

## **Kromatindynamik under kvävesvält i fissionsjäst, *Schizosaccharomyces pombe*.** *Dennis Larsson, Examensarbete E 45 hp*

Jäst är oftast förknippat med bakning och fermentering men inom vetenskapliga kretsar är jäst väldigt användbara som modellorganismer inom cellbiologi. Jästarten *Schizosaccharomyces pombe* är en encellig organism först utvunnen ur en afrikansk öl och är mycket lämpad för studier inom genetik på grund av dess få kromosomer och kromatinstruktur som påminner mycket om de hos djur och även människor. Kromatin är långa kedjor av DNA omlindat runt proteiner kallade histoner vilket i sin tur är organiserade i strukturer som kallas nukleosomer och är den packade formen av genetiskt material i cellerna. Det förekommer i princip i två konfigurationer i jäst, heterokromatin och eukromatin. Heterokromatin är en tätt packad konfiguration där generna är tystade och är ofta funnet i områden där genreglering är hårt nedtryckt, t.ex. telomerer och centromerer. Eukromatin är en mer lätt packad konfiguration som tillåter fullt genuttryck. I *S. pombe* är heterokromatin huvudsakligen funnet i närheten av kärnmembranet under normala förhållanden.

En studie påvisade att en kromatinregion innehållande sju gener som under kvävesvält visade förlust av nukleosomer vilket ledde till en stor ökning av genuttryck. Dessutom visade det sig att regionen förflyttades under kvävesvält från kärnmembranet till ett mer centralt läge i cellkärnan. Detta fenomen gav upphov till hypotesen att denna förflyttning under kvävesvält är viktig för att fullständigt genuttryck ska ske.

För att klargöra effekten av förflyttning i samband med upp-regleringen generna i regionen använde vi en stam av *S. pombe* i vilken vi satt in en gen för ett protein som binder till en "gal4 binding region" på genomet, vilket i det här fallet finns insatt i nämnda kromatinregionen. När det väl sitter där kommer enzymet farnesyltransferas och identifierar en aminosyrasvans som sitter på proteinet och fäster en molekyll på den. Denna molekyll är vattenavstötande och kommer därför att attraheras och binda till andra vattenavstötande områden i cellkärnan, som i det här fallet är det kärnmembranet, och därmed fästa regionen vid membranet vilket i teorin borde hindra förflyttningen.

Vi är intresserade av att se om det här proteinet har en effekt på förflyttningen och därför behövs kromatinregionen och några referenspunkter som kärnmembranet och spindelpolkroppen, vilka taggas med fluorescerande proteiner (GFP, DsRed, och TdTomato). Med regionen och dessa andra strukturer taggade kan man undersöka kromatinrörelsen under kvävesvält med hjälp av fluorescensmikroskopi och därmed avgöra effektiviteten av det insatta proteinet.

För att mäta genuttrycket från generna före och efter kvävesvält användes RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), en teknik som utnyttjar enzymet omvänt transkriptas som omvandlar mRNA, en produkt av genuttryck, till komplementärt DNA (cDNA) som kan läsas av och tolkas. Med hjälp av denna teknik kunde vi klargöra huruvida kvävesvältsprocessen var lyckad eller inte genom att jämföra mängden DNA.

När man lägger ihop alla experimenten har vi en bra bakgrund att undersöka omständigheterna kring omlokaliseringen av kromatinet och effekter det har på generna som svarar på kvävesvält i *S. pombe*.