	++	-	++	-

B

Στέλεχος.	hc26			
	-		+	
	Min	3-AT	Min	3-AT
wt	6.4	13,7	6.1	12.9
AFR1-1	3.1	5.2	5.8	10.7
gcn5	4.3	7.2	4.4	8.1
ada2	3.5	5.1	3.7	5.4
gcn4	1.1	1.5	0.9	1.3

A. Η ανθεκτικότητα του στελέχους **AFR1-1** στην **3-AT**, βελτιώνεται, χωρίς βέβαια να αποκαθίσταται στα επίπεδα ενός στελέχους φυσικού τύπου, μετά από υπερέκφραση του κλώνου **hc26**. Η επίδραση αυτή είναι ειδική για το στέλεχος αυτό αφού δεν εκδηλώνεται στα υπόλοιπα στελέχη του πίνακα.

B. Αντίστοιχη είναι η επίδραση του κλώνου αυτού στη μεταγραφή ενός γονιδίου μάρτυρα που φέρει στον υποκινητή του τον DNA στόχο για την πρωτεΐνη Gcn4 (GCRE, GCRE-LacZ). Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.



B

Identities = 150/150 (100%)

```

hc26:      1 GTTCACTTTTCGGTGTCAACAATCAACACTAACGCTGCGACAGCAGCTGCT 50
          |||
NO320:    1910 gttcaetttcggtgteaacaataacaactaaegctgcgacageagctgct 1959

hc26:      51 AATGCCAGAAATGCTACTTTCACTCATGCAACCCATTCTGGTTCGCTTCA 100
          |||
NO320:    1960 aatgccagaaatgctactttcaactcatgcaaccattctggttcgcttca 2009

hc26:     101 ACCCTCATATCATAGCAGCTCACTATTATCGTCCACAAATTGACACCAAGG 150
          |||
NO320:    2010 accctcatatcatagcagctcactattatcggtccacaattgacaccaagg 2059
    
```

C

Identities = 16/38 (42%), Positives = 29/38 (76%)

```

No320(hc26): 141 SLLSSTIDTKVTTATTSTSRDGSSSLAFTTGLNQSVU 178
                SS+++++ +T VTT+TTST+  SS+  F+++ N SV+
Rox1:        236 SSIINHSSQTPVTTTTTSTTTATSSPGKFSSSPNSSVL 273
    
```

Εικόνα 7.9:

Σχετικά με την πρωτοταγή δομή του κλώνου hc26.

A. Περιορισμένη χαρτογράφηση του κλώνου **hc26**. Επίσης εικονίζεται και η έλλειψη Δ KpnI που κατασκευάστηκε από αυτόν, καθώς και επίδραση που είχε η υπερέκφραση της στο στέλεχος **AFR1-1**. Όπως φαίνεται διατηρούσε τις ιδιότητες του άθικτου κλώνου (+).

B. Η ταύτιση (**Identity**) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του κλώνου hc26 με αυτή του αναγνωστικού πλαισίου **NO320** του δεκάτου τετάρτου χρωμοσώματος του σακχαρομύκητα.

C. Φαίνεται η περιοχή της εντονότερης ομοιότητας ανάμεσα στο προϊόν του αναγνωστικού πλαισίου **NO320** και του μεταγραφικού καταστολέα **Rox1**.

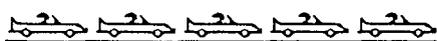
Ο καθορισμός της ακριβούς λειτουργίας του προϊόντος του αναγνωστικού πλαισίου NO320, καθώς και η διερεύνηση της σχέσης του με την μεταλλαγή AFR1-1, βρίσκεται σε εξέλιξη.

Ένα γονίδιο που πιθανά είναι το AFR1

Για την κλωνοποίηση επικρατών αλληλόμορφων στο σακχαρομύκητα απαιτείται η κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης από το στέλεχος που φέρει τη μεταλλαγή. Στη συνέχεια η βιβλιοθήκη αυτή εισάγεται σε στελέχη φυσικού τύπου και επιλέγονται τα μετασχηματισμένα κύτταρα που εμφανίζουν τους φαινότυπους του μεταλλαγμένου στελέχους. Τα κύτταρα αυτά θα φέρουν τον πλασμιδιακό εκείνο κλώνο που περιέχει το μεταλλαγμένο γονίδιο.

Για την κλωνοποίηση του αλληλόμορφου AFR1-1 και προκειμένου να αποφευχθεί η κατασκευή βιβλιοθήκης, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα. Η μέθοδος αυτή απέδωσε δυο κλώνους (R26-1, R26-2). Μέσω χαρτογράφησης με περιοριστικά ένζυμα διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το ίδιο ένθεμα που όμως έχει εισαχθεί στα πλασμίδια με διαφορετική κατεύθυνση (Πίνακας 7.7A). Η εισαγωγή του ενός ή του άλλου κλώνου σε στελέχη φυσικού τύπου, εμπόδιζε την ανάπτυξη σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.10. Επίσης, η μεταγραφική ενεργοποίηση από την πρωτεΐνη Gcp4 μειώνεται στα φυσικού τύπου στελέχη που φέρουν τους κλώνους αυτούς. (Πίνακας 7.7B). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά προσομοιάζουν αυτά στελεχών AFR1-1 και αποτέλεσαν τη βάση για την επιλογή των δύο κλώνων.

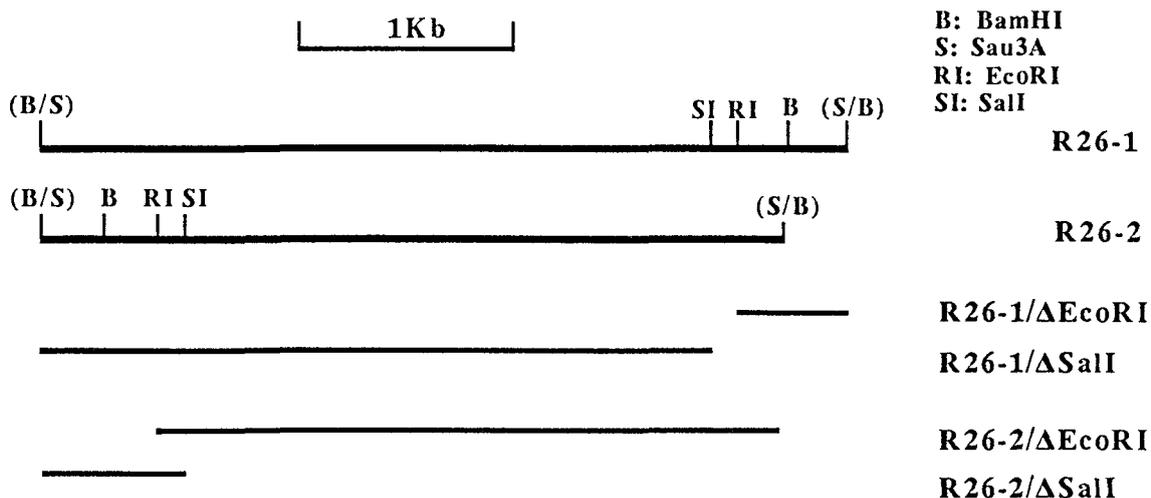
Το γεγονός ότι οι κλώνοι αυτοί αναπαράγουν τους φαινότυπους του στελέχους AFR1-1, όταν εισαχθούν σε στελέχη φυσικού τύπου, δεν αποτελεί και απόδειξη ότι φέρουν το αλληλόμορφο AFR1-1. Αν και είναι δύσκολο να διατυπωθεί μια άλλη εναλλακτική, εντούτοις θα πρέπει να απομονωθεί και η αντίστοιχη γενωμική περιοχή από στέλεχος φυσικού τύπου και ναδειχθεί ότι δεν έχει την ικανότητα να μετατρέπει σε στελέχη AFR1-1 τα φυσικού τύπου στα οποία εισάγεται. Επίσης ο καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλώνων R26-1 και R26-2 και η σύγκριση της με αυτήν της αντίστοιχης γενωμικής περιοχής φυσικού τύπου, θα επιτρέψει την ακριβή χαρτογράφηση της μεταλλαγής AFR1-1. Η ανάλυση αυτού του είδους θα επιτρέψει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη δομή της πρωτεΐνης Afr1, την πιθανή λειτουργία της¹⁵⁵, τη φύση της μεταλλαγής AFR1-1 και τέλος ίσως οδηγήσει στο σχεδιασμό περαιτέρω πειραμάτων που να διαφωτίσουν το μηχανισμό της μεταγραφικής ενεργοποίησης.



Πίνακας 7.7:

Τα δεδομένα για τους κλώνους R26-1 και R26-2 που πιθανά περιέχουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο AFR1-1.

A



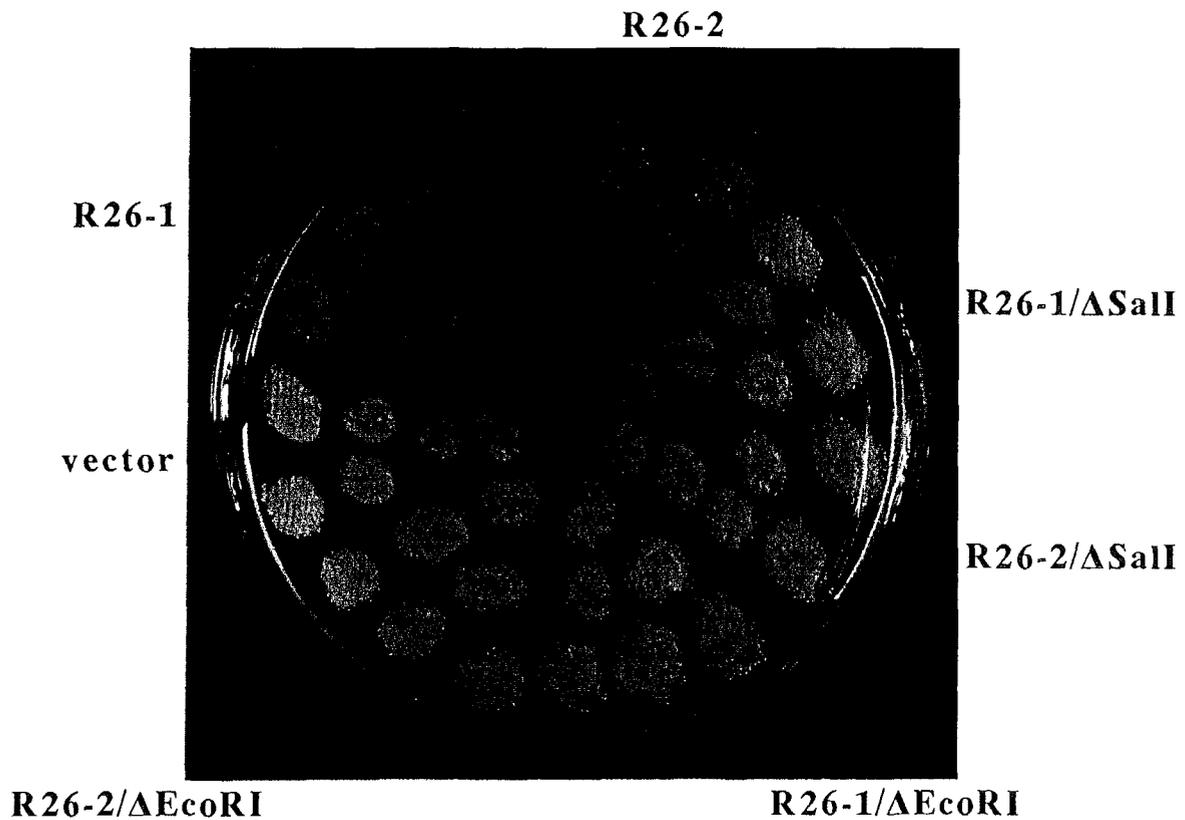
B

Στέλεχος	Ενεργότητα β-Γαλακτοσιδάσης			
	wt		AFR1-1	
	Min	3-AT	Min	3-AT
R26-1	3.9	7.2	3.1	6.9
R26-2	3.1	6.7	3.7	7.2
R26-1/ΔEcoRI	6.8	13.2	3.3	6.5
R26-1/ΔSalI	6.3	12.9	3.4	5.9
R26-2/ΔEcoRI	5.8	13.7	4.0	5.3
R26-2/ΔSalI	6.8	11.9	3.1	5.6
vector	6.4	13.3	2.9	5.7

A. Οι χάρτες περιοριστικών ενζύμων των κλώνων **R26-1** και **R26-2**. Εικονίζονται επίσης και οι δυο ελλείψεις που κατασκευάστηκαν από τον κάθε ένα (**R26-1/ΔEcoRI**, **R26-1/ΔSalI**, **R26-2/ΔEcoRI**, **R26-2/ΔSalI**).

B. Μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου μάρτυρα που φέρει στον υποκινητή το DNA στοιχείο GCRE στο οποίο συνδέεται η πρωτεΐνη Gcn4 (**GCRE-LacZ**), κάτω από συνθήκες καταστολής (**Min**) ή αποκαταστολής (**3-AT**) της μετάφρασης του GCN4 mRNA, σε στελέχη φυσικού τύπου και στελέχη **AFR1-1**. Οι τιμές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

Φαινότυποι που προσδίδουν οι κλώνοι R26-1 και R26-2 σε στελέχη φυσικού τύπου.



Εικόνα 7.10:

Η επίδραση των κλώνων R26-1 και R26-2 σε στέλεχος φυσικού τύπου

Στελέχη φυσικού τύπου (**Wild type**) όπως είναι γνωστό, είναι ανθεκτικά στην έλλειψη του αμινοξέος Ιστιδίνη που προκαλείται από την χρήση 3-AT (**vector**). Παρόλα αυτά η εισαγωγή των κλώνων R26-1 και R26-2 μειώνει αισθητά την ανθεκτικότητα αυτή (**R26-1**, **R26-2**). Εφ' όσον η μεταλλαγή AFR1-1 είναι επικρατής, κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο. Οι ελλείψεις των κλώνων αυτών (**R26-1/ΔEcoRI**, **R26-1/ΔSalI**, **R26-2/ΔEcoRI**, **R26-2/ΔSalI**), δεν επιδρούν στην ανθεκτικότητα του στελέχους. Συνεπώς το γονίδιο που φέρουν οι δύο κλώνοι και ευθύνεται για το φαινότυπο που προσδίδουν, καταστρέφεται ή απομακρύνεται με τις ελλείψεις αυτές.

8^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

α) Πως η πρωτεΐνη Gcn4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων;

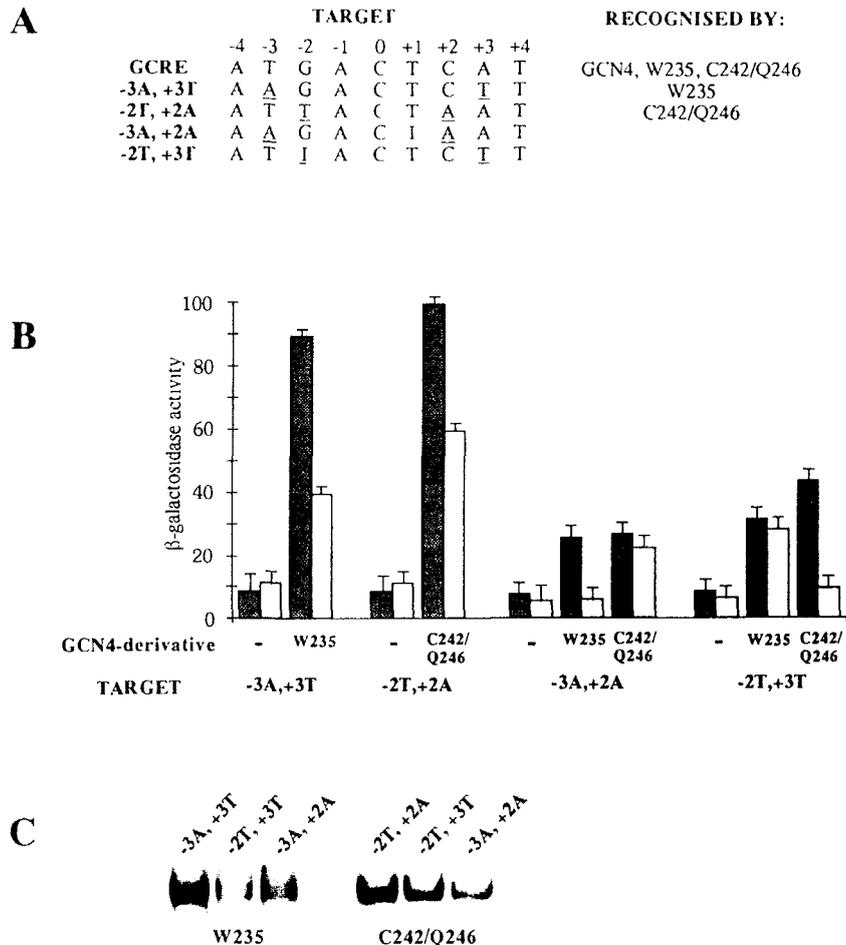
Μη συμμετρικοί στόχοι

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι δεσμευόμενοι στο DNA μεταγραφικοί ενεργοποιητές λειτουργούν αυξάνοντας το ρυθμό συγκρότισης παραγωγικών συμπλόκων έναρξης της μεταγραφής. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων των περιοχών ενεργοποίησης τους με τους βασικούς παράγοντες της μεταγραφής είτε άμεσα είτε μέσω πρωτεϊνών που λειτουργούν ως διαμεσολαβητές²²². Οι δύο αυτές περιπτώσεις δεν αλληλοαναιρούνται και ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής είναι δυνατόν να δρά και με τους δύο τρόπους. Ο μεταγραφικός ενεργοποιητής Gcn4 του σακχαρομύκητα, δεσμεύεται στο DNA ως διμερές και θεωρητικά η συνολική του δράση ενεργοποίησης θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της ανεξάρτητης λειτουργίας των περιοχών ενεργοποίησης του κάθε μονομερούς. Είναι δυνατόν τοπολογικές παράμετροι ή περιορισμοί να συνεπάγονται την μή λειτουργική ισοδυναμία των δύο αυτών περιοχών; Για να απαντηθεί η παραπάνω ερώτηση επωφεληθήκαμε από το γεγονός ότι η πρωτεΐνη-διαμεσολαβητής Ada2 απαιτείται μόνο για την διαμεσολάβηση ενός μέρους της ενεργότητας του παράγοντα Gcn4. Κατά τον τρόπο αυτό η χρήση μή παλινδρομικών DNA στόχων σύνδεσης του Gcn4 αποκάλυψε μια πολικότητα στην χρήση της πρωτεΐνης Ada2 και τα αποτελέσματα της μελέτης υποδικνύουν ότι πραγματικά οι δύο περιοχές ενεργοποίησης του διμερούς Gcn4 είναι λειτουργικά διακριτές.

Η ερώτηση που αφορά την λειτουργική ισοδυναμία των περιοχών ενεργοποίησης ενός διμερούς Gcn4 συνδεδεμένου με DNA μπορεί να προσεγγιστεί μέσω μιας στρατηγικής, η οποία να επιτρέπει την κατ' επιλογή απομάκρυνση κάθε μιας από τις δύο αυτές περιοχές. Έχοντας ως σκοπό την επιλογή προσανατολισμένων στο χώρο ετεροδιμερών από τα οποία απουσιάζει η μία ή άλλη περιοχή ενεργοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν δύο μεταλλαγμένα γονίδια GCN4. Το κάθε ένα από τα γονίδια αυτά έφερε μεταλλαγή, η οποία έδινε την ικανότητα στην αντίστοιχη πρωτεΐνη Gcn4 να αναγνωρίζει ειδικά, διαφορετικούς συμμετρικούς DNA στόχους. Οι δύο μεταλλαγές που χρησιμοποιήθηκαν έφεραν στη θέση 235 το αμινοξύ Τρυπτοφάνη αντί του κανονικού Ασπαραγίνη (W235), η μία και στις θέσεις 242 και 246 τα αμινοξένα Κυστεΐνη και Γλουταμικό οξύ αντίστοιχα αντί των κανονικών Σερίνη και Λυσίνη (C242/Q246). Η πρώτη πρωτεΐνη αναγνωρίζει την DNA αλληλουχία 5'-AAGACTCTT-3' και η δεύτερη

την αλληλουχία 5'-ATTACTAAT-3'. Στην συνέχεια σχεδιάστηκαν DNA στόχοι, οι οποίοι αποτελούνταν από δύο διαφορετικές πλευρές και συνεπώς ήταν ασύμμετροι. Η κάθε πλευρά ήταν ειδική για μία από τις δύο μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn4 (Οι στόχοι αυτοί φαίνονται στην Εικόνα 8.1A). Θεωρήθηκε ότι οι ασύμμετροι αυτοί στόχοι θα αναγνωριζόντουσαν μόνο από ετεροδιμερή Gcn4 τα οποία θα σχηματιζόνταν από τις δυο μεταλλαγμένες πρωτεΐνες. Θα ήταν επομένως δυνατή η κατ' επιλογή αφαίρεση της περιοχής ενεργοποίησης του ενός ή του άλλου μονομερούς που πλέον θα ήταν συνδεδεμένο κατά βούληση σε μία από τις δύο πλευρές του στόχου.

Πολικότητα I.



Εικόνα 8.1:

Η απαίτηση για την πρωτεΐνη Ada2 στην μεταγραφική ενεργοποίηση από τα μεταλλαγμένα παράγωγα του γονιδίου GCN4 μέσω συμμετρικών και ασύμμετρων στόχων.

A. Η αλληλουχία των DNA στόχων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς επίσης και οι αντίστοιχες γι' αυτούς μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn4 φαίνονται στο τμήμα αυτό. Χρησιμοποιήθηκε η καθιερωμένη αρίθμηση για τα νουκλεοτίδια των στόχων.

B. Μεταγραφική ενεργοποίηση *in vivo* ενός γονιδίου μάρτυρα ως συνάρτηση της θέσης σύνδεσης, του είδους Gcn4 και της παρουσίας (σκιασμένες μπάρες) ή της απουσίας (λευκές μπάρες) της πρωτεΐνης Ada2.

Γ. Σύνδεση *in vitro* των πρωτεϊνών Gcn4, W235 και C242/Q246, στον ιδανικό γι' αυτές στόχο (-3A, +3T και -2T, +2A αντίστοιχα). Επίσης φαίνεται πως αυτές οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται στους ασύμμετρους στόχους -3A, +2A και -2T, +3T. Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν προερχόταν από το πατρικό S288C.

Τα πλήρη ολιγονουκλεοτίδια στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο Παράρτημα. Οι τιμές β-Γαλακτοσιδάσης εκφράζονται σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

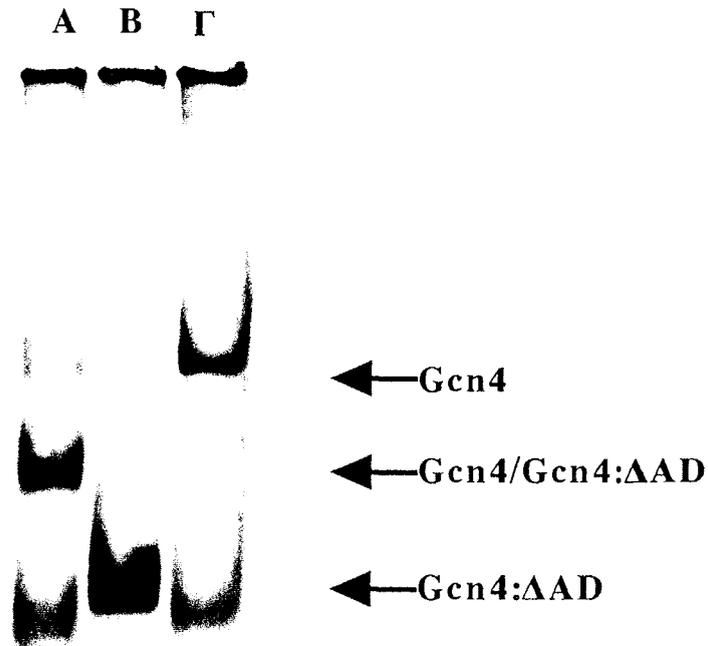
Ετεροδιμερή Gcn4:

Εφ' όσον τα δύο είδη μεταλλαγμένων γονιδίων GCN4 συνεκφράζονται μέσα στο κύτταρο, τελικά θα δημιουργείται ένα μίγμα από δυο είδη ομοδιμερών και ένα είδος ετεροδιμερους. Κατι τέτοιο θα συμβαίνει επειδή δεν απαιτείται η παρουσία του DNA στόχου για τον διμερισμό. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8.2, τουλάχιστον *in vitro*, όταν συν-μεταφράζονται δυο διαφορετικά είδη πρωτεϊνών σχηματίζεται ένα αξιόλογο ποσοστό ετεροδιμερών³²⁶. Ο σχεδιασμός των στόχων, έγινε έτσι ώστε ένα γονίδιο μάρτυρας που φέρει στον υποκινητή του ένα τέτοιο ασύμμετρο στόχο, να ενεργοποιείται μεταγραφικά μόνο από ετεροδιμερή που συγκροτούνται από τις δύο διαφορετικά μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn4.

Αντίθετα με ότι αναμενόταν, τα ομοδιμερή από μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn4 είχαν την ικανότητα να επάγουν την μεταγραφή μέσω αυτών των ασύμμετρων DNA στόχων, όπως φαίνεται στην εικόνα 8.1B. Το γεγονός αυτό έκανε την στρατηγική της επιλογής ετεροδιμερών μη εφαρμόσιμη. Σε συμφωνία με αυτήν την παρατήρηση, *in vitro* πειράματα σύνδεσης των ομοδιμερών μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn4 με ασύμμετρους στόχους, έδειξε ότι τα παραπάνω ομοδιμερή είχαν την ικανότητα να συνδέονται στους στόχους αυτούς. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται στην εικόνα 8.1C. Επιπρόσθετα στη εικόνα 8.3 φαίνεται ότι τα ομοδιμερή αυτά έχουν σε διαφορετικό βαθμό το καθένα, την ικανότητα να καταστέλουν τη ευαισθησία στην έλλειψη αμινοξέων, ενός στελέχους *gcn4*. Συνεπώς θα πρέπει να συνδέονται και με τους φυσικού τύπου στόχους που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων για τα βιοσυνθετικά αμινοξέα.

Η ενδιαφέρουσα παρατήρηση εδώ, είναι ότι η ενεργοποίηση των γονιδίων μαρτύρων με ασύμμετρους στόχους στον υποκινητή τους, από τα ομοδιμερή, κυμάνθηκε στα μισά επίπεδα αυτής γονιδίων με παλίνδρομους στόχους. Αυτό δεν είναι κατ' αρχή αναμενόμενο αφού δεν μπορεί να αποδοθεί στη συνάφεια που εμφανίζουν τα ομοδιμερή για μη ιδανικούς στόχους. Πραγματικά όπως φαίνεται στη εικόνα 8.1C, οι διαφορές στην ικανότητα σύνδεσης των ομοδιμερών σε συμμετρικούς και μη στόχους δεν ήταν σημαντικές. Πάντα βέβαια με βάση την ευαισθησία της μεθόδου που εφαρμόστηκε.

Ετεροδιμερή in vitro.

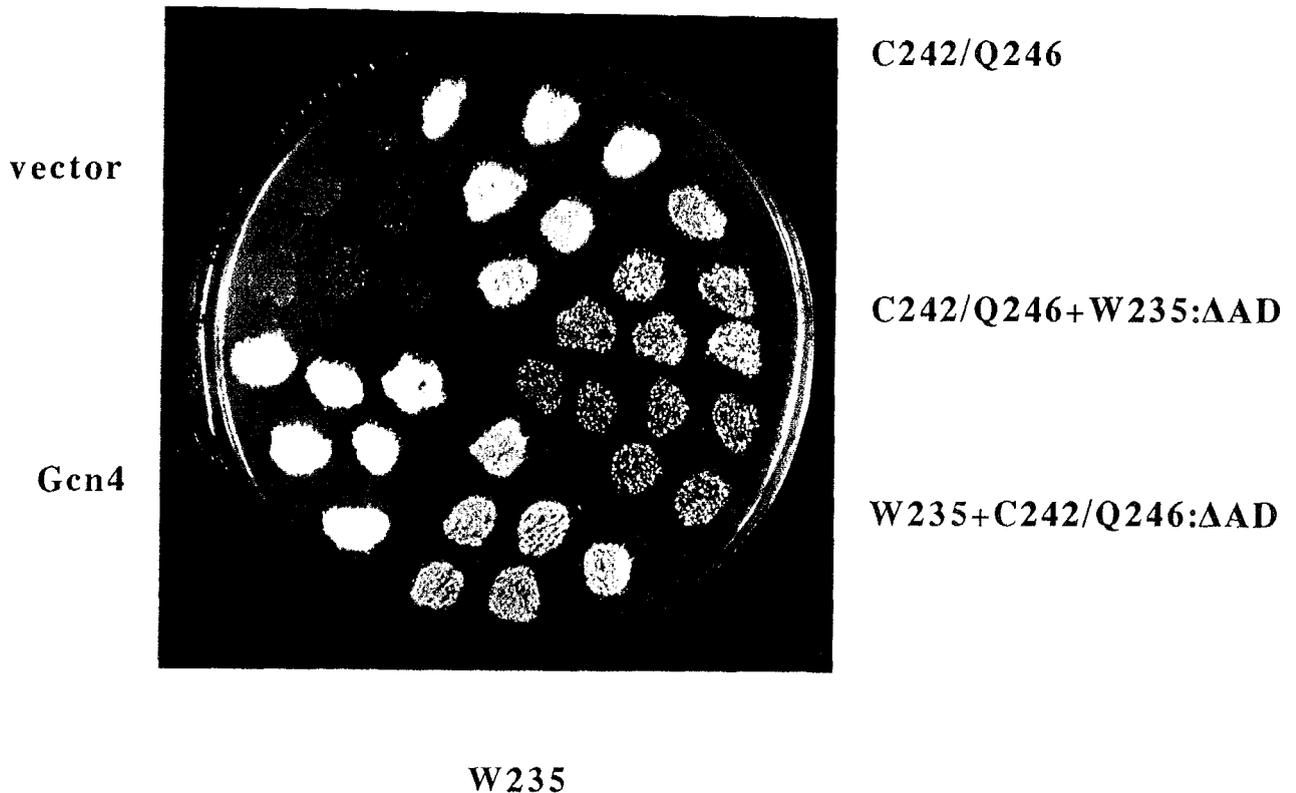


Εικόνα 8.2:

Σχηματισμός ετεροδιμερών Gcn4 in vitro.

Χρησιμοποιώντας σύστημα μετάφρασης από δικτυοκύτταρα κουνελιού, μεταφράστηκε mRNA που κωδικοποιούσε τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη Gcn4 (**Γ, Gcn4**). Σε διαφορετική αντίδραση μεταφράστηκε το mRNA του παραγώγου χωρίς περιοχή ενεργοποίησης (**B, Gcn4:ΔAD**). Όταν τα δυο αυτά mRNAs συν-μεταφραστούν εμφανίζεται ένα ενδιάμεσης κινητικότητας σύμπλοκο που αντιστοιχεί στο ετεροδιμερές (**A, Gcn4/Gcn4:ΔAD**). Η ανίχνευση των ομοδιμερών και του ετεροδιμερούς έγινε αφού η ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με τον ιδανικό DNA στόχο (GCRE). Ακολούθησε ανάλυση των συμπλόκων σε μη αποδιαταχτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης.

Στέλεχος: Δgcn4.



Εικόνα 8.3:

Η λειτουργία των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn4 in vivo.

Σε ένα στέλεχος Δgcn4 εισήχθησαν πλασμιδιακές κατασκευές που έφεραν τα μεταλλαγμένα παράγωγα του γονιδίου GCN4 (C242/Q246, W235). Τα ίδια κύτταρα συν-μετασηματίστηκαν με αυτές τις κατασκευές αλλά και επιπρόσθετα με άλλες που έφεραν παράγωγα χωρίς περιοχή ενεργοποίησης (C242/Q246+W235:ΔAD, W235+C242/Q246:ΔAD), διαφορετικού είδους μεταλλαγής. Για λόγους σύγκρισης φαίνονται και στελέχη μετασηματισμένα είτε με πλασμίδιο που φέρει το φυσικού τύπου γονίδιο (Gcn4), είτε απλώς με το φορέα (vector). Οπως φαίνεται ο συν-μετασηματισμός με παράγωγα χωρίς περιοχή ενεργοποίησης περιορίζει την ικανότητα ανάπτυξης παρουσία 3-AT που προσδίδουν τα μεταλλαγμένα γονίδια στο στέλεχος Δgcn4. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της κατά τα άλλα, λειτουργικότητας των παραγώγων αυτών.

Μεταλλαγμένα Gcn4 ομοδιμερή και μη συμμετρικοί στόχοι

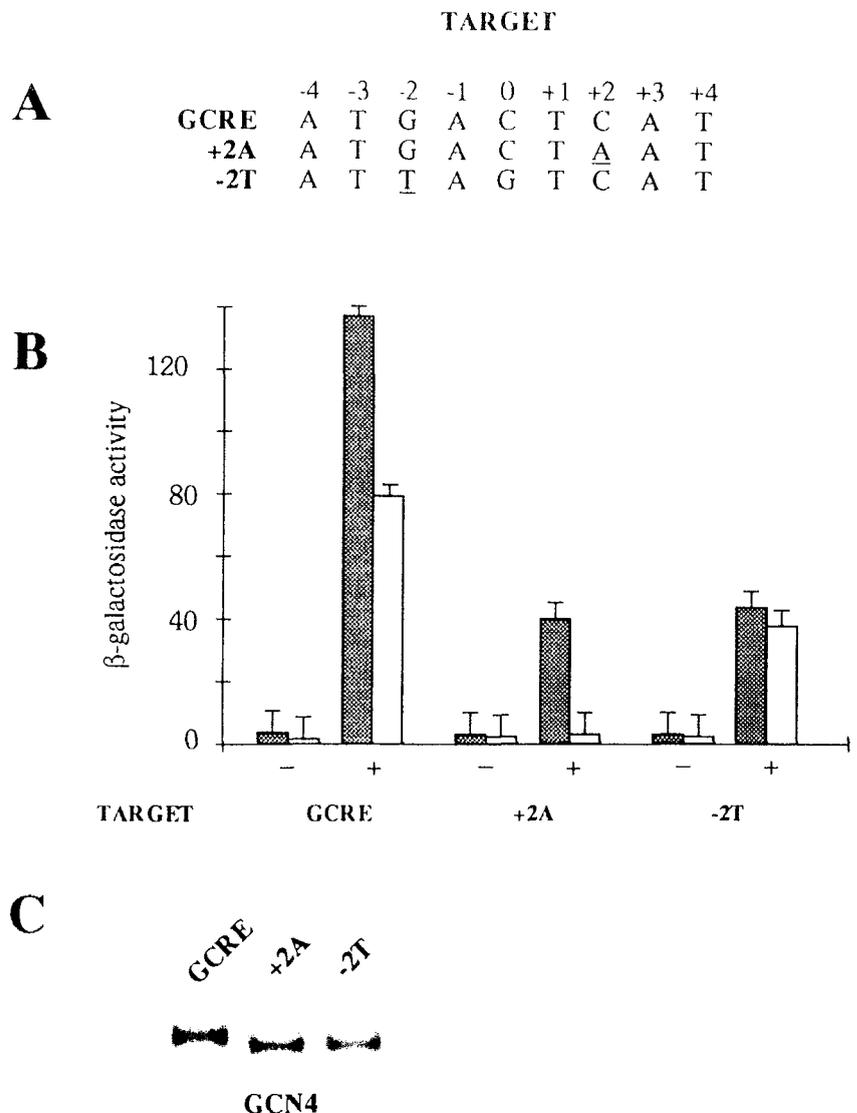
Παρόλο το γεγονός ότι και τα ομοδιμερή είχαν την ικανότητα και να δεσμεύονται και να ενεργοποιούν τη μεταγραφή μέσω ασύμμετρων στόχων, τέτοια ομοδιμερή εμφάνισαν ισχυρή πολικότητα στην εξάρτηση από το διαμεσολαβητή Ada2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8.1B, η ενεργοποίηση από ομοδιμερή Gcn4 πρωτεϊνών του τύπου W235 μέσω του ασύμμετρου στόχου -3A, +2A ήταν απόλυτα εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη Ada2, ενώ η ενεργοποίηση μέσω του ίδιου στόχου από ομοδιμερή Gcn4 τύπου C242/Q246 ήταν ανεξάρτητη της παρουσίας του διαμεσολαβητή αυτού. Στον DNA στόχο αυτόν (-3A, +2A) η αριστερή πλευρά ήταν κατάλληλη για τη μεταλλαγή W235 και η δεξιά πλευρά ειδική για την μεταλλαγή C242/Q246. Όταν οι πλευρές αυτές αντιστράφηκαν, η παρουσία της πρωτεΐνης Ada2 έγινε απαραίτητη για ενεργοποίηση μέσω της μεταλλαγής C242/Q246 και όχι πλέον για την μεταλλαγή W235.

Η ενεργοποίηση που οφείλεται σε κάθε ένα από τα δύο μεταλλαγμένα ομοδιμερή που αποτελούνται από πρωτεΐνες Gcn4 του ενός ή του άλλου τύπου, μέσω του αντίστοιχου για αυτά συμμετρικού στόχου εμφανίζεται μόνο μερικώς εξαρτώμενη από την παρουσία της πρωτεΐνης Ada2. Το συμπέρασμα που συνάγεται από τα παραπάνω είναι ότι σε διαμορφώσεις ασύμμετρου στόχου/ενεργοποιητή, όποτε η αριστερή πλευρά ήταν ιδανική η εξάρτηση από την πρωτεΐνη Ada2 ήταν απόλυτη.

Για να γενικευτούν οι παραπάνω παρατηρήσεις σχεδιάστηκαν δύο επιπρόσθετοι ασύμμετροι στόχοι και εξετάσθηκε η ενεργοποίηση μέσω αυτών, από την φυσικού τύπου πρωτεΐνη Gcn4. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8.4A, στον στόχο +2A η αριστερή πλευρά ήταν ιδανική, σε αντίθεση με τον στόχο -2T όπου η δεξιά πλευρά ήταν ιδανική. Οι άλλες πλευρές των στόχων αυτών προέρχονται από συμμετρικούς DNA στόχους στους οποίους η πρωτεΐνη Gcn4 δεν μπορεί να δεσμευτεί *in vitro* και να ενεργοποιήσει μέσω αυτών την μεταγραφή *in vivo*¹⁵⁴. Το δεδομένα αυτά που αφορούν τους στόχους, απεικονίζονται στην εικόνα 8.4A και C. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από την χρήση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn4, η ενεργοποίηση μέσω αυτών των ασύμμετρων στόχων, από ομοδιμερή της φυσικού τύπου Gcn4 πρωτεΐνης, αυτή τη φορά, συμμορφώθηκε επίσης με τον κανόνα της αριστερής πλευράς. Δηλαδή οποτεδήποτε η αριστερή πλευρά του στόχου ήταν ιδανική ενώ η δεξιά ακατάλληλη η εξάρτηση από το διαμεσολαβητή Ada2 ήταν πλήρης όπως φαίνεται στην εικόνα 8.4B.

Απο πού όμως προέρχεται αυτή η πολικότητα στη εξάρτηση από κάποιο διαμεσολαβητή στην οποία εξαναγκάζονται τα συνδεδεμένα με μη παλίνδρομο DNA στόχο, ομοδιμερή;

Πολικότητα II.



Εικόνα 8.4:

Φαίνεται η εξάρτηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης μέσω της φυσικού τύπου πρωτεΐνης **Gcn4**, από την πρωτεΐνη **Ada2** είτε από συμμετρικούς είτε από ασύμμετρους στόχους.

A. Στο τμήμα αυτό παρουσιάζεται η αλληλουχία των στόχων που χρησιμοποιήθηκαν. Ο στόχος **+2A** αποτελείται από μια ιδανική αριστερή πλευρά ενώ στον στόχο **-2T** ιδανική ήταν η δεξιά πλευρά. Και στους δύο στόχους οι άλλες δύο πλευρές που ήταν ακατάλληλες προερχόταν από το στόχο στον οποίο συνδέεται η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη **Gcn4** του τύπου **C242/Q246**, όπου η φυσικού τύπου πρωτεΐνη ούτε μπορεί να συνδεθεί *in vitro* ούτε να ενεργοποιήσει την μεταγραφή *in vivo*.

B. Προσδιορίζεται η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου μάρτυρα από την φυσικού τύπου πρωτεΐνη (+), *in vivo* ως συνάρτηση της θέσης σύνδεσης και της παρουσίας (σκιασμένες μπάρες) ή της απουσίας (λευκές μπάρες) της πρωτεΐνης **Ada2**. Επίσης καταγράφεται η ενεργοποίηση κατά την απουσία οποιασδήποτε πρωτεΐνης **Gcn4** (-), κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Γ. Σύνδεση της φυσικού τύπου πρωτεΐνης **Gcn4** με τον ιδανικό, παλίνδρομο στόχο (**GCRE**) καθώς και με τους ασύμμετρους στόχους **+2A** και **-2T**, *in vitro*.

Μεταβολές στη δομή του διμερούς Gcn4, επαγόμενες από τη δέσμευση σε DNA στόχο

Μια απλή ερμηνεία των αποτελεσμάτων που καταγράφονται παραπάνω βασίζεται στο μοντέλο που περιγράφεται στο σχήμα 8.1. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, κάθε μία από τις δύο περιοχές ενεργοποίησης του διμερούς Gcn4 που βρίσκεται συνδεδεμένο σε ένα παλίνδρομο DNA στόχο επικοινωνεί με τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες με ανεξάρτητους μηχανισμούς ένας των οποίων εμπλέκει την πρωτεΐνη Ada2. Τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο μηχανισμός αυτός αφορά την περιοχή ενεργοποίησης του μονομερούς Gcn4 που βρίσκεται συνδεδεμένο στην αριστερή, απομακρυσμένη από το στοιχείο TATA πλευρά. Αυτή η πολικότητα υποδικνύει ότι είτε η τοπολογία είτε η διαμόρφωση στο χώρο της κάθε περιοχής ενεργοποίησης έχει ως αποτέλεσμα να εκτείνονται διαφορετικές επιφάνειες της περιοχής αυτής προς την κατεύθυνση του στοιχείου TATA.

Η άποψη αυτή της έκθεσης διαφορετικών επιφανειών μιας περιοχής ενεργοποίησης προς την κατεύθυνση του σημείου έναρξης της μεταγραφής υποστηρίζεται και από γενετικά δεδομένα που αφορούν τον ενεργοποιητή Gal4. Στην περίπτωση του ενεργοποιητή αυτού με την μία επιφάνεια αλληλεπιδρά ο καταστολέας Gal80 ενώ η άλλη επιφάνεια είναι υπεύθυνη για την μεταγραφική ενεργοποίηση³⁸.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ αποδεικνύουν ότι ομοδιμερή Gcn4 έχουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με ασύμμετρους στόχους στους οποίους μόνο η μία πλευρά είναι κατάλληλη για δέσμευση. Σε τέτοιες καταστάσεις προτείνεται ότι η σύνδεση υποβοηθείται από την αλληλεπίδραση του ενός μονομερούς με την κατάλληλη πλευρά και στην συνέχεια το άλλο μονομερές εξαναγκάζεται να αλληλεπιδράσει με την ακατάλληλη πλευρά. Η υπόθεση που εισάγεται είναι ότι αυτή η τελευταία αλληλεπίδραση επάγει μια μεταβολή στην διαμόρφωση ή στην τοπολογία της περιοχής ενεργοποίησης του αντίστοιχου μονομερούς, τέτοια που να την αχρηστεύει λειτουργικά όπως φαίνεται στο σχήμα 8.1B και C. Μάλιστα έχει αναφερθεί ότι η περιοχή σύνδεσης στο DNA της περιοχής Gcn4 αποκτά δομή αφού γίνει η σύνδεση και επίσης έχει αναφερθεί ότι η διαμόρφωση της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης αυτής, σε διάλυμα ποικίλει σε συνάρτηση με το pH^{301, 307}.

Με βάση τα παραπάνω προτείνεται ότι η εξαναγκασμένη σύνδεση με μη κατάλληλη πλευρά συνεπάγεται μια μεταβολή στην διαμόρφωση της περιοχής σύνδεσης στο DNA η οποία μεταδίδεται και στην περιοχή ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονομερούς, μέσω αλλαγών στο τοπικό φυσικοχημικό περιβάλλον. Η πρόταση αυτή υποστηρίζεται και από μελέτες που δείχνουν ότι η ενεργότητα αρκετών μεταγραφικών

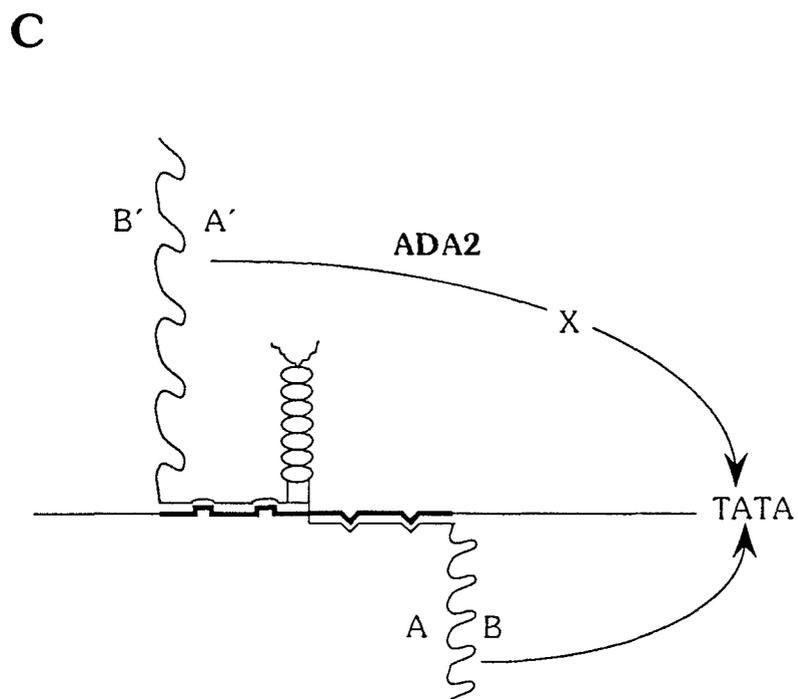
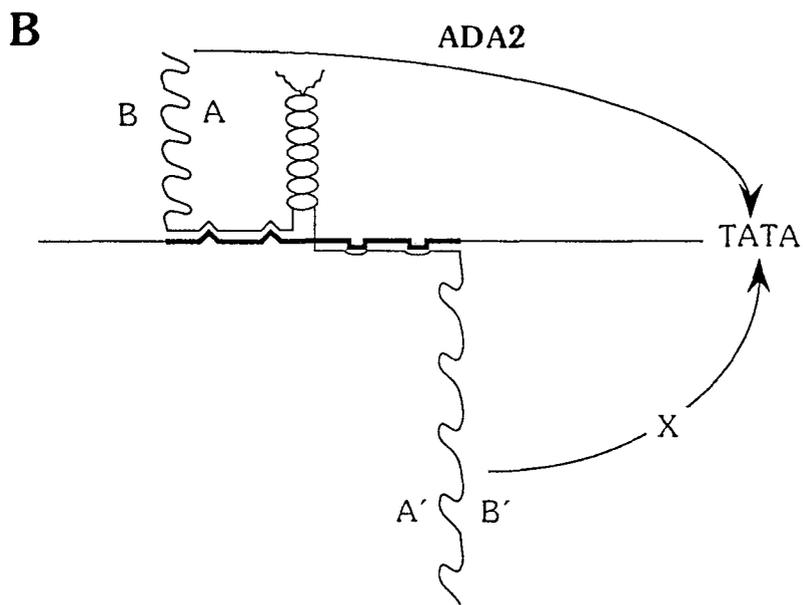
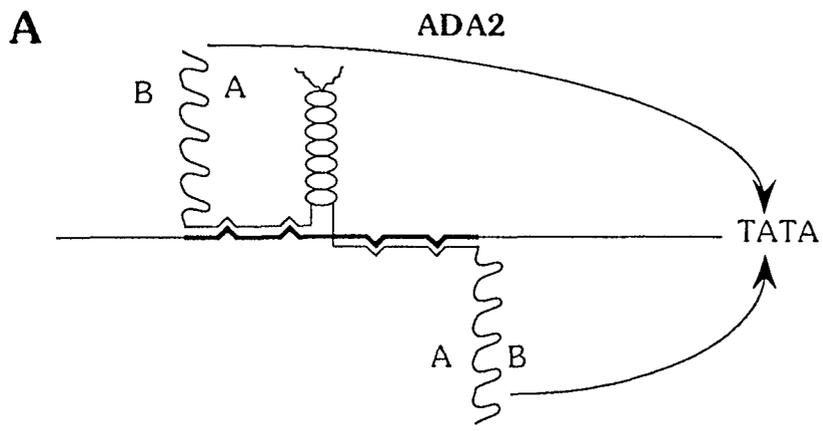
Σχήμα 8.1:

Γενικό μοντέλο ερμηνείας της μη λειτουργικής ισοδυναμίας των περιοχών ενεργοποίησης του διμερούς μεταγραφικού παράγοντα Gcn4 με βάση της συνέπειες που έχει η σύνδεση τους με ασύμμετρους στόχους.

- A.** Σύνδεση με ένα ιδανικό, παλίνδρομο DNA στόχο οδηγεί σε όμοια διαμόρφωση και των δύο μονομερών. Κάθε περιοχή ενεργοποίησης εκθέτει διαφορετική επιφάνεια προς την κατεύθυνση του στοιχείου TATA (**A** ή **B**). Η δυαδική συμμετρία του συνδεδεμένου με το DNA ομοδιμερούς Gcn4, η οποία προκύπτει από κρυσταλλογραφικές μελέτες υποστηρίζει την παραπάνω θεώρηση. Μόνο η επιφάνεια **A** επικοινωνεί με τους βασικούς παράγοντες με ένα μηχανισμό, στον οποίο εμπλέκεται η πρωτεΐνη Ada2, ενώ η επιφάνεια **B** αλληλεπιδρά με αυτούς τους παράγοντες μέσω ενός απροσδιόριστου προς το παρόν μηχανισμού.

- B.** Εξαναγκασμένη σύνδεση της πρωτεΐνης Gcn4 σε ακατάλληλη δεξιά πλευρά ενός στόχου επάγει μια μεταβολή στη δομή της περιοχής ενεργοποίησης του συνδεδεμένου με την πλευρά αυτή μονομερούς, η οποία αλλάζει την επιφάνεια **B** σε **B'**. Το γεγονός αυτό καταργεί την επικοινωνία της περιοχής αυτής με τους βασικούς παράγοντες. Αυτή η διαμόρφωση αφήνει την μεταγραφική ενεργοποίηση σε πλήρη εξάρτηση από τη λειτουργία της πρωτεΐνης Ada2.

- Γ.** Όταν η πρωτεΐνη Gcn4 εξαναγκαστεί να συνδεθεί σε ακατάλληλη δεξιά πλευρά η επιφάνεια **A** μετατρέπεται σε **A'**, γεγονός που καταργεί την εξαρτημένη από την πρωτεΐνη Ada2 μεταγραφική ενεργοποίηση.

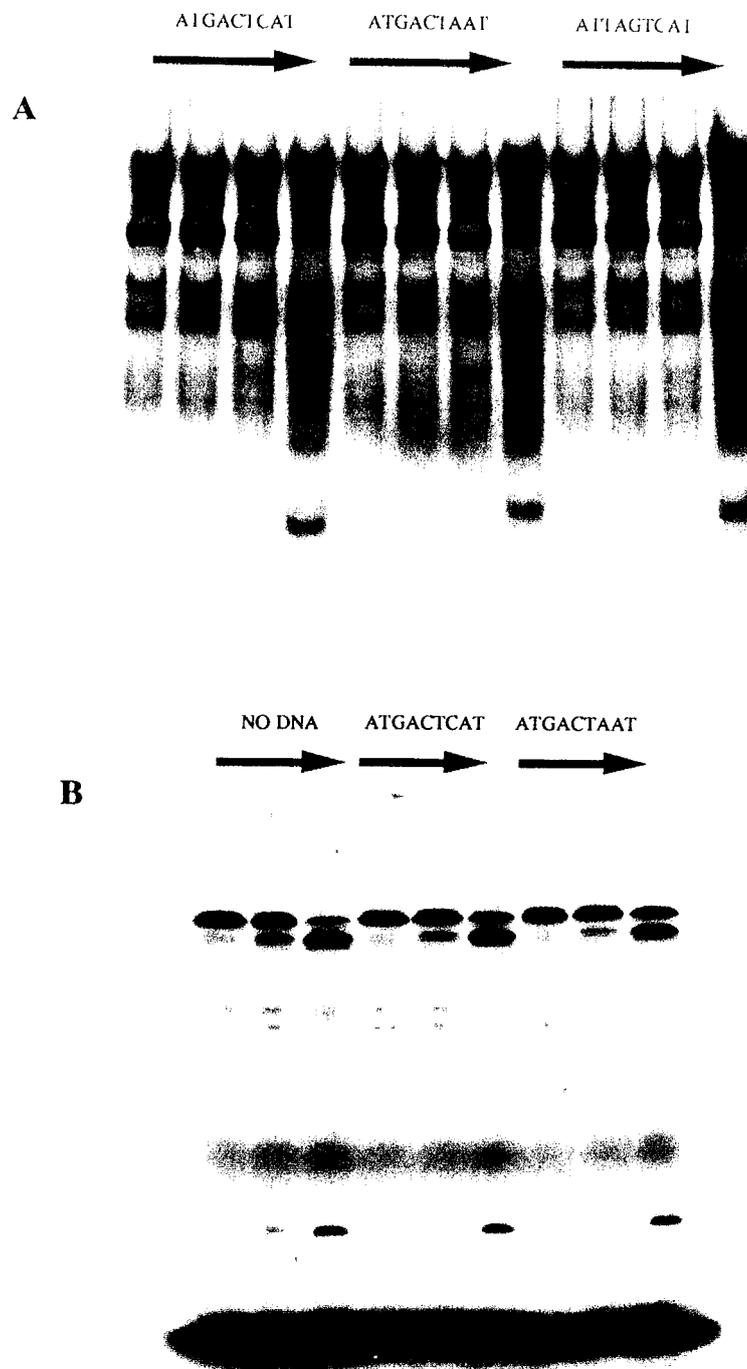


παραγόντων ρυθμίζεται από την αλληλουχία του στόχου. Έτσι για παράδειγμα η σύνδεση του μεταγραφικού ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα, PRTF ρυθμίζει την ενεργότητα του²⁸². Ομοια, η περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης VP16 γίνεται μη λειτουργική όταν εξαναγκαστεί σε σύνδεση με μια ακατάλληλη-αρνητική θέση δέσμησης στο DNA⁵⁸. Επιπρόσθετα, η δέσμηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB σε ένα μη παλίνδρομο DNA στόχο CRE, ελαττώνει την ενεργότητα του παράγοντα αυτού. Ως τελευταίο αναφέρετε το παράδειγμα της πρωτεΐνης MyoD¹⁰¹. Πρόκειται για ένα ενεργοποιητή του οποίου δύο αμινοξέα τα οποία εντοπίζονται μέσα στην περιοχή σύνδεσης με το DNA και αλληλεπιδρούν με την μείζονα αύλακα (major groove) της δίκλωνης έλικας του DNA, ρυθμίζουν την λειτουργία της περιοχής ενεργοποίησης.

Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι δομικές μεταβολές που προκαλούνται από την σύνδεση ενός μεταγραφικού παράγοντα με τον αντίστοιχο γι' αυτόν στόχο, επηρεάζουν τις ιδιότητες ενεργοποίησης του παράγοντα αυτού. Η εξάρτηση, επομένως του ενεργοποιητή Gcn4 από συγκεκριμένες πρωτεΐνες διαμεσολαβητές, η οποία καθορίζεται από την φύση του DNA στόχου, θα μπορούσε να προέρχεται από τέτοιες μεταβολές στην διαμόρφωση, οι οποίες επάγονται από σύνδεση σε ένα καθορισμένο στόχο. Αυτές οι αλλαγές είναι δυνατόν είτε να αποκαθιστούν, είτε να διαταράξουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, οι οποίες να είναι κρίσιμες για την μεταγραφική ενεργοποίηση. Προκειμένου να ανιχνευτούν πιθανές τροποποιήσεις στη δομή συμπλόκων της πρωτεΐνης Gcn4 με DNA στόχους, οι οποίοι δεν είναι ιδανικά παλίνδρομοι, εφαρμόστηκε περιορισμένη πρωτεόλυση της πρωτεΐνης αυτής που είναι συνδεδεμένη με διαφορετικούς ασύμμετρους στόχους.

Για το σκοπό αυτό η Gcn4 πρωτεΐνη συντέθηκε *in vitro* και σημάνθηκε με ³⁵S Μεθειονίνη. Η ραδιενεργή πρωτεΐνη αφέθηκε να συνδεθεί είτε με τον ιδανικό DNA στόχο (GCRE: 5'-ATGACTCAT-3'), ή με δύο άλλους μη ιδανικούς ασύμμετρους στόχους, ο ένας των οποίων αποτελείται από μια ιδανική αριστερή πλευρά (+2A: 5'-ATGACTAAT-3') και ο άλλος από ιδανική δεξιά πλευρά (-2T: 5'-ATTAGTCAT-3'). Η δεξιά και η αριστερή πλευρά καθορίστηκαν σε σχέση με το στοιχείο TATA. Τα σύμπλοκα πρωτεΐνης DNA κατεργάστηκαν στην συνέχεια με Χυμοτριψίνη και διαχωρήστηκαν ηλεκτροφορητικά κάτω από μη αποδιαταχτικές συνθήκες, όπως φαίνεται στην εικόνα 8.5A. Οι θέσεις προτίμησης για υδρόλυση από Χυμοτριψίνη της πρωτεΐνης Gcn4 έχουν χαρτογραφηθεί στο παρελθόν. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη αυτή υδρολύεται κάτω από τις συνθήκες που επικρατούσαν σε ένα αμινο-τελικό τμήμα μοριακού βάρους 42KDa και σε ένα καρβοξυ-τελικό μοριακού βάρους 12KDa. Το τελευταίο αυτό τμήμα εμπεριέχει την περιοχή σύνδεσης με το DNA. Αυτό το πεπτίδιο συνδεδεμένο με τον ιδανικό, παλίνδρομο

Επαγόμενες
μεταβολές.



Εικόνα 8.5:

Η σύνδεση της πρωτεΐνης Gcn4 σε ασύμμετρο στόχο επάγει μεταβολές στην δομή της, που προκαλούν διαφορετική κινητικότητα των συμπλόκων πρωτεΐνης DNA, κατά την διάρκεια μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης.

A. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή Πολυακρυλαμίδης, συμπλόκων φυσικού τύπου πρωτεΐνης Gcn4 και DNA μετά από μερική υδρόλυση με Χυμοτριψίνη. Οι στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο GCRE (ιδανικά παλίνδρομος) και οι +2A και -2T (ασύμμετροι).

B. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή Ακρυλαμίδης παρουσία SDS, των πεπτιδίων της πρωτεΐνης Gcn4 που προκύπτουν μετά από μερική υδρόλυση των μορίων Gcn4 που είναι συνδεδεμένα με DNA (με τον στόχο GCRE ή τον στόχο +2A). Επίσης κάτω από τις ίδιες συνθήκες αναλύθηκε και το πρότυπο υδρόλυσης πρωτεΐνης Gcn4, η οποία δεν είχε συνδεθεί με κάποιο στόχο (NO DNA).

DNA στόχο μετατοπίζεται σχετικά γρηγορότερα κατά την ηλεκτροφόρηση από το πεπτίδιο, το οποίο είναι συνδεδεμένο με τους δύο μή ιδανικούς ασύμμετρους στόχους (εικόνα 8.5A, GCRE: 5'-ATGACTCAT-3' σε σχέση με τους +2A: 5'-ATGACTAAT-3' ή -2T: 5'-ATTAGTCAT-3', η τέταρτη θέση της κάθε ομάδας αντιδράσεων περιοριστικής υδρόλυσης). Αυτές οι διαφορές στην κινητικότητα δεν μπορούν να αποδοθούν στα ολιγονουκλεοτίδια DNA που περιείχαν τους στόχους επειδή αυτά μετατοπίζονται πανομοιότυπα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Αυτή η παρατήρηση υποδικνύει ότι μια μεταβολή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης επάγεται από την σύνδεση με διαφορετικούς DNA στόχους. Όταν οποιαδήποτε από τις δύο πλευρές του DNA στόχου είναι ακατάλληλη για επαφή, το σύμπλοκο πρωτεΐνης-DNA εμφανίζει σχετικά πιο χαλαρή δομή, σε αντίθεση με το σύμπλοκο που περιλαμβάνει ιδανική αλληλουχία δέσμευσης.

Με σκοπό να αποκλειστεί η περίπτωση που συμβαίνει υδρόλυση σε διαφορετικές θέσεις μέσα στην πρωτεΐνη Gcn4 και τελικά να παράγονται πεπτίδια διαφορετικού μεγέθους ανάλογα με τον DNA στόχο, στο οποίο αυτή είναι συνδεδεμένη, τα προϊόντα της υδρόλυσης αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στην εικόνα 8.5B. Και πάλι ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη Gcn4, συνδεδεμένη είτε με τον ιδανικό στόχο (GCRE: 5'-ATGACTCAT-3'), είτε με έναν από τους μή παλίνδρομους (+2A: 5'-ATGACTAAT-3') υδρόλύθηκε με Χυμοτριψίνη. Παράλληλα έγινε και υδρόλυση ελέγχου πρωτεΐνης Gcn4, η οποία δεν είχε συνδεθεί με DNA, κάτω από τις ίδιες συνθήκες (NO DNA). Και στις τρεις περιπτώσεις το μέγεθος των πεπτιδίων που προέκυψαν ήταν και πάλι 42KDa και 12KDa, όπως φαίνεται στην εικόνα 8.5. (Εικόνα 8.5B, η τρίτη θέση κάθε ομάδας αντιδράσεων υδρόλυσης). Το γεγονός αυτό αποκλείει την υδρόλυση σε εναλλακτικές θέσεις λόγω της φύσης του DNA στόχου. Συνεπώς διαφέρει η περίπτωση της πρωτεΐνης Gcn4 από αυτήν του παράγοντα PRTF όπου ανάλογα με την αλληλουχία του στόχου όπου αυτός συνδέεται, εμφανίζεται και διαφορετικό πρότυπο υδρόλυσης λόγω χρήσης εναλλακτικών θέσεων.

Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν εδώ επιβεβαιώνουν την υπόθεση των μεταβολών στη δομή της πρωτεΐνης Gcn4 που επάγονται από το DNA στόχο. Δεν αποδεικνύουν ότι αυτές εκτείνονται μέχρι και την περιοχή ενεργοποίησης. Όμως σε συνδυασμό με την ήδη υπάρχουσα πληροφορία γύρω από το θέμα αυτό καθώς και με την πολικότητα της ενεργοποίησης από ασύμμετρους στόχους, αποτελούν μια καλά θεμελιωμένη πρώτη προσέγγιση στο ζήτημα της ρύθμισης της δράσης ενός παράγοντα από τη φύση του στόχου στον οποίο αυτός δεσμεύεται.

β) Παράμετροι ενεργοποίησης

Gcn5, Ada2 και ο DNA στόχος

Εκτός από τις μηχανιστικές συνέπειες που προκύπτουν από το μοντέλο που περιγράφηκε, είναι βιολογικά σημαντικό επειδή προβλέπει την συμμετοχή της θέσης δέσμευσης στην ρύθμιση του δυναμικού ενεργοποίησης ενός μεταγραφικού παράγοντα καθώς και την κατεύθυνση της ενεργοποίησης αυτής. Στις περισσότερες φυσιολογικές καταστάσεις οι DNA στόχοι σύνδεσης της πρωτεΐνης Gcn4 είναι ασύμμετροι όπου μόνο η αριστερή πλευρά του στόχου είναι ιδανική. Τέτοιου είδους θέσεις σύνδεσης οδηγούν σε ποικίλα επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης, τα οποία επίπεδα καθορίζονται πιθανώς από τη λειτουργία της περιοχής ενεργοποίησης του μονομερούς που εφάπτεται στην δεξιά πλευρά του στόχου.

Επιπρόσθετα, η πολική λειτουργία αυτών των περιοχών ενεργοποίησης θα μπορούσε να ερμηνεύσει την μονοκατευθυντική δράση μεταγραφικών παραγόντων σε οργανισμούς με γένωμα πυκνά κατηλλειμένο από γονίδια όπως αυτό του σακχαρομύκητα. Για παράδειγμα στην περίπτωση των γονιδίων HIS3 και PET56, τα οποία μεταγράφονται προς αντίθετες κατευθύνσεις, υπάρχει μια DNA αλληλουχία σύνδεσης για την πρωτεΐνη Gcn4 στην μέση της μή μεταγραφόμενης περιοχής που τα χωρίζει. Παρόλα αυτά η πρωτεΐνη Gcn4 ρυθμίζει μόνο την έκφραση του γονιδίου HIS3. Η θέση σύνδεσης αυτή για την Gcn4, είναι ασύμμετρη και αποτελείται από μια ιδανική αριστερή πλευρά σε σχέση με το στοιχείο TATA του γονιδίου HIS3.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η παρουσία ή η απουσία ενός διαμεσολαβητή μπορεί, σε συνδυασμό με τον κατάλληλο DNA στόχο, να καθορίσει την κατεύθυνση της μεταγραφικής ενεργοποίησης. Οι πρωτεΐνες διαμεσολαβητές αποτελούν επομένως μια παράμετρο μεταγραφικής ενεργοποίησης. Επίσης παράμετρο μεταγραφικής ενεργοποίησης αποτελεί και ο DNA στόχος, του οποίου η φύση είναι ικανή να διαμορφώσει ποιοτικά και ποσοτικά το τελικό αποτέλεσμα της δράσης ενός μεταγραφικού παράγοντα. Συμβαίνει μάλιστα αυτή η παράμετρος να μην είναι δεδομένη για όλα τα γονίδια που ρυθμίζονται από ένα συγκεκριμένο ενεργοποιητή, αλλά να διαφέρει κατά περίπτωση.

Το στοιχείο TATA

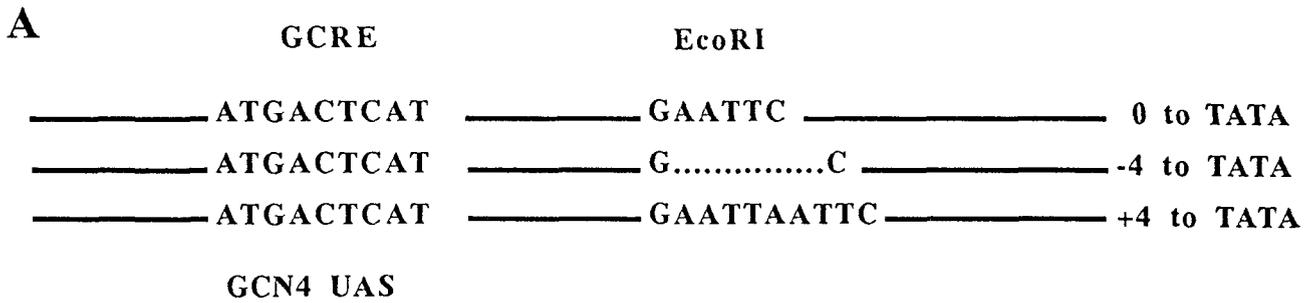
Εκείνο που δεν διαφέρει σε κανονικές συνθήκες είναι ύπαρξη των διαμεσολαβητών. Τα στελέχη φυσικού τύπου, εξ' ορισμού διαθέτουν ακέραιο το σύνολο των πρωτεϊνών αυτών. Εμφανίζεται συνεπώς ένα ερμηνευτικό πρόβλημα: Πώς σε τέτοια στελέχη επιτυγχάνεται η παρατηρούμενη μονοκατευθυντική ενεργοποίηση, εφ' όσον όπως έχει διαπιστωθεί, το φαινόμενο αυτό προκύπτει μόνο από το συνδυασμό της απουσίας ενός διαμεσολαβητή και του κατάλληλου DNA στόχου; Μήπως υφίσταται και άλλη παράμετρος ενεργοποίησης που να συμμετέχει στον καθορισμό του τελικού αποτελέσματος;

Η σύνδεση του μεταγραφικού ενεργοποιητή Gcn4 σε μή συμμετρικό στόχο αχρηστεύει το μονομερές που εφάπτεται στην ακατάλληλη πλευρά. Αυτό που μένει λειτουργικό, προβάλλει δυο επιφάνειες ενεργοποίησης, μία προς την κάθε διεύθυνση του DNA. Για να επιτύχει ενεργοποίηση μονάχα προς τη μια κατεύθυνση θα πρέπει να πάψει η τοποθετημένη προς την αντίθετη πλευρά, επιφάνεια της περιοχής ενεργοποίησης να επικοινωνεί με τους βασικούς παράγοντες της μεταγραφής. Όπως ειπώθηκε, αυτο μπορεί να γίνει με την απομάκρυνση του υπεύθυνου για την επικοινωνία αυτή, διαμεσολαβητή. Όταν ο διαμεσολαβητής αυτός είναι παρόν, θα πρέπει να εμποδίζεται η δράση της επιφάνειας αυτής με διαφορετικό μηχανισμό.

Το σύμπλοκο των βασικών μεταγραφικών εντοπίζεται συνδεδεμένο μέσω της πρωτεΐνης TBP, στο DNA στοιχείο TATA. Η τοπολογία του στοιχείου αυτού πάνω στη διπλή έλικα του DNA έχει δείχτει ότι επηρεάζει την μεταγραφική ενεργοποίηση. Επειδή η διπλή έλικα εμφανίζει περιοδικότητα δέκα νουκλεοτιδικών βάσεων, το στοιχείο TATA είναι δυνατό να τεθεί στην αντίθετη πλευρά της διπλής έλικας με μετακίνηση κατά πέντε βάσεις (Διαφορά φάσης: 180°). Είναι λοιπόν δυνατό, η φάση του στοιχείου αυτού σε σχέση με τον DNA στόχο σύνδεσης της πρωτεΐνης Gcn4 να έχει επίδραση στη μεταγραφική ενεργοποίηση;

Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό έγινε μετατόπιση του στοιχείου TATA από τον ιδανικό στόχο δέσμευσης της Gcn4, κατά τέσσερις βάσεις και προς τη μία και προς τη άλλη κατεύθυνση, στον υποκινητή ενός γονιδίου μάστρυρα. Τα αποτελέσματα αυτής της μετακίνησης φαίνονται στον πίνακα 8.1. Οι μετρήσεις έγιναν σε στελέχη φυσικού τύπου καθώς και σε ada2, και δείχνουν ίδια μεταβολή της ενεργοποίησης κατά τη μετακίνηση, είτε προς τη μία είτε προς την άλλη κατεύθυνση (Προσέγγιση, Απομάκρυνση). Διαπιστώνεται επίσης ότι η αρχική τοποθέτηση του στοιχείου TATA ήταν η ευνοϊκότερη αφού και η προσέγγιση αλλά και η απομάκρυνση του από τον DNA στόχο της Gcn4, μείωνε τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης περίπου στο μισό.

Η παράμετρος TATA.



B

	Στέλεχος	
	WT	ada2
0 to TATA	12.1	5.4
-4 to TATA	7.6	3.1
+4 to TATA	7.2	2.3

Πίνακας 8.1:

Οι συνέπειες της μετακίνησης του στοιχείου TATA σε σχέση με τον DNA στόχο της πρωτεΐνης Gcn4.

A. Σχηματική παράσταση των υποκινητών οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό, ελέγχοντας την έκφραση ενός χιμερικού γονιδίου μάρτυρα (HIS3-LacZ).

B. Οι τιμές ενεργότητας β-Γαλακτοσιδάσης των παραπάνω κατασκευών σε στελέχη φυσικού τύπου και *ada2*. Οι τιμές αυτές είναι σε μονάδες Miller και αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με απόκλιση μικρότερη από 10%.

Η τοπολογία του στοιχείου TATA, αποτελεί επομένως μια επιπλέον παράμετρο ενεργοποίησης η οποία σε συνδυασμό με τη φύση του DNA στόχου, να επιβάλλει μονοκατευθυντική μεταγραφή. Προτείνεται ότι για να αποκατασταθεί η επαφή μιας επιφάνειας της περιοχής ενεργοποίησης με τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, θα πρέπει το στοιχείο TATA στο οποίο εντοπίζονται αυτοί, να βρίσκεται στην κατάλληλη πλευρά της διπλής έλικας του DNA. Αν έστω, υπάρχουν στοιχεία TATA και από τις δύο πλευρές του σημείου σύνδεσης με το DNA της πρωτεΐνης Gcn4 και το ένα είναι σε θέση ακατάλληλη για την αποκατάσταση επαφής με το ένα από τα δύο μονομερή Gcn4, τότε η μεταγραφή από το στοιχείο αυτό θα καταργηθεί αν λόγω ασυμμετρίας του DNA στόχου, αχρηστευθεί το άλλο μονομερές.

Για την περίπτωση των γονιδίων PET56 και HIS3, τα αντίστοιχα στοιχεία TATA βρίσκονται σε διαφορά φάσης περίπου 180° , αναφορικά με την αλληλουχία δέσμευσης της πρωτεΐνης Gcn4 που βρίσκεται ανάμεσα τους. Πιθανώς λοιπόν να παρεμποδίζεται η ενεργοποίηση από την πλευρά του PET56, λόγω αυτής της τοπολογίας.

9^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Συζήτηση των αποτελεσμάτων που καταγράφονται στα Κεφάλαια 7 και 8. Συμπεράσματα, και προοπτική.

Με πόσους τρόπους επιδρά η πρωτεΐνη Gcn4 στη μεταγραφική μηχανή του κυττάρου;

Οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων, αυξάνοντας τη συχνότητα των γεγονότων έναρξης στο υποκινητή τους²³. Δυο γενικά μοντέλα έχουν προταθεί σχετικά με την ικανότητα αυτή των ενεργοποιητών, είτε:

- α) Οι πρωτεΐνες αυτές αυξάνουν την προσέλευση των βασικών παραγόντων που απαρτίζουν το σύμπλοκο έναρξης, πάνω σε στοιχεία του υποκινητή όπως το TATA⁵³, ή:
- β) Επιδρούν σε ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα έναρξης, τροποποιώντας τα αλλοστερικά με τρόπο κατάλληλο ώστε να ξεκινήσει η μεταγραφή

Οι δυο αυτοί μηχανισμοί δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενοι. Ενας μεταγραφικός ενεργοποιητής θα μπορούσε να επεμβαίνει και στις δυό παραπάνω διαδικασίες αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και των δυο μηχανισμών. Για οποιαδήποτε πάντως παρέμβαση, θα πρέπει να υπάρχει τρόπος επίδρασης ενός ενεργοποιητή στη μεταγραφική μηχανή του κυττάρου.

Η πρωτεΐνη Gcn4 προκειμένου να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή σε πλήρη έκταση απαιτεί την παρουσία μορίων διαμεσολαβητών. Ως τέτοια μόρια έχουν αναγνωριστεί τα προϊόντα των γονιδίων GCN5, ADA2 και ADA3^{20, 89, 191}. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες συμμετέχουν σε ένα σύμπλοκο που μεσολαβεί για τη δράση και άλλων ενεργοποιητών εκτός από του Gcn4. Στελέχη μεταλλαγμένα με τρόπο τέτοιο που να αχρηστεύονται ένα ή περισσότερα από τα τρία αυτά γονίδια, εμφανίζουν πτώση των επιπέδων μεταγραφής γονιδίων που επάγονται από Gcn4. Η μείωση αυτή της επαγωγής φτάνει το 50%, για την περίπτωση του ενεργοποιητή αυτού, ενώ για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που επίσης εξαρτώνται από τους διαμεσολαβητές αυτούς το ποσοστό μείωσης διαφέρει. Η επαγόμενη από την πρωτεΐνη Gal4 μεταγραφή πέφτει κατά 70% περίπου και η επαγωγή από τον ενεργοποιητή VP16 σχεδόν καταργείται αφού η πτώση ξεπερνά το 80%.

Η ιδιότητα των όξινων ενεργοποιητών να τιτλοδοτούν βασικούς παράγοντες της μεταγραφής, όταν υπερεκφραστούν, είναι ένα άλλο φαινόμενο που εκτός από την ενεργοποίηση, απαιτεί την παρουσία διαμεσολαβητών. Η επίδραση της απουσίας των μορίων αυτών στην τιτλοδότηση, είναι ανάλογη αυτής στην ενεργοποίηση,

υποδεικνύοντας τη στενή συσχέτιση των δυο διαδικασιών.

Για την περίπτωση της υπερέκφρασης του Gcn4, η αργοπορία που προκαλείται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αναιρείται από την ταυτόχρονη υπερέκφραση του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIIB. Με βάση το γεγονός αυτό μπορεί να προταθεί ότι ο παράγοντας αυτός είναι το τιτλοδοτούμενο μόριο κάτω από συνθήκες υπερέκφρασης και ότι αποτελεί ένα από τους στόχους στους οποίους άμεσα ή έμμεσα επιδρά το Gcn4.

Εφ, όσον όλες οι επιδράσεις του Gcn4 στη μεταγραφή, είτε θετικές ως ενεργοποιητή είτε αρνητικές ως τιτλοδοτή, εξασθενούν με την έλλειψη των πρωτεϊνών διαμεσολαβητών Gcn5, Ada2 και Ada3, θα πρέπει το σύμπλοκο στο οποίο αυτές συμμετέχουν να αποτελεί τον ένα κρίκο που συνδέει τον ενεργοποιητή αυτό με τη μεταγραφική μηχανή^{191, 240}. Όμως η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων από την πρωτεΐνη Gcn4 δεν καταργείται από την απουσία αυτών των διαμεσολαβητών. Το ίδιο δεν καταργείται και το φαινόμενο της τιτλοδότησης, όπως έχει αναφερθεί. Θα πρέπει λοιπόν να υφίσταται κάποιος μηχανισμός με τον οποίο να διασφαλίζεται το υπόλοιπο μισό της δράσης του Gcn4 που μένει χωρίς να συμμετέχουν σ' αυτόν οι τρεις παραπάνω διαμεσολαβητές. Είναι συνεπώς πιθανή η ύπαρξη και άλλων διαμεσολαβητών που δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμα και αποκαθιστούν επίσης επικοινωνία ανάμεσα στην πρωτεΐνη Gcn4 και την μεταγραφική μηχανή.

Εναλλακτικά η πρωτεΐνη αυτή θα ήταν δυνατό να αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής μέσω απ' ευθείας επαφής της περιοχής ενεργοποίησης της με κάποιους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες^{224, 27, 247, 263, 318}, όπως φαίνεται στην εικόνα 6.2 του Κεφαλαίου 6. Η ανίχνευση *in vitro* μιας ασθενικής αλλά ειδικής παρόλα αυτά αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην πρωτεΐνη Gcn4 και τον παράγοντα TFIIIB, συνηγορεί για κάτι τέτοιο. Η ισχύς της αλληλεπίδρασης αυτής όμως δεν είναι τέτοια που να θεωρηθεί ότι το μισό της ενεργότητας της πρωτεΐνης Gcn4 προέρχεται από αυτήν. Πιθανά η επαφή του Gcn4 με τον TFIIIB να σταθεροποιείται από τους υποτιθέμενους επιπρόσθετους διαμεσολαβητές.

Τα δυο μονομερή που απαρτίζουν το διμερές Gcn4 δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμα.

Η πρωτεΐνη Gcn4 δεσμεύεται ως διμερές στην ψευδοπαλίνδρομη DNA αλληλουχία 5'ATGACTCAT'3. Η δομή του συμπλόκου της περιοχής δέσμευσης στο DNA του Gcn4, με τον παραπάνω στόχο, έχει βρεθεί με κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Δεν είναι όμως ακόμα γνωστή η διάταξη στο χώρο των δυο περιοχών ενεργοποίησης του παράγοντα αυτού. Παρόλα αυτά, με τη βοήθεια κυκλικού διχρωμισμού δείχτηκε ότι σε σχετικά όξινες συνθήκες είναι δυνατό οι περιοχές αυτές να έχουν δομή β πτυχωτής επιφάνειας³⁰¹. Η συμμετρία στο χώρο του διμερούς Gcn4 υποβάλλει την άποψη ότι οι δυο αυτές περιοχές ενεργοποίησης προβάλλουν διαφορετική επιφάνεια προς την κατεύθυνση έναρξης της μεταγραφής³⁸. Μήπως το γεγονός αυτό απαιτεί να έρχονται αυτές οι ανόμοιες επιφάνειες σε επαφή με τους βασικούς παράγοντες, με διαφορετικό τρόπο;

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μια βλάβη στο σύμπλοκο διαμεσολάβησης Gcn5/Ada2/Ada3 που χρησιμοποιείται και από την πρωτεΐνη Gcn4, έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση στο μισό των επιδράσεων της πρωτεΐνης αυτής στη μεταγραφή¹⁹¹. Με βάση και τα όσα αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, μπορεί να προταθεί το εξής:

Υπόθεση: Οι δυο διαφορετικές επιφάνειες ενεργοποίησης που προβάλλονται προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής από το Gcn4, επικοινωνούν με το σύμπλοκο έναρξης μέσω διαφορετικών διαμεσολαβητών ή πιο γενικά τρόπων. Η περιοχή ενεργοποίησης του ενός από τα μονομερή επιτυγχάνει κάτι τέτοιο με τη βοήθεια του συμπλόκου Gcn5/Ada2/Ada3. Μια βλάβη σ' αυτό το σύμπλοκο, αφήνει μόνο το άλλο μονομερές δραστικό, μειώνοντας τη συνολική επίδραση του διμερούς στο μισό.

Τα πειράματα που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 8 είναι σχεδιασμένα ώστε να ερευνηθεί το αληθές ή όχι αυτής της υπόθεσης. Η πιο άμεση απάντηση στο ερώτημα αυτό θα δινόταν από την ανάλυση της επαγωγής της μεταγραφής από διμερή Gcn4, που θα διέθεταν μόνο μια περιοχή ενεργοποίησης αφού η άλλη θα είχε απομακρυνθεί. Δεν είναι δύσκολη η συνέκφραση στο κύτταρο ενός κανονικού γονιδίου GCN4 και ενός που του λείπει η περιοχή ενεργοποίησης. Τέτοια συνέκφραση θα έχει ως αποτέλεσμα και τη δημιουργία ετεροδιμερών ανάμεσα στις δυο ειδών πρωτεΐνες. Πως όμως θα επιλεγθεί η μελέτη μόνο των ετεροδιμερών αυτών; Για το λόγο αυτό συν-εκφράστηκαν στο κύτταρο γονίδια GCN4 που έφεραν μεταλλαγές στην περιοχή δέσμευσης στο DNA, τέτοιες ώστε να αναγνωρίζουν DNA στόχους διαφορετικούς από τον γνωστό¹⁵⁴. Ακόμα τα γονίδια

αυτά ήταν έτσι μεταλλαγμένα που οι αντίστοιχες πρωτεΐνες να μην αναγνωρίζουν η μία την DNA αλληλουχία σύνδεσης της άλλης. Μια τέτοια συν-έκφραση, σε συνδυασμό με χρήση κατάλληλων DNA στόχων που να αποτελούνται από μια πλευρά ειδική και μόνο για το ένα είδος μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, και από μια άλλη ειδική μόνο για την δεύτερη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, θα επέτρεπε την επιλογή των ετεροδιμερών (Σχήμα 9.1). Με τη χρήση λοιπόν, μη συμμετρικών DNA στόχων στους υποκινητές γονιδίων μαρτύρων θα γινόταν δυνατή η μελέτη της επαγωγής της μεταγραφής από ετεροδιμερή Gcn4 που είτε διέθεταν είτε όχι περιοχή ενεργοποίησης για το μονομερές που δεσμεύεται στη απομακρυσμένη από το στοιχείο TATA πλευρά του στόχου (αριστερή), ή στην κοντινή (δεξιά). Μάλιστα για να μην υπάρχει παρεμβολή από το ενδογενές Gcn4, η ανάλυση έγινε σε στελέχη με έλλειψη του γονιδίου GCN4, φυσικού τύπου. Επίσης για την εξακρίβωση της επίδρασης μιας βλάβης του συμπλόκου διαμεσολάβησης Gcn5/Ada2/Ada3 στην μεταγραφή από τέτοια ετεροδιμερή, μετρήθηκε η μεταγραφή των γονιδίων μαρτύρων και σε στελέχη στα οποία εκτός από το GCN4, έχει καταστραφεί και το γονίδιο ADA2 (Πίνακας 9.1. Φαίνεται το σχετικό ποσοστό ενεργοποίησης).

Το αρχικά δυσάρεστο που διαπιστώθηκε κατά την εφαρμογή της παραπάνω προσέγγισης ήταν ότι ακόμα και ομοδιμερή Gcn4 που αποτελούνταν από μονομερή ικανά να αναγνωρίσουν την μια μόνο ή την άλλη πλευρά του DNA στόχου, είχαν την ικανότητα να ενεργοποιούν την μεταγραφή μέσω μη συμμετρικών στόχων (Πίνακας 9.2. Φαίνεται και πάλι το σχετικό ποσοστό ενεργοποίησης). Αρκούσε επομένως η δέσμευση του ενός μονάχα μονομερούς στην κατάλληλη γι' αυτό πλευρά του στόχου, για να σταθεροποιήσει την πολύ ασθενική επαφή του άλλου με την διαφορετική άλλη πλευρά. Το γεγονός αυτό καθιστούσε ανεφάρμοστο το σχήμα της μελέτης ετεροδιμερών Gcn4³²⁶, από τα οποία να έχει αφαιρεθεί η περιοχή ενεργοποίησης του ενός ή του άλλου μονομερούς, τουλάχιστον με τη διακριτική ικανότητα που διαθέτει η μέθοδος μέτρησης της μεταγραφικής επαγωγής που χρησιμοποιήθηκε (Ενεργότητα β- Γαλακτοσιδάσης).

Όταν, παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε η συμπεριφορά των ομοδιμερών Gcn4 σε συνδυασμό με μη συμμετρικούς DNA στόχους, κατά την απουσία της πρωτεΐνης Ada2, διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός πολύ συγκεκριμένου πρότυπου εξάρτησης της επαγόμενης μεταγραφής, από τον διαμεσολαβητή αυτόν²⁸⁵ (Πίνακας 9.3. Φαίνεται ξανά το σχετικό ποσοστό ενεργοποίησης). Συγκεκριμένα:

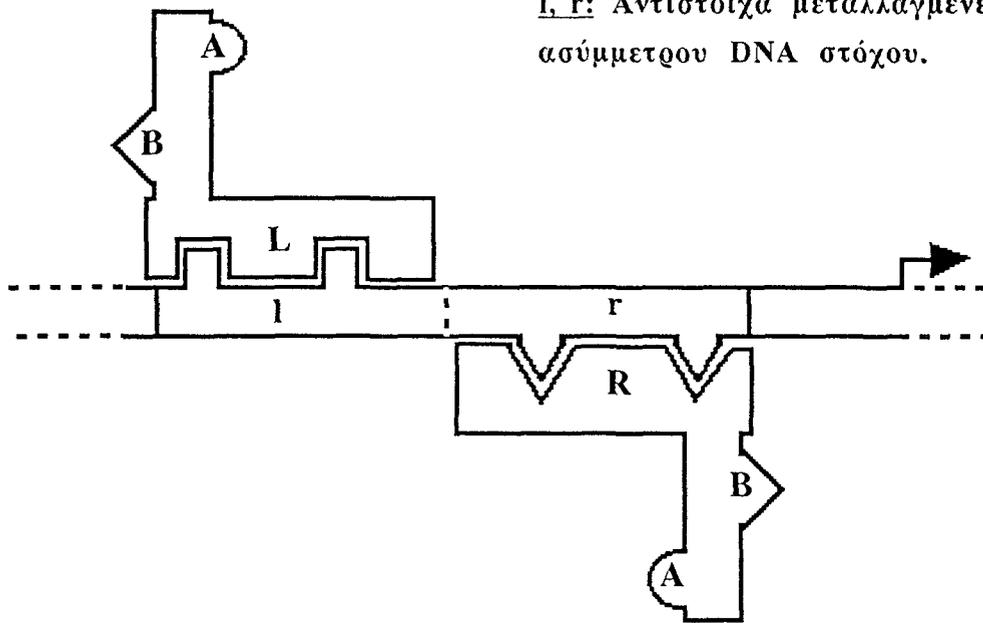
- α) Σε οποιαδήποτε περίπτωση όπου η δεξιά πλευρά του DNA στόχου είναι ακατάλληλη για το Gcn4, η μεταγραφή εμφανίζεται ολοκληρωτικά εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη Ada2.

Στρατηγική επιλογής ετεροδιμερών Gcn4.

A, B: Επιφάνειες της περιοχής ενεργοποίησης.

L, R: Μεταλλαγμένα μονομερή Gcn4.

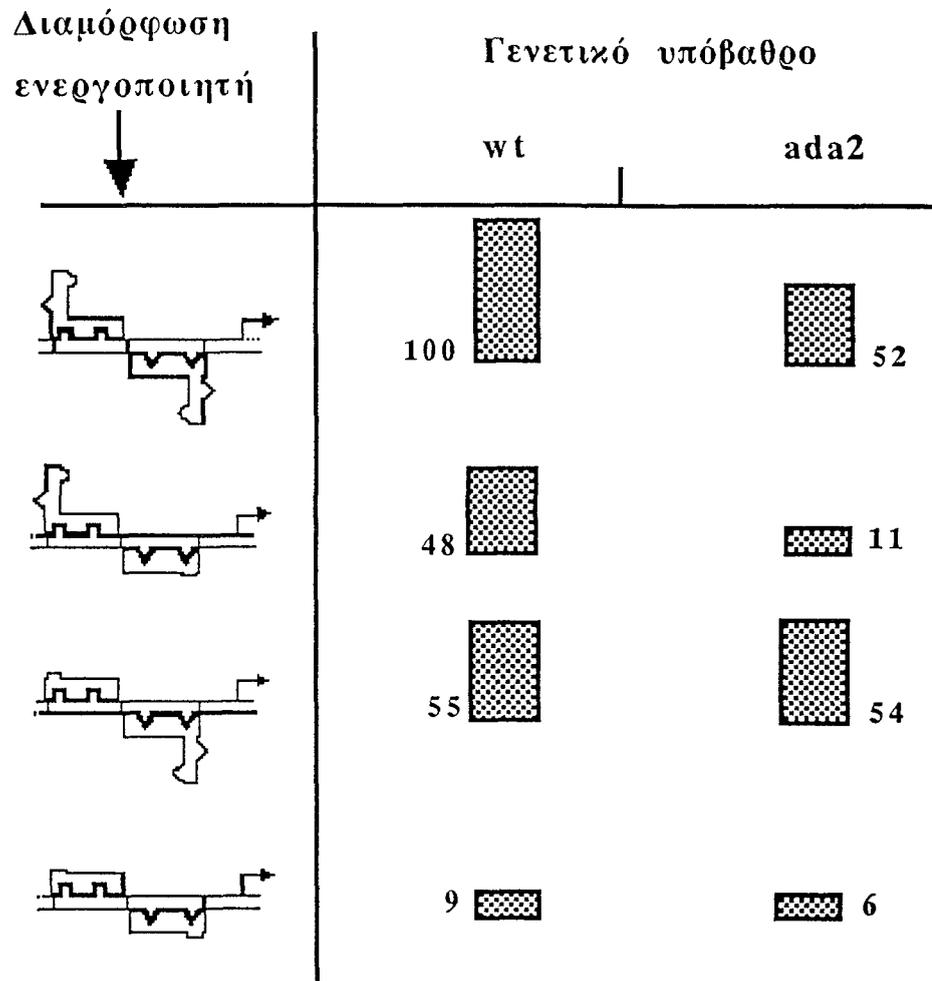
l, r: Αντίστοιχα μεταλλαγμένες πλευρές του ασύμμετρου DNA στόχου.



Σχήμα 9.1:

Κατασκευάστηκαν ασύμμετροι DNA στόχοι που αποτελούνταν από ανόμοιες μεταλλαγμένες πλευρές. Θεωρήθηκε ότι σε αυτούς θα δεσμευόντουσαν μονάχα ετεροδιμερή **Gcn4** τα οποία θα περιλάμβαναν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες με εξειδίκευση δέσμευσης αντίστοιχη των πλευρών των στόχων.

Τα αποτελέσματα από τη χρήση ετεροδιμερών.

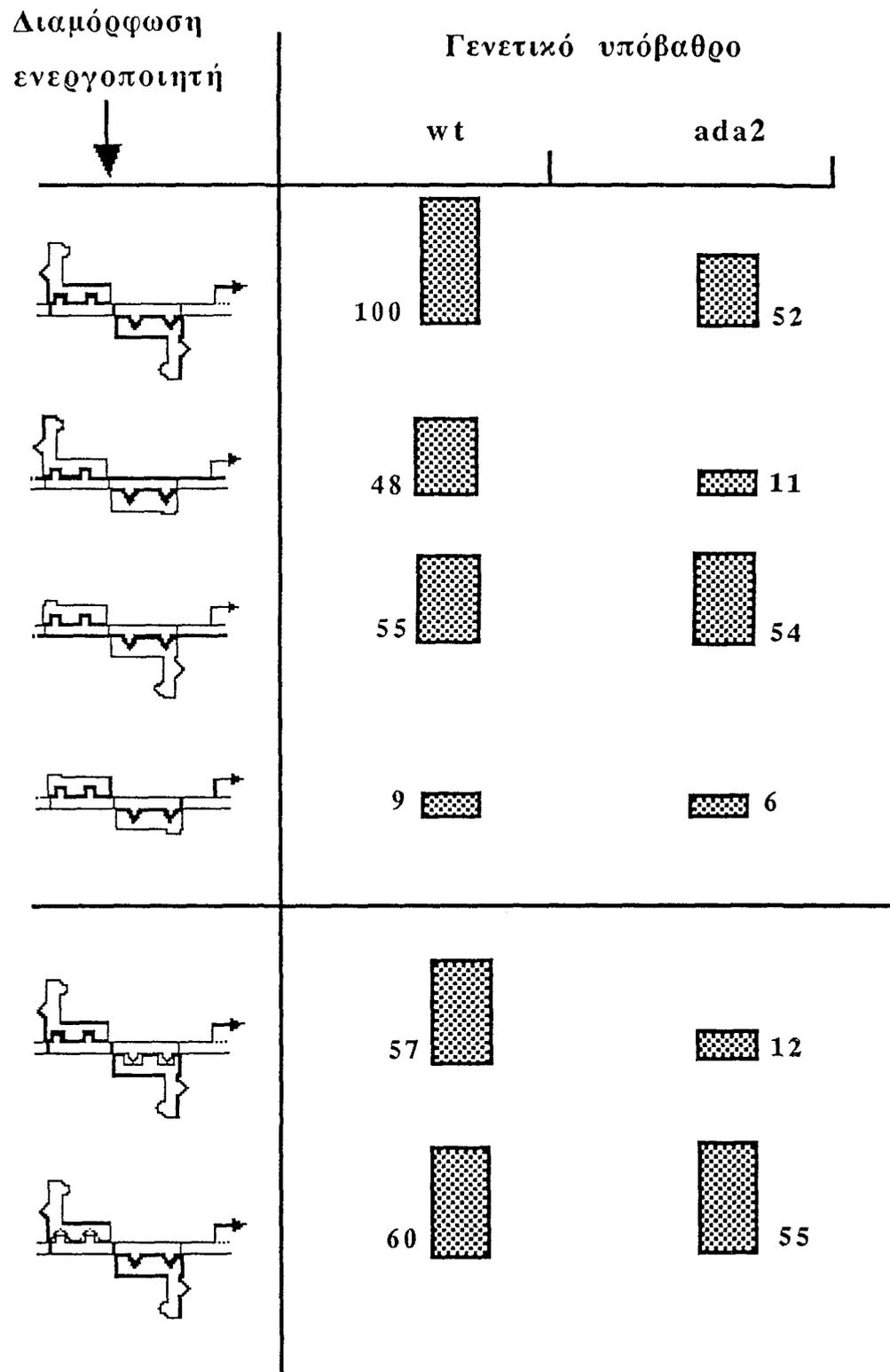


Πίνακας 9.1:

Όταν μετρήθηκε η μεταγραφή μέσω μη συμμετρικών στόχων από τα υποτιθέμενα ετεροδιμερή Gcn4, διαπιστώθηκε ένα πολικό πρότυπο εξάρτησης από τον διαμεσολαβητή **Ada2**.

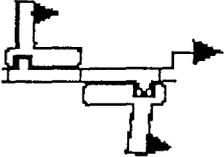
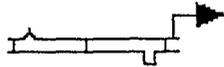
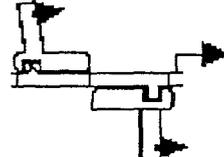
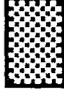
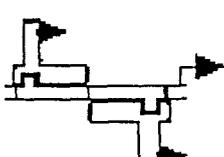
Η διαδοχική απομάκρυνση των δύο περιοχών ενεργοποίησης έδειξε εξάρτηση μόνο της μιας από την παρουσία της πρωτεΐνης **Ada2**. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν δε διέθεταν ενδογενές GCN4.

Ασύμμετροι στόχοι και μεταλλαγμένα ομοδιμερή Gcn4.



Πίνακας 9.2:

Τα ομοδιμερή Gcn4 έχουν την ικανότητα ενεργοποίησης από ασύμμετρους στόχους. Εκτός αυτού εμφανίζουν και πολικό χαρακτήρα όσον αφορά την χρήση της πρωτεΐνης Ada2. Και εδώ τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν δε διέθεταν ενδογενές GCN4.

Διαμόρφωση ενεργοποιητή ↓	Γενετικό υπόβαθρο	
	wt	ada2
	1 	 1
	4 	 1
	1 	 1
	4 	 3
	1 	 1
	8 	 4

Πίνακας 9.3:

Οι ασύμμετροι DNA στόχοι επιβάλλουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο εξάρτησης της ενεργοποίησης μέσω της πρωτεΐνης Gcn4, από τον διαμεσολαβητή Ada2.

- β) Όταν η αριστερή πλευρά είναι ακατάλληλη, η παρουσία ή όχι της πρωτεΐνης αυτής είναι γεγονός αδιάφορο για την ενεργοποίηση.
- γ) Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις η επαγόμενη από ομοδιμερή Gcn4, μεταγραφή μέσω μη συμμετρικών στόχων, κατά την παρουσία της πρωτεΐνης Ada2, ήταν μειωμένη στο μισό σε σχέση με DNA στόχους συμμετρικούς και κατάλληλους για το εκάστοτε ομοδιμερές.

Ο συνδυασμός των παραπάνω οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση του μονομερούς Gcn4 που εφάπτεται στην ακατάλληλη πλευρά του μη συμμετρικού DNA στόχου, παρεμποδίζεται έτσι ώστε να καταργείται εντελώς. Απομένει μονάχα το άλλο, στο οποίο και οφείλεται η επαγωγή που τελικά παρατηρείται. Επιπρόσθετα, η δράση του αριστερού μονομερούς που απομένει λειτουργικό όταν δεν είναι κατάλληλη για δέσμευση η δεξιά πλευρά του στόχου με συνέπεια να αχρηστεύεται το αντίστοιχο μονομερές, είναι εξαρτημένη από την αριτιότητα του συμπλόκου διαμεσολάβησης Gcn5/Ada2/Ada3. Αντίθετα όταν αχρηστευθεί το αριστερό μονομερές λόγω ακαταλληλότητας της αριστερής πλευράς του στόχου, η δράση του δεξιού που απομένει είναι αδιάφορη στην παρουσία της πρωτεΐνης Ada2.

Τα παραπάνω συνηγορούν στην άποψη ότι οι περιοχές ενεργοποίησης ή τουλάχιστον οι επιφάνειες τους που προβάλλονται προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής, δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμες³²⁶. Η επιφάνεια που προβάλλεται από το αριστερό μονομερές έρχεται σ' επαφή με τη μεταγραφική μηχανή μέσω του συμπλόκου Gcn5/Ada2/Ada3. Η βλάβη στο σύμπλοκο αυτό που προκαλείται από την έλλειψη της πρωτεΐνης Ada2, έχει ως συνέπεια τη διακοπή της επικοινωνίας του αριστερού μονομερούς με τους βασικούς παράγοντες έναρξης της μεταγραφής. Οσον αφορά το δεξί μονομερές, η επιφάνεια που προβάλλει προς το στοιχείο TATA και που διαφέρει για λόγους συμμετρίας από αυτή που προβάλλει το αριστερό, δεν χρησιμοποιεί το σύμπλοκο Gcn5/Ada2/Ada3 για να αποκαταστήσει επαφή με γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Παραμένει άγνωστος ο μηχανισμός επικοινωνίας του μονομερούς αυτού. Είναι πιθανό να έρχεται σε απ' ευθείας επαφή μ' αυτούς τους παράγοντες, ή να χρησιμοποιεί διαφορετικούς διαμεσολαβητές.

Δεν συζητείται η περίπτωση οι δυο περιοχές ενεργοποίησης του διμερούς Gcn4 να συμπλέκονται με τρόπο τέτοιο που να σχηματίζουν μια ενιαία δομή ενεργοποίησης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης που περιγράφηκε δεν είναι εύκολα συμβατά με κάτι τέτοιο. Δεν υπάρχει δε, ικανότητα διμερισμού μέσω των περιοχών ενεργοποίησης και είναι απίθανο να εξαναγκάζονται αυτές σε επαφή μεταξύ τους από τη διάταξη της περιοχής σύνδεσης με το DNA και της περιοχής διμερισμού του Gcn4. Αυτό είναι απίθανο επειδή οι περιοχές ενεργοποίησης συνδέονται με το υπόλοιπο μόριο μέσω

αμινοξικών αλληλουχιών που έχουν ιδιότητες εύκαμπτου συνδέσμου χωρίς συγκεκριμένη δομή, μια που οι αλληλουχίες αυτές είναι υπερβολικά ευαίσθητες σε πρωτεόλυση.

Το ερώτημα που γενάται στο σημείο αυτό και σε σχέση με την ερμηνεία των δεδομένων που αναπτύχθηκε στις προηγούμενες παραγράφους, έχει σχέση με το πως ακριβώς αχρηστεύεται η περιοχή ενεργοποίησης του μονομερούς Gcp4 που δεν εφάπτεται καλά στο στόχο. Η αχρήστευση είναι προφανώς λειτουργική. Αλλά είναι δυνατό να προέρχεται από δομικές μεταβολές του μορίου που να επεκτείνονται και να αφορούν τελικά την περιοχή αυτή;

Η φύση του DNA στόχου επάγει μεταβολές στη δομή του διμερούς Gcn4.

Η θεώρηση που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο βασίζεται βέβαια στη σιωπηλή παραδοχή ότι τροποποιείται με τρόπο τέτοιο, ώστε να παροπλίζεται η περιοχή ενεργοποίησης του μονομερούς Gcn4 που εφλαπτεται στην ακατάλληλη πλευρά ενός μη παλίνδρομου στόχου. Πως όμως γίνεται η τροποποίηση αυτή; Όπως θα φανεί στη συνέχεια, ίσως ο τρόπος που τέθηκε η ερώτηση να μην είναι ο σωστότερος.

Έχει διαπιστωθεί ότι αρκετές δεσμευόμενες σε νουκλεϊκά οξέα πρωτεΐνες αποκτούν την τελική και λειτουργική τους διαμόρφωση στο χώρο, μετά από την αλληλεπίδραση με το νουκλεϊκό οξύ. Αρκετές τέτοιες πρωτεΐνες ανήκουν στη κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων. Ειδικά για το Gcn4 έχει δείχτει ότι η περιοχή δέσμευσης στο DNA αποκτά σταθερή δομή α έλικας μόνο μετά από αλληλεπίδραση με το στόχο. Αυτό ισχύει και για τα δυο μονομερή που απαρτίζουν το διμερές αφού για το διμερισμό δεν απαιτείται σύνδεση με το DNA και μάλλον θα πρέπει να προηγηθεί για να συμβεί κατόπιν τέτοια σύνδεση¹²⁹. Η επαφή του Gcn4 με το DNA εξασφαλίζεται με αλληλεπίδραση και δημιουργία δεσμών ανάμεσα σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές βάσεις και στα κατάλληλα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής δέσμευσης. Μάλιστα με τη βοήθεια εκτεταμένης γενετικής ανάλυσης έχουν χαρτογραφηθεί οι περισσότερες αυτές αλληλεπιδράσεις¹⁵⁴. Η κρυσταλογραφική μελέτη του συμπλόκου DNA-περιοχή δέσμευσης του Gcn4, επιβεβαίωσε και συμπλήρωσε την παραπάνω εικόνα.

Οι μεταβολές της δομής που συνεπάγεται η δέσμευση μιας πρωτεΐνης στο DNA οδήγησαν στη διατύπωση του μοντέλου της Επαγόμενης Προσαρμογής (Induced Fit) για παρόμοιες καταστάσεις. Κατά το μοντέλο αυτό, η αλληλεπίδραση με το DNA επάγει στην πρωτεΐνη τη δομή εκείνη που είναι πιο κατάλληλη για τη δέσμευση. Το μοντέλο αυτό προβλέπει ότι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε συγκεκριμένο DNA στόχο αλλά έχει και ανοχή σε κάποιες αλλαγές στη νουκλεοτιδική σύσταση του στόχου αυτού, θα εμφανίζει διαφορές στη δομή της ανάλογα με τον ακριβή στόχο στον οποίο βρίσκεται δεσμευμένη. Μια από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες περιπτώσεις που συμβιβάζονται με τη θεώρηση που περιγράφηκε είναι αυτή του μεταγραφικού παράγοντα της ζύμης, PRTF. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που έχει συμμετοχή στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στον καθορισμό του συζευκτικού-αναπαραγωγικού τύπου (Mating Type), στο σακχαρομύκητα²⁸². Η δομή του μεταγραφικού αυτού παράγοντα μεταβάλλεται ανάλογα με τον στόχο στον οποίο βρίσκεται συνδεδεμένος^{93, 223}.

Δεν αρκεί όμως η μεταβολή της δομής της περιοχής σύνδεσης με το DNA για να δικαιολογηθεί η λειτουργική συμπεριφορά των διμερών Gcn4 που συνδέονται με

ασύμμετρο στόχο. Θα πρέπει οποιαδήποτε δομική μεταβολή να επεκτείνεται και στην περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής επηρεάζοντας την έτσι ώστε να παρεμποδίζεται η δράση της. Είναι ήδη γνωστό ότι παρόμοια είναι η κατάσταση που υφίσταται για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι και ο PRTF που αναφέρθηκε προηγουμένως. Ισχύουν τα παραπάνω και για το Gcn4;

Η πρωτεολυτική υδρόλυση συμπλόκων της πρωτεΐνης Gcn4 με διάφορους DNA στόχους, αλλά και ελεύθερης πρωτεΐνης, έδειξε κατ' αρχήν ότι η δομή του διμερούς είναι χαλαρότερη όταν αυτό δεν είναι συνδεδεμένο με DNA. Η διαμόρφωση του δε, όταν είναι δεσμευμένο σε μη συμμετρικό στόχο, διαφέρει απ' αυτήν που εμφανίζει κατά τη σύνδεση του με την ιδανική ψευδοπαλίνδρομη αλληλουχία. Συνεπώς είναι δυνατό η φύση του DNA στόχου να επάγει μεταβολές στη διαμόρφωση του διμερούς Gcn4. Με την τεχνική που εφαρμόστηκε δεν είναι εφικτό να διακριθεί αν οι μεταβολές αυτές αφορούν το μονομερές εκείνο που βρίσκεται συνδεδεμένο με την μη κατάλληλη πλευρά ή επεκτείνονται και στο άλλο που εφάπτεται στην ιδανική. Η συγγένεια που εμφανίζει το διμερές για τον ιδανικό στόχο, ελάχιστα διαφέρει από αυτήν για τον μη συμμετρικό. Επομένως δεν φαίνεται να μπορούν οι διαφορές στη ενεργοποίηση που παρατηρούνται μλεσω τέτοιων DNA στόχων, να αποδοθούν στην αλλαγή της συνάφειας του διμερούς γι' αυτούς εφ' όσον δεν υφίσταται κάτι τέτοιο.

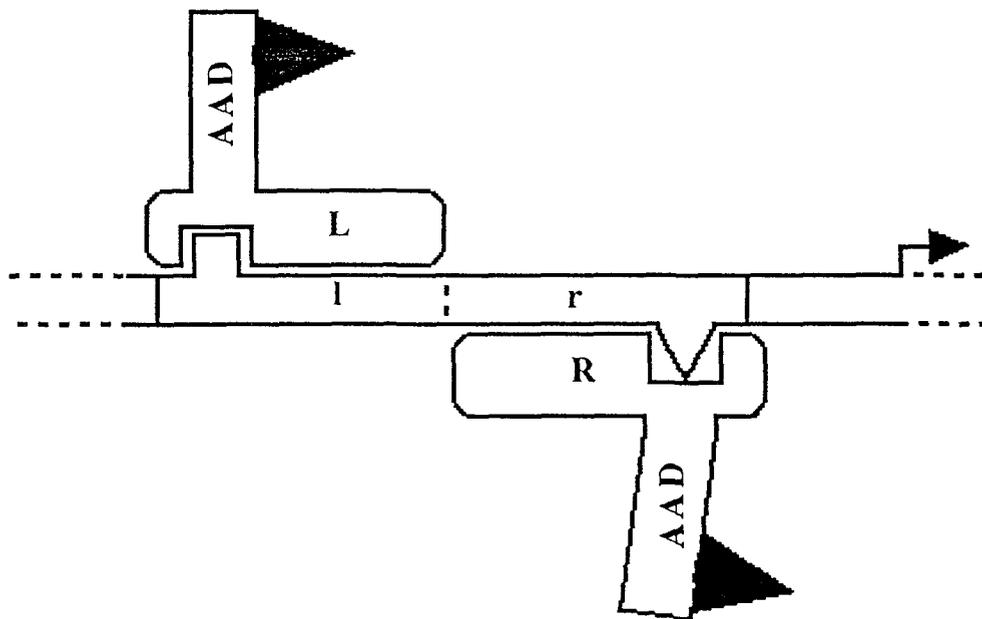
Τα δεδομένα που αναφέρθηκαν εδώ, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μεταβολή στην ικανότητα ενεργοποίησης που επάγεται από την ασυμμετρία του στόχου, οφείλεται στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Gcn4 που συνδέεται με το στόχο αυτό. Η διαμόρφωση αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει ή να επηρεάζει και την περιοχή ενεργοποίησης του μορίου. Είναι μάλιστα πιθανότερο, η σύνδεση σε μη παλίνδρομο στόχο να μην επιτρέπει στο μονομερές που εφάπτεται στην ακατάλληλη πλευρά να λάβει τη δομή που απαιτείται να έχει προκειμένου να ενεργοποιήσει αποτελεσματικά τη μεταγραφή (Σχήμα 9.2). Κατά συνέπεια λοιπόν, μια συντηρητικότερη διατύπωση του αποτελέσματος της ασυμμετρίας του DNA στόχου να είναι, όχι ότι αυτός εξαναγκάζει το ένα μονομερές να λάβει μια μη παραγωγική δομή, αλλά μάλλον δεν του επιτρέπει να αποκτήσει την κανονική λειτουργική διαμόρφωση.

Η κατάσταση σε μη παλίνδρομους DNA στόχους για την πρωτεΐνη Gcn4.

AAD: Οξίνη περιοχή ενεργοποίησης (Acidic Activation Domain).

L, R: Μονομερή Gcn4, φυσικού τύπου.

l, r: Πλευρές του ασύμμετρου DNA στόχου.



Σχήμα 9.2:

Η επαφή ενός μονομερούς Gcn4 με ακατάλληλη για σύνδεση πλευρά συνεπάγεται την αχρήστευση της αντίστοιχης περιοχής ενεργοποίησης.

Αποτελεί η πρωτεΐνη Afr1 συστατικό εναλλακτικού τρόπου επικοινωνίας του ενεργοποιητή Gcn4 με τη μεταγραφική μηχανή;

Η μεταλλαγή AFR1-1 επιλέχθηκε ώστε να έχει τα χαρακτηριστικά μεταλλαγής σε γονίδιο που κωδικοποιεί διαμεσολαβητή της μεταγραφής²⁸³. Το αρχικό σχήμα της επιλογής απαιτούσε την άρση της επιβράδυνσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την εξασθένηση του φαινομένου της τιτλοδότησης που προέρχεται από την υπερέκφραση του GCN4. Εκτός από αυτή την επίδραση, η μεταλλαγή AFR1-1 μειώνει την ενεργοποίηση της μεταγραφής από την πρωτεΐνη Gcn4 και από αρκετούς άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Gal4, ο Har2/Har3/Har4, ο Yap1, ο Cad1 και ο υποτιθέμενος dA:dT δεσμευόμενος παράγοντας, που έχουν ελεγχθεί^{184, 194, 278, 321}. Η ενεργοποίηση από VP16 δεν επηρεάζεται από τη μεταλλαγή αυτή ενώ η έκταση της επίδρασης στην ενεργοποίηση από Gcn4 φτάνει το 50%.

Σε μια μόνο περίπτωση η επίδραση της μεταλλαγής AFR1-1 στη μεταγραφή ενός γονιδίου μάρτυρα δεν ήταν δυσμενής ή έστω ανύπαρκτη. Σε αυτήν του γονιδίου URA3. Σε στελέχη AFR1-1, τα επίπεδα της ενεργότητας β-Γαλακτοσιδάσης που προέρχεται από χειμερικό γονίδιο με cis ρυθμιστικές αλληλουχίες του URA3, είναι διπλάσια αυτών που παρατηρούνται σε στελέχη φυσικού τύπου. Πώς ερμηνεύεται αυτή η φαινομενικά αντιφατική παρατήρηση; Η μεταγραφή στο γονίδιο URA3 ξεκινάει από αρκετά διαφορετικά σημεία του υποκινητή του²⁵³. Ο πληθυσμός των mRNAs που παράγονται είναι λοιπόν ετερογενής και ένα μεγάλο μέρος από αυτά έχουν εκτείνονται αρκετά προς την 5' κατεύθυνση ώστε να περιλαμβάνουν ένα μικρό αναγνωστικό πλαίσιο πριν από αυτό για την πρωτεΐνη Ura3. Το αναγνωστικό αυτό πλαίσιο έχει αρνητική επίδραση στη μετάφραση του κυρίως πλαισίου στα mRNAs υπάρχει. Ένας τρόπος επομένως, για να αυξηθεί η έκφραση του γονιδίου URA3 είναι να ξεκινάει η μεταγραφή συχνότερα από σημεία τέτοια ώστε το mRNA που παράγεται να μην περιέχει αυτό το ανασταλτικό πλαίσιο. Να μεταβληθεί δηλαδή το σημείο έναρξης της μεταγραφής.

Μεταλλαγές στο γονίδιο ADA3, έχει αναφερθεί ότι έχουν και τέτοιες επιδράσεις²³⁶. Μεταβάλλουν δηλαδή το σημείο έναρξης. Είναι δυνατό επομένως μια αλλαγή σε ένα διαμεσολαβητή να επηρεάσει τη συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης με τρόπο που να παρατηρηθούν και τέτοιες μεταβολές. Με βάση το γεγονός αυτό, προτείνεται ότι η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου URA3 σε στελέχη AFR1-1 οφείλεται στην αλλαγή του σημείου έναρξης της μεταγραφής εξαιτίας της μεταλλαγής AFR1-1 (Κεφάλαιο 7, Εικόνα 7.8), με τρόπο που να μην περιλαμβάνεται το μικρό

αναγνωστικό πλαίσιο στην πλειονότητα των μηνυμάτων, των οποίων και η μετάφραση πλέον ευνοείται. Επομένως η μεταλλαγή αυτή αποκτάει άλλο ένα χαρακτηριστικό που απαντά στην οικογένεια των διαμεσολαβητών και κάνει πιθανότερο το ενδεχόμενο, το αντίστοιχο γονίδιο να κωδικοποιεί για τέτοιο μόριο.

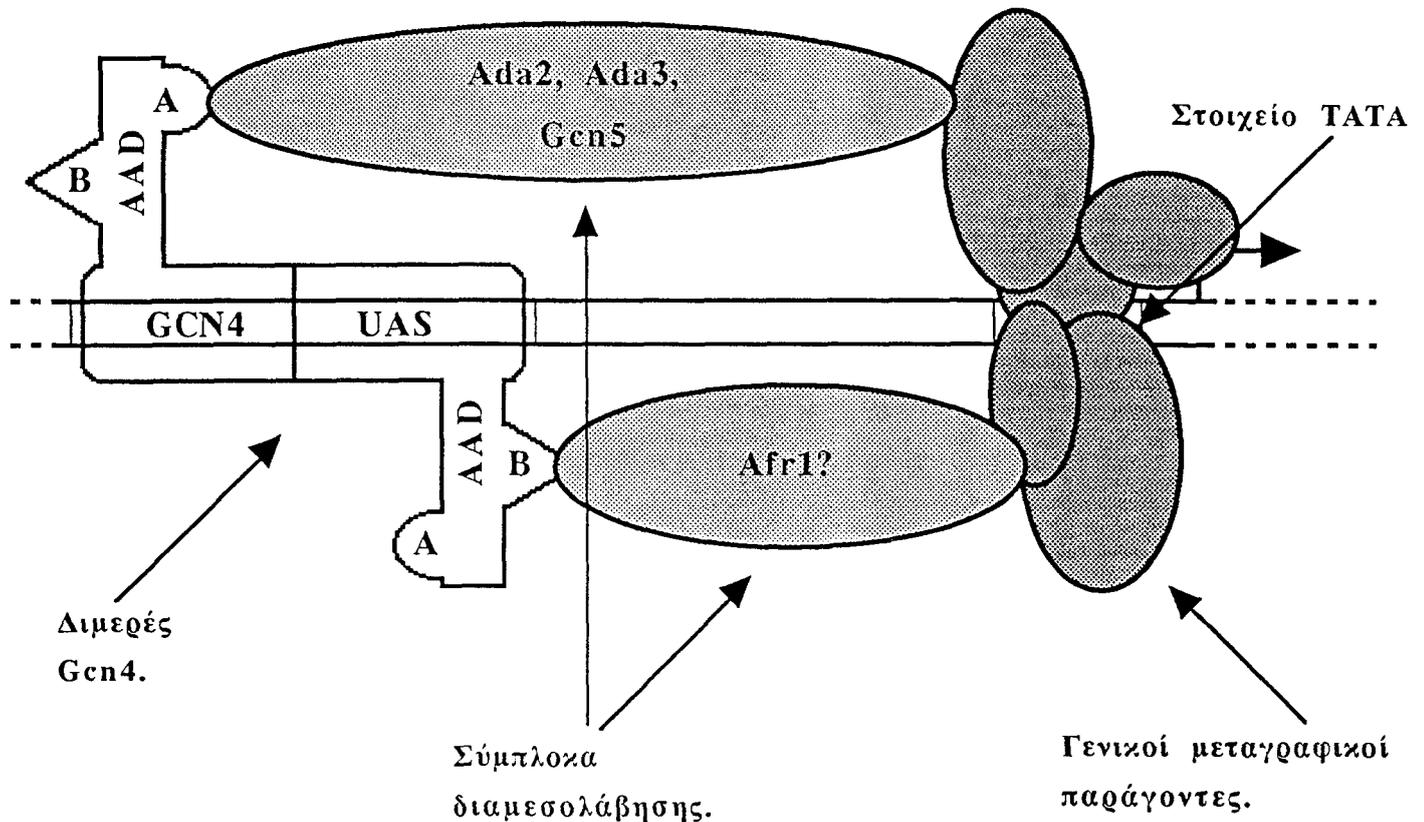
Είναι ενδιαφέρον που η μεταλλαγή AFR1-1 προκαλεί πτώση των επιπέδων της επαγωγής από την πρωτεΐνη Gcn4, στο μισό. Τόσο είναι το ποσοστό που μένει μετά από καταστροφή των γονιδίων GCN5, ADA2 και ADA3¹⁹¹. Μήπως λοιπόν το υπόλοιπο αυτό διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη Afr1; Παρόμοια συμπληρωματικότητα των επιδράσεων παρατηρείται και στην περίπτωση του ενεργοποιητή VP16. Ενώ η δράση του καταργείται σχεδόν από βλάβη στα τρία παραπάνω γονίδια, παραμένει ανεπηρέαστη σε γενετικό υπόβαθρο AFR1-1. Εναλλακτικά θα ήταν δυνατό η πρωτεΐνη αυτή να συμμετέχει στο ίδιο σύμπλοκο διαμεσολάβησης με αυτό που σχηματίζουν, τουλάχιστον οι πρωτεΐνες Gcn5/Ada2/Ada3. Ποιός είναι επομένως ο φαινότυπος ενός στελέχους AFR1-1 στο οποίο έχει κατασραφεί το γονίδιο GCN5;

Μια τέτοια καταστροφή είναι θανατηφόρα. Το δεδομένο τούτο υποδεικνύει ότι το συνδυασμένο αυτό γεγονός επιδρά στη μεταγραφή που διεξάγεται στο κύτταρο, γενικότερα και με τρόπο μη συμβατό με τη ζωή. Ας ληφθεί εδώ υπ' όψη ότι οι διαμεσολαβητές δεν είναι ειδικοί για ένα μόνο μεταγραφικό ενεργοποιητή αλλά εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων χωρίς φυσικά να είναι και καθολική η χρήση τους. Αυτό το τελευταίο τους διαχωρίζει από τους γενικούς παράγοντες της μεταγραφής οι οποίοι είναι απαραίτητη σε όλους τους υποκινητές.

Τα παραπάνω γενετικά δεδομένα συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη Afr1 αποτελεί συστατικό του εναλλακτικού τρόπου επικοινωνίας του Gcn4 με τη μεταγραφική μηχανή. Ειδικότερα προτείνεται, με βάση και τα όσα αναφέρθηκαν σε προηγούμενες σελίδες, ότι η πρωτεΐνη Afr1 συμμετέχει στην αποκατάσταση επαφής μεταξύ της περιοχής ενεργοποίησης του δεξιού μονομερούς της Gcn4, με το σύμπλοκο έναρξης. Η υποθετική, προς το παρόν, κατάσταση αυτή δείχνεται στο σχήμα 9.3. Η λειτουργική και δομική μελέτη του γονιδίου AFR1 καθώς και η βιοχημική και γενετική ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης Afr1 με την Gcn4, άλλους μεταγραφικούς ενεργοποιητές και βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, θα καθορίσει σαφέστερα το ρόλο της Afr1 στη διαδικασία της μεταγραφής.

Το μοντέλο.

A, B: Επιφάνειες που προβάλλονται από την περιοχή ενεργοποίησης
AAD: Οξινή περιοχή ενεργοποίησης (Acidic Activation Domain).
GCN4 UAS: Στόχος σύνδεσης της πρωτεΐνης Gcn4.
BD: Περιοχή σύνδεσης με το DNA (Binding Domain).



Σχήμα 9.3:

Παρουσιάζεται το μοντέλο που ενσωματώνει τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης μέσω της πρωτεΐνης Gcn4.

Κάθε περιοχή ενεργοποίησης προβάλλει δύο επιφάνειες στις οποίες εφάπτονται διαφορετικά σύμπλοκα διαμεσολάβησης.

Μονοκατευθυντική ενεργοποίηση από συμμετρικό ενεργοποιητή;

Η συμμετρία τόσο του DNA στόχου όσο και του διμερούς Gcn4 που συνδέεται σ' αυτόν, υποβάλλει την απόψη ότι ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός είναι ικανός να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή και προς τις δύο κατευθύνσεις του DNA. Παρόλο που υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την άποψη αυτή, δεν έχει στην πραγματικότητα παρατηρηθεί κάτι τέτοιο. Μάλιστα υπάρχουν περιπτώσεις που ενώ τίποτα θεωρητικά δεν εμποδίζει να συμβεί αυτό, εν' τούτοις δε συμβαίνει.

Ένα σχετικό παράδειγμα αποτελεί ο γενετικός τύπος των γονιδίων PET56, HIS3 και DED1^{189, 278}. Τα γονίδια PET56 και HIS3 μεταγράφονται κατά αντίθετες διευθύνσεις και τα κώδικα μεταφραστικής έναρξης των αναγνωστικών τους πλαισίων απέχουν μόνο κατά 150 περίπου νουκλεοτίδια¹⁸⁴. Επομένως οι *cis* ρυθμιστικές τους αλληλουχίες είναι κοινές ή τουλάχιστον επικαλύπτονται. Στο μέσο δε της μεταξύ τους απόστασης απαντά μια θέση σύνδεσης της πρωτεΐνης Gcn4. Ενώ το γονίδιο HIS3 βρίσκεται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο της πρωτεΐνης αυτής, το PET56 δε ρυθμίζεται καθόλου απ' αυτήν. Δεν είναι προφανής κάποιος λόγος για το γεγονός αυτό. Τι λοιπόν προκαλεί την παρατηρούμενη μονοκατευθυντική μεταγραφή από ένα συμμετρικό ενεργοποιητή; Ποιό είναι το εμπόδιο στην επαγωγή του PET56 από την πρωτεΐνη Gcn4;

Ο DNA στόχος δέσμευσης του Gcn4 που βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια PET56 και HIS3 δεν είναι ιδανική και ούτε καν παλίνδρομη. Η αριστερή της πλευρά είναι ιδανική αλλά η δεξιά αποκλείει από κάτι τέτοιο. Πρόκειται για την αλληλουχία 5'ATGACTCTT'3, η οποία στην υπογραμμισμένη θέση έχει Θυμίνη αντί για Αδενίνη. Το γονίδιο PET56 βρίσκεται προς το 5' άκρο της ακολουθίας αυτής, ενώ το HIS3 προς το 3'. Δεν είναι καθόλου ασυνήθιστο φαινόμενο η ύπαρξη μη ιδανικών στόχων στους υποκινητές γονιδίων που ελέγχονται από την πρωτεΐνη Gcn4. Το αντίθετο, αυτή η απόκλιση είναι ο κανόνας και δεν έχει βρεθεί γονίδιο που να φέρει ιδανικά παλίνδρομο στόχο στον υποκινητή του. Η έκταση δέ, της επαγωγής του κάθε γονιδίου κατά την απόκριση του συστήματος γενικού ελέγχου της βιοσυνθεσης των αμινοξέων ποικίλλει. Το ίδιο και η επαγωγή μέσω υπερέκφρασης του γονιδίου GCN4. Επιπρόσθετα, ένα από τα πιο εντυπωσιακά γεγονότα είναι ότι η ενεργοποίηση κάποιων από τα γονίδια που κωδικοποιούν βιοσυνθετικά ένζυμα και ελέγχονται από τη πρωτεΐνη Gcn4, εμφανίζεται ευαίσθητη στην απουσία διαμεσολαβητών όπως οι πρωτεΐνες Gcn5 και Ada2, ενώ αντίθετα κάτι τέτοιο είναι αδιάφορο για την έκφραση άλλων. Ας προσπαθήσουμε να ερμηνεύσουμε τα φαινόμενα αυτά, εμπλέκοντας μερικές από τις απόψεις που έχουν

συζητηθεί σε προηγούμενα σημεία.

Θα πρέπει πρώτα να αναφερθούμε στην επίδραση της θέσης του στοιχείου TATA στην ενεργοποίηση¹⁸⁹. Τα πειράματα απομάκρυνσης και προσέγγισης του στοιχείου αυτό στο DNA στόχο σύνδεσης της Gcn4 πρωτεΐνης, έδειξαν ότι η γωνία-φάση που σχηματίζει το στοιχείο με το στόχο επιδρά στην έκταση της ενεργοποίησης. Η χωροδιάταξη, αναφορικά με την αλληλουχία σύνδεσης του διμερούς Gcn4, του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής που συγκροτείται πάνω στο στοιχείο TATA, καθορίζεται από τη στροφή που σχηματίζει το στοιχείο αυτό με το στόχο. Η επίδραση στη μεταγραφή της παραπάνω στροφής, είναι δυνατό να αποδοθεί στο ότι κάποιες διαμορφώσεις ευνοούν την επικοινωνία του ενεργοποιητή με τους γενικούς παράγοντες και κάποιες άλλες τη δυσχερύνουν.

Αν το παραπάνω επιχείρημα συνδυαστεί με την ύπαρξη ενός ασύμμετρου στόχου όπου οι δυνατότητες για επαφές ενεργοποιητή-βασικών παραγόντων λιγοστεύουν λόγω παροπλισμού του ενός μονομερούς, ίσως συγκεκριμένες γωνίες που σχηματίζει το στοιχείο TATA με ένα ασύμμετρο στόχο, να καταργούν την ενεργοποίηση. Το στοιχείο TATA του γονιδίου PET56 βρίσκεται, αναφορικά με το στόχο του Gcn4, σχεδόν αντιδιαμετρικά με το TATA του HIS3. Μόνο το ένα μονομερές του διμερούς Gcn4 που συνδέεται με το DNA στόχο που βρίσκεται στον υποκινητή του HIS3, είναι λειτουργικό. Είναι το αριστερό σχετικά με το HIS3, ή το δεξιό για το PET56. Η επιφάνεια της περιοχής ενεργοποίησης που προβάλλει το μονομερές αυτό προς το HIS3, απαιτεί το σύμπλοκο Gcn5/Ada/Ada3, για διαμεσολάβηση της δράσης της. Αντίθετα η δράση της επιφάνειας που προβάλλεται προς την κατεύθυνση του γονιδίου PET56 διοχετεύεται με διαφορετικό τρόπο, πιθανά με τη συμμετοχή της πρωτεΐνης Aft1.

Η διάταξη του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής που καθορίζεται από τη θέση του στοιχείου TATA, ίσως είναι κρίσιμη για την αποκατάσταση επικοινωνίας με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή. Είναι επομένως πιθανό το TATA του PET56 να μην είναι στην κατάλληλη φάση για να υπάρχει η δυνατότητα το λειτουργικό μονομερές Gcn4, να επιδράσει με το σύμπλοκο έναρξης που βρίσκεται στο TATA αυτό. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μονοκατευθυντική μεταγραφή που παρατηρείται και αφορά μόνο το HIS3. Η αναγκαιότητα για τέτοιου είδους μονοκατευθυντική ενεργοποίηση είναι προφανής σε οργανισμούς με γονιδίωμα πυκνά κατειλημμένο από γονίδια, όπως αυτό του σακχαρομύκητα, όπου η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου δεν θα πρέπει να παρεμβάλλεται στην έκφραση γειτονικών που ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο. Αν κάτι τέτοιο επιτρεπόταν να συμβεί, οι επιπτώσεις στη λειτουργία του κυττάρου ίσως να ήταν πολύ δυσμενείς.

Η εκδοχή που αναπτύχθηκε εδώ οδηγεί σε μερικές προβλέψεις που είναι δυνατό

να ελεγχθούν πειραματικά. Κατ' αρχή θα πρέπει η μεταφορά του στοιχείου TATA του PET56, σε θέση ευνοϊκή, να το θέσει και αυτό κάτω από τον έλεγχο του Gcn4. Η αντικατάσταση του ασύμμετρου DNA στόχου για το Gcn4, με τον ιδανικό θα πρέπει πιθανά να επηρεάσει την έκφραση του PET56. Για την πρώτη περίπτωση της μετακίνησης του TATA, η μεταγραφική επαγωγή του PET56 που ενδεχομένως θα παρατηρηθεί θα πρέπει να είναι ανεξάρτητη της αριτιότητας ή όχι του συμπλόκου διαμεσολάβησης Gcn5/Ada/Ada3, εφ' όσον θα οφείλεται στο δεξί, σε σχέση με το γονίδιο αυτό, λειτουργικό μονομερές του Gcn4.

Η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου HIS3 είναι ισχυρά εξαρτημένη από την παρουσία των πρωτεϊνών Gcn5, Ada και Ada3. Παρόλα αυτά η εξάρτηση από τις ίδιες αυτές πρωτεΐνες, της επαγωγής άλλων επίσης ελεγχόμενων από τον μεταγραφικό παράγοντα Gcn4, γονιδίων, διαφέρει σε έκταση⁸⁹. Αυτή η διαφοροποίηση θα μπορούσε να αποδοθεί στη φύση της αλληλουχίας δέσμευσης του Gcn4 που φέρουν τα γονίδια αυτά. Το τελικό αποτέλεσμα που προκύπτει, είναι η αύξηση του ρεπερτορίου των πρότυπων ρύθμισης που προσφέρονται από ένα συγκεκριμένο ενεργοποιητή.

Οι υποκινητές των γονιδίων φαίνεται να εξελίχθηκαν με τρόπο που να φέρουν τέτοιες ρυθμιστικές αλληλουχίες και με τέτοια διάταξη, που να εξασφαλίζεται η σωστή έκταση της επαγωγής, ανάλογα πάντα με τις επιταγές της σχετικής φυσιολογίας.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A) Μια εναλλακτική μέθοδος για την κλωνοποίηση επικρατών αλληλόμορφων, γονιδίων του *Sacharomyces cerevisiae*

Η μεγαλύτερη δυσκολία στην κλωνοποίηση μιας επικρατούς μετάλλαξης στο σακχαρομύκητα είναι η ανάγκη κατασκευής μιας βιβλιοθήκης του γονιδιώματος του μεταλλαγμένου στελέχους¹⁰³. Για να αποφύγουμε την ανάγκη της κατασκευής βιβλιοθήκης, παρουσιάζουμε μια εναλλακτική λύση η οποία βασίζεται στην ικανότητα του σακχαρομύκητα να κάνει ακριβή και αποδοτικό ομόλογο ανασυνδιασμό¹².

Μια επικρατής μετάλλαξη μπορεί να κλωνοποιηθεί μετασχηματίζοντας φυσικού τύπου κύτταρα σακχαρομύκητα με γενωμική βιβλιοθήκη ενός στελέχους φυσικού τύπου ταυτόχρονα με γενωμικό DNA προερχόμενο από το μεταλλαγμένο στέλεχος και επιλέγοντας για μετασχηματισμένα κύτταρα με το μεταλλαγμένο φαινότυπο²⁸⁴.

Αυτά αντιπροσωπεύουν τα ακόλουθα πιθανά γεγονότα:

- i) Ανασυνδιασμό ανάμεσα στο τμήμα του γενομικού DNA του μεταλλαγμένου στελέχους που περιέχει το μεταλλαγμένο γονίδιο και στον αντίστοιχο τόπο στο γονιδίωμα του στελέχους δέκτη, φυσικού τύπου.
- ii) Ανασυνδιασμό μεταξύ αυτών των DNA και ενός πλασμιδιακού κλώνου της βιβλιοθήκης που περιέχει το ενδιαφέρον γονίδιο, αν αυτά συνυπάρχουν στο ίδιο κύτταρο.
- iii) Μια αυθόρμητη μεταλλαγή που δίνει το μεταλλαγμένο φαινότυπο.

Η τέταρτη δυνατότητα όπου μερικά επιπρόσθετα αντίγραφα ενός γονιδίου φυσικού τύπου θα είχαν ως αποτέλεσμα τον ίδιο μεταλλαγμένο φαινότυπο, θεωρείται απίθανη και θα αποτελούσε πρόβλημα ακόμη και για την κλασσική προσέγγιση. Η συνμεταβίβαση του μεταλλαγμένου φαινότυπου με το πλασμίδιο θα διευκόλυνε την επιλογή των συμβάντων της δεύτερης κατηγορίας τα οποία πιθανόν οδηγούν στην απομόνωση του μεταλλαγμένου γονιδίου που μας ενδιαφέρει.

Αρχικά ερευνήσαμε την πιθανότητα να διορθώσουμε μια μεταλλαγή σ' ένα γνωστό γονίδιο που βρίσκεται σ' ένα κεντρομεριδιακό, χαμηλής αντιπροσώπευσης πλασμίδιο, χρησιμοποιώντας την παραπάνω στρατηγική του ανασυνδιασμού μεταξύ ενός πλασμιδίου και ενός τμήματος γενομικού DNA.

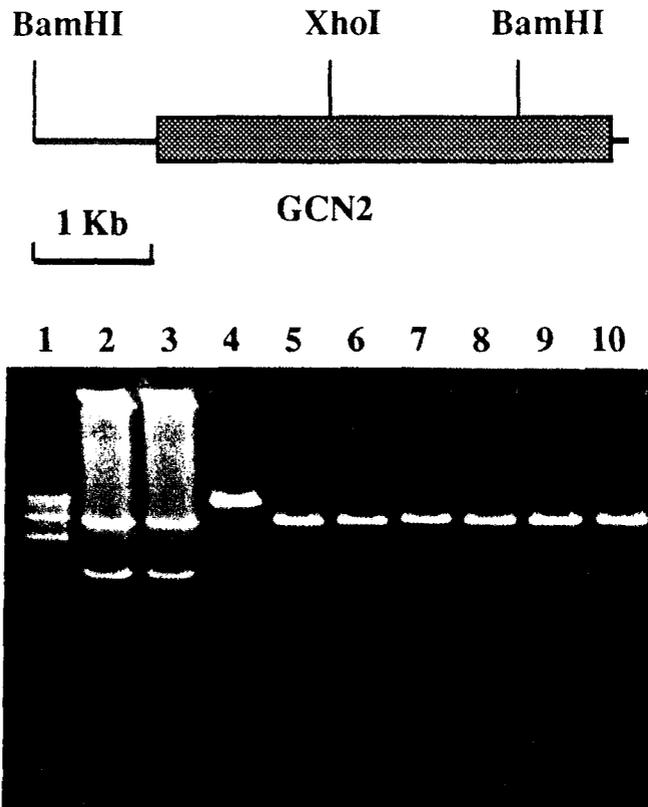
Ένα στέλεχος *gcn2Δ, ura3-52*, ευαίσθητο σε 10 mM 3-αμινοτριαζόλης (3-AT)²²⁵, συνμετασχηματίστηκε με 20 μg ενός πλασμιδίου με γονίδιο μάρτυρα επιλογής το *URA3*

(YCp50) που περιέχει ένα ελαττωματικό γονίδιο GCN2, και με 50μg γενομικού DNA από το στέλεχος φυσικού τύπου S288C. Το γονίδιο GCN2 του πλασμιδίου απενεργοποιήθηκε (μεταλλάχθηκε) υδρολύοντας με το περιοριστικό ένζυμο XhoI, γεμίζοντας και συνδέοντας τη μοναδική θέση XhoI μέσα στο ανοιχτό πλαίσιο κωδικής ανάγνωσης. Από 20.000 μετασχηματισμένα κύτταρα, 7 ήταν ανθεκτικά στην 3-AT μετά από πέρασμα των αποικιών σε τρυβλία με ελάχιστο θρεπτικό που περιείχε 10mM 3-AT. Σε 6 περιπτώσεις αυτή η ανθεκτικότητα αποδείχθηκε ότι προέρχεται από το πλασμίδιο μετά από έξωση του πλασμιδίου που έγινε με μεταχείριση των μετασχηματισμένων κυττάρων με 1 mg/ml 5-φλουροοροτικό οξύ (5-FOA)¹⁰³. Τα πλασμίδια αυτών των 6 κλώνων απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν για την πιστότητα της επιδιόρθωσης, δηλαδή την αποκατάσταση της θέσης για το περιοριστικό ένζυμο XhoI. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα Π.1, όπου και είναι φανερή η επιδιόρθωση της θέσης XhoI. Σ' αυτό το πείραμα, η αποκατάσταση δεν θα μπορούσε να προέρχεται από μια ανταλλαγή πληροφορίας ανάμεσα στο πλασμίδιο, το οποίο φέρεται από όλα τα μετασχηματισμένα κύτταρα και το γονιδίωμα των ίδιων των κυττάρων, αφού το μετασχηματισμένο στέλεχος έχει εκτενή έλλειψη του γονιδίου GCN2.

Προκειμένου να προσομοιώσουμε συνθήκες για την κλωνοποίηση επικαρωτών αλληλόμορφων, ακολουθήσαμε την εξής προσέγγιση:

Ένα *ura3-52, leu2-1* στέλεχος (RH116) μετασχηματίστηκε με 50 μg μιας βιβλιοθήκης γενομικού DNA που προέρχεται από το ίδιο στέλεχος, κατασκευασμένης πάνω σε ένα URA3 πλασμίδιο (pRS316), και με 100μg γενομικού DNA που απομονώθηκε από ένα στέλεχος φυσικού τύπου, το S288C. Η πληρότητα της βιβλιοθήκης ήταν περίπου 8000 ανεξάρτητοι πλασμιδικοί κλώνοι με ένα ένθεμα μεγέθους περίπου 7Kb. Το μέγεθος του γενομικού DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν περίπου 50Kb. Μετά το μετασχηματισμό, τα κύτταρα αφέθηκαν για 6 ώρες σε υγρό θρεπτικό ελάχιστης σύστασης που περιείχε 2mM Λευκίνη, πριν ν' απλωθούν σε τρυβλία ελάχιστης σύστασης για άμεση επιλογή για πρωτοτροφικούς κλώνους Ουρακίλης και Λευκίνης. Περίπου 100.000 Ura⁺ μετασχηματισμένα κύτταρα, όπως μετρήθηκε από το άπλωμα ενός κλάσματος 1/1000 των κυττάρων σε *min* τρυβλία, απλώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν 2mM Λευκίνη. Απ' αυτά, 68 ήταν επίσης πρωτοτροφικά για τη Λευκίνη. Αυτά τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία ελάχιστης σύστασης που περιείχαν 0.3mM Ura, 2mM Leu, 1mg/ml 5-FOA και σε 5 περιπτώσεις η πρωτοτροφεία για τη Λευκίνη συνμεταβιβαζόταν με το πλασμίδιο (Πίνακας Π.1). Τα πλασμίδια αυτών των μετασχηματισμένων κλώνων απομονώθηκαν και αποδείχτηκε ότι συμπληρώνουν και τις δυο αυξοτροφείες για Ουρακίλη και Λευκίνη όταν ξαναεισάγονται σ' ένα στέλεχος *ura3-52* και *leu2-1*.

Η επιδιόρθωση του γονιδίου GCN2



Εικόνα Π.1:

Επισκευή ενός αλληλόμορφου του *gcn2* μετά από συνμετασχηματισμό με γενομικά τμήματα DNA.

Επάνω: Γραφική αναπαράσταση του γονιδιακού τόπου **GCN2** όπου φαίνεται η θέση της μοναδικής θέσης **XhoI** και των ακραίων **BamHI**.

Κάτω: Περιοριστική ανάλυση των πλασμιδίων που φέρουν το **GCN2**.

Θέση 1: Υδρόλυση του DNA του φάγου λ από HindIII (μάρτυρας μεγέθους)

Θέση 2: Το πλασμίδιο YCr50 που φέρει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *gcn2* που προήλθε από την καταστροφή της θέσης XhoI, μετά από υδρόλυση με BamHI και XhoI.

Θέση 3: Διπλή υδρόλυση BamHI/XhoI ενός πλασμιδίου που απομονώθηκε από ένα μετασχηματισμένο κλώνο ευαίσθητο στην 3-AT. Δεν παρατηρείται καμία επισκευή της θέσης XhoI.

Θέσεις 4-9: Διπλή υδρόλυση BamHI/XhoI των πλασμιδίων που απομονώθηκαν από τους ανθεκτικούς στην 3-AT μετασχηματισμένους κλώνους. Σε όλες τις περιπτώσεις, η θέση της XhoI έχει επισκευαστεί.

Θέση 10: Υδρόλυση μάρτυρας με BamHI/XhoI του YCr50 που φέρει το γονίδιο GCN2 φυσικού τύπου.

Πίνακας Π.1:

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της εφαρμογής της μεθόδου.

	RH1168 γενωμική βιβλιοθήκη	
	+S288C	+RH1168
	γενωμικό DNA	γενωμικό DNA
<hr/>		
Μετασηματισμένα στελέχη.		
<hr/>		
Ura ⁺ a	100,000	100,000
Ura ⁺ , Leu ⁺ a	68	0
5-FOA ^r , Leu ⁺ b	63	—
5-FOA ^r , Leu ⁻ b	5	—

Μια γενωμική βιβλιοθήκη που προήλθε από κύτταρα **RH1168** εισάχθηκε στο στέλεχος **RH1168** μαζί με γενωμικό DNA είτε του στελέχους **S288C** (φυσικός τύπος), είτε του στελέχους **RH1168** (*ura3-52, leu2-1*). Εδώ παρουσιάζεται ο αριθμός πρωτοτροφικών μετασηματισμένων κυττάρων για κάθε μεταβολίτη. Η μεταβίβαση της πρωτοτροφείας για Λευκίνη εξετάσθηκε μετά από ενάντια επιλογή για το γονίδιο μάρτυρα **URA3** που φέρει το πλασμίδιο.

Επιπλέον, αυτά τα 5 πλασμίδια έφεραν αλληλουχίες DNA που περιείχαν το γονίδιο LEU2, όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση μέσω περιοριστικής υδρόλυσης. Τελικά, σ' ένα πείραμα ελέγχου, όπου το γενωμικό DNA που προερχόταν από το στελέχος S288C, αντικαταστάθηκε με DNA που προήλθε από το στέλεχος RH1168, δε βρέθηκαν μετασχηματισμένοι κλώνοι πρωτοτροφικοί για τη Λευκίνη.

Η συνολική συχνότητα χρήσιμων ανασυνδιαστικών γεγονότων μεταξύ των μετασχηματισμένων κλώνων σακχαρομύκητα υπολογίστηκε σε 0.5×10^{-4} . Αυτή η συχνότητα είναι πολύ μεγαλύτερη απ'ότι θα είχαμε προβλέψει με απλό πολλαπλασιασμό της πιθανότητας συνύπαρξης μέσα σ'ένα κύτταρο ενός ορισμένου πλασμιδιακού κλώνου και του συγγενούς του τμήματος γενωμικού DNA, με την πιθανότητα ενός παραγωγικού ανασυνδιασμού ανάμεσα σ'αυτα τα δύο. Προφανώς, περισσότερα από 1 πλασμίδια της βιβλιοθήκης και τμήματα γενωμικού DNA μπαίνουν σ' ένα κύτταρο κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού.

Η μέθοδος που περιγράφεται εδώ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση αντι της μεθόδου επιδιόρθωσης εγκοπής-έλλειψης (Gap-repair)¹⁰³ προκειμένου να απομονωθούν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα γνωστών γονιδίων από το γονιδίωμα μεταλλαγμένων στελεχών, όταν δεν υπάρχουν κατάλληλες θέσεις για υδρόλυση από ένζυμα περιορισμού ώστε να δημιουργηθεί ένα κατάλληλο άνοιγμα-έλλειψη μέσα στο γονίδιο. Σύμφωνα μ'αυτή την εναλλακτική, το γενωμικό DNA του μεταλλαγμένου στελέχους μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με ένα πλασμίδιο που φέρει το φυσικό τύπο του γονιδίου που μας ενδιαφέρει για το συνμετασχηματισμό κυττάρων μεταλλαγμένου ή φυσικού τύπου ανάλογα με το αν το αλληλόμορφο είναι υποτελής ή επικρατές. Τα πλασμίδια που επιφέρουν το μεταλλαγμένο φαινότυπο μπορούν πλέον να απομονωθούν και να αναλυθούν.

B) Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

pBluescript KSII+,

pUC18: Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τους συνήθεις χειρισμούς υποκλωνοποίησης και καθορισμού της πρωτοταγούς δομής του DNA. Γονίδιο επιλογής στην *E. coli*, το bla (ampR) και για τα δυο. Το πρώτο απο αυτά επιτρέπει και μια σειρά επιπροσθέτων χειρισμών του κλωνοποιημένου ενθέματος όπως *in vitro* μεταγραφή και παραγωγή υπό κατάλληλες συνθήκες, μονόκλωνου DNA.

YCp50: Πρόκειται για ένα πλασμίδιο που είναι δυνατό να διατηρηθεί και στο βακτηρίδιο *E. coli* και στο σακχαρομύκητα σε 1-3 αντίγραφα. Είναι πλασμίδιο με γονίδιο επιλογής το URA3.

YEp24,

YEp13: Αυτά τα πλασμίδια λόγω του αυξημένου αριθμού αντιγράφων τους στο σακχαρομύκητα (40-70) είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για υπερέκφραση γονιδίων στο σακχαρομύκητα. Γονίδιο επιλογής το URA3 για το πρώτο και το LEU2 για το δεύτερο.

pDB20: Εκτός του ότι αυτό το πλασμίδιο υπεραντιπροσωπεύεται στο σακχαρομύκητα, φέρει και τις αλληλουχίες του υποκινητή και του σήματος τερματισμού της μεταγραφής που προέρχονται από το γονίδιο ADHI του σακχαρομύκητα. Πρόκειται για ένα πολύ ισχυρό υποκινητή που μπορεί να οδηγήσει σε υψηλή έκφραση γονιδίων που ακολουθούν. Γονίδιο επιλογής το URA3.

pRS 314,

pRS 315,

pRS 316: Τα πλασμίδια αυτά αποτελούν εξελιγμένες κατασκευές ίδιου τύπου με το YCp50 που όμως επιτρέπουν ευκολότερο χειρισμό κατά τις υποκλωνοποιήσεις. Το καθένα απ' αυτά δεν επιτρέπει επιλογή μετασηματισμένων κυττάρων σακχαρομύκητα που είναι αυξότροφα για διαφορετικούς μεταβολιτές (τροπτοφάνη, λευκίνη, ουρακίλη αντίστοιχα).

YEp 351,

YEp 352: Πρόκειται για πλασμίδια αντίστοιχα του YEp 24 αλλά με χαρακτηριστικά που ευκολύνουν τη χρήση τους για υποκλωνοποιήσεις.

YCp 50 LacZ:

Είναι ένα τροποποιημένο πλασμίδιο YCp 50 που φέρει ολόκληρο το οπερόνιο Lac ώστε να επιτρέπει την έκφραση της β-Γαλακτοσιδάσης στο σακχαρομύκητα κάτω από την επίδραση εγγύς ρυθμιστικών στοιχείων ενός γονιδίου του οποίου είναι επιθυμητό να καθοριστεί η ρύθμιση.

URA3-LacZ**GCN4-LacZ**

Τα πλασμίδια αυτά προέρχονται από το YCp-LacZ και φέρουν ολόκληρο το οπερόνιο Lac κάτω από τον έλεγχο *cis* (εγγύς) ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων URA3 και GCN4 αντίστοιχα.

VC8

VC11 Τα πλασμίδια αυτά προέρχονται από το εργαστήριο του Kevin Struhl και δόθηκαν από το Δημήτρη Τζαμαρία. Είναι χαμηλής αντιπροσώπευσης στο σακχαρομύκητα και φέρουν το γονίδιο-μάρτυρα επιλογής URA3. Επιπρόσθετα φέρουν και το Lac οπερόνιο όπου το γονίδιο της β γαλακτοσιδάσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός τροποποιημένου υποκινητή που προέρχεται από το γονίδιο HIS3. Ο υποκινητής αυτός περιέχει για μεν το πλασμίδιο VC8 την τέλεια DNA αλληλουχία δέσμευσης της Gcn4 πρωτεΐνης, για δε το VC11 μια DNA αλληλουχία ακατάλληλη για δέσμευση της πρωτεΐνης αυτής. Οι αλληλουχίες αυτές εντοπίζονται ανάμεσα σε μοναδικές θέσεις υδρόλυσης για τα ένζυμα περιορισμού BamHI και EcoRI.

CS15 Και αυτό το πλασμίδιο αποκτήθηκε με τον ίδιο τρόπο, όπως και τα προηγούμενα. Πρόκειται για ένα πλασμίδιο που φέρει το αναγνωστικό πλαίσιο για την πρωτεΐνη Gcn4 αμέσως μετά από τον υποκινητή του γονιδίου DED1, ένα σχετικά ισχυρό, συνεχώς ενεργό υποκινητή. Είναι πλασμίδιο χαμηλής αντιπροσώπευσης στο σακχαρομύκητα με γονίδιο επιλογής το URA3. Επίσης, το πλασμίδιο αυτό φέρει πριν το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου GCN4 και μετά τον υποκινητή του γονιδίου DED1, την DNA αλληλουχία του υποκινητή της βακτηριακής πολυμεράσης SP6. Αυτό καθιστά δυνατή την παραγωγή *in vitro*, mRNA του GCN4.

Τα τρία τελευταία πλασμίδια είναι βασισμένα στο φορέα YCp88 ο οποίος είναι αντίστοιχος του YCp50.

Λεπτομερής αναφορές και χάρτες για τα πλασμίδια που περιγράφονται εδώ μπορούν να αναζητηθούν στις εξής πηγές: 12, 103, 260, 42.

Γ) Τα ολιγονουκλεοτίδια

ι) Οι DNA στόχοι που περιγράφονται στο κείμενο του Κεφαλαίου 8:

	Ονομασία
1) 5'-GATCCATGG-ATGACTCAT-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TACTGAGTA-AAAAAACTTAA-5'	(GCRE),
2) 5'-GATCCATGG-AT <u>I</u> ACTCAT-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TAATGAGTA-AAAAAACTTAA-5'	(-2T/C),
3) 5'-GATCCATGG-ATGACT <u>A</u> AT-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TACTGATTA-AAAAAACTTAA-5'	(+2A)
4) 5'-GATCCATGG-AT <u>I</u> A <u>G</u> TCAT-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TAATGAGTA-AAAAAACTTAA-5'	(-2T)
5) 5'-GATCCATGG-A <u>A</u> GACTC <u>I</u> T-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TTCTGAGAA-AAAAAACTTAA-5'	(-3A/+3T)
6) 5'-GATCCATGG-AT <u>I</u> ACT <u>A</u> AT-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TAATGATTA-AAAAAACTTAA-5'	(-2T/+2A)
7) 5'-GATCCATGG-A <u>A</u> GACT <u>A</u> AT-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TTCTGATTA-AAAAAACTTAA-5'	(-3A/+2A)
8) 5'-GATCCATGG-AT <u>I</u> ACTC <u>I</u> T-TTTTTTGG-3' 3'-GTACC-TAATGAGAA-AAAAAACTTAA-5'	(-2T/+3T)

Το εννεαμερές που αποτελεί την καθεαυτό αλληλουχία δέσμευσης φαίνεται στο κέντρο, απομονωμένο από την υπόλοιπη αλληλουχία του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου. Το κεντρικό C γράφεται με έντονο χαρακτήρα και οι αλλαγές του κάθε στόχου σε σχέση με τον τέλειο (GCRE), είναι υπογραμμισμένες στη μια μόνο αλυσίδα.

ii) Άλλα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν:

	<u>Όνομασία</u>
1) 5'-ATTATTGATAGTATAGGG-3'	(BSTEII-45,)
2) 5'-GCAGCACGTTTCCTTATATGTAGC-3'	(UPE1)
3) 5'-GGAAACCGGTTTTAATAGAAGAGACGGATCTGG-3'	(FC11)
4) 5'-GGGGTACCGAAATCTTGAAAGTATTC-3'	(TPK2/A)
5) 5'-GGGGTACCAGATCTAATCCACAAC-3'	(TPK2/B)

Από τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά:

Το **πρώτο** χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενθεμάτων στη θέση περιορισμού για το ένζυμο BstEII, που υπάρχει στο γονίδιο GCN4.

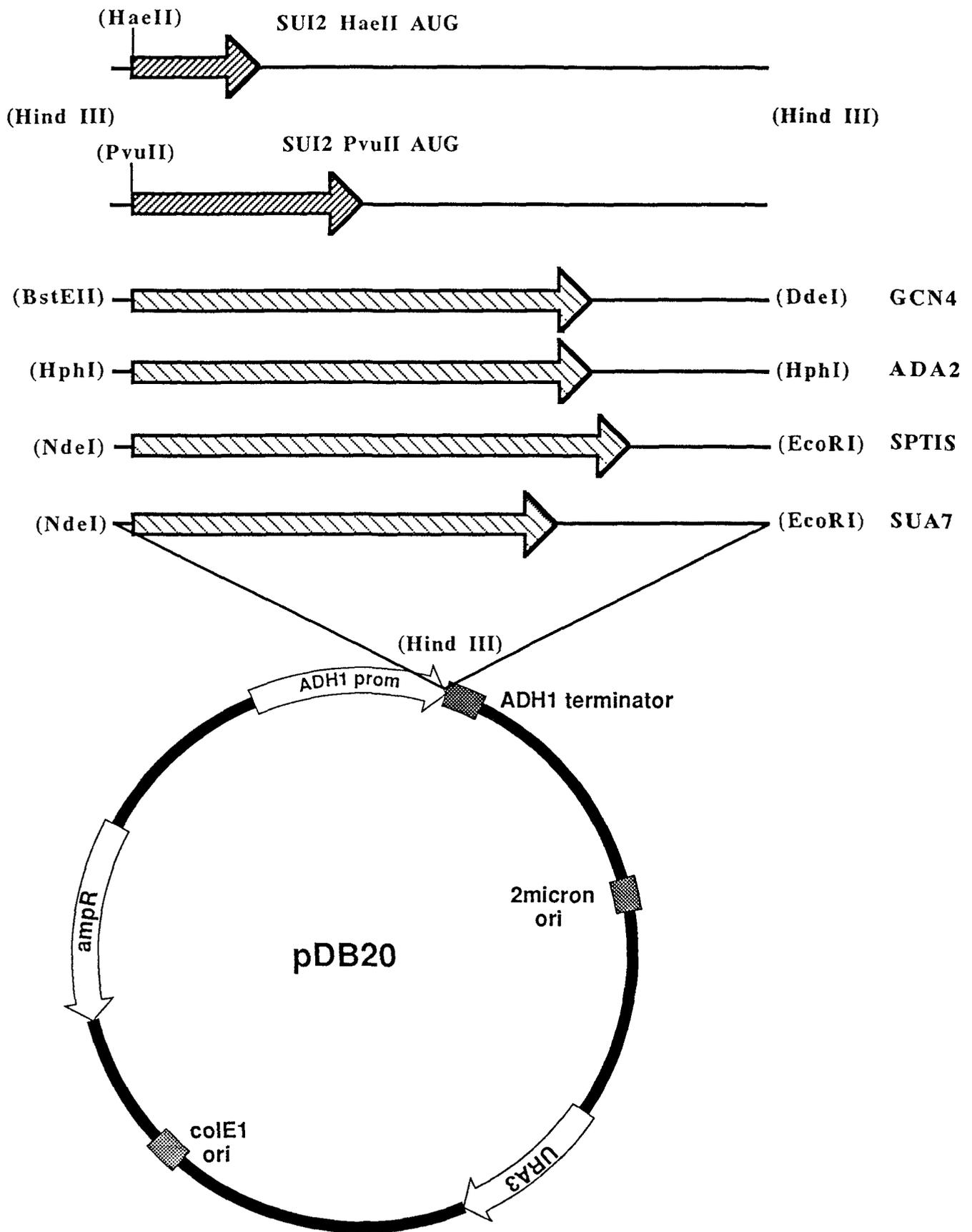
Το **δύετο** για την ανάλυση επέκτασης εκκινητή (primer extension) του γονιδίου URA3.

Το **τρίτο** για την κλωνοποίηση του γονιδίου SUI3 που κωδικοποιεί για τη β υπομονάδα του eIF2.

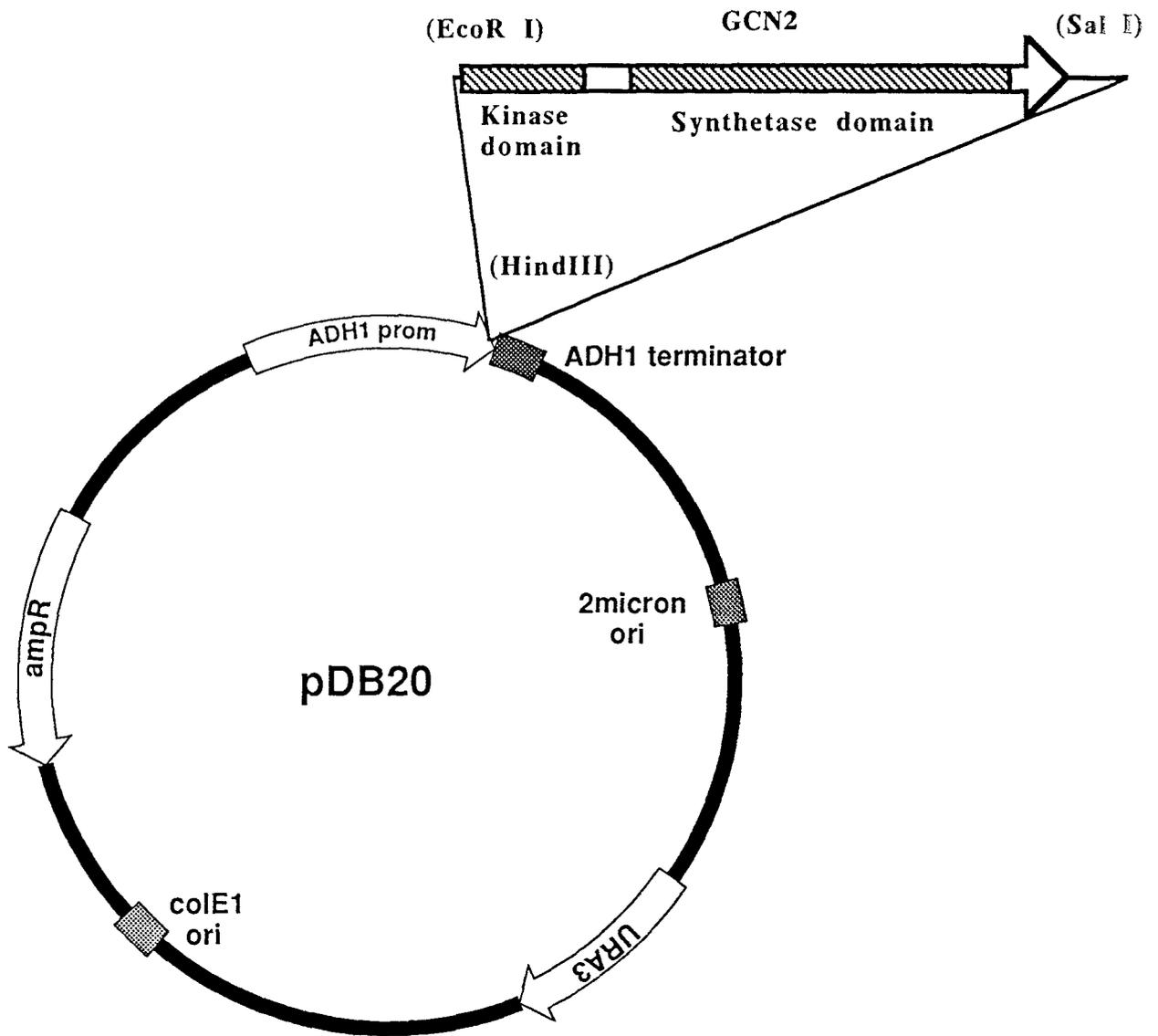
Το **τέταρτο** και το **πέμπτο** για πολλαπλασιασμό μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), αλληλουχιών για το γονίδιο TPK2.

Δ) Οι πλασμιδιακοί κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν

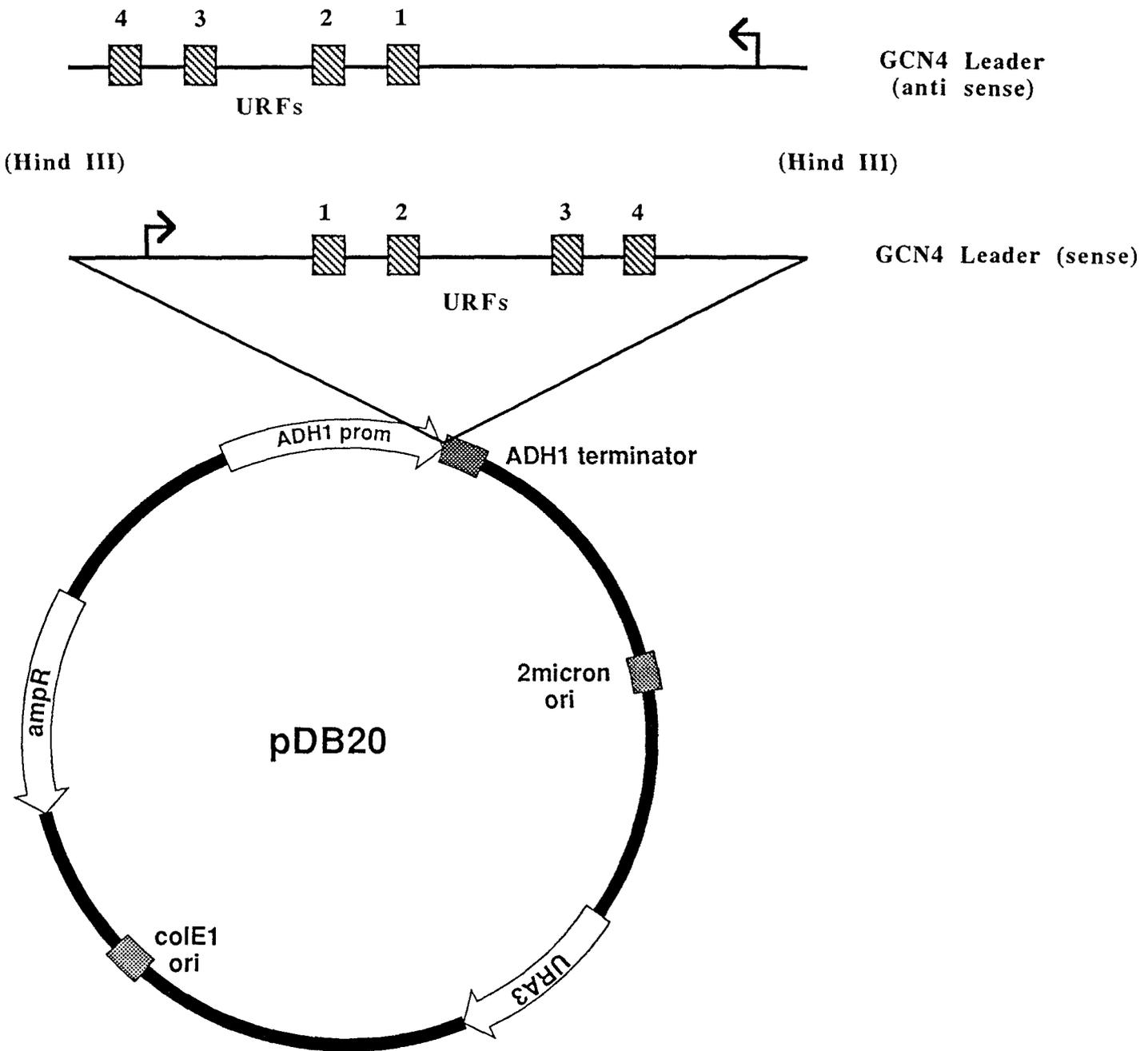
Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται οι πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που περιγράφονται στη διατριβή. Είναι ομαδοποιημένοι σύμφωνα με κοινά δομικά τους στοιχεία, όπως για παράδειγμα ο πλασμιδιακός φορέας που αποτέλεσε τη βάση για την κατασκευή τους. Η ονομασία του φορέα αυτού αναφέρεται στο κέντρο του κάθε πλασμίδιου. Οι φορείς περιγράφονται σε άλλο σημείο του Παραρτήματος (B). Κάθε πλασμίδιο συνοδεύεται από μια σύντομη περιγραφή της χρήσης για την οποία κατασκευάστηκε. Όσον αφορά τις θέσεις αναγνώρισης από ενδονουκλεάσες περιορισμού, σημειώνονται μονάχα αυτές που έχουν σχέση με την κατασκευή του κάθε πλασμίδιου (Οι θέσεις που βρίσκονται μέσα σε παρένθεση χρησιμοποιήθηκαν και καταστράφηκαν κατά τη διαδικασία της κατασκευής των πλασμιδίων).



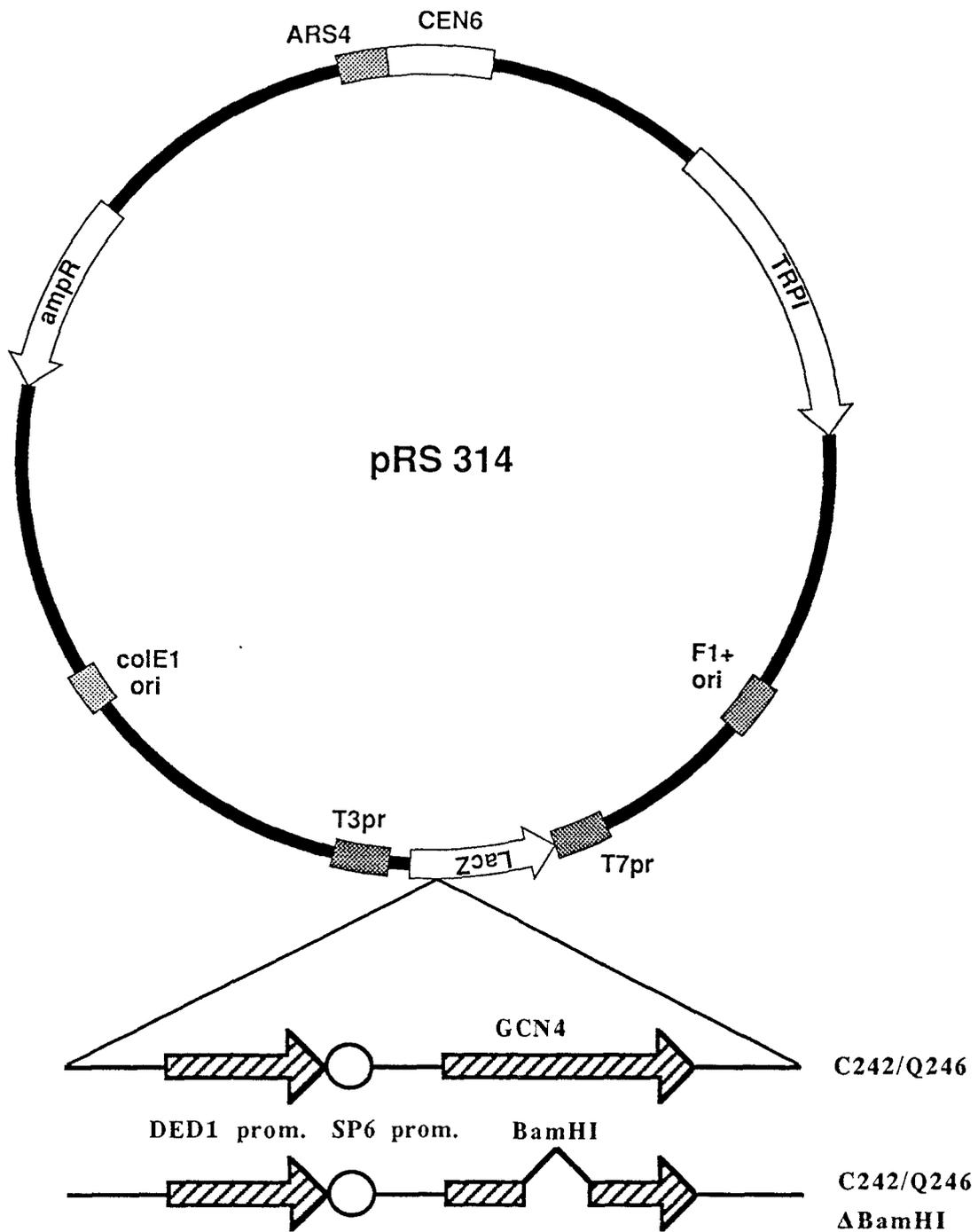
Τα πλασμίδια για την υπερέκφραση των δύο καρβοξυτελικών παραγώγων της α υπομονάδας του eIF2 καθώς και τα πλασμίδια για την υπερέκφραση των γονιδίων GCN4, ADA2, SPT15 (TBP) και SUA7 (TFIIB).



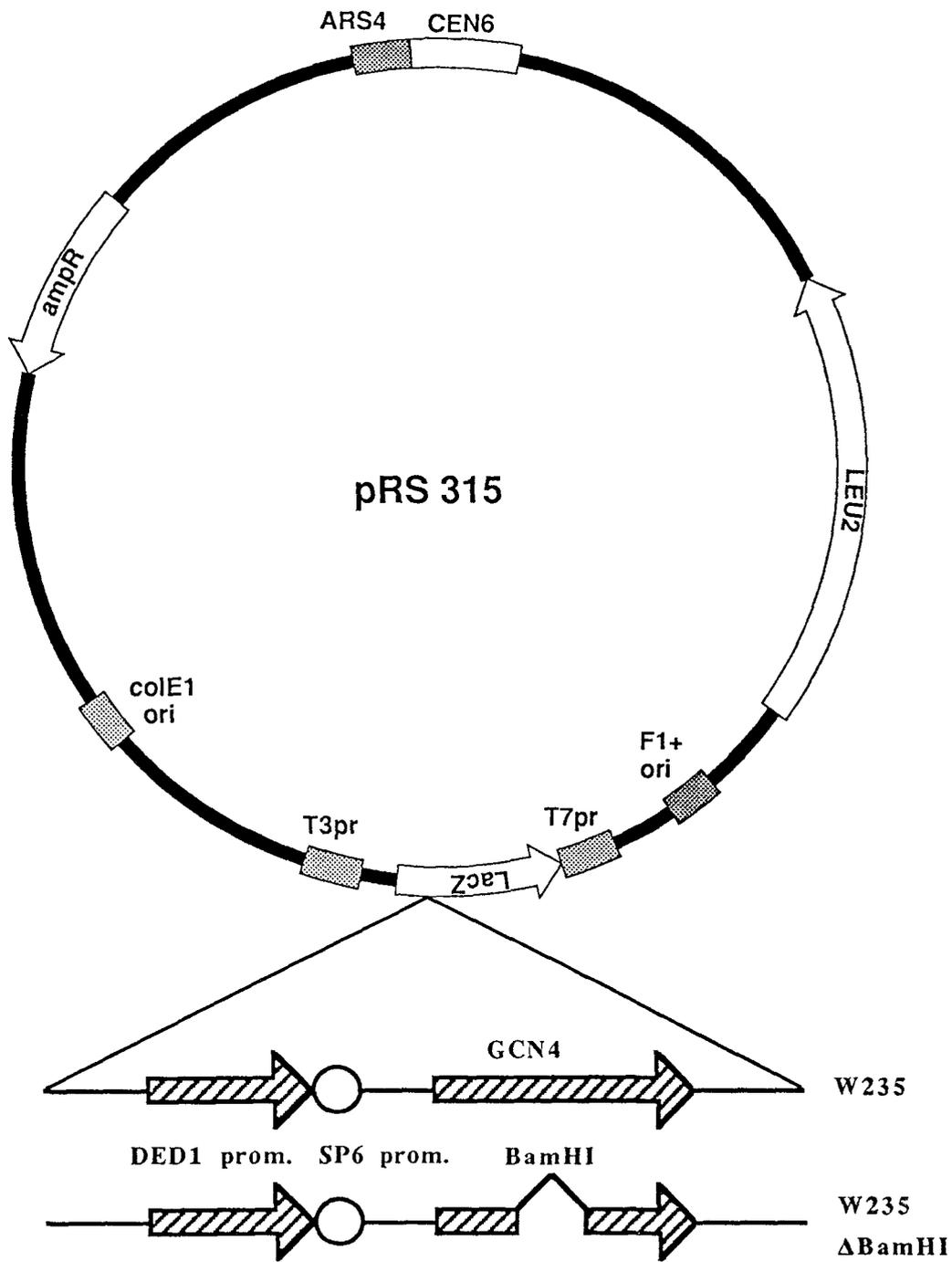
Το πλασμίδιο υπερέκφρασης του γονιδίου που είναι παράγωγο του GCN2 και φέρει έλλειψη της αμινοτελικής περιοχής η οποία έχει περιορισμένη ομοιότητα με κινάση.



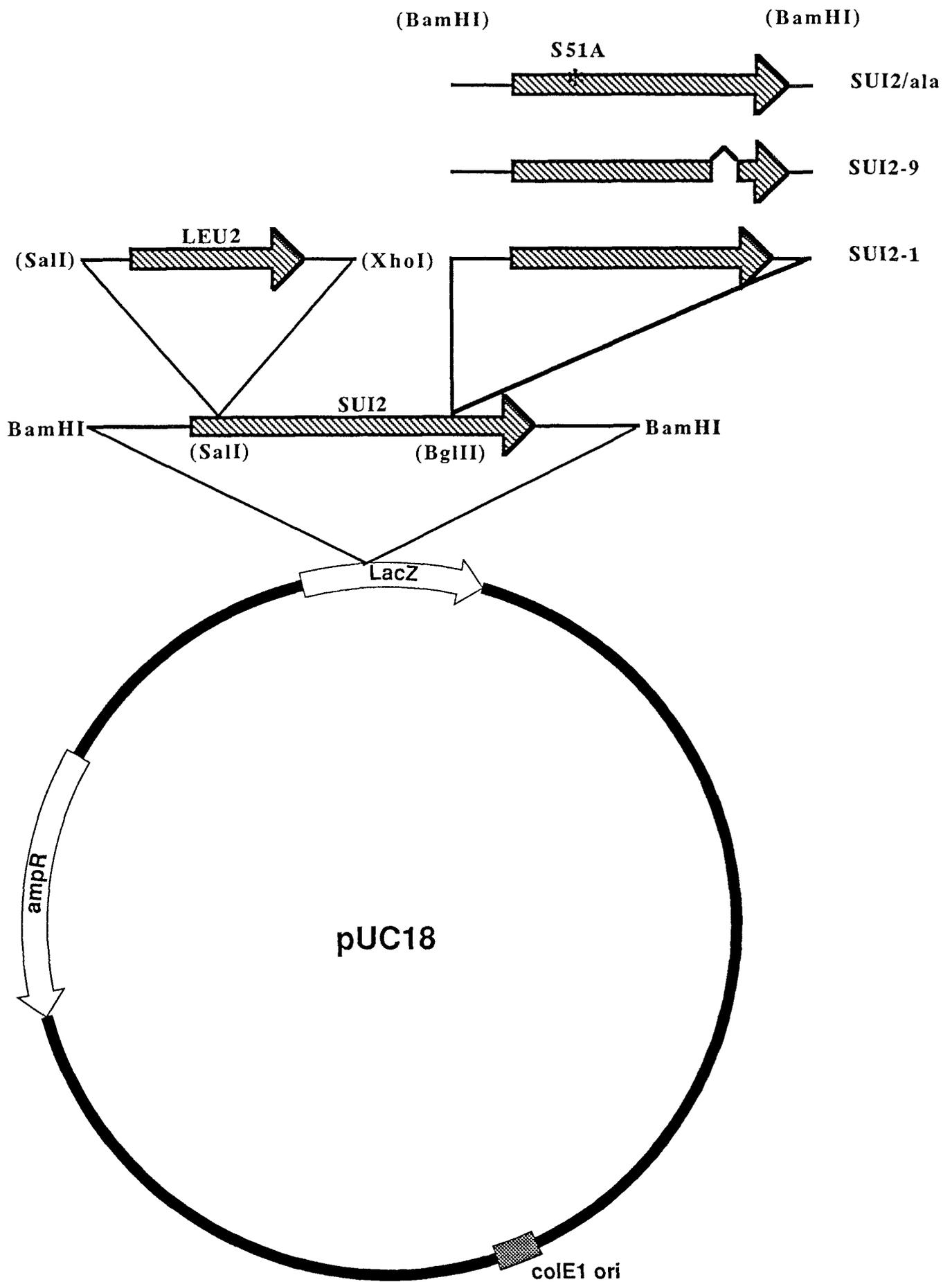
Τα αρχικά πλασμίδια για την υπερέκφραση της 5' μή μεταφραζόμενης περιοχής του GCN4 mRNA.



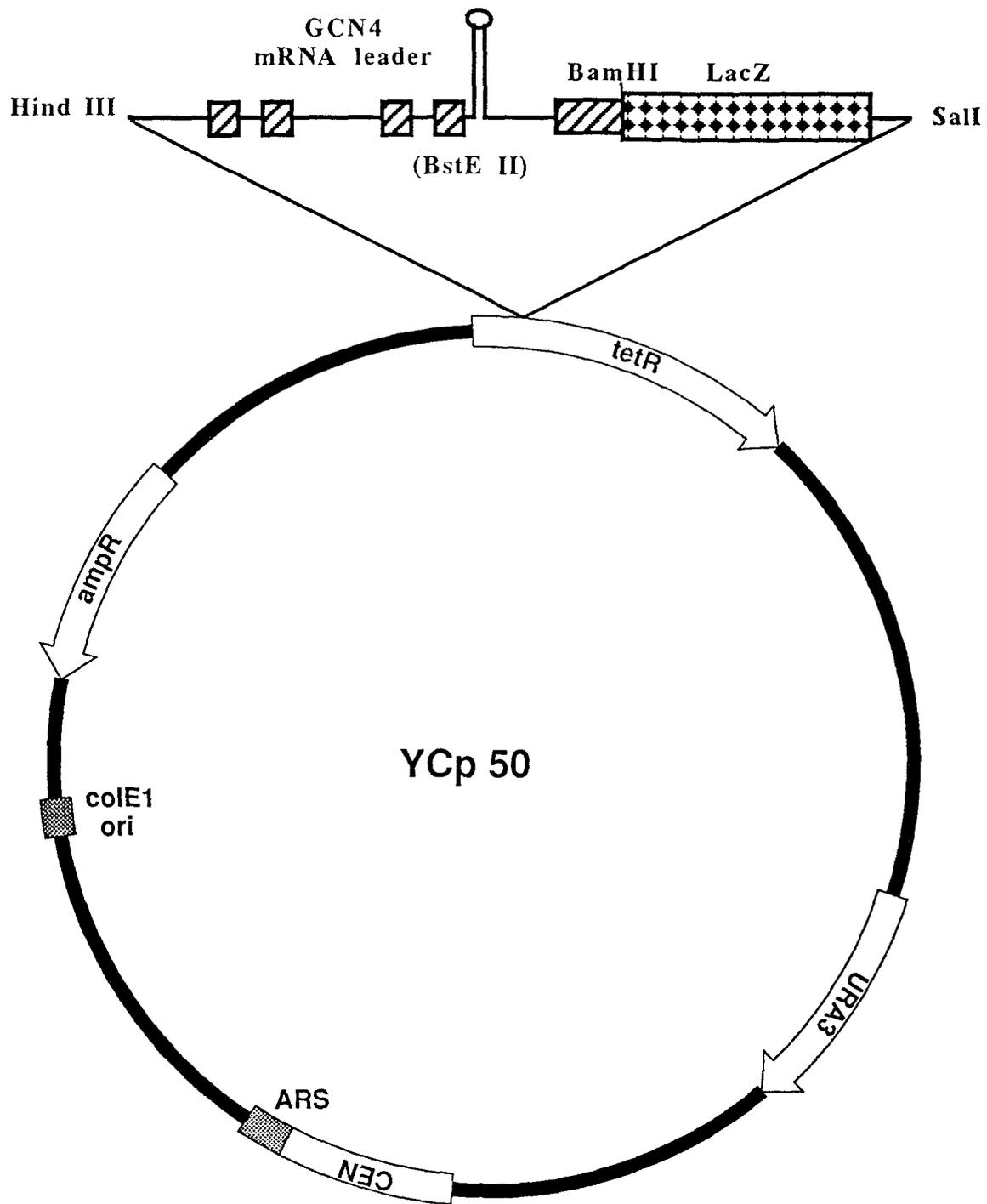
Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση των μεταλλαγμένων γονιδίων GCN4, στο σακχαρομύκητα. Τα ίδια πλασμίδια αποτέλεσαν το υπόστρωμα για *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων αυτών.



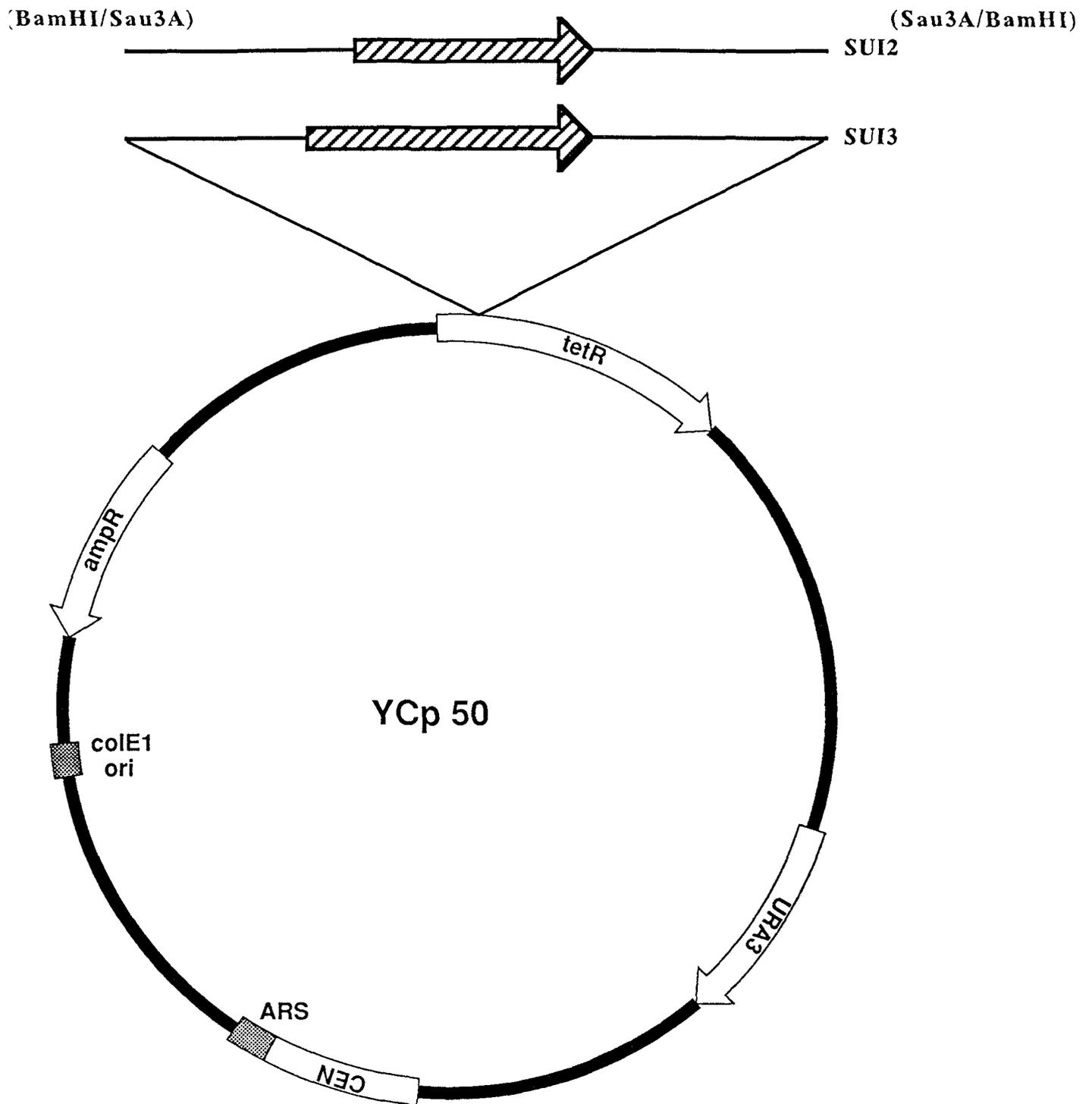
Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση των μεταλλαγμένων γονιδίων GCN4, στο σακχαρομύκητα. Τα ίδια πλασμίδια αποτέλεσαν το υπόστρωμα για *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων αυτών.



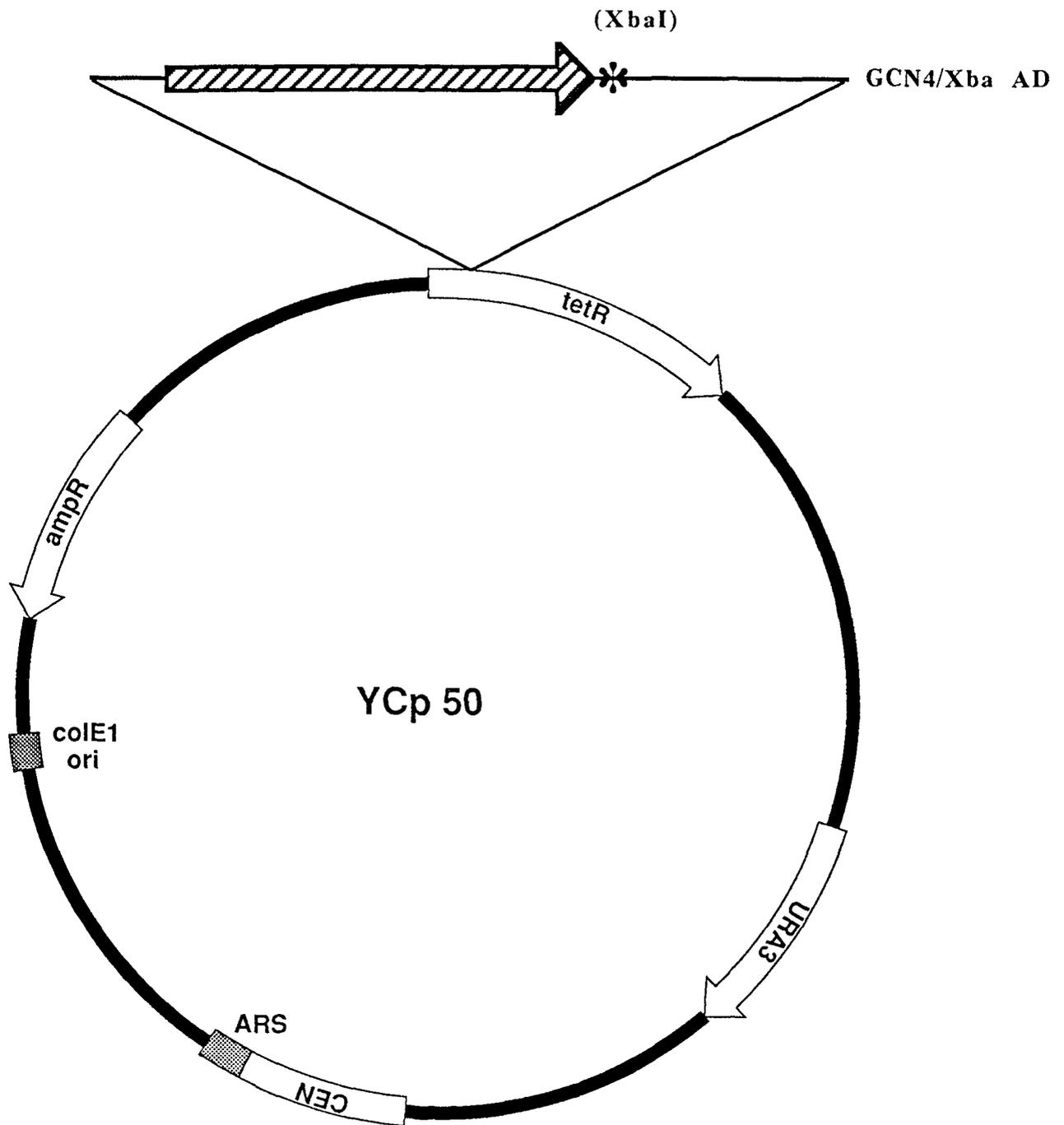
Τα πλασμίδια για την αντικατάσταση του φυσικού τύπου γονιδίου SUI2 με τις μεταλλαγμένες μορφές του.



Το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο μάρτυρα με την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GCN4, η οποία περιέχει την αλληλουχία TAR του HIV1 στην θέση BstE II.



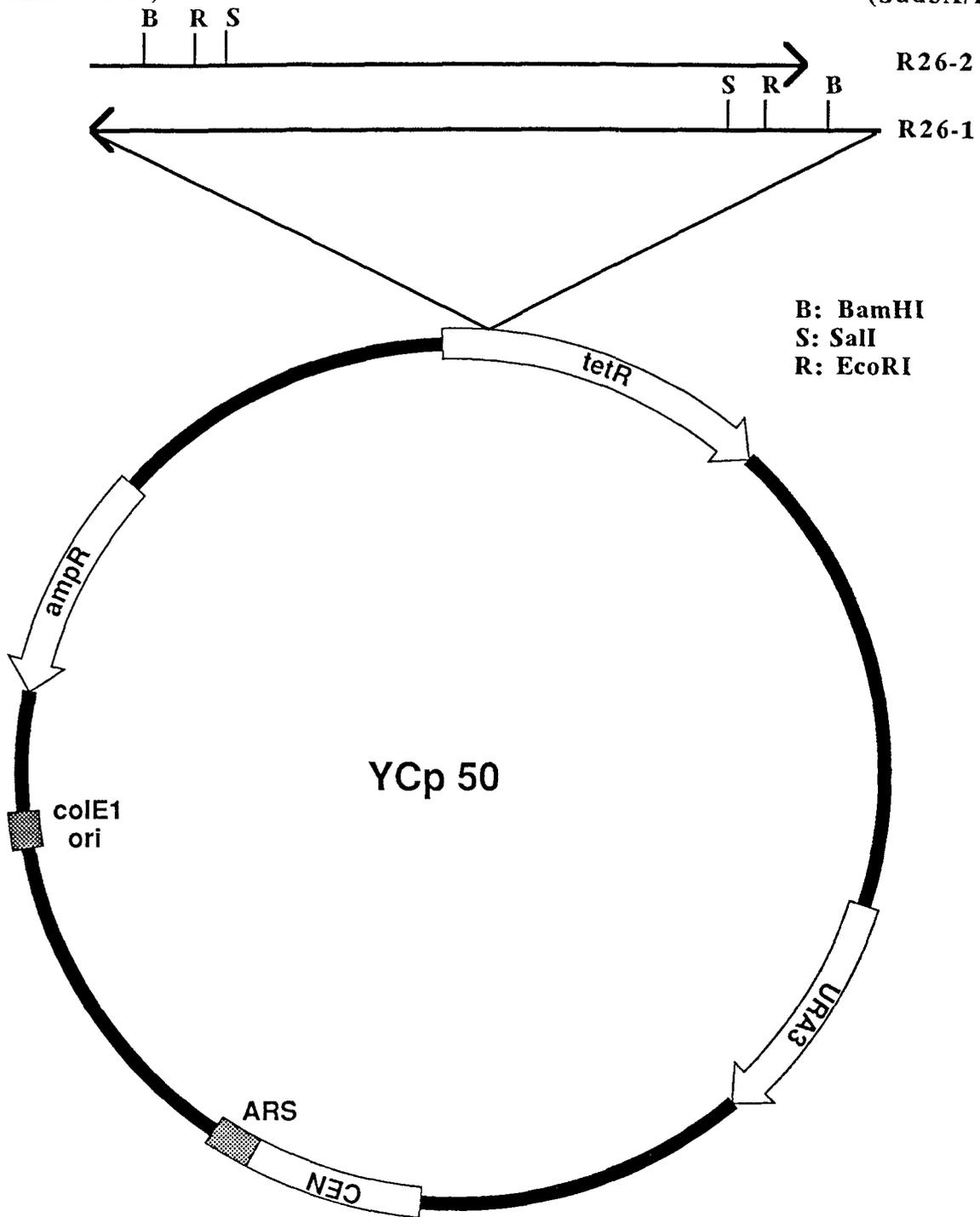
Οι γενωμικοί κλώνοι που περιέχουν τα γονίδια SUI2 και SUI3 που κωδικοποιούν για την α και β υπομονάδα του eIF2 αντίστοιχα.



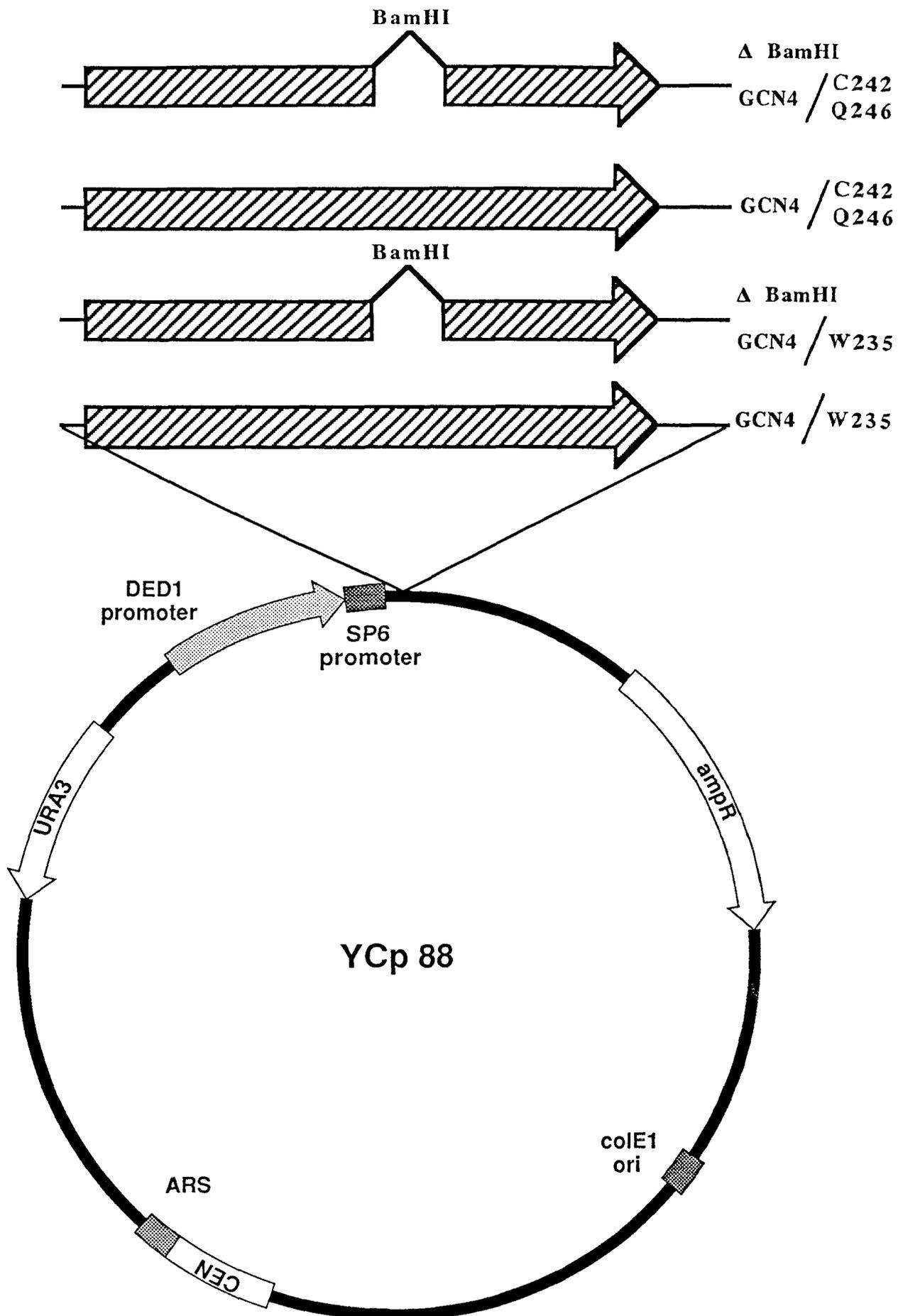
Το πλασμίδιο για την υπερέκφραση της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Gcn4.

(BamHI/Sau3A)

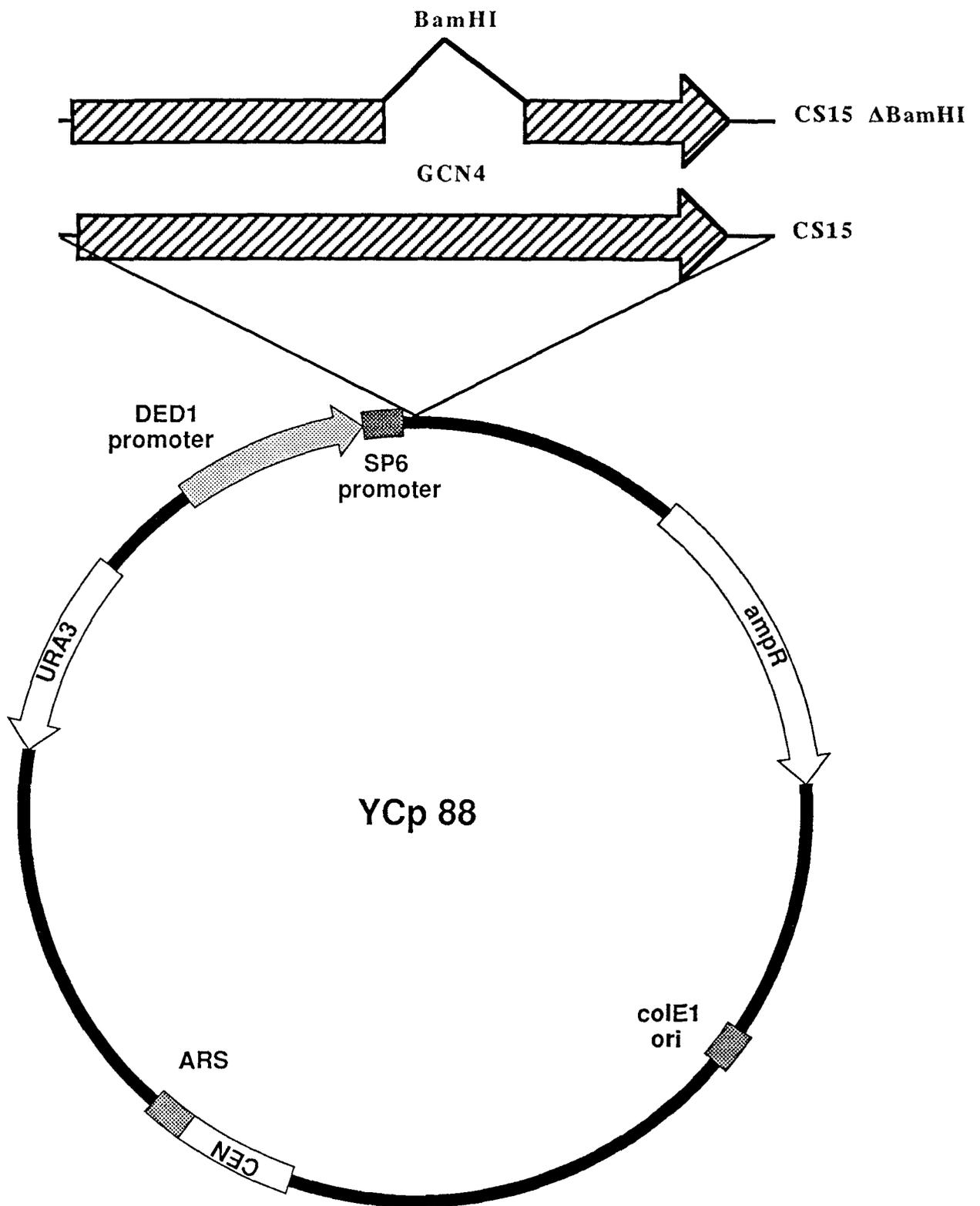
(Sau3A/BamHI)



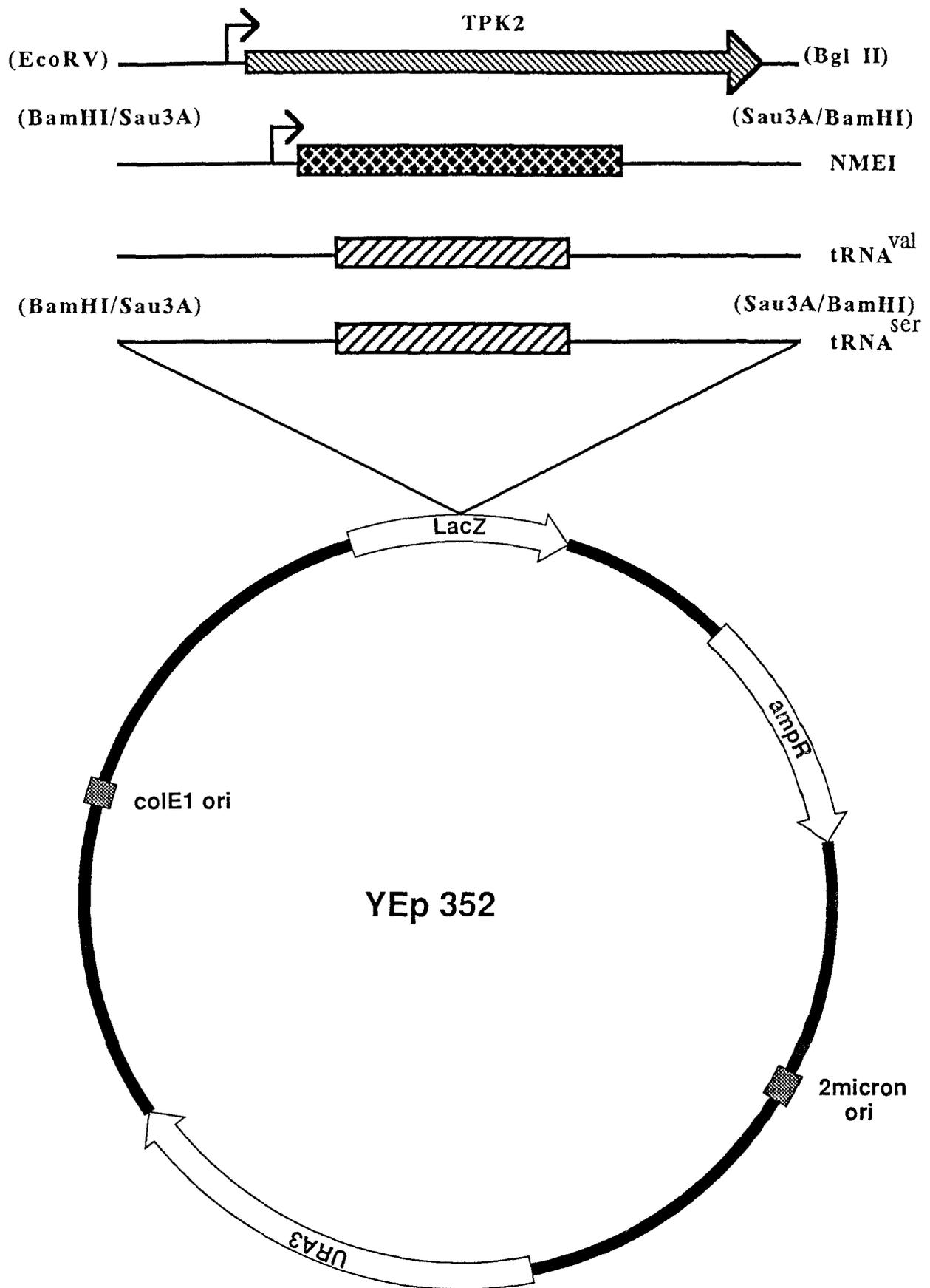
Οι γενωμικοί κλώνοι που απομονώθηκαν κατά την προσπάθεια κλωνοποίησης του αλληλόμορφου AFR1-1.



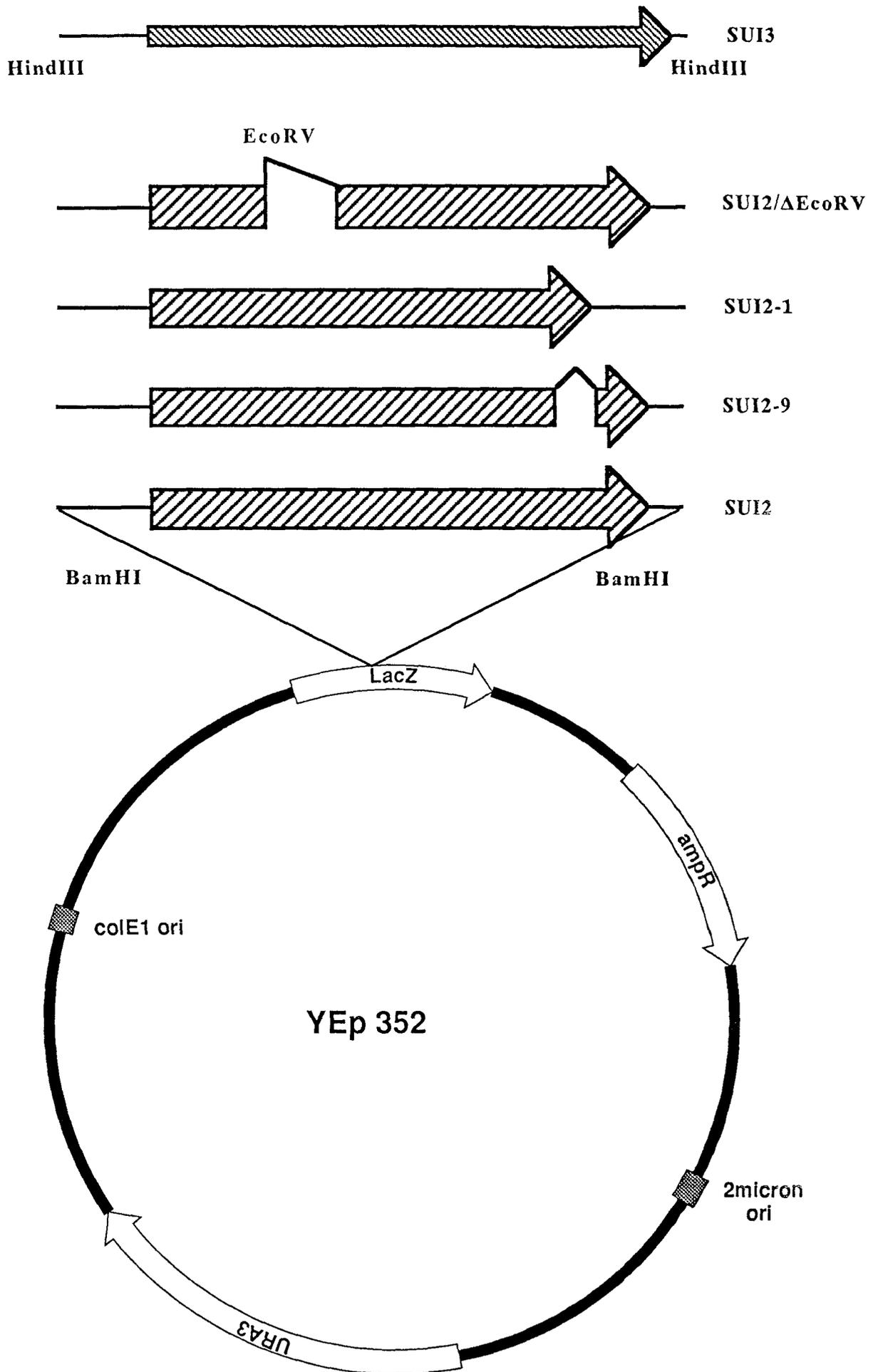
Τα αρχικά πλασμίδια με τις μεταλλαγές στο γονίδιο GCN4 καθώς και τα παράγωγα αυτών χωρίς την περιοχή ενεργοποίησης.



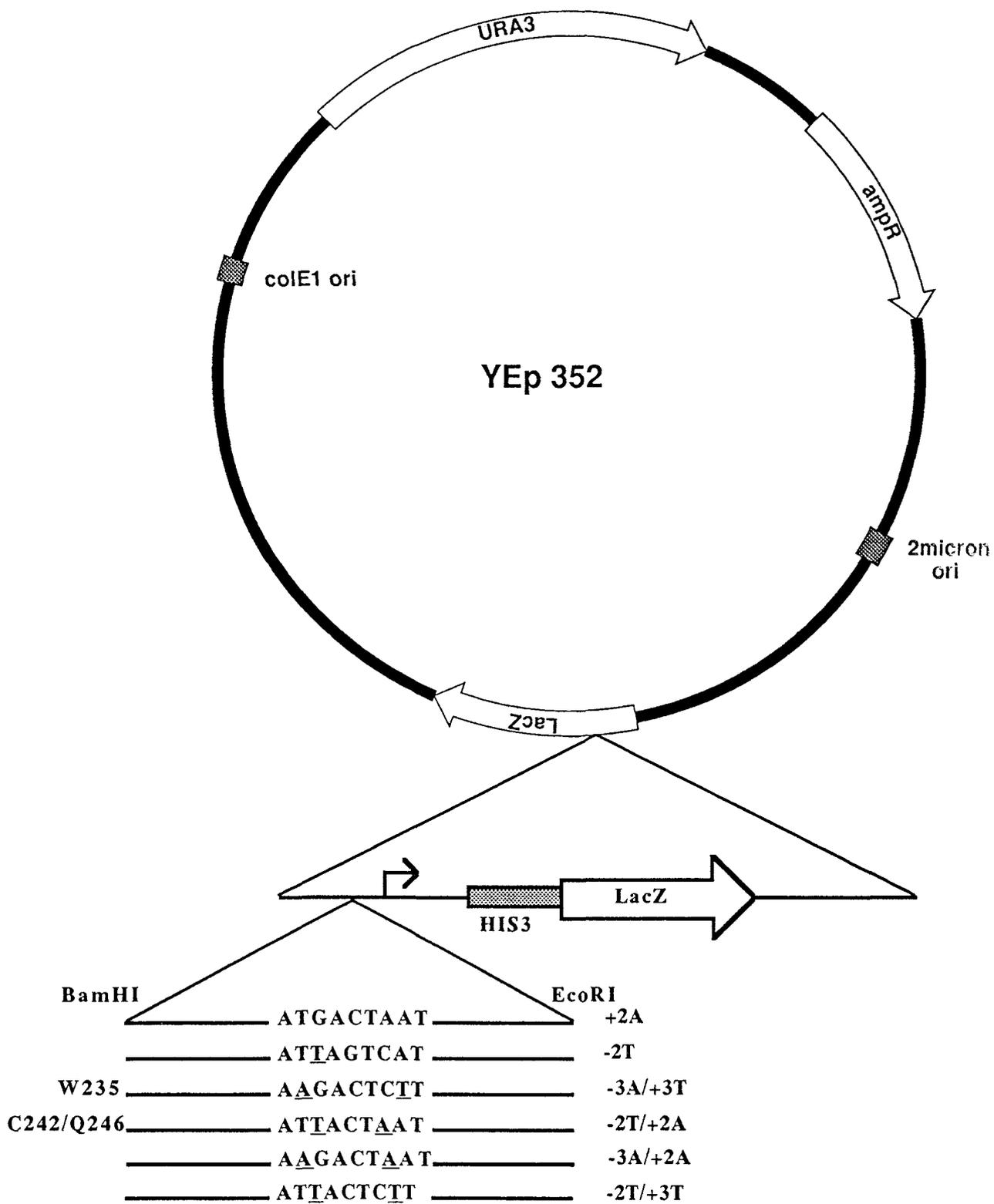
Τα αρχικά πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο GCN4 και το παράγωγο του με έλλειψη της περιοχής ενεργοποίησης.



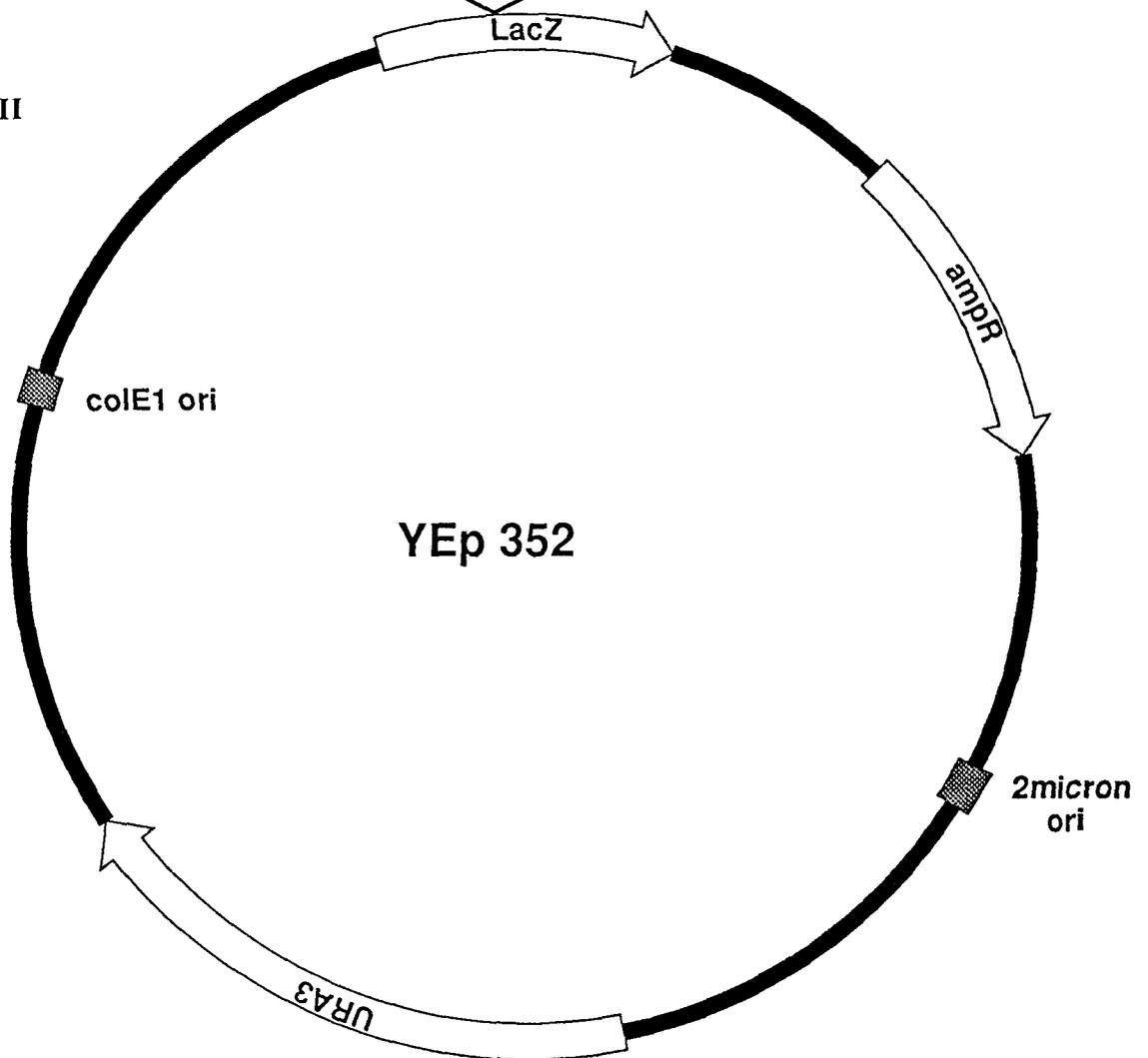
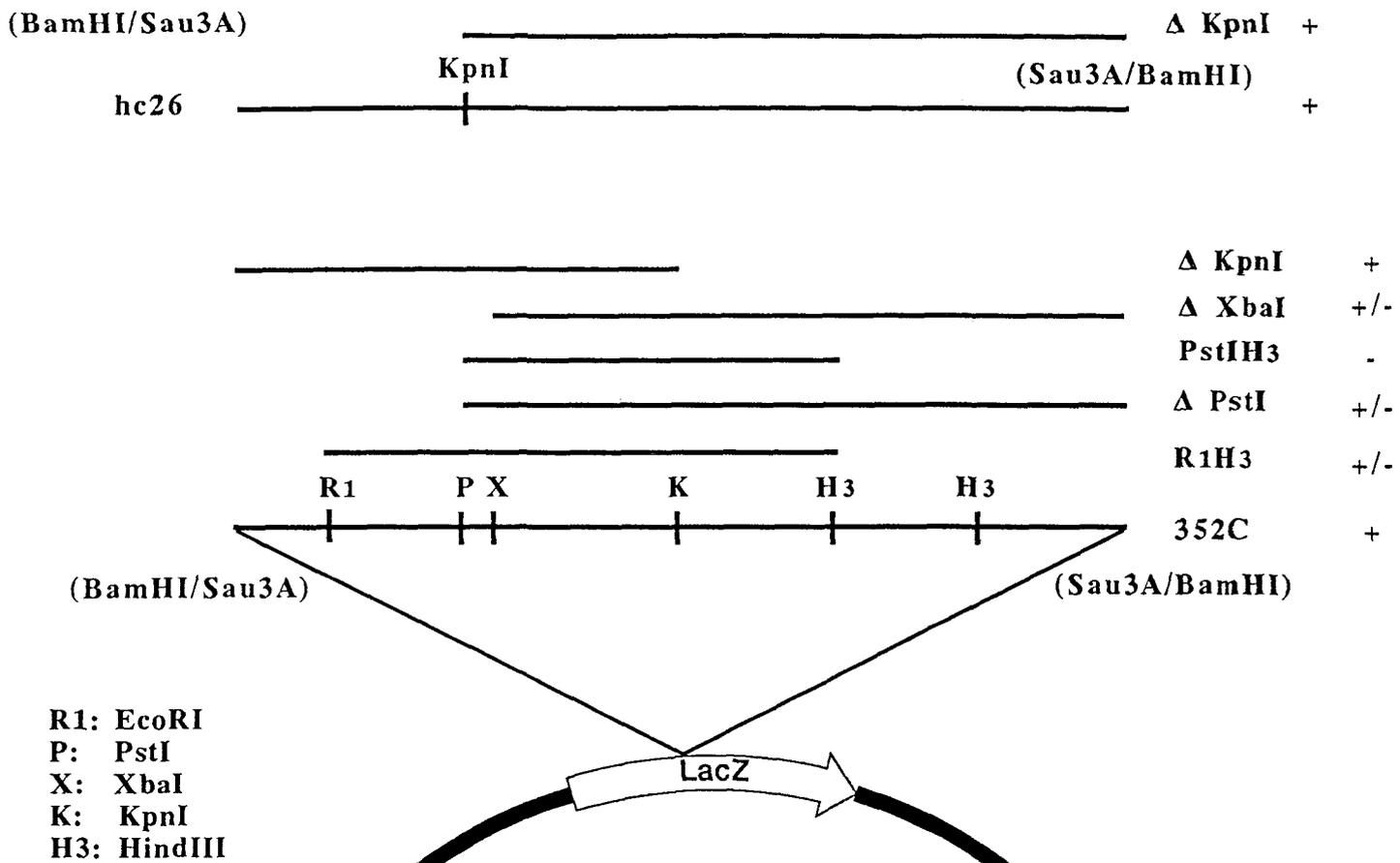
Τα πλασμίδια για την υπερέκφραση των tRNAs Σερίνης και Βαλίνης (pseudo-tRNA), του γονιδίου NMEI καθώς και της Κινάσης TPK2.



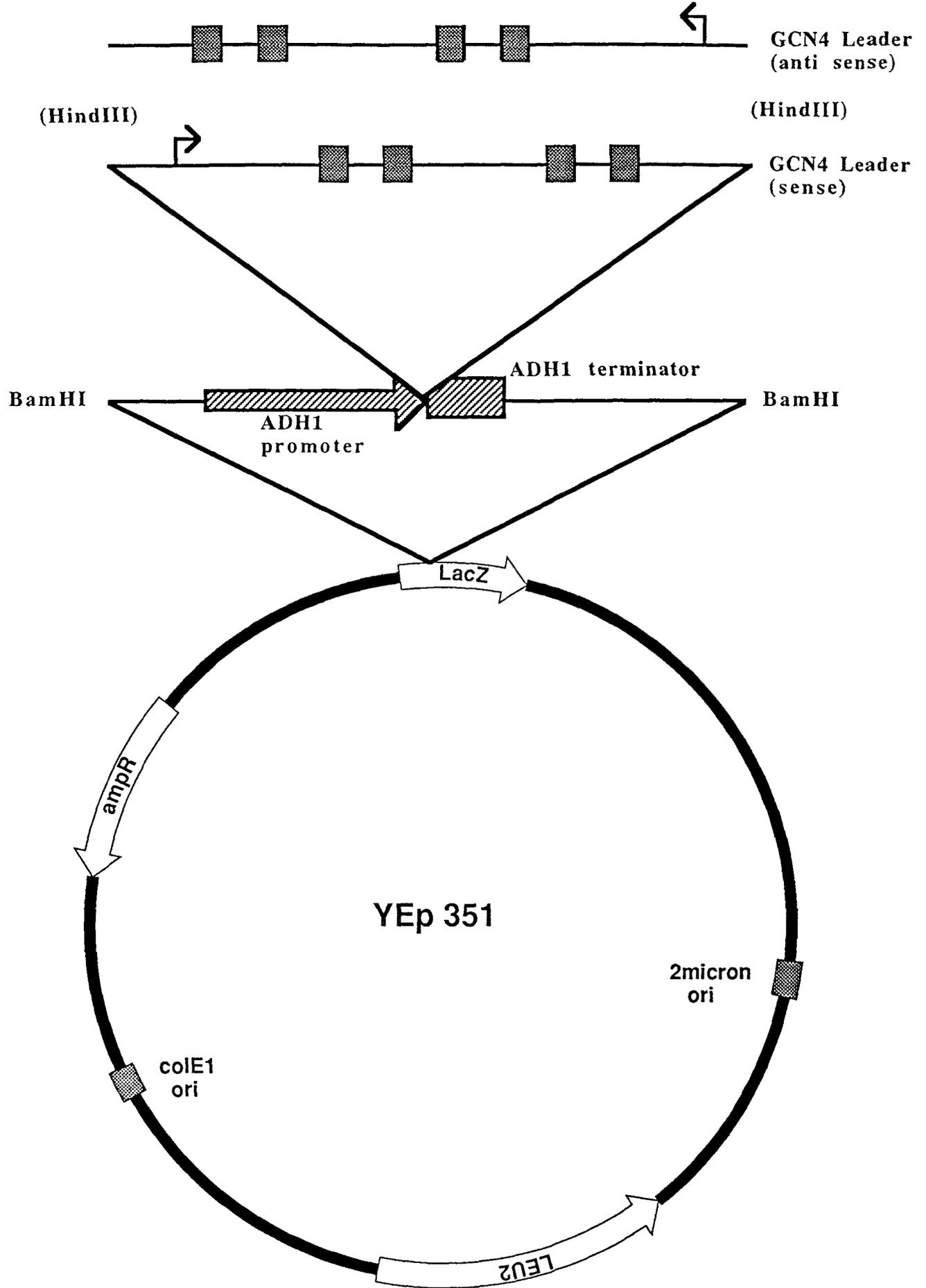
Τα πλασμίδια για την υπερέκφραση των γονιδίων SUI2 και SUI3 για την α και την β υπομονάδα του eIF2, αντίστοιχα. Επίσης φαίνονται και τα πλασμίδια για την υπερέκφραση τριών μεταλλαγμένων αλληλόμορφων



Τα πλασμίδια για την υπερέκφραση γονιδίων μαρτύρων που φέρουν στον υποκινητή τους, ασύμμετρους DNA στόχους για την πρωτεΐνη Gen4.



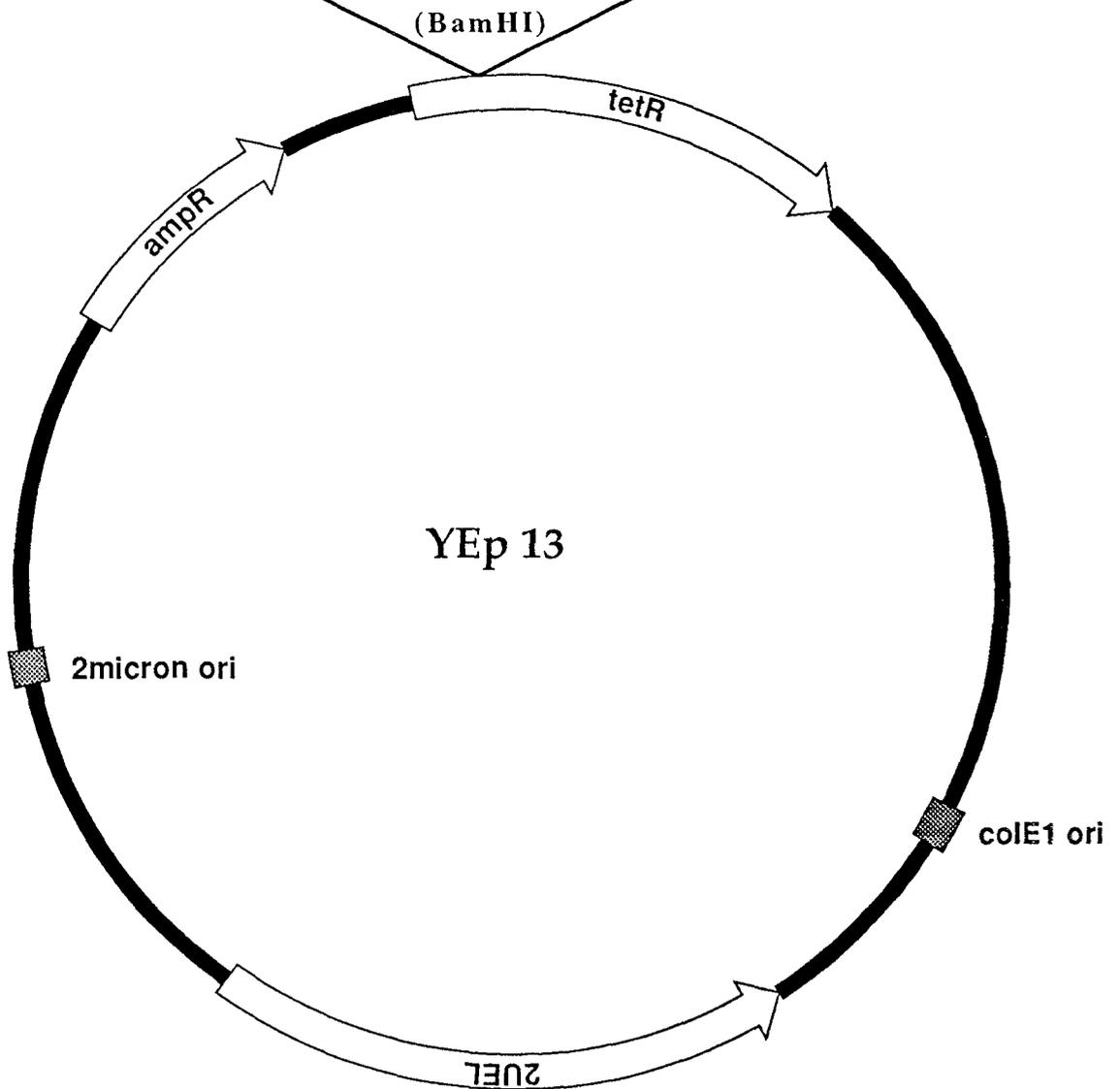
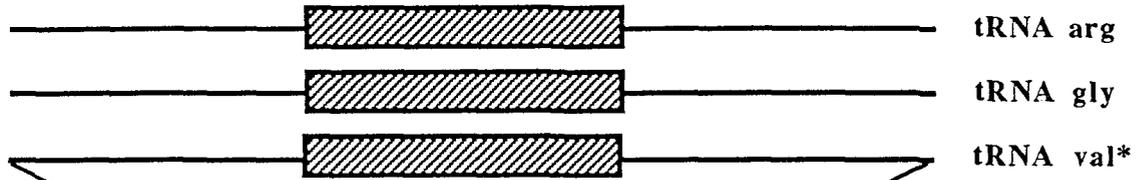
Οι πλασμιδιακοί κλώνοι των καταστολέων 352C και hc26, καθώς και οι ελλείψεις που έγιναν πάνω σε αυτούς. Επίσης καταγράφεται και ποιές από τις ελλείψεις αυτές διατηρούν τους αρχικούς φαινότυπους των κλώνων.



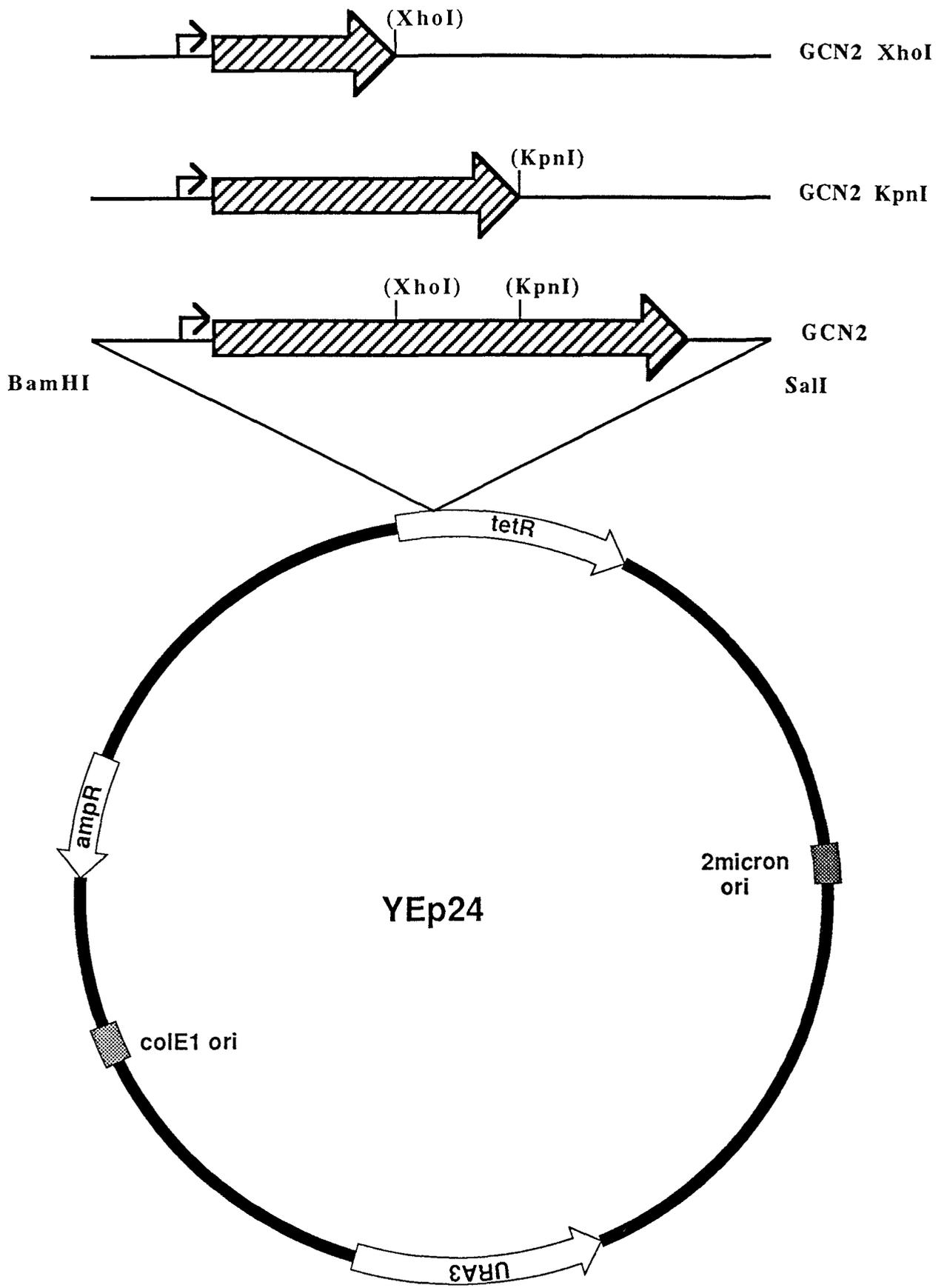
Τα πλασμίδια για την υπερέκφραση της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του GCN4 mRNA.

(BamHI/Sau3A)

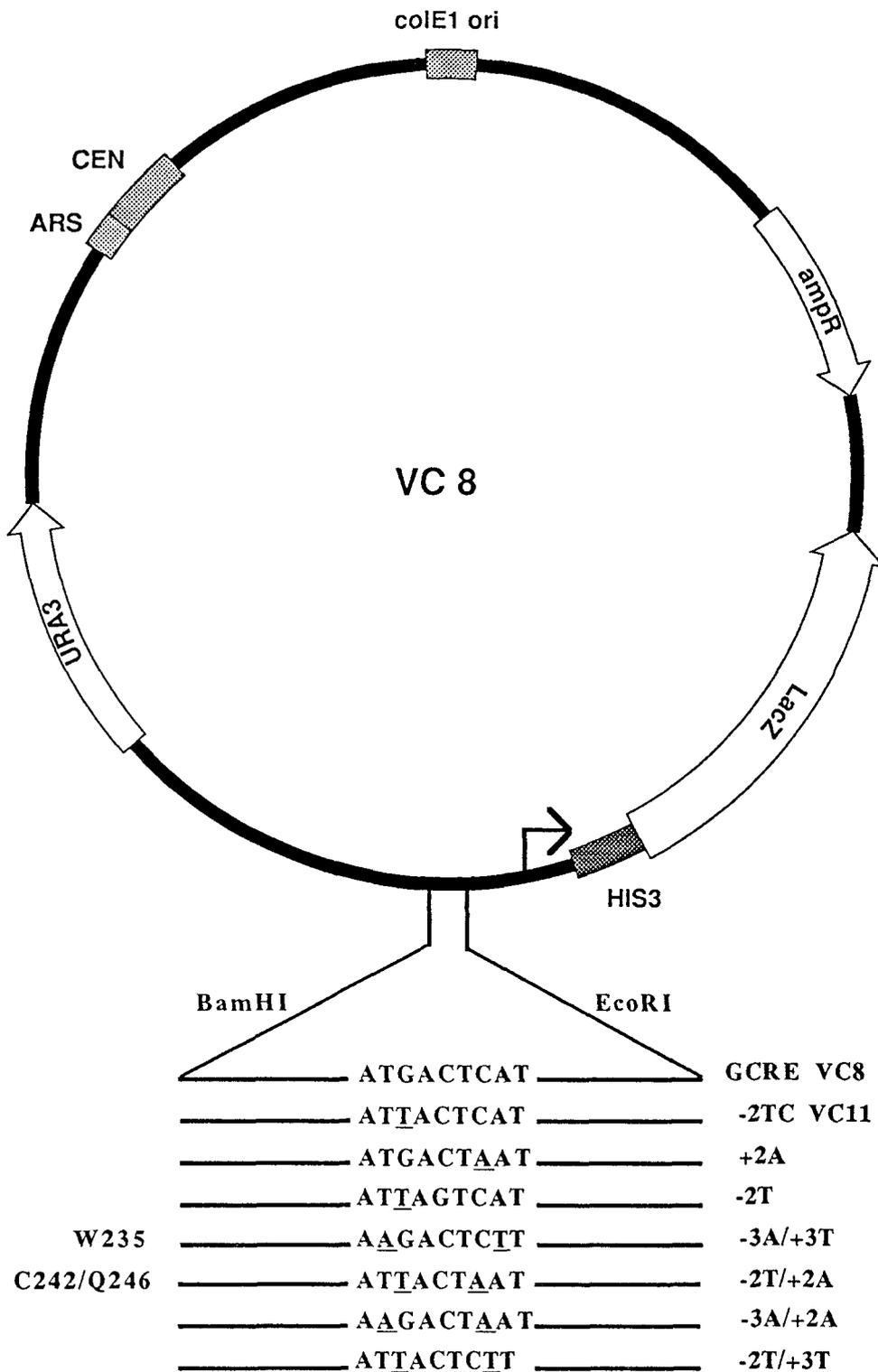
(Sau3A/BamHI)



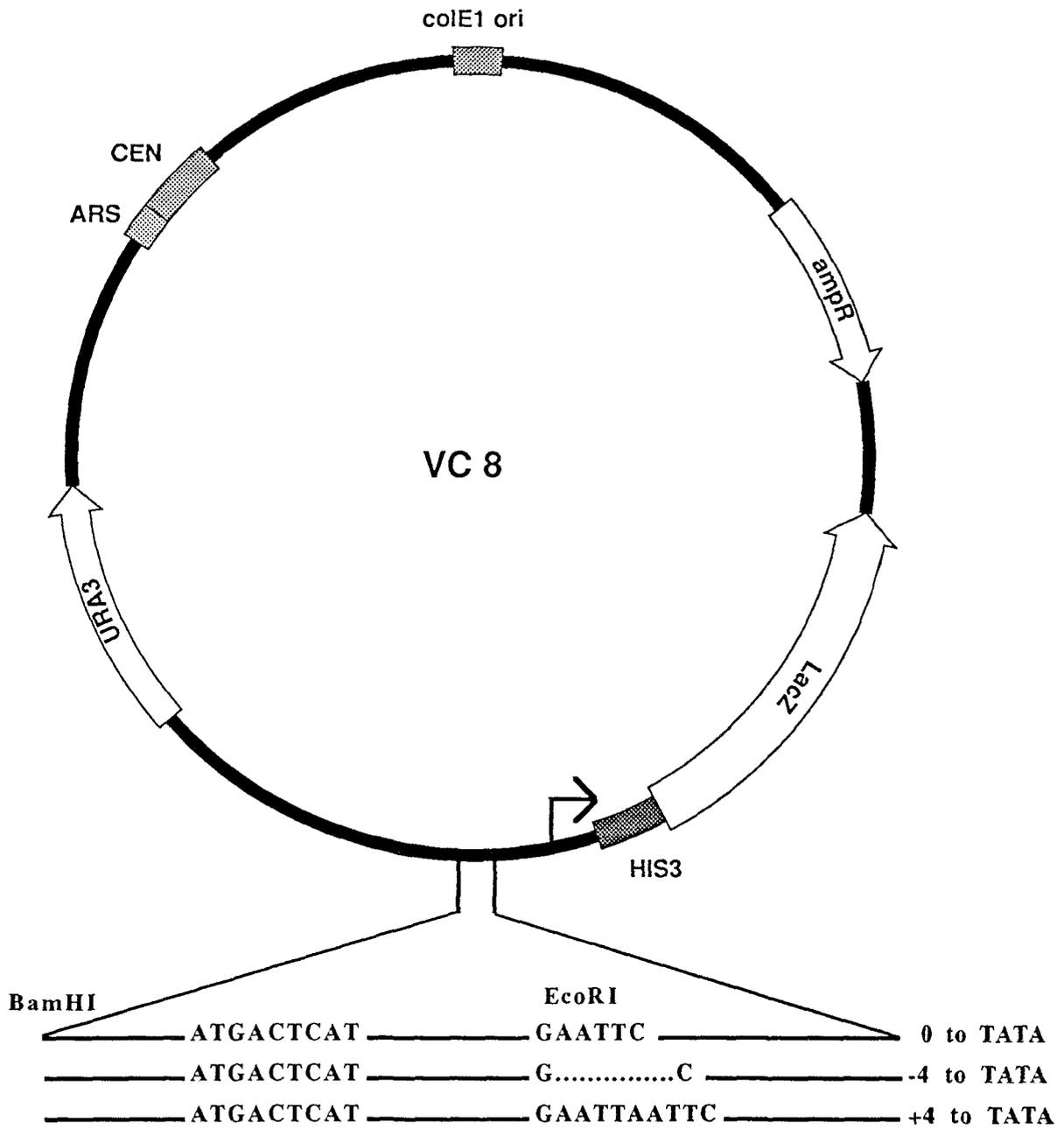
Τα πλασμίδια υπερέκφρασης της κινάσης TPK2 και των tRNAs Αργινίνης, Γλυκίνης και του pseudo-tRNA Βαλίνης.



Τα πλασμίδια για την υπερέκφραση των ελλείψεων του γονιδίου GCN2.



Τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια μάστρες με τον ιδανικό και τους ασύμμετρους DNA στόχους για την πρωτεΐνη Gcn4.



Τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια μάρτυρες των οποίων το στοιχείο TATA βρίσκεται σε διάφορες αποστάσεις σε σχέση με τον ιδανικό στόχο της πρωτεΐνη Gcn4.

E) Συντμήσεις

Αναλύονται οι συντμήσεις που συναντώνται στο κείμενο, με τη σειρά εμφάνισής τους:

GCN:	G eneral C ontrol N onderepresible.
GCD:	G eneral C ontrol D erepresible.
ATP:	A denosine T ri- P hosphate.
GTP:	G uanosine T ri- P hosphate.
cAMP:	c yclic A denosine M ono- P hosphate
γ:	Μικρογραμμιο.
λ:	Μικρολίτρο.
μl:	M icro L itre.
u:	U nit.
SDS:	S odium D odecyl S ulphate.
eIF:	E ukariotic I nitiation F actor.
GEF:	G uanosine E xchange F actor.
DAI:	D ouble stranded R NA A ctivated I nhibitor.
TBP:	T ATA B inding P rotein.
TAF:	T BP A ssociated F actor.
Min:	M INimal growth medium.
3-AT:	3 - A mino T riazole.
CRE:	C AMP R esponsive E lement.
AAD:	A cidic A ctivation D omain.
UAS:	U pstream A ctivating S equence.
BD:	B inding D omain.
EMS:	E thyl- M ethane- S ulphonate.
EST:	E xpressed S equence T ag.
GST:	G lutathionine S T ransferase.
PCR:	P olymerase C hain R eaction.
S:	S vedberg.
bp:	B ase P airs.
Kb:	K ilobase.
KDa:	K ilo D altons.
RPM:	R evolutions P er M inute.
AP1:	A ctivator P rotein 1.
HSV:	H erpes S implex V irus.

HIV:	H uman I mmunodeficiency V irus.
bZIP:	B asic Z IPper.
EDTA:	E thylene- D iamino- T etra-acetic A cid.
FOA:	F luoro- O rotic A cid.
h:	high.
TRA:	T Riazol- A mine.
TBE:	T ris B orate E DTA.
TAE:	T ris A cetate E DTA.
HIS:	H IStidine.
LEU:	L EUcine.
URA:	U RAcil.
TRP:	T Ry P tophan.
TE:	T ris E DTA.
UV:	U ltra V iolet.

ΣΤ) Ένα μικρό λεξικό όρων

Εδώ αποσαφηνίζονται μερικοί αγγλικοί όροι που χρησιμοποιηθήκαν στη διατριβή, με τη σειρά εμφάνισης τους:

Summary:	Περίληψη.
Primer:	Εκκινητής.
In vitro:	Στο δοκιμαστικό σωλήνα.
In vivo:	Στη φύση.
Zipper:	Φερμουάρ.
Leucine:	Λευκίνη.
Mitochondrial:	Μιτοχονδριακός.
Processing:	Κατεργασία.
Stringent:	Αυστηρός.
Responce:	Απόκριση.
Acid:	Οξύς.
Basic:	Βασικός.
Module:	Λειτουργικό τμήμα.
Element:	Στοιχείο.
Regulation:	Ρύθμιση.
Constitutive:	Συστατικός.
Protein:	Πρωτεΐνη.
Binding:	Δέσμευση.
Activation:	Ενεργοποίηση.
Domain:	Περιοχή.
Function:	Λειτουργία.
Reduction:	Μείωση.
Lactate:	Γαλακτικό οξύ.
Glucose:	Γλυκόζη.
Mating:	Σύζευξη.
Type:	Τύπος.
Induced:	Επαγόμενος.
Fit:	Προσαρμοζώ.
Gap:	Διάκενο.
Repair:	Επιδιορθώνω.
Micron:	Μικρόμετρο.

Factor:	Παράγοντας.
Activity:	Ενεργότητα.
Target:	Στόχος.
Derivative:	Παράγωγο.
Recognize:	Αναγνωρίζω.
Strain:	Στέλεχος.
Vector:	Φορέας.
Plasmid:	Πλασμίδιο.
Dominant:	Επικρατής.
Derepression:	Αποκαταστολή.
General:	Γενικός.
Control:	Ελεγχος.
Non:	Μη.
Tag:	Σημαδούρα.
Sequence:	Αλληλουχία.
Frame:	Πλαίσιο.
Leader:	Ηγούμενος.
Peptide:	Πεπτίδιο.
Virus:	Ιός.
Mediator:	Διαμεσολαβητής.
Adaptor:	Προσαρμογέας.
Complex:	Σύμπλοκο.
Cis:	Εγγύς.
Trans:	Διάμεσος.
Promoter:	Υποκινητής.
Termination:	Τερματισμός.
Origin:	Αρχή.
Fusion:	Σύντηξη.
Reporter:	Μάρτυρας.
Transcription:	Μεταγραφή.
Translation:	Μετάφραση.
Allele:	Αλληλόμορφο.
Northern:	Βόρεια.
Yeast:	Ζύμη.
Suppressor:	Καταστολέας.
Squelch:	Παροπλίζω.

Titrate:	Τιτλοδοτώ.
Dimmer:	Διμερές.
Pallindrome:	Παλίνδρομο.
Pseudo:	Ψεύδο.
Scanning:	Σάρωση.
Sesitivity:	Ευαισθησία.
Temperature:	Θερμοκρασία.
Thermotolerance:	Θερμοανθεκτικότητα.
Aquire:	Αποκτώ.
Identity:	Ταυτότητα.
Positive:	Θετικός.
Pulse:	Παλμός.
Chase:	Ακολουθώ.
Probe:	Ανιχνευτής.
Profile:	Κατατομή.
Polysome:	Πολύσωμα.
Similarity:	Ομοιότητα.
Hardware:	Μηχανήματα.
Nick:	Εγκοπή.
Urea:	Ουρία.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A) Αναφορές (1-327)

1. Abastado, J-P., Miller, P.F., Jackson, B.M., and Hinnebusch, A.G., (1991) "Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for *GCN4* translational control." *Mol. Cel. Biol.* **11** : 486-496.
2. Abastado, J-P., Miller, P.F., and Hinnebusch, A.G., (1991) "A quantitative model for translational control of the *GCN4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *The New Biologist* **3** : 511-524.
3. Abate, C., Patel, L., Rauscher III, F.J., and Curran, T., (1990) "Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro." *Science* **249** : 1157-1161.
4. Adhin, M.R., and van Duin, J., (1990) "Scanning model for translational reinitiation in Eubacteria." *J. Mol. Biol.* **213** : 811-818.
5. Aebi, M., Kirchner, G., Chen, J-Y., Vijayraghavan, U., Jacobson, A., Martin, N.C., and Abelson, J., (1990) "Isolation of a temperature-sensitive mutant with an altered tRNA nucleotidyltransferase and cloning of the gene encoding tRNA nucleotidyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **265** : 16216-16220.
6. Ahmad, M.F., Nasrin, N., Banerjee, A.C., and Gupta, N.K., (1985) "Purification and properties of eukaryotic initiation factor 2 and its ancillary protein factor (Co-eIF-2A) from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **260** : 6955-6959.
7. Albert Hubbard, E.J., Jiang, R., and Carlson, M., (1994) "Dosage-dependent modulation of glucose repression by MSN3 (STD1) in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cel. Biol.* **14** : 1972-1978.
8. Altmann, M., Müller, .PP., Wittmer, B., Ruchti, F., Lanker, S., and Trachsel, H., (1993) "A *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity." *EMBO J.* **12** : 3997-4003.
9. Anderson, D. and G. Blobel, (1983) " Immunoprecipitation of proteins from cell free traslations." *Meth. Enzymol.* **96** : 111-117.
10. Aparicio, O.M., and Gottschling, D.E., (1994) "Overcoming telomeric silencing: a *trans*-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way." *Genes Dev.* **8** : 1133-1146.

11. Arndt, K. and G. Fink, (1986) "GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 8516-8522.
12. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley and sons, (1987) .
13. Baan, R.A., Keller, P.B., and Dahlberg, A.E., (1981) "Isolation of eukaryotic initiation factor 2 from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biological Chemistry **256** : 1063-1066.
14. Baim, S.B., Pietras, D.F., Eustice, D.C., and Sherman, F., (1985) "A mutation allowing an mRNA secondary structure diminishes translation of *Saccharomyces cerevisiae* Iso-1-cytochrome *c*." Mol. Cell. Biol. **5** : 1839-1846.
15. Baim, S.B., and Sherman, F., (1988) "mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol. Cell. Biol. **8** : 1591-1601.
16. Barnes, C.A., Singer, R.A., and Johnston, G.C., (1993) "Yeast *prt1* mutations alter heat-shock gene expression through transcript fragmentation." EMBO J. **12** : 3323-3332.
17. Becker, P.B., (1994) "The establishment of active promoters in chromatin." BioEssays **16** : 541-547.
18. Benbrook, D.M., and Jones, N.C., (1994) "Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes." Nucl. Acid Res. **22** : 1463-1469.
19. Bennetzen, J.L., and Hall, B.D., (1981) "Codon, selection in yeast." Journal of Biological Chemistry **256** : 1099-1110.
20. Berger, S.L., Cress, W.D, Cress, A, Triezenberg, S.J., and Guarente, L., (1990) "Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors." Cell **61** : 1199-1208.
21. Berger, S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Agapire, J., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., and Guarente, L., (1992) "Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains." Cell **70** : 251-265.

22. Berk, A.J., and Schmidt, M.C., (1990) "How *do* transcription factors work?" *Genes Dev.* **4** : 151-155.
23. Boeke, J.D., and Corces, V.G., (1989) "Transcription and reverse transcription of retrotransposons." *Annu. Rev. Microbiol.* **43** : 403-434.
24. Bommer, U.A., Stahl, J., Henske, A., Lutsch, G., and Bielka, H., (1988) "Identification of proteins of the 40 S ribosomal subunit involved in interaction with initiation factor eIF-2 in the quaternary initiation complex by means of monospecific antibodies." *FEBS Let.* **233** : 114-118.
25. Boorstein, W.R., and Craig, E.A., (1990) "Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element." *EMBO J.* **9** : 2543-2553.
26. Borovjagin, A.V., Evstafieva, A.G., Ugarova, T.Y., and Shatsky, I.N., (1990) "A factor that specifically binds to the 5'-untranslated region of encephalomyocarditis virus RNA." *FEBS Let.* **261** : 237-240.
27. Brandl, C. and K. Struhl, (1989) "Yeast *GCN4* transcriptional activator protein interacts with RNA polymerase II in vitro." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 2652-2657.
28. Brandl, C., and Struhl, K., (1990) "A nucleosome-positioning sequence is required for *GCN4* to activate transcription in the absence of a TATA element." *Mol. Cel. Biol.* **10** : 4256-5265.
29. Brandl, C.J., Furlanetto, A.M., Martens, J.A., and Hamilton, K.S., (1993) "Characterization of *NGG1*, a novel yeast gene required for glucose repression of *GAL4p*-regulated transcription." *EMBO J.* **12** : 5255-5265.
30. Brenner, C., Nakayama, N., Goebel, M., Tanaka, K., Toh-e, A., and Matsumoto, K., (1988) "*CDC33* encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cel. Biol.* **8** : 3556-3559.
31. Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P.B., Choi, E-Y., Finberg, K., Roeder, G.S., and Snyder, M., (1994) "Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev.* **8** : 1087-1105.
32. Cairns, B.R., Kim, Y-J., Sayre, M.H., Laurent, B.C., and Kornberg, R.D., (1994) "A multisubunit complex containing the *SWI1/ADR6*, *SWI2/SNF2*, *SWI3*, *SNF5*, and *SNF6* gene products isolated from yeast," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 1950-1954.

33. Carey, M., Lin, Y-S., Green, M.R., and Ptashne, M., (1990) "A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives." *Nature* **345** : 361-364.
34. Carsiotis, M., and R. F. Jones, (1974) "Cross- pathway regulation: Tryptophan-mediated control of histidine and arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*." *J. Bacteriol.* **119** : 889-895.
35. Casrilho-Valavicius, B., Yoon, H., and Donahue, T.F., (1990) "Genetic characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* translational initiation suppressors *sui1*, *sui2* and *SUI3* and their effects on *HIS4* expression." *Genetics* **124** : 483-495.
36. Cavallini, B., Faus, I., H., Matthesm, Chipoulet, J.M., Winsor, B., Egly, J.M., and Chambon, P., (1989) "Cloning of the gene encoding the yeast protein BTF1Y, which can substitute for the human TATA box-binding factor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 9803-9807.
37. Chasman, D.J., Lue, N.F., Buchman, A.R., LaPointe, J.W., and Lorch, Y., (1990) "A yeast protein that influences the chromatin structure of UAS_G and functions as a powerful auxiliary gene activator." *Genes Dev.* **4** : 503-514.
38. Chasman, D.I., and Kornberg, R.D., (1990) "GAL4 protein: purification, association with GAL80 protein, and conserved domain structure." *Mol. Cell. Biol.* **10** : 2916-2923.
39. Chen, W., and Struhl, K., (1989) "Yeast upstream activator protein GCN4 can stimulate transcription when its binding site replaces the TATA element." *EMBO J.* **8** : 261-268.
40. Chen, J-J., Throop, M.S., Gehrke, L., Kuo, I., Pal, J.K., Brodsky, M., and London, I., (1991) "Cloning of the cDNA of the heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α (eIF-2 α) kinase of rabbit reticulocytes: homology to yeast GCN2 protein kinase and human double-stranded-RNA-dependent eIF-2 α kinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 7729-7733.
41. Chen, J-L., Attardi, L.D., Verrijzer, C.P., Yokomori, K., and Tjian, R., (1994) "Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators." *Cell* **79** : 93-105.
42. Chien, C., Bartel, P. L., Sternglanz, R., and Fields, S., (1991) "The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 9578-9582.

43. Chiu, M.I., Mason, T.L., and Fink, G.R., (1992) "HTS1 encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidyl-tRNA synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*: mutations alter the specificity of compartmentation." *Genetics* **132** : 987-1001.
44. Choi, S.Y., Scherer, B.J., Schnier, J., Davies, M., Kaufman, R.J., and Hershey, J.W.B., (1992) "Stimulation of protein synthesis in COS cells transfected with variants of the α -subunit of initiation factor eIF-2" *Journal of Biological Chemistry* **267** : 286-293.
45. Choy, B., and Green, M.R., (1993) "Eucaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly." *Nature* **366** : 531-536.
46. Chu, S., Archer, R.H., Zengel, J.M., and Lindahl, L., (1994) "The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91** : 659-663.
47. Cigan, A.M., and Donahue, T.F., (1987) "Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast-a review" *Gene* **59** : 1-18.
48. Cigan, A.M., Pabich, E.K., Feng, L., and Donahue, T.F., (1989) "Yeast translation initiation suppressor *sui2* encodes the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 and shares sequence identity with the human α subunit." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 2784-2788.
49. Cigan, A.M., Foiani, M., Hannig, E.M., and Hinnebusch, A.G., (1991) "Complex formation by positive and negative translational regulators of *GCN4*." *Mol. Cell. Biol.* **11** : 3217-3228.
50. Clark, S.J., Colthurst, D.R., and Proud, C.G., (1988) "Structure and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. Casein kinase 2 and protein kinase C phosphorylate distinct but adjacent sites in the β -subunit." *Biochimica Biophysica Acta* **968** : 211-219.
51. Clemens, M.J., (1990) "Does protein phosphorylation play a role in translational control by eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases?" *Trends in Biochem. Sci.* **15** : 172-175.
52. Cohen, D.R., and Curran, T., (1990) "Analysis of dimerization and DNA binding functions in Fos and Jun by domain-swapping: involvement of residues outside the leucine zipper/basic region." *Oncogene* **3** : 929-936.
53. Collart, M.A., and Struhl, K., (1994) "NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization." *Genes Dev.* **8** : 525-537.

54. Colthurst, D.R., Campbell, D.G., and Proud, C.G., (1987) "Structure and regulation of eukaryotic initiation factor eIF-2." *Eur. J. Biochem.* **166** : 357-363.
55. Conrad, M.N., Wright, J.H., Wolf, A.J., and Zakian, V.A., (1990) "RAP1 protein interacts with yeast telomers in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability." *Cell* **63** : 739-750.
56. Cormack, B.P., Strubin, M., Ponticelli, A.S., and Struhl, K., (1991) "Functional differences between yeast and human TFIID are localised to the highly conserved region." *Cell* **65** : 341-348.
57. Cpolecchia, R., Buser, P., Stotz, A., and Linder, P., (1993) "A new yeast translation initiation factor suppresses a mutation in the eIF-4A RNA helicase." *EMBO J.* **12** : 4005-4011.
58. Cress, W.D., and Triezenberg, S.J., (1991) "Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain." *Science* **251** : 87-90.
59. Curran, T., and Franza, B.R.Jr., (1988) "Fos and Jun: the AP-1 connection." *Cell* **55** : 395-397.
60. De Benedetti, A., and Baglioni, C., (1984) "Inhibition of mRNA binding to ribosomes by localized activation of dsRNA-dependent protein kinase." *Nature* **311** : 79-81.
61. Dholakia, J.N., and Wahba, A.J., (1987) "The isolation and characterization from rabbit reticulocytes of two forms of eukaryotic initiation factor 2 having different β -polypeptides." *Journal of Biological Chemistry* **262** : 10164-10170.
62. Dholakia, J.N., and Wahba, A.J., (1989) "Mechanism of the nucleotide exchange reaction in eukaryotic polypeptide chain initiation." *Journal of Biological Chemistry* **264** : 546-550.
63. Diallynas, G., and Thireos, G., (1994) "Genetic and biochemical evidence for yeast GCN2 protein kinase polymerization." *Gene* **143** : 21-27.
64. Dilinger, E.A., Chaudhuri, A., and Maitra, U., (1979) "Purified eucariotic initiation factor 2 from calf liver consists of two polypeptide chains of 48.000 and 38.000 daltons." *J. Biol. Chem.* **254** : 6845-6848.
65. Donahue, T., R. Daves, G. Lucchini and G. Fink, (1983) " A short nucleotide sequence required for regulation of *HIS4* by the general control system of yeast." *Cell* **32** : 89-99.

66. Donahue, T.F., and Cigan, A.M., (1988) "Genetic selection for mutations that reduce or abolish ribosomal recognition of the *HIS4* translational initiator region." *Mol. Cell. Biol.* **8** : 2955-2963.
67. Donahue, T.F., Cigan, A.M., E.K., Pabich, and Valavicius, B.C., (1988) "Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 β gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process." *Cell* **54** : 621-632.
68. Drapkin, R., and Reinberg, D., (1994) "The essential twist." *Nature* **369** : 523-581.
69. Driscoll Penn, M., B. Galgoci and H. Greer, (1983) "Identification of *AAS* genes and their regulatory role in general control of amino acid biosynthesis in yeast." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 2704-2710.
70. Driscoll Penn, M., Thireos, G., and Greer, H., (1984) "Temporal analysis of general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: role of positive regulatory genes in initiation and maintenance of mRNA derepression." *Mol. Cell. Biol.* **4** : 520-528.
71. Driscoll Penn, M., "Positive regulation of amino acid biosynthesis.," PhD dissertation. *Harvard*, 1985.
72. Edery, I., Petryshyn, R., and Sonenberg, N., (1989) "Activation of double-stranded RNA-dependent kinase (*dsl*) by the TAR region of HIV-1 mRNA: a novel translational control mechanism." *Cell* **56** : 303-312.
73. Eisenmann, D.M., Dollard, C., and Winston, F., (1989) "SPT15, the gene encoding the yeast TATA binding factor TFIID is required for normal transcription initiation in vivo." *Cell* **58** : 1183-1191.
74. Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., and Karin, M., (1994) "The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 Transcription factors is conserved between yeast and mammals." *Cell* **77** : 381-390.
75. Evans, R.M., and Hollenberg, S.M., (1988) "Zinc fingers: Gilt by association." *Cell* **52** : 1-3.
76. Fascher, K.D., Schmitz, J., and Hörz, W., (1990) "Role of *trans*-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promoter in *S. cerevisiae*." *EMBO J.* **9** : 2523-2528.

77. Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., and Kornberg, R.D., (1993) "Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair." *Cell* **75** : 1379-1387.
78. Feng, Y., Gunter, L.E., Organ, L.E., and Cavener, D.R., (1991) "Translation initiation in *Drosophila melanogaster* is reduced by mutations upstream of the AUG initiator codon." *Mol. Cel. Biol.* **11** : 2149-2153.
79. Ferreri, K., Gill, G., and Montminy, M., (1994) "The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 1210-1213.
80. Fikes, J.D., Becker, D.M., Winston, F., and Guarente, L., (1990) "Striking conservation of TFIID in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* **346** : 291-294.
81. Fink, G.R., (1986) "Translational control of transcription in Eukaryotes." *Cell* **45** : 155-156.
82. Firoz Ahmad, M., Nasrin, N., Bagchi, M.K., Chakravarty, I., and Gupta, N.K., (1985) "A comparative study of the characteristics of eIF-2 and eIF-2-ancillary factor activities from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rabbit reticulocytes." *Journal of Biological Chemistry* **260** : 6960-6965.
83. Foiani, M., Cigan, A.M., Paddon, C.J., Harashima, S., and Hinnebusch, A.G., (1991) "GCD2, a translational repressor of the *GCN4* gene, has a general function in the initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cel. Biol.* **11** : 3203-3216.
84. Ford, M.J., Anton, I.A., and Lane, D.P., (1988) "Nuclear protein with sequence homology to translation initiation factor eIF-4A." *Nature* **332** : 736-738.
85. Frankel, A.D., and Kim, P.S., (1991) "Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation." *Cell* **65** : 717-719.
86. Frederickson, R.M., Montine, K.S., and Sonenberg, N., (1991) "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is increased in Src-transformed cell lines." *Mol. Cel. Biol.* **11** : 2896-2900.
87. Ge, H., and Roeder, R.G., (1994) "Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes." *Cell* **78** : 513-523.

88. Geballe, A.P., and Morris, D.R., (1994) "Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation." *Trends in Biochem. Sci.* **19** : 159-164.
89. Georgakopoulos, T., and Thireos, G., (1992) "Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription." *EMBO J.* **11** : 4145-4152.
90. Gill, G., and Ptashne, M., (1988) "Negative effect of the transcriptional activator GAL4." *Nature* **334** : 721-724.
91. Gill, G., and Tjian, R., (1991) "A highly conserved domain of TFIID displays species specificity in vivo." *Cell* **65** : 333-340.
92. Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., and Tjian, R., (1994) "A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAF_{II}110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 192-196.
93. Glass, C.K., Holloway, J.M., Devary, O.V., and Rosenfeld, M.G., (1988) "The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response element." *Cell* **54** : 313-323.
94. Godrich, J.A., Hoey, T., Thut, C.J., Admon, A., and Tjian, R., (1993) "Drosophila TAF_{II}40 interacts with both the VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB." *cell* **75** : 519-530.
95. Gottesfeld, J.M., Wolf, V.J., Dang, T., Forbes, D.J., and Hart, P., (1994) "Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIB component." *Science* **263** : 81-84.
96. Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A., (1990) "Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription." *Cell* **63** : 751-762.
97. Green, S.R., Spalding, A., Ashford, T., Proud, C.G., and Tuite, M.F., (1991) "Synthesis of human initiation factor-2 α in *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* **108** : 253-258.
98. Green, S.R., and Mathews, M.B., (1992) "Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI." *Genes Dev.* **6** : 2478-2490.

99. Gross, M., Redman, R., and Kaplansky, D.A., (1985) "Evidence that the primary effect of phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2(α) in rabbit reticulocyte lysate is inhibition of the release of eukaryotic initiation factor-2-GDP from 60 S ribosomal subunits." *Journal of Biological Chemistry* 260 : 9491-9500.
100. Gross, M., Wing, M., Rundquist, C., and Rubino, M.S., (1987) "Evidence that phosphorylation of eIF-2(α) prevents the eIF-2B-mediated dissociation of eIF-2-GDP from the 60 S subunit of complete initiation complexes." *Journal of Biological Chemistry* 262 : 6899-6907.
101. Gross, M., and Rubino, M.S., (1989) "Regulation of eukaryotic initiation factor-2B activity by polyamines and amino acid starvation in rabbit reticulocyte lysate." *Journal of Biological Chemistry* 264 : 21879-21884.
102. Guarante, L., (1987) "Regulatory proteins in yeast." *Ann. Rev. Genet.* 21 : 425-436.
103. Guthrie, C., and Fink, G.R., *Methods in enzymology-Guide to yeast genetics and molecular biology.*, Academic press, (1991) .
104. Hackett, P.B., Petersen, R.B., Hensel, C.H., Albericio, F., Gunderson, S.I., Palmenberg, A.C., and Barany, G., (1986) "Synthesis *in vitro* of a seven amino acid peptide encoded in the leader RNA of Rous Sarcoma Virus." *J. Mol. Biol.* 190 : 45-57.
105. Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P.A., and Guarente, L., (1989) "Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: a gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions." *Cell* 58 : 1173-1181.
106. Hannig, E.M., and Hinnebusch, A.G., (1988) "Molecular analysis of GCN3, a translational activator of GCN4: evidence for posttranslational control of GCN3 regulatory function." *Mol. Cell. Biol.* 8 : 4808-4820.
107. Hannig, E.M., Williams, N.P., Wek, R.C., and Hinnebusch, A.G., (1990) "The translational activator GCN3 function downstream from GCN1 and GCN2 in the regulatory pathway that couples GCN4 expression to amino acid availability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 126 : 549-562.
108. Hansen, J.C., and Wolffe, A.P., (1994) "A role for histones H2A/H2B in chromatin folding and transcriptional repression." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 2339-2343.
109. Harashima, S., and Hinnebusch, A.G., (1986) "Multiple GCD genes required for repression of GCN4, a transcriptional activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* 6 : 3990-3998.

110. Harashima, S., Hannig, E.M., and Hinnebusch, A.G., (1987) "Interactions between positive and negative regulators of *GCN4* controlling gene expression and entry into the yeast cell cycle." *Genetics* **117** : 409-419.
111. Hartley, A.D., Ward, M.P., and Garrett, S., (1994) "The Yak1 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* moderates thermotolerance and inhibits growth by an Sch9 protein kinase-independent mechanism." *Genetics* **136** : 465-474.
112. Hentze, M.W., (1990) "Overcoming inhibitions." *The New Biologist* **2** : 33-36.
113. Herendeen, D.R., Williams, K.P., Kassavetis, G.A, and Geiduschek, E.P., (1990) "An RNA polymerase-binding protein that is required for communication between an enhancer and a promoter." *Science* **248** : 573-578.
114. Herman, R.C., (1989) "Alternatives for the initiation of translation." *Trends in Biochem. Sci.* **14** : 219-222.
115. Herrera, F., Correia, H., Triana, L., and Fraile, G., (1991) "Association of ribosomal subunits. A new functional role for yeast EF-1 α in protein biosynthesis." *Eur. J. Biochem.* **200** : 321-327.
116. Hill, D.E., Hope, I.A., Macke, J.P., and Struhl, K., (1986) "Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein." *Science* **234** : 451-457.
117. Hinnebusch, A. and G. Fink, (1983) "Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** .
118. Hinnebusch, A.G., (1984) "Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 6442-6446.
119. Hinnebusch, A.G., (1985) "A hierarchy of *trans*-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cel. Biol.* **5** : 2349-2360.
120. Hinnebusch, A.G., Jackson, B.M., and Mueller, P., (1988) "Evidence for regulation of reinitiation in translational control of *GCN4* mRNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 7279-7283.
121. Hinnebusch, A.G., (1988) "Novel mechanisms of translational control in yeast." *Trends in Genet.* **4** : 169-172.

122. Hinnebusch, A.G., (1990) "Transcriptional and translational regulation of gene expression in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Progress in nucleic acid research and Molecular Biology* **38** : 195-240.
123. Hiremath, L.S., Hiremath, S.T., Rychlik, Wojciech, R., Joshi, S., Domier, L.L., and Rhoads, R.E., (1989) "In vitro synthesis, phosphorylation, and localization on 48 S initiation complexes of human protein synthesis initiation factor 4E." *Journal of Biological Chemistry* **264** : 1132-1138.
124. Hoekema, A., Kastelein, R.A., Vasser, M., and Boer, H.A., (1987) "Codon replacement in the *PGK1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression." *Mol. Cell. Biol.* **7** : 2914-2924.
125. Hoekstra, M.F., Demaggio, A.J., and Dhillon, N., (1991) "Genetically identified protein kinases in yeast." *Trends in Genetics* **7** : 256-261.
126. Holmes, D. S. and D.T. Quigley, (1981) "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." *Annal. Biochem.* **114** : 193-196.
127. Hope, I. and K. Struhl, (1985) "GCN4 protein synthesized in vitro binds *HIS3* regulatory sequences: Implications for the general control of amino acids biosynthesis in yeast." *Cell* **43** : 177-188.
128. Hope, I.A., and Struhl, K., (1986) "Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast." *Cell* **46** : 885-894.
129. Hope, I.A., and Struhl, K., (1987) "GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA." *EMBO J.* **6** : 2781-2784.
130. Hope, I.A., Mahadevan, S., and Struhl, K., (1988) "Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein." *Nature* **333** : 635-639.
131. Horikoshi, M., Yamamoto, T., Ohkuma, Y., Well, P.A., and Roeder, R.G., (1990) "Analysis of structure-function relationships of yeast TATA box binding factor TFIID." *Cell* **61** : 1171-1178.
132. Huijbergse, J.M., Good, P.D., Marczyński, G.T., Jaehning, J.A., and Engelke, D.R., (1993) "Gal4 protein binding is required but not sufficient for derepression and induction of GAL2 expression." *Journal of Biological Chemistry* **268** : 22219-22222.

133. Hyockman, K., Imbalzano, A.N., Khavari, P.A., Kingston, R.E., and Green, M.R., (1994) "Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex." *Nature* **370** : 477-481.
134. Imbalzano, A.N., Hyockman, K., Green, M.R., and Kingston, R.E., (1994) "Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA." *Nature* **370** : 481-311.
135. Ito, Hisao, Fukuda, Yasuki, Murata, Kousaku, and Kimura, Akira, (1983) "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *Journal of Bacteriology* **153** : 163-168.
136. Jackson, R.J., (1988) "Picornavirus break the rules." *Nature* **334** : 292-293.
137. Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S., and Tjian, R., (1990) "GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase." *Cell* **63** : 155-165.
138. Jackson, R.J., and Standart, N., (1990) "Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?" *Cell* **62** : 15-24.
139. Jackson, R.J., (1991) "The ATP requirement for initiation of eukaryotic translation varies according to the mRNA species." *Eur. J. Biochem.* **200** : 285-294.
140. Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L., (1994) "Human TAF_{II} 30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor." *Cell* **79** : 107-117.
141. Jang, S.K., and Wimmer, E., (1990) "Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57 kD RNA-binding protein." *Genes Dev.* **4** : 1560-1572.
142. Jaramillo, M., Dever, T.E., Merrick, W.C., and Sonenberg, N., (1991) "RNA unwinding in translation: assembly of helicase complex intermediates comprising eukaryotic initiation factors eIF-4F and eIF-4B." *Mol. Cel. Biol.* **11** : 5992-5997.
143. John, M., Briand, J-P., Granger-Schnarr, M., and Schnarr, M., (1994) "Two pairs of oppositely charged amino acids from Jun and Fos confer heterodimerization to GCN4 leucine zipper." *Journal of Biological Chemistry* **269** : 16247-16253.
144. Johnson, .PF., and McKnight, S.L., (1989) "Eukaryotic transcriptional regulatory proteins." *Annu. Rev. Biochem.* **58** : 799-839.

145. Jones, E.W., and Fink, G.R., (1985) "Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast." *Microbiol. Rev.* 5 : 181-293.
146. Kamakaka, R.T.M., Bulger, M., and Kadonaga, J.T., (1993) "Potentiation of RNA polymerase II transcription by Gal4-VP16 during but not after DNA replication and chromatin assembly." *Genes Dev.* 7 : 1779-1795.
147. Kanazawa, S., Driscoll, M., and Struhl, K., (1988) "ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance." *Mol. Cell. Biol.* 8 : 664-673.
148. Kaufman, R.J., and Murtha, P., (1987) "Translational control mediated by eucaryotic initiation factor-2 is restricted to specific mRNAs in transfected cells." *Mol. Cell. Biol.* 7 : 1568-1571.
149. Kaufman, R.J., Davies, M.V., Pathak, V.K., and Hershey, J.W.B., (1989) "The phosphorylation state of eucaryotic initiation factor 2 alters translational efficiency of specific mRNAs." *Mol. Cel. Biol.* 9 : 946-958.
150. Keegan, L., Gill, G., and Ptashne, M., (1986) "Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein." *Science* 231 : 699-704.
151. Kelly, R. G., (1970) "Preparation of uniformly labeled DNA by Nick translation." *J. Biol. Chem.* 254 : 39-45.
152. Kemp, B.E., and Pearson, R.B., (1990) "Protein kinase recognition sequence motifs." *Trends in Biochem. Sci.* 15 : 342-346.
153. Kill, D.E., and Struhl, K., (1988) "Molecular characterization of *GCD1*, a yeast gene for general control of amino acid biosynthesis and cell-cycle initiation." *Nucl. Acid Res.* 16 : 9253-9265.
154. Kim, J., Tzamarias, D., Ellenberger, T., Harrison, S.C., and Struhl, K., (1993) "Adaptability at the protein-DNA interface is an important aspect of sequence recognition by b ZIP proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 4513-4517.
155. Kim, K.T., Hashimoto, S., Kelleher III, R.J., Flanagan, P.M., Kornberh, R.D., Horikoshi, M., and Roeder, R.G., (1994) "Effects of activation-defective TBP mutations on transcription initiation in yeast." *Nature* 369 : 252-255.
156. Kim, Y-J., Björklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., and Kornberg, R.D., (1994) "A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II." *Cell* 77 : 599-608.

157. Klein, C., and Struhl, K., (1994) "Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains in vivo." *Science* **266** : 280-282.
158. Koleske, A.J., and Young, R.A., (1994) "An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators." *Nature* **368** : 466-469.
159. Kozak, M., and Shatkin, A.J., (1978) "Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of Edeine." *Journal of Biological Chemistry*. **253** : 6568-6577.
160. Kozak, M., (1979) "Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes." *Nature* **280** : 82-85.
161. Kozak, M., (1986) "Bifunctional messenger RNAs in Eucaryotes." *Cell* **47** : 481-483.
162. Kozak, M., (1986) "Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells." *Methods in Enzymol.* **133** : 546-574.
163. Kozak, M., (1987) "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs" *Nucl. Acid Res.* **15** : 8125-8148.
164. Kozak, M., (1988) "Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress." *Mol. Cell. Biol.* **8** : 2737-2744.
165. Kozak, M., (1989) "Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs." *Mol. Cel. Biol.* **9** : 5134-5142.
166. Kozak, M., (1990) "Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 8301-8305.
167. Kozak, M., (1991) "Structural features in eukaryotic, mRNAs that modulate the initiation of translation." *Journal of Biological Chemistry*. **266** : 19867-19870.
168. Kozak, M., (1991) "An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control." *Journal Cell Biology* **115** : 887-903.
169. Kozak, M., (1992) "A consideration of alternative models for the initiation of translation in eukaryotes." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **27** : 385-402.

170. Krezschmar, M., Kaiser, K., Lottspeich, F., and Meisterernst, M., (1994) "A novel mediator of class II transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators." *Cell* **78** : 513-523.
171. Krupitza, G., and Thireos, G., (1990) "Translational activation of GCN4 mRNA in a cell-free system is triggered by uncharged tRNAs." *Mol. Cell. Biol.* **10** : 4375-4378.
172. Kurtz, S., and Shore, D., (1991) "RAP1 protein activates and silences transcription of mating-type genes in yeast." *Genes Dev* **5** : 616-628.
173. Kyripides, N., Papamatheakis, J., Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "A transient GCN4 mRNA destabilization follows GCN4 translational derepression." *J. Biol. Chem.* Submitted .
174. Lamping, E., Lückl, J., Paltauf, F., Henru, S.A., and Kohlwein, S.D., (1995) "Isolation and characterization of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with pleiotropic deficiencies in transcriptional activation and repression." *Genetics* **137** : 55-65.
175. Lanker, S., Bushman, J., Hinnebusch, A., Trachsel, H., and Mueller, P., (1992) "Autoregulation of the yeast lysyl-tRNA synthetase gene GCD5/KRS1 by translational and transcriptional control mechanisms." *Cell* **70** : 647-657.
176. Laurent, B.C., Yang, X., and Carlson, M., (1992) "An essential *Saccharomyces cerevisiae* gene homologous to SNF2 encodes a helicase-related protein in a new family." *Mol. Cel. Biol.* **12** : 1893-1902.
177. Lee, K.A.W., and Krajewski, W., (1994) "A monomeric derivative of the cellular transcription factor CREB functions as a constitutive activator." *Mol. Cell. Biol.* **14** : 7204-7210.
178. Leuther, K.K., Salmeron, J.M., and Johnston, S.A., (1993) "Genetic evidence that an activation domain of GAL4 does not require acidity and may form a β sheet." *Cell* **72** : 575-585.
179. Li, Y., and Kornberg, R.D., (1994) "Interplay of positive and negative effectors in function of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 2362-2366.
180. Lin, Y-S., Carey, M.F., Ptashne, M., and Green, M.R., (1988) "GAL4 derivatives function alone and synergistically with mammalian activators in vitro." *Cell* : 659-664.

181. Lin, Y-S., Carey, M., Ptashne, M., and Green, M.R., (1990) "How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously." *Nature* **345** : 359-361.
182. Lipkin, S.M., Nelson, C.A., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G., (1992) "A negative retinoic acid response element in the rat oxytocin promoter restricts transcriptional stimulation by heterologous transactivation domains." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 1209-1213.
183. Lucchini, G., Hinnebusch, A., Chen, C., and Fink, G., (1984) "Positive regulatory interactions of the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **4** : 1326-1333.
184. Lue, N. F., and Kornberg, R.D., (1982) "Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res.* **10** : 2625-2637.
185. Lue, N.F., and Kornberg, R.D., (1987) "Accurate initiation at RNA polymerase II promoters in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 8839-8843.
186. Lue, N.F., Buchman, A.R., and Kornberg, R.D., (1989) "Activation of yeast RNA polymerase II transcription by a thymidine-rich upstream element *in vitro*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 486-490.
187. Ma, J., and Ptashne, M., (1988) "Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator." *Cell* **55** : 443-446.
188. Macgregor, P.F., Abate, C., and Curran, T., (1990) "Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1." *Oncogene* **5** : 451-458.
189. Mahadevan, S., and Struhl, K., (1990) " T_c , an unusual promoter element required for constitutive transcription of the yeast *HIS3* gene." *Mol. Cel. Biol.* **10** : 4447-4455.
190. Marciniak, R.A., Calnan, B.J., Frankel, A.D., and Sharp, P.A., (1990) "HIV-1 Tat protein *trans*-activates transcription *in vitro*." *Cell* **63** : 791-802.
191. Marcus, G.A., Silverman, N., Berger, S.L., Horiuchi, J., and Guarente, L., (1994) "Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors." *EMBO J.* **13** : 4807-4815.

192. Martens, J.A., and Brandl, C.J., (1994) "GCN4p activation of the yeast TRP3 gene is enhanced by ABF1p and uses a suboptimal TATA element." *Journal of Biological Chemistry* **269** : 15661-15667.
193. Martinez, E., Chiang, C-M., Ge, H., and Roeder, R.G., (1994) "TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter." *EMBO J.* **13** : 3115-3126.
194. McBratney, S., You, C., and Sarnow, P., (1993) "Internal initiation of translation." *Current Opinion in Cell Biology* **5** : 961-965.
195. McNeil, B.J., (1988) "Functional characterisation of a pyrimidine-rich element in the 5'-noncoding region of the yeast Iso-1-cytochrome c gene." *Mol. Cell Biol.* **8** : 1045-1054.
196. Meerovitch, K., Pelletier, J., and Sonenberg, N., (1989) "A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation." *Genes Dev.* **3** : 1026-1034.
197. Merrick, W.C., (1992) "Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis." *Microbiological Reviews* **56** : 291-315.
198. Messenguy, F., D. Colin and J. P. Ten Have, (1980) "Regulation of compartmentalisation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control." *Eur.J. Biochem.* **108** : 439-447.
199. Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S.B., Kerr, I.M., Williams, B.R.G., and Hovanessian, A.G., (1990) "Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon." *Cell* **62** : 379-390.
200. Miller, J., *Experiments in Molecular Genetics.*, N. Y., Cold Spring Harbor, C.S.H. Lab., (1978) .
201. Miller, P.F., and Hinnebusch, A.G., (1989) "Sequences that surround the stop codons of upstream open reading frames in *GCN4* mRNA determine their distinct functions in translational control." *Genes Dev.* **3** : 1217-1225.
202. Mitcell, P.J., and Tjian, R., (1989) "Transcription regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." *Science* **245** : 371-378.
203. Moehle, C.M., and Hinnebusch, A.G., (1991) "Association of RAP1 binding sites with stringent control of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cel. Biol.* **11** : 2723-2735.

204. Moldave, K., (1985) "Eukaryotic protein synthesis." *Ann. Rev. Biochem.* **54** : 1109-1149.
205. Moye, W. and H. Zalkin, (1987) "Roles of the TGACT repeat sequence in the yeast *TRP5* promoter." *J.Biol.Chem.* **262** : 3609-3618.
206. Muchardt, C., and Yaniv, M., (1993) "A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor." *EMBO J.* **12** : 4279-4290.
207. Mueller, P.P., and Hinnebusch, A.G., (1986) "Multiple upstream AUG codons mediate translational control of *GCN4*." *Cell* **45** : 201-207.
208. Mueller, P.P., Harashima, S., and Hinnebusch, A.G., (1987) "A segment of *GCN4* mRNA containing the upstream AUG codons confers translational control upon a heterologous yeast transcript" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 2863-2867.
209. Mueller, P.P., and A.G. Hinnebusch, (1987) "Multiple *GCD* genes regulate the translation of *GCN4* mRNA in yeast." *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **84** : 2863-2870.
210. Munroe, D., and Jacobson, A., (1990) "mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation." *Mol. Cel. Biol.* **10** : 3441-3455.
211. Myers, P.L., Skvirsky, R.C., Greenberg, M.L., and Greer, H., (1986) "Negative regulatory gene for general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cel. Biol.* **6** : 3150-3155.
212. Mylin, L.M., Bhat, J.P., and Hopper, J.E., (1989) "Regulated phosphorylation and dephosphorylation of GAL4, a transcriptional activator." *Genes Dev.* **3** : 1157-1165.
213. Nassal, M., Junker-Niepmann, M., and Schaller, H., (1990) "Translational inactivation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly." *Cell* **63** : 1357-1363.
214. Natsoulis, G., Hilger, F., and Fink, G.R., (1986) "The *HTS1* gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine tRNA synthetases of *S.cerevisiae*." *Cell* **46** : 235-243.
215. Nishizawa, M., Suzuki, Y., Nogi, Y., Matsumoto, K., and Fukasawa, T., (1990) "Yeast Gal11 protein mediates the transcriptional activation signal of two different transacting factors, Gal4 and general regulatory factor I/repressor/activator site binding protein1/translation upstream factor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 5373-5377.

216. Niederberger, P., M. Aebi and R. Huetter, (1983) "Influence of the general control of amino acid biosynthesis on cell growth and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Gen. Microbiol.* **129** : 2572-2579.
217. Noel, B., Magritte., Naefels, ed. Bonfini Press. N. Y., H. N. Adams Inc., (1979) **Leager**: .
218. Normanly, J., and Abelson, J., (1989) "tRNA identity." *Annu. Rev. Biochem.* **58** : 1029-1049.
219. O'Neil, K.T., Hoess, R.H., and DeGrado, W.F., (1990) "Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif." *Science* **249** : 774-778.
220. Oakley, M.G., and Dervan, P.B., (1990) "Structural motif of the GCN4 DNA binding domain characterized by affinity cleaving." *Science* **248** : 847-850.
221. Ochoa, S., and de Haro, C., (1979) "Regulation of protein synthesis in eukaryotes." *Ann. Rev. Biochem.* **48** : 549-580.
222. Ohana, B., Moore, P.A., Ruben, S.M., Southgate, C.D., Green, M.R., and Rosen, C.A., (1993) "The type 1 human immunodeficiency virus Tat binding protein is a transcriptional activator belonging to an additional family of evolutionarily conserved genes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 192-196.
223. Ording, E., Kvavik, W., Bostad, Q., and Gabrielsen, S., (1994) "The functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein." *Eur. J. Biochem.* **222** : 113-120.
224. Ozer, J., Moore, P.A., Bolden, A.H., Lee, A., Rosen, C.A., and Lieberman, P.M., (1994) "Molecular cloning of the small (γ) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription." *Genes Dev.* **8** : 2324-2335.
225. Paddon, C., E. Hanning and A. Hinnebusch, (1989) "Amino acid sequence similarity between *GCN3* and *GCD2*, positive and negative translational regulators of *GCN4* : Evidence for antagonism by competition." *Genetics* **122** : 551-568.
226. Padmanabha, R., Chen-Wu, J.L-P., Hanna, D.E., and Glover, C.V.C., (1990) "Isolation, sequencing, and disruption of the yeast *CKA2* gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **10** : 4089-4099.
227. Pain, V.M., (1986) "Initiation of protein synthesis in mammalian cells." *Biochem. J.* **235** : 625-637.

228. Paluh, J.L., Orbach, M.J., Legerton, T.L., and Yanofsky, C., (1988) "The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene *v-jun*-encoded protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 3728-3732.
229. Paluh, J.L., and Yanofski, C., (1991) "Characterization of *Neurospora* CPC1, a bZIP DNA-binding protein that does not require aligned heptad leucines for dimerization." *Mol. Cell. Biol.* **11** : 935-944.
230. Paololla, D.N., Rodgers Palmer, C., and Schepartz, A., (1994) "DNA targets for certain bZIP proteins distinguished by an intrinsic bend." *Science* **264** : 1130-1133.
231. Pathak, V.K., Nielsen, P.J., Trachsel, H., and Hershey, J.W.B., (1988) "Structure of the β subunit of translational initiation factor eIF-2." *Cell* **54** : 633-639.
232. Paule, M.R., (1990) "In search of the single factor." *Nature* **344** : 819-820.
233. Pelletier, J., and Sonenberg, N., (1985) "Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency." *Cell* **40** : 515-526.
234. Peltz, S.W., Donahue, J.L., and Jacobson, A., (1992) "A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **12** : 5778-5784.
235. Peterson, D.T., Safer, B., and Merrick, W.C., (1979) "Role of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of 80 S initiation complexes." *Journal of Biological Chemistry* **254** : 7730-7735.
236. Pina, B., Berger, S., Marcus, G.A., Silverman, N., Agapite, J., and Guarente, L., (1993) "ADA3: a gene identified by resistance to GAL4-VP16, with properties similar to and different from those of ADA2." *Mol. Cell. Biol.* **13** : 5981-5989.
237. Piotrowska, M., (1980) "Cross pathway regulation of ornithin carbamyltransferase synthesis in *Aspergillus nidulans*." *J. Gen. Microbiol.* **116** : 335-345.
238. Planta, R.J., and H.A., Raue, (1988) "Control of ribosome biogenesis in yeast." *Trends in Genetics* **4** : 64-68.
239. Ponticelli, A.S., and Struhl, K., (1990) "Analysis of *Saccharomyces cerevisiae his3* transcription in vitro: biochemical support for multiple mechanisms of transcription." *Mol. Cell. Biol.* **10** : 2832-2839.

- 240.** Poon, D., Schroeder, S., Wang, C.K., Yamamoto, T., Horikoshi, M., Roeder, R.G., and Weil, P.A., (1991) "The conserved carboxy-terminal domain of *Saccharomyces cerevisiae* TFIID is sufficient to support normal cell growth." *Mol. Cell Biol.* **11** : 4809-4821.
- 241.** Ptashne, M., (1986) "Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance." *Nature* **322** : 697-701.
- 242.** Ptashne, M., (1988) "How eukaryotic transcriptional activators work." *Nature* **335** : 683-689.
- 243.** Ptashne, M., and Gann, A.A.F., (1990) "Activators and targets." *Nature* **346** : 329-331.
- 244.** Pu, W.T., and Struhl, K., (1991) "Highly conserved residues in the bZIP domain of yeast GCN4 are not essential for DNA binding." *Mol. Cell. Biol.* **11** : 4918-4926.
- 245.** Ramirez, M., Wek, R.C., and Hinnebusch, A.G., (1991) "Ribosome association of GCN2 protein kinase, a translational activator of the *GCN4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **11** : 3027-3036.
- 246.** Ramirez, M., Wek, R.C., Vazquez de Aldana, C.R., Jackson, B.M., Freeman, B., and Hinnebusch, A.G., (1992) "Mutations activating the yeast eIF-2 α kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases." *Mol. Cell. Biol.* **12** : 5801-5815.
- 247.** Reddy, P., and Hahn, S., (1991) "Dominant negative mutations in yeast TFIID define a bipartite DNA-binding region." *Cell* **65** : 349-357.
- 248.** Reese, J.C., Apone, L., Walker, S.S., Griffin, L.A., and Green, M.R., (1994) "Yeast TAF_{II}s in a multisubunit complex required for activated transcription." *Nature* **371** : 523-527.
- 249.** Rhoads, R.E., (1991) "Protein synthesis, cell growth and oncogenesis." *Current Opinion in Cell Biology* **3** : 1019-1024.
- 250.** Rich, A., and Rajbhandary, U.L., (1976) "Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties." *Methods in Enzymol.* **148** : 567-602.
- 251.** Rogers, S., Wells, R., and Rechsteins, M., (1986) "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." *Science* **234** : 364-374.

- 252.** Romero, D.P., and Dahlberg, A.E., (1986) "The alpha subunit of initiation factor 2 is phosphorylated in vivo in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **6** : 1044-1049.
- 253.** Rose, M., and Botstein, D., (1983) "Structure and function of the yeast *URA3* gene. Differentially regulated expression of hybrid β -galactosidase from overlapping coding sequences in yeast." *J. Mol. Biol.* **170** : 883-904.
- 254.** Rotenberg, M.O., Moritz, M., and Woolford, J.L. Jr., (1988) "Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes." *Genes Dev.* **2** : 160-172.
- 255.** Roussou, I., Thireos, G., and Hauge, B.M., (1988) "Transcriptional-translational regulatory circuit in *Saccharomyces cerevisiae* which involves the *GCN4* transcriptional activator and the *GCN2* protein kinase." *Mol. Cell. Biol.* **8** : 2132-2139.
- 256.** Rowlands, A.G., Panniers, R., and Henshaw, E.C., (1988) "The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2." *Journal Biological Chemistry* **263** : 5526-5533.
- 257.** Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Decer, T.E., Merrick, W.C., and Sonenberg, N., (1990) "Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F." *Mol. Cell. Biol.* **10** : 1134-1144.
- 258.** Sachs, A.B., and Davis, R.W., (1990) "Translation initiation and ribosomal biogenesis: involvement of a putative rRNA helicase and RPL46." *Science* **247** : 1077-1079.
- 259.** Safer, B., (1983) "2B or not 2B: regulation of the catalytic utilization of eIF-2" *Cell* **33** : 7-8.
- 260.** Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular cloning-a laboratory manual*, 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press, (1989) .
- 261.** Sanger, F. and A.R. Coulson, (1975) " DNA sequencing with chain termination inhibitors." *J. Mol. Biol.* **94** : 441-449.
- 262.** Schimmel, P.R., and Söll, D., (1979) "Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs." *Ann. Rev. Biochem.* **48** : 601-648.
- 263.** Schmidt, M.C., Kao, C.C., Pei, R., and Berk, A.J., (1989) "Yeast TATA-box transcription factor gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 7785-7789.

264. Schmitt, M.E., and Clayton, D.A., (1985) "Yeast site-specific ribonucleoprotein endoribonuclease MRP contains an RNA component homologous to mammalian RNase MRP RNA and essential for cell viability." *Genes Dev.* **6** : 1975-1985.
265. Schmitt, M.E., and Clayton, D.A., (1992) "Yeast site-specific ribonucleoprotein endoribonuclease MRP contains an RNA component homologous to mammalian RNase MRP RNA and essential for cell viability." *Genes Dev.* **6** : 1975-1985.
266. Schmitt, M.E., and Clayton, S.A., (1993) "Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8 rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **13** : 7935-7941.
267. Schneider, R.J., and Shenk, T., (1987) "Impact of virus infection on host cell protein synthesis." *Ann. Rev. Biochem.* **56** : 317-332.
268. Scorsone, K.A., Panniers, R., Rolands, A.G., and Henshaw, E.C., (1987) "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 during physiological stresses which affect protein synthesis." *Journal Biological chemistry* **262** : 14538-14543.
269. Seipel, K., Georgiev, O., Gerber, H-P., and Schaffner, W., (1993) "C-terminal domain (CTD) of RNA-polymerase II and N-terminal segment of the human TATA binding protein (TBP) can mediate remote and proximal transcriptional activation respectively." *Nucl. Acid Res.* **21** : 5609-5615.
270. Sharp, P.M., Tuohy, T.M.F., and Mosurski, K.R., (1986) "Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes." *Nucl. Acid Res.* **14** : 5125-5143.
271. Siekierka, J., Manne, V., and Ochoa, S., (1984) "Mechanism of translational control by partial phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 352-356.
272. Singer, V.L., Wobbe, C.R., and Struhl, K., (1990) "A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation." *Genes Dev.* **4** : 636-645.
273. Smeal, T., Angel, P., Meek, J., and Karin, M., (1989) "Different requirement for formation of Jun : Jun and Jun : Fos complexes." *Genes Dev.* **3** : 2091-2100.
274. Song, C-Z., Loewenstein, P.M., and Green, M., (1994) "Transcriptional activation in vitro by the human immunodeficiency virus type I Tat protein: evidence for specific interaction with coactivator (s)." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 9357-9363.

275. Southern, E. M., (1975) "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J. Mol. Biol.* **98** : 503-508.
276. Strauss, E.J., and Guthrie, C., (1991) "A cold-sensitive mRNA splicing mutant is a member of the RNA helicase gene family." *Genes Dev.* **5** : 629-641.
277. Struhl, K., (1982) "Regulatory sites for *his3* expression in yeast." *Nature* **300** : 284-286.
278. Struhl, K., (1985) "Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 8419-8423.
279. Struhl, K., (1989) "Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast." *Annu. Rev. Biochem.* **58** : 1051-1077.
280. Suckow, M., Madan, A., Kisters-Woike, B., von Wilcken-Bergmann, B., and Müller-Hill, B., (1994) "Creating new DNA binding specificities in the yeast transcriptional activator GCN4 by combining selected amino acid substitutions." *Nucl. Acid Res.* **22** : 2198-2208.
281. Svaren, J., Schmitz, J., and Hörz, W., (1994) "The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the PHO5 promoter." *EMBO J.* **13** : 4856-4862.
282. Tan, S., and Richmond, T.J., (1990) "DNA binding-induced conformational change of the yeast transcriptional activator PRTF." *Cell* **62** : 367-377.
283. Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "Transcriptional interference by *GCN4* overexpression reveals multiple interactions mediating transcriptional activation." *Mol. Gen. Genet.* **In Press** .
284. Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "A recombinatorial method useful for cloning dominant alleles in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucl. Acid Res.* **In Press** .
285. Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "The requirement for a transcriptional mediator is determined by the polarity of the target of a dimeric activator." *Science* **Submitted** .
286. Thireos, G., M. Driscoll-Penn and H. Greer, (1984) "5' untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 5096-5101.

287. Thireos, G., Tzamarias, D., Tavernarakis, N., P., Liodis, and D., Alexandraki, (1995) "Gene overexpression reveals alternative mechanisms of inducing GCN4 mRNA translation." *Gene* In preparation .
288. Thomas, N.S.B., Matts, R.L., Levin, D.H., and London, I.M., (1985) "The 60S ribosomal subunit as a carrier of eukaryote initiation factor 2 and the site of reversing factor activity during protein synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 260 : 9860-9866.
289. Thompson, C.M., Koleske, A.J., Chao, D.M., and Young, R.A., (1993) "A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast." *Cell* 73 : 1361-1375.
290. Thompson, J.S., Ling, X., and Grunstein, M., (1994) "Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast." *Nature* 369 : 245-247.
291. Thorsness, P.E., and Fox, T.D., (1990) "Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* 346 : 376-379.
292. Tjian, R., and Maniatis, T., (1994) "Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces." *Cell* 77 : 5-8.
293. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., and Wigler, M., (1988) "*SCH9*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits." *Genes Dev.* 2 : 517-527.
294. Trono, D., Andino, R., and Baltimore, D., (1988) "An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis." *Journal of Virology* 62 : 2291-2299.
295. Tsao, Y-P., Wu, H-Y., and Liu, L.F., (1989) "Transcription-driven supercoiling of DNA: Direct biochemical evidence from in vitro studies." *Cell* 56 : 111-118.
296. Tzamarias, D., Alexandraki, D., and Thireos, G., (1986) "Multiple cis-acting elements modulate the translational efficiency of GCN4 mRNA in yeast." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 4849-4853.
297. Tzamarias, D., and Thireos, G., (1988) "Evidence that the *GCN2* protein kinase regulates reinitiation by yeast ribosomes." *EMBO J.* 7 : 3547-3551.
298. Tzamarias, D., Roussou, I., and Thireos, G., (1989) "Coupling of GCN4 mRNA translational activation with decreased rates of polypeptide chain initiation." *Cell* 57 : 947-954.

299. Tzamarias, D., and Struhl, K., (1994) "Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex." *Nature* **369** : 758-761.
300. Underwood, M.R., and Fried, H.M., (1990) "Characterization of nuclear localizing sequences derived from yeast ribosomal protein L29." *EMBO J.* **9** : 91-99.
301. Van Hoy, M., Leuther, K.K., Kodadek, T., and Johnston, S.A., (1993) "The acidic activation domains of the GCN4 and GAL4 proteins are not α helical but form β sheets." *Cell* **72** : 587-594.
302. Vazquez de Aldana, C., Wek, R., San Segundo, P., Truesdell, A., and Hinnebusch, A., (1994) "Multicopy tRNA genes functionally suppress mutations in yeast eIF2 α kinase GCN2: Evidence for separate pathways coupling gcn4 expression to uncharged tRNA." *Mol. Cell. Biol.* **14** : 7920-7932.
303. Venter, U., Svaren, J., Schmitz, J., Schmid, A., and Hörz, W., (1994) "A nucleosome precludes binding of the transcription factor Pho4 *in vivo* to a critical target site in the PHO5 promoter." *EMBO J.* **13** : 4848-4855.
304. Verdin, E., Paras, P.Jr., and Van Lint, C., (1993) "Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation." *EMBO J.* **12** : 3249-3259.
305. Vincent, A.C., and Struhl, K., (1992) "ACR1, a yeast ATF/CREB repressor" *Mol. Cell. Biol.* **12** : 5394-5405.
306. Wang, W., Gralla, J.D., and Carey, M., (1992) "The acidic activator GAL4-AH can stimulate polymerase II transcription by promoting assembly of a closed complex requiring TFIID and TFIIA." *Genes Dev.* **6** : 1716-1727.
307. Weaver, J.C., and Astumian, D., (1990) "The response of living cells to very weak electric fields: the thermal noise limit." *Science* **247** : 459-462.
308. Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E., and Jäckle, H., (1989) "The homeotic gene *fork head* encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo." *Cell* **57** : 645-658.
309. Weigel, D., and Jäckle, H., (1990) "The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors?" *Cell* **63** : 455-456.
310. Wek, R.C., Jackson, B.M., and Hinnebusch, A.G., (1989) "Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2

protein suggests a mechanism for coupling *GCN4* expression to amino acid availability." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 4579-4583.

- 311.** Wek, R.C., Ramirez, M., Jackson, B.M., and Hinnebusch, A.G., (1990) "Identification of positive-acting domains in GCN2 protein kinase required for translational activation of *GCN4* expression." *Mol. Cell. Biol.* **10** : 2820-2831.
- 312.** Wek, R.C., Cannon, J.F., Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G., (1992) "Truncated protein phosphatase GLC7 restores translational activation of *GCN4* expression in yeast mutants defective for the eIF-2 α kinase GCN2." *Mol. Cell. Biol.* **12** : 5700-5710.
- 313.** Wickens, M.P., and Dahlber, J.E., (1987) "RNA-protein interactions." *Cell* **51** : 339-342.
- 314.** Wiemken, A and P. Nurse, (1973) "Isolation and characterization of the amino acid pools located within the cytoplasm and vacuoles of *Candida utilis*." *Planta* **109** : 293-298.
- 315.** Williams, N.P., Mueller, P.P., and Hinnebusch, A.G., (1988) "The positive regulatory function of the 5' -proximal open reading frames in *GCN4* mRNA can be mimicked by hererologous, short coding sequences." *Mol. Cell. Biol.* **8** : 3827-3836.
- 316.** Williams, N.P., Hinnebusch, A.G., and Donahue, T.F., (1989) "Mutations in the structural genes for eukaryotic initiation factors 2 β and 2 α of *Saccharomyces cerevisiae* disrupt translational control of *GCN4* mRNA." *Proc. Acad. Sci. USA* **86** : 7515-7519.
- 317.** Williams, T., and Tjian, R., (1991) "Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2." *Genes Dev* **5** : 670-682.
- 318.** Wobbe, C.R., and Struhl, K., (1990) "Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription in vitro." *Mol. Cell Biol.* **10** : 3859-3867.
- 319.** Wolfner, M., D. Yep, F. Messenguy and G. Fink, (1975) "Integration of amino acid biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisie*." *J. Mol. Biol.* **96** : 273-279.
- 320.** Woychik, N.A., and Young, R.A., (1990) "RNA polymerase II: subunit structure and function." *Trends in Biochem. Sci.* **15** : 347-351.

- 321.** Yarger, J.G., Armilei, G., and Gorman, M.C., (1986) "Transcription terminator-like element within a *Saccharomyces cerevisiae* promoter region." *Mol cell biol* **6** : 1095-1101.
- 322.** Yen, P.M., Ikeda, M., Wilcox, E.C., Brubaker, J.H., Spanjaard, R.A., Sugawara, A., and Chin, W.W., (1994) "Half-site arrangement of hybrid glucocorticoid and thyroid hormone response elements specifies thyroid hormone receptor complex binding to DNA and transcriptional activity." *Journal of biological chemistry* **269** : 12704-12709.
- 323.** Yokomori, K., Zeidler, M.P., Chen, J-L., Verrijner, C.P., Milodzik, M., and Tjian, R., (1994) "Drosophila TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation." *Genes Dev.* **8** : 2313-2323.
- 324.** Yost, H.J., and Lindquist, S., (1988) "Translation of unspliced transcripts after heat shock." *Science* **242** : 1544-15.
- 325.** Zhang, L., and Guarente, L., (1993) "Evidence that TUP1/SSN6 has a positive effect on the activity of the yeast activator HAP1." *Genetics* **136** : 813-817.
- 326.** Zhou, Y., Busby, S., and Ebright, R.H., (1993) "Identification of the functional subunit of a dimeric transcription activator protein by use of oriented heterodimers." *Cell* **73** : 375-379.
- 327.** Zin, K., Keller, A., Whittemore, L-A., and Maniatis, T., (1988) "2-aminopurine selectively inhibits the induction of β -interferon, *c-fos*, and *c-myc* gene expression." *Science* **240** : 210-213.



B) Δημοσιεύσεις

Στοιχεία της διατριβής αυτής έχουν δημοσιευτεί ή θα δημοσιευθούν στις παρακάτω εργασίες:

1. Kyrpides, N., Papamatheakis, J., Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "A transient GCN4 mRNA destabilization follows GCN4 translational derepression." J. Biol. Chem., **Submitted** .
2. Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "Transcriptional interference by GCN4 overexpression reveals multiple interactions mediating transcriptional activation." Mol. Gen. Genet., **In Press** .
3. Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "A recombinatorial method useful for cloning dominant alleles in *Saccharomyces cerevisiae*." Nucl. Acid Res., **In Press** .
4. Tavernarakis, N., and Thireos, G., (1995) "The requirement for a transcriptional mediator is determined by the polarity of the target of a dimeric activator." Science, **Submitted** .
5. Thireos, G., Tzamarias, D., Tavernarakis, N., P., Liodis, and D., Alexandraki, (1995) "Gene overexpression reveals alternative mechanisms of inducing GCN4 mRNA translation." Gene, **In preparation** .



Για τη συγγραφή της διατριβής αυτής, χρησιμοποιήθηκε η υποδομή (Hardware) της ομάδας Κρυσταλογραφίας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), με προσφορά του Μιχάλη Κοκκινίδη.