Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche de partenaires fonctionnels de CTD kinase CTK1

Alsteen, Gladys

Award date:
2002

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 28. Apr. 2024

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Recherche de partenaires fonctionnels de la CTD kinase *CTK1*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

Gladys ALSTEEN

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Recherche de partenaires fonctionnels de la CTD kinase CTK1

ALSTEEN Gladys

Résumé

Le domaine carboxy-terminal (CTD) de la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II de levure comporte 26 à 27 répétitions d'une séquence consensus de 7 acides aminés, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (YSPTSPS). L'état de phosphorylation du CTD dans les complexes d'initiation et d'élongation étant différent, cela suggère que la phosphorylation pourrait jouer un rôle dans le contrôle du fonctionnement de l'ARN polymérase II. Une des kinases phosphorylant le CTD est CTDK-1. Celle-ci est composée de trois sous-unités (α, β, γ). Le gène *CTK1* codant pour la sous-unité α possède l'activité kinase. La délétion de ce gène est responsable d'un retard de croissance en conditions permissives (30°C) et d'un phénotype cryosensible en conditions restrictives (18°C). Au cours de ce travail, nous avons recherché des partenaires fonctionnels de *CTK1*. Dans ce but, nous avons cherché à identifier les protéines qui, lorsqu'elles sont surexprimées restaurent le phénotype sauvage d'une souche Δ *ctk1* transformée par une banque sauvage multicopie. La recherche de candidats suppresseurs a été faite parmi les colonies capables de croître en conditions restrictives. Dans un premier temps, nous avons discriminé par PCR diagnostique, parmi ces colonies, les complémentants des suppresseurs. Dans un deuxième temps, nous avons identifié les candidats suppresseurs par séquençage.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2002
Promoteur: Professeur J. Vandenhaute

Je remercie le Professeur Vandenhaute pour m'avoir offert la possibilité de faire ce mémoire dans son laboratoire.

Merci aux membres du jury, C. Benet, A. Decreux, B. Flamion, C. Lambert-de Rouvroit pour avoir prêté un œil critique et attentif à ce mémoire.

Un grand merci à Vincent pour le temps qu'il m'a consacré ainsi que pour sa patience et ses précieux conseils.

Merci à Max et Ben pour leur précieuse aide.

Je remercie Sophie pour son soutien et sa disponibilité.

Merci à Lio, Godefroid, Rose-Ma, Monique et Mélanie pour leur bonne humeur.

Merci à toutes les personnes que j'ai croisé à un moment où un autre et qui ont répondu à mes questions.

Merci à Sarah, Géraldine, Régis, Jean-Mi, Denis, Jean-Be et Alexis pour leur soutien et leur amitié.

Je remercie mes parents pour leur soutien et leurs encouragements pendant toutes ces longues années d'étude.

Et enfin, j'aimerais remercier une personne qui compte beaucoup pour moi. Merci Oli pour ta patience et tes encouragements.

Abréviations.

°C	:Degré centigrade
ADN	:Acide DésoxyriboNucléique
ARN	:Acide RiboNucléique
cs	:cryosensible
CTD	:Carboxy-Terminal Domain
DMSO	:DiméthylSulfoxyde
DO	:Densité Optique
EDTA	:EthylèneDiamine-TétraAcétate
GTF	:General Transcription Factor
kb	:Kilo Base
LB	:Milieu de Luria-Bertani
ORF	:Open Reading Frame
PCR	:Polymerase Chain Reaction
PEG	:PolyEthylène Glycol
PIC	:Preinitiation Complex
POL II	:ARN polymérase II
rpm	:Rotations par minute
SDS	:Sodium Dodécyl Sulfate
TAE	:Tris-Acétate-EDTA
TE	:Tris-EDTA
tm	:température de melting
Tris	:Tri-(hydroxyméthil)-aminométhane
UV	:Ultra-Violet
w/o	:Without
YPD	:Milieu Yeast Peptone Dextrose

Plan du travail

Introduction.....1

1.La transcription chez les Eucaryotes.....1

1.1.L'initiation.....2

1.1.1.La formation du complexe d'initiation.....3

1.2.L'élongation.....3

1.3.La terminaison.....4

2.La CTD kinase CTDK-1.....4

2.1.Introduction.....4

2.2.La CTD kinase CTDK-1.....6

2.2.1.Caractéristiques des mutants *ctk1*.....7

2.3.La recherche de suppresseurs.....7

Objectif du mémoire.....9

Résultats.....10

1.Préliminaires.....10

2.Discrimination par PCR des clones complémentés « CTK1 ».....11

3.Identification des candidats suppresseurs par séquençage.....13

Conclusions et discussion.....15

Matériels.....18

1.les tampons.....18

2.Les solutions.....19

3.Milieux de culture.....22

3.1.Milieux de culture bactériens.....22

3.1.1.Milieu Luria-Bertani (LB).....22

3.1.2.Milieu SOB Liquide.....22

3.2.Milieux de culture levuriens.....23

3.2.1.Milieu YPD.....23

3.2.2.Milieu Casa.....23

3.2.3.Milieu glycérol solide.....24

3.2.4.Milieu éthanol solide.....24

3.2.5.Milieu raffinose solide.....24

3.2.6.Milieu galactose solide.....25

3.2.7.Milieu minimum.....25

3.2.8.Milieu synthétique.....25

Méthodes. 26

1.Souches bactériennes et plasmides. 26

1.1.Souche bactérienne. 26

1.2.Plasmide. 26

2. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries. 27

2.1.Transformation des bactéries par choc thermique. 27

2.2.Transformation des bactéries par électroporation. 28

3.Techniques relatives à l'utilisation de levures. 30

3.1.Transformation de levures. 30

4. Techniques relatives à l'ADN. 31

4.1 Extraction d'ADN de levures. 31

4.2 Extraction d'ADN plasmidique par minipréparation. 32

4.3.Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). 33

4.3.1. Principe général 33

4.4.Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose. 35

4.5.Extraction de l'ADN à partir de gel. 36

4.6.Restriction de l'ADN. 38

4.7.Réaction de ligation. 38

4.8.Le séquençage. 39

4.8.1. Le séquençage automatique. 39

Bibliographie 41

Introduction

Introduction.

1.La transcription chez les Eucaryotes (pour une revue lire Hampsey, 1998).

La transcription constitue l'étape préliminaire de l'expression génétique.

Contrairement aux procaryotes qui possèdent une seule ARN polymérase, les eucaryotes, dont fait partie *Saccharomyces cerevisiae*, ont trois ARN polymérases nucléaires . L'ARN polymérase I (POL I) synthétise le pré-ARN 35s, précurseur des ARN ribosomiques 25s,18s et 5.8s qui constituent les ARN les plus représentés dans la cellule. L'ARN polymérase II (POL II) synthétise les précurseurs des ARN messagers (mRNA), ainsi que la plupart des petits ARN (Small Nuclear RNA et Small Nucleolar RNA). L'ARN polymérase III (POL III) transcrit les ARN de transfert, l'ARN ribosomique 5s et les petits ARN non synthétisés par la POL II.

Le mécanisme de la transcription impliquant ces trois ARN polymérases est divisé en trois étapes : l'initiation au cours de laquelle se réalisent le recrutement de la machinerie de transcription au niveau du promoteur et le démarrage de celle-ci ; l'élongation, au cours de laquelle l'ARN est synthétisé et enfin la terminaison assurant le décrochage de la polymérase et de l'ARN nouvellement formé.

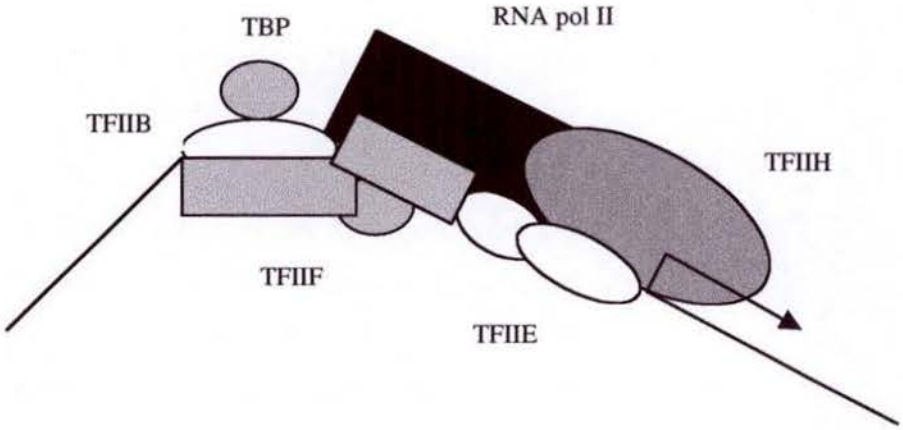

Figure 1 : Schéma du complexe de préinitiation.
Les GTFs se lient à l'ADN formant un complexe avec l'ARN polymérase au site d'initiation de la transcription. C'est le complexe de préinitiation (PIC) ou machinerie basale. La composition en sous-unités est indiquée, excepté pour TFIIH (9 sous-unités) et pour la POL II (12 sous-unités) (Hampsey, 1998).

1.1.L'initiation.

L'initiation, la première étape de la transcription, se fait à des sites précis de l'ADN, appelés promoteurs.
Un promoteur "type" de classe II (POL II dépendant) se compose de plusieurs boîtes (proximales, telle la boîte TATA, ou plus distales, telles les US, Upstream Sequences). Chacune de celle-ci est formée de séquences nucléotidiques (séquence *cis*) reconnues par des facteurs exerçant un contrôle en *trans* (facteurs *trans*).

La boîte TATA a pour rôle de positionner l'ARN polymérase II au niveau du site +1. Sa séquence consensus est $TATA^{A}/_{T}A^{A}/_{T}$.

Les UAS (Upstream Activating Sequence) et les URS (Upstream Repressing Sequence) ayant un rôle activateur ou répresseur, respectivement, sont situées à des distances importantes du promoteur du gène, généralement en amont de celui-ci. C'est, dans ce cas, la structure tridimensionnelle de l'ADN qui permet de rapprocher ces éléments régulateurs du gène à transcrire.

L'initiation de la transcription demande l'assemblage d'un complexe multiprotéique sur ce promoteur. En effet, l'ARN polymérase a besoin de facteurs multiples pour se positionner au point de départ de la transcription, pour former ce qu'on appelle parfois le PIC (preinitiation complex) (figure 1). Il existe des facteurs généraux de transcription ou GTFs (TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIH et TFIIF) qui contribuent à la transcription de niveau basal (pour une revue lire Hampsey et Reinberg, 1999). Des facteurs additionnels, par exemple des activateurs, peuvent augmenter la transcription au-delà du niveau basal. En fait, les activateurs, souvent multiples, interagissent avec les facteurs généraux de transcription par l'intermédiaire de « coactivateurs » (par exemple certains des TAF de TFIID) qui relaient les signaux des activateurs vers le reste de la machinerie.

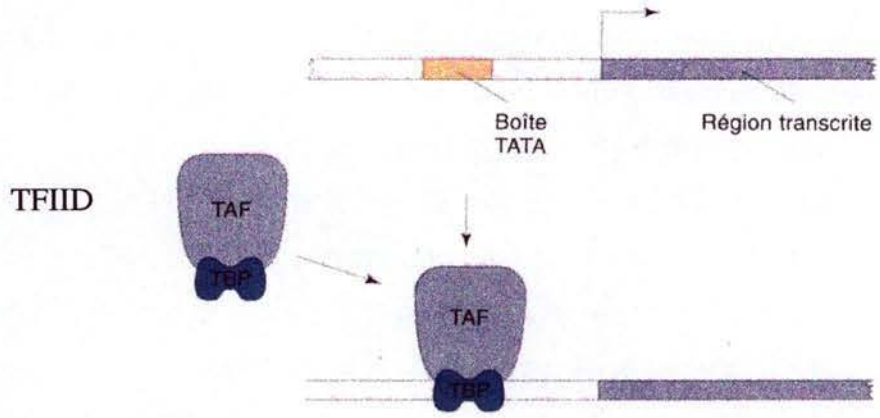

Figure 2 : Le facteur de transcription TFIID est recruté au niveau de la boîte TATA via le TBP (TATA Binding Protein) (en bleu foncé). Il comprend également différents TAF (TBP Associated Factor) (en bleu clair). Ensuite, les autres GTFs viennent se fixer à l'ADN selon un ordre précis (non représenté).

Les nombreux peptides impliqués à ce seul stade de la transcription, la plus étudiée, sont de l'ordre de la centaine sans qu'actuellement l'ensemble du processus de leur mise en place soit élucidé.

1.1.1.La formation du complexe d'initiation.

Une succession d'étapes met en jeu des éléments du promoteur, l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de la transcription qui sont des complexes protéiques dont une des fonctions est d'assurer la stabilité du complexe d'initiation de la transcription.
La première étape est la fixation du facteur de transcription TFIID sur la boîte TATA (figure 2). TFIID est composé d'un grand nombre de sous-unités, dont l'une, responsable de la reconnaissance de la séquence TATA, est appelée TBP (TATA box Binding Protein). Une fois TFIID fixé, les autres facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase II viennent s'assembler (figure 3).

1.2.L'élongation (pour une revue lire Uptain *et al.*, 1997).

Lors de l'élongation, l'ARN polymérase construit un ARN hybridé avec le brin antisens de l'ADN, dont la séquence primaire est la copie du brin sens mais composé de ribonucléotides au lieu des désoxyribonucléotides et d'uracile à la place des thymines.

L'élongation nécessite aussi la présence de nombreux facteurs, certains spécifiques de l'élongation mais d'autres également impliqués dans l'initiation (Costa et Arndt, 2000). Par exemple, le facteur général de transcription TFIIF, qui est essentiel pour la stabilité du PIC et l'initiation, régule aussi l'élongation.

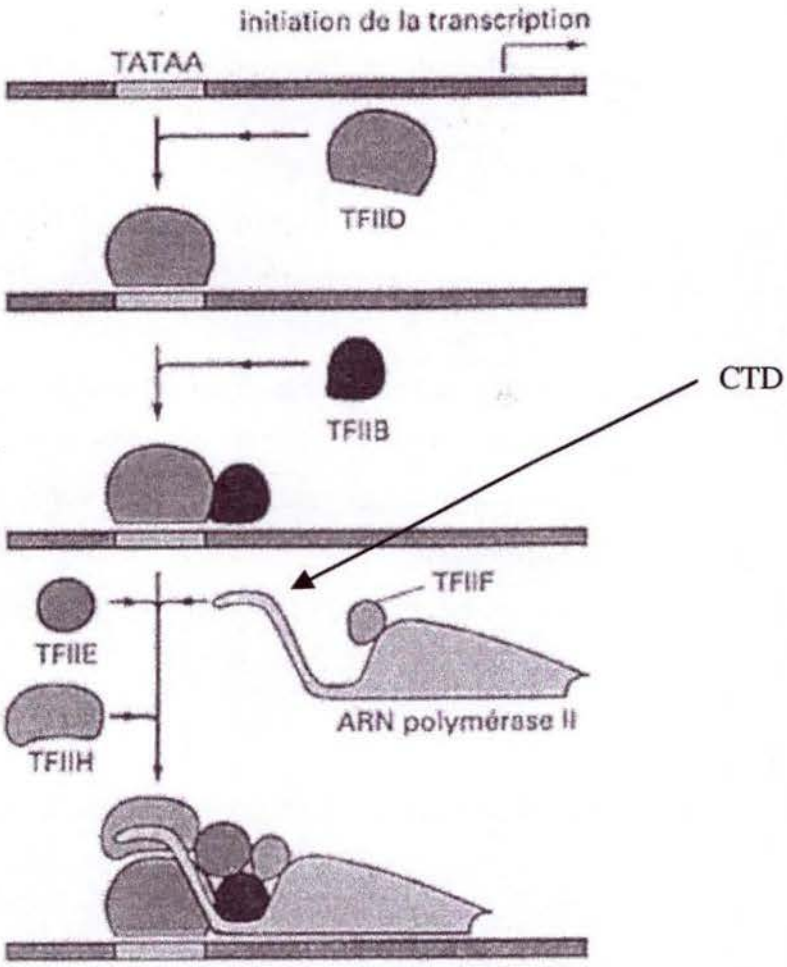

Figure 3 : Schéma représentant l'assemblage des facteurs généraux de Transcription.

L'ARN polymérase arrive dans le PIC sous la forme d'un complexe préformé avec TFIIF. Les sous-unités des GTFs ne sont pas représentées.

TFIIF interagit directement avec l'ARN polymérase II ; son rôle serait de mettre fin aux « pauses » faites par l'enzyme.

Lorsque le site promoteur est libéré par la progression de l'ARN polymérase II c'est-à-dire par l'entrée en élongation, un autre complexe d'initiation peut se mettre en place.

1.3.La terminaison.

Des signaux de polyadénylation (séquence type :5' -A-A-T-A-A-A-3' sur le brin sens) contribuent à la terminaison de la transcription d'un gène. Le clivage de l'ARN naissant, par une endonucléase, aura lieu 20 bases en aval du signal. L'ARN polymérase quitte l'ADN et libère le transcrit d'ARN qui contient l'information génétique recopiée pour permettre l'expression du gène sous forme de protéine.

2.La CTD kinase CTDK-1.

2.1.Introduction.

Comme toute transcription, celle des mRNA par la POL II implique de nombreuses étapes dont l'initiation, l'élongation et la terminaison.

La transition entre l'initiation et l'élongation est un événement hautement régulé dans le cycle de la transcription.

Le domaine carboxy-terminal (CTD) de la plus grande sous-unité de la POL II joue un rôle important dans cette transition. Le CTD consiste en une répétition d'une séquence consensus de 7 acides aminés, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (YSPTSPS). Le CTD de la POL II de la levure contient de 26 à 27 répétitions (Allison et al., 1985).

Des expériences faites *in vivo* et *in vitro* montrent que le CTD n'est pas phosphorylé dans les complexes d'initiation et est hyperphosphorylé dans les complexes d'élongation, suggérant que la phosphorylation du CTD est un événement se passant pendant ou après la transition de l'initiation à l'élongation (Lee et Greenleaf, 1997) et qu'elle pourrait intervenir dans les contrôles du fonctionnement de la POL II à ces étapes.

Trois CTD kinases sont impliquées dans la régulation de l'ARN polymérase II chez *S. cerevisiae* (Hautbergue et Goguel, 2000).

La kinase Kin28 et la cycline qui lui est associée font partie du facteur général de transcription TFIIH. Il a été montré que *KIN28* phosphoryle le CTD seulement après que la POL II se soit associée au promoteur, et aurait dès lors un rôle dans l'élongation.

Une autre kinase, Srb10, phosphoryle le CTD antérieurement à la formation du complexe d'initiation sur le promoteur, avec comme conséquence l'inhibition de la transcription.

Une troisième kinase, CTDK-1, a été isolée pour sa capacité à phosphoryler une protéine de fusion contenant un CTD (de drosophile) (Lee et Greenleaf, 1989) mais son rôle biologique reste inconnu.

2.2.La CTD kinase CTDK-1.

La CTD kinase, CTDK-1, est composée de trois sous-unités non-essentielles (α, β, γ) de 58, 38 et 32 kDa, respectivement (Lee et Greenleaf, 1991).

Nous nous intéressons plus particulièrement au gène *CTK1*, codant la sous-unité α de l'enzyme.

Via les banques de données NBRF et EMBL et en utilisant la totalité de la séquence d'acides aminés de *CTK1*, l'équipe de chercheurs de Lee trouvent que toutes les protéines avec une homologie significative à Ctk1 sont des protéines kinases ou des sous-unités catalytiques de protéines kinases. En fait, la sous-unité α de la CTD kinase contient un domaine interne qui est hautement homologue à des sous-unités catalytiques d'autres protéines kinases et contient, plus particulièrement, les résidus qui sont invariants dans ces sous-unités. Ces données suggèrent fortement que la sous-unité α est une sous-unité catalytique (Lee et Greenleaf, 1991).
Les protéines les plus homologues à CTK1 sont CDC28 de *S. cerevisiae* et ses homologues, incluant la CDC2 de l'homme et Cdc2 de la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Ctk2 est une sous-unité cycline et ctk3, la troisième sous-unité de fonction inconnue, ne montre aucune similarité à d'autres protéines connues. Les produits des gènes de *CTK1*, *CTK2* et *CTK3* sont associés physiquement *in vitro* et interagissent fonctionnellement *in vivo* (Sterner *et al.*, 1995) .

2.2.1.Caractéristiques des mutants *ctk1*.

Le gène *CTK1* est présent en simple copie dans le génome de *S.cerevisiae* . Le gène *CTK1* n'est pas essentiel en conditions de culture habituelles, mais en disruptant le gène, un retard de croissance à 30°C (conditions permissives) et une létalité à 16°C (conditions restrictives) est observable.

Afin de juger de la présence de la forme phosphorylée ou non de la plus grande sous-unité de la POL II dans la souche sauvage et dans le mutant, des anticorps dirigés contre le CTD phosphorylé ont été utilisés (Lee et Greenleaf, 1991).
La forme hyperphosphorylée est présente dans la souche sauvage et en très petite quantité dans le mutant. Cela montre que l'état de phosphorylation *in vivo* de la grande sous-unité de la POL II est altéré lorsque les cellules ne possèdent pas *CTK1*, soutenant l'idée que cette kinase joue un rôle dans la phosphorylation du CTD *in vivo*.

La phosphorylation du CTD accompagne la transition entre l'initiation et l'élongation et représente donc une étape potentiellement importante pour un contrôle transcriptionnel.

2.3.La recherche de suppresseurs.

L'approche génétique faite lors de ce mémoire a été la recherche de suppresseurs pour un mutant *Δ ctk1*.
Il s'agit ici d'une suppression « indirecte », c'est-à-dire impliquant un deuxième gène (par opposition à la suppression directe laquelle résulterait d'une deuxième mutation dans la protéine déjà mutée).

Un tel type de suppression implique qu'un ou des facteurs, non alléliques, interagissent de manière physique ou fonctionnelle avec le produit du gène muté, cette interaction ayant comme conséquence la restauration du phénotype sauvage. Un exemple de ce phénomène est la suppression par dosage génique ou multicopie ; cette suppression consiste en ce qu'un phénotype lié à la mutation d'une protéine arrive à être « compensé » par la surexpression d'une autre protéine sauvage.

La recherche de suppresseurs par dosage génique nécessite donc de transformer le mutant par un plasmide multicopie exprimant le gène candidat suppresseur.

Cette approche a pour but d'obtenir puis d'identifier des partenaires fonctionnels de *CTK1*.

Objectif du mémoire

Objectif du mémoire.

Le but de ce mémoire consiste en la recherche de partenaires fonctionnels de Ctk1 (CTD kinase).

Cette protéine kinase qui phosphoryle le domaine caboxy-terminal (CTD) de la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II, est constituée de trois sous-unité (α, β, γ) de 58, 38, 32 kDa. Le CTD de la polymérase II contient de multiples répétitions d'une séquence heptamérique, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, au nombre de 26-27 chez la levure.

Les mutants délétés pour *ctk1* présentent un phénotype cryosensible (cs). Ceci indique que le produit du gène *CTK1*, c'est-à-dire la CTD kinase, est requis pour une croissance normale.

Nous voulons identifier des protéines capables de supprimer ce phénotype cs lorsqu'elles sont surexprimées. En effet, la suppression peut révéler des interactions structurelles et fonctionnelles opérant *in vivo* dans la cellule.

Antérieurement à ce mémoire, un mutant a été transformé par un plasmide multicopie et les transformants ont été mis en croissance à 18°C.

Dans un premier temps, afin de discriminer les clones complémentés des vrais suppresseurs, une série de PCR sera effectuée en utilisant des amorces spécifiques de *CTK1*. En effet, si la souche a été transformée avec un plasmide contenant une copie sauvage du gène *CTK1*, une bande spécifique apparaîtra en gel d'agarose.

Ensuite, les clones non complémentés seront séquencés afin d'identifier les candidats suppresseurs.

Résultats

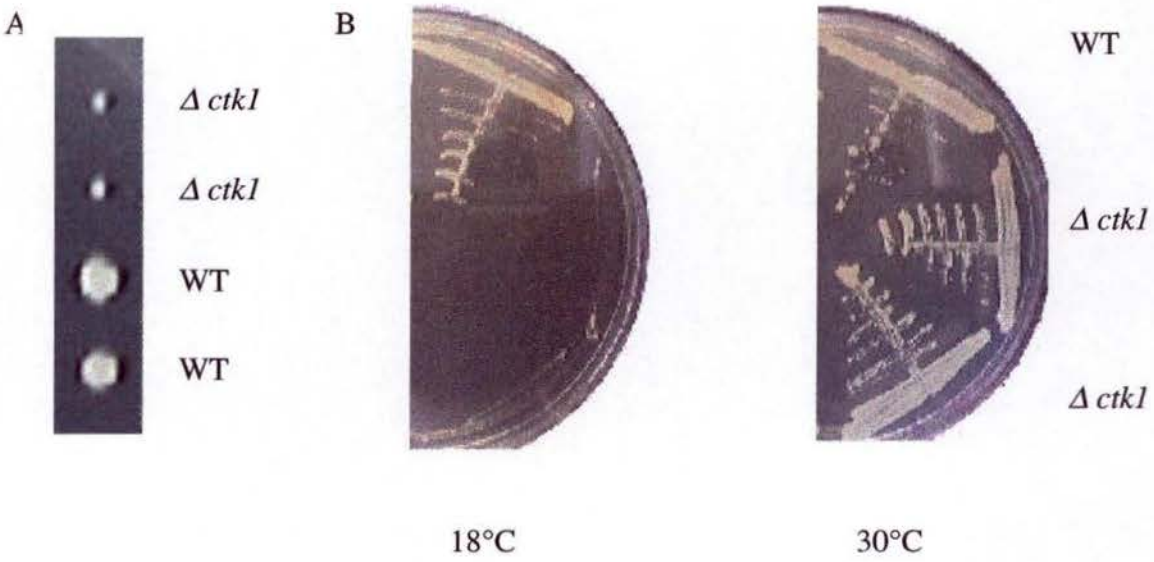

Figure 1 : caractéristiques phénotypiques du mutant Δ *ctk1*.

A.La délétion de *CTK1* cause un retard de croissance.

Les souches portant une copie sauvage de *CTK1* poussent normalement tandis que les souches portant une copie délétée sont plus petites

B.La délétion de *CTK1* cause un phénotype cryosensible.

Une souche *CTK1* et deux souches Δ *ctk1* sont mises à pousser à 18°C et 30°C. A 18°C, seule la souche sauvage pousse.

Résultats

1.Préliminaires.

Le but de notre travail est la recherche de partenaires fonctionnels de Ctk1. La CTD kinase qui nous intéresse est composée de trois sous-unités (α,β,γ). Le gène *CTK1* code pour la sous-unité α. Cette kinase phosphoryle le CTD de l'ARN polymérase II, qui comprend un domaine heptamérique, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser(YSPTSPS), répété 26 à 27 fois chez la levure (Allison L *et al*, 1985).

La délétion de *CTK1* est responsable d'un phénotype cryosensible (cs) (Lee et Greenleaf, 1991). En effet, en conditions restrictives (18°C ou moins), la croissance d'un mutant ctk1 s'arrête, tandis qu'en conditions permissives (30°C), seul un léger retard de croissance est observable par rapport à la souche sauvage (figure 1).

Afin d'identifier des protéines qui, lorsqu'elles sont surexprimées, sont capables de supprimer ce phénotype cs, une souche délétée *ctk1* a été transformée par une banque sauvage multicopie (pFL44L, mise à disposition par F. LACROUTE) et les transformants ont été mis en croissance à 18°C.

Lors de la construction de cette banque, l'ADN génomique a subi une digestion partielle par Sau3A. Les fragments génomiques, d'une taille moyenne de 7 kb, ont été insérés dans le vecteur pFL44L au site BamHI (figure 2).

66 000 transformants ont été criblés parmi lesquels 332 colonies étaient capables de croître à 18°C.

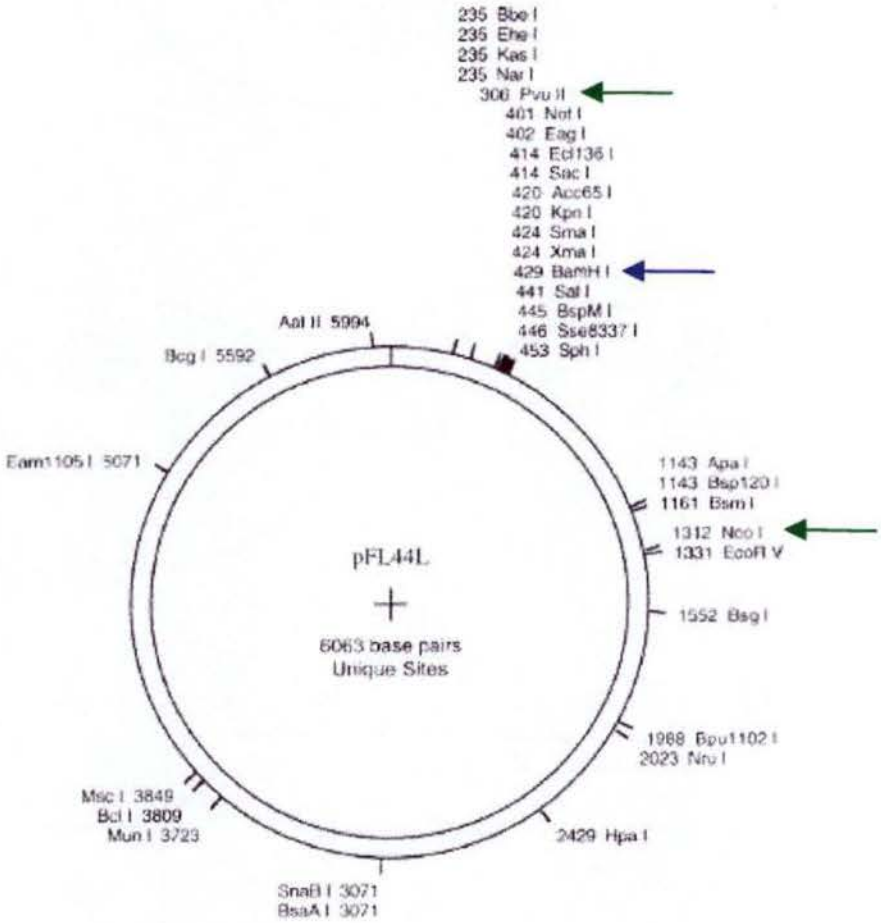

Figure 2 :Carte de restriction du plasmide pFL44L comprenant seulement les sites uniques.
Il contient une origine de réplication de bactérie (ori) et de levure (2µ) ainsi qu'un marqueur de sélection de bactérie (amp^R) et de levure (URA3).
Les flèches indiquent les sites utilisés pour le clonage de la banque (en bleu) et les restrictions diagnostiques (en vert).

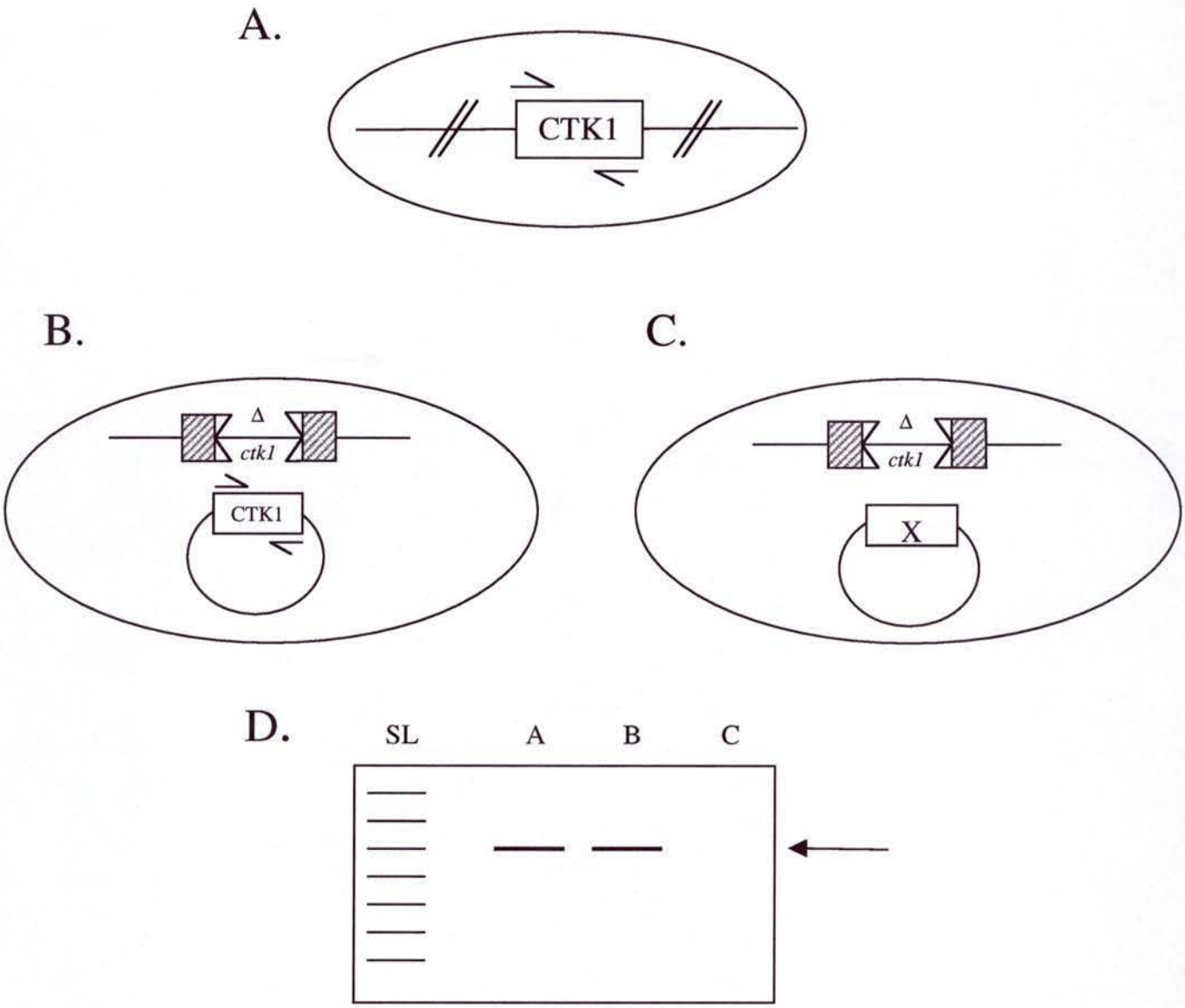

Figure 3:Schéma représentant les 3 cas possibles lors d 'une PCR diagnostique.

A. Pour la souche sauvage, ayant le gène *CTK1,* les amorces s'hybrident et une bande sera visible en gel d'agarose.

B. pour une souche Δ*ctk1,* complémentée par une copie sauvage de *CTK1*, les amorces s'hybrident et une bande est de nouveau présente.

C. Pour une souche Δ*ctk1*,ayant été transformée par un plasmide exprimant le gène candidat suppresseur, les amorces ne s'hybrident pas et aucune bande n'est observée.

D. Schéma d'un gel agarose représentant les différentes possibilités évoquées précédemment. La flèche indique la bande spécifique à 800 ou 600 pb selon le couple d'amorces choisi.

A priori, trois groupes de protéines sont capables de restaurer la croissance d'un mutant. Il s'agit d'abord de Ctk1 elle-même. On parle, alors de complémentation. La complémentation consiste en la restauration d'un phénotype dans une souche mutée pour le gène x, par l'apport d'une ou plusieurs copies sauvages de ce gène.
Plus intéressantes sont les protéines impliquées dans la même fonction que Ctk1 (redondance de fonction), et les protéines régulées par Ctk1 (épistasie).

Notre travail va consister à analyser les 332 candidats obtenus.

2.Discrimination par PCR des clones complémentés « CTK1 » .

Compte tenu du fait que la restauration de la croissance sera obtenue au premier chef par *CTK1* lui-même, la recherche de suppresseurs sera facilitée si on peut, au préalable, écarter les complémentants.

La méthode PCR utilisée va discriminer les clones qui ont été complémentés par une copie sauvage de *CTK1* des autres.

Pour chaque série de PCR sur colonies, un plasmide contenant la copie sauvage de *CTK1* et un tube PCR comprenant de l'eau ont été utilisés comme contrôles positif et négatif, respectivement.

Les amorces utilisées sont spécifiques de *CTK1*. Dans une souche sauvage où le gène *CTK1* est présent, les amorces s'hybrident et il y a amplification de la région cible (figure 3A). Deux couples d'amorces ont été utilisés, l'un amplifiant un fragment de 800 paires de bases et l'autre de 600 paires de bases. Pour une souche Δ *ctk1*, deux cas sont possibles.

2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	21	22	23	25	26	27	28
+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
29	30	31	32	33	34	36	38	39	40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	53	54	55	56	57
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
58	59	61	62	63	65	66	67	68	69	70	71	72	73	75	76	77	78	79	88	89	91	94	95	96
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97	98	99	100	101	102	103	104	113	115	116	117	120	121	123	124	128	129	130	131	132	134	135	137	138
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
139	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	164	165
+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
166	168	169	170	171	172	173	174	175	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	204	205	206	207
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
208	209	211	213	219	220	221	222	223	224	225	226	227	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
241	242	243	244	245	246	247	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	265	266	267	268
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
269	270	271	273	274	275	276	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	293	294	295	296
+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
313	314	315	316	317	318	321	322	323	324	326	327	328	329	337	338	339	341	364	365	366	367	368	369	371
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
373	374	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	396	397	398	399
+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
400	401	402	403																					
+	+	+	+																					

tableau 1: tableau récapitulatif des résultats de la PCR diagnostique sur les candidats suppresseurs.

+:bande visible en PCR.
-: pas de bande en PCR

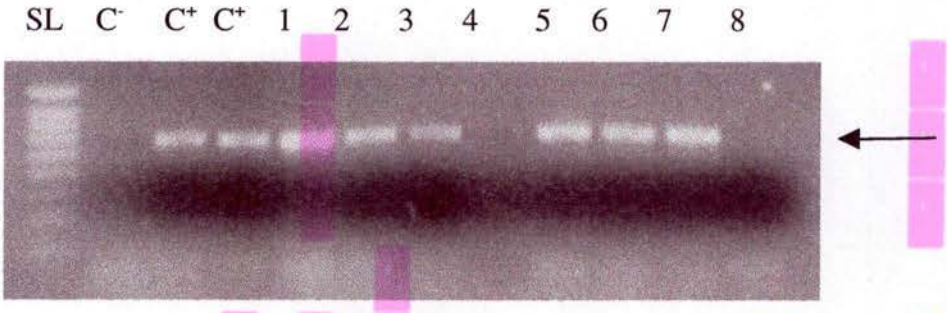

Figure 4 : Distinction entre complémentation et vrais suppresseurs par la PCR.
Lorsque *CTK1* est présent, une bande spécifique (indiquée par la flèche) apparaît. Les clones 4 et 8 sont donc des suppresseurs potentiels. Tous les autres sont des délétants complémentés par CTK1.
SL : Ladder
C^- : contrôle négatif
C^+ : contrôle positif

Dans le cas où le plasmide transformé dans la souche Δ *ctk1* contient la copie sauvage du gène *CTK1* (figure 3B), les amorces s'hybrident et il y amplification de 800 ou 600 paires de bases selon le couple d'amorces utilisé. Il s'agit dans ce cas d'un clone où il y a complémentation. Dans le deuxième cas, le plasmide comporte un insert autre que la copie sauvage de *CTK1*. Dans ce cas-ci, les amorces ne s'hybrident pas et aucune bande spécifique ne sera visible en gel d'agarose (figure 3C).

Le fait qu'il s'agisse d'une délétion explique le choix de notre méthode. En effet, si cela avait été une mutation ponctuelle, nos amorces s'hybrideraient pour tous les clones et nous ne pourrions discriminer les clones complémentés des vrais suppresseurs.

Nous avons à notre disposition, en début de travail, 332 colonies sur lesquelles nous effectuons des PCR (tableau 1).
Pour 232 clones, une bande spécifique apparaît sur gel d'agarose, ce qui signifie que ces 232 clones ont été complémentés par une copie sauvage de *CTK1*. 47 clones sont donc des suppresseurs potentiels (figure 4) car ils n'ont pas donné d'amplicon dans ce même test PCR.

Ensuite, les plasmides de ces 47 clones ont été extraits de la levure et transformés dans *E. coli* pour amplifier le plasmide responsable de la suppression. Des minipréparations ont été réalisées sur les transformants, suivies d'une restriction diagnostique. Le principe de la restriction diagnostique est de restreindre les plasmides des différents candidats par des enzymes se trouvant de part et d'autre du site de clonage. Ce type de restriction sert souvent à vérifier que le plasmide contient bien un insert. Les enzymes choisies, dans ce cas présent, sont *Pvu*II et *Nco*I (voir figure 2).

Sachant que le plasmide pFL44L fait 6063 pb, que le site de restriction de *Pvu*II est à 306 pb et que celui de *Nco*I est à 1312 pb, nous nous attendons à la libération d'un fragment de 5057 pb (correspondant au plasmide) ainsi qu'un ou plusieurs fragments de différentes tailles, caractéristiques des inserts (figure 5).

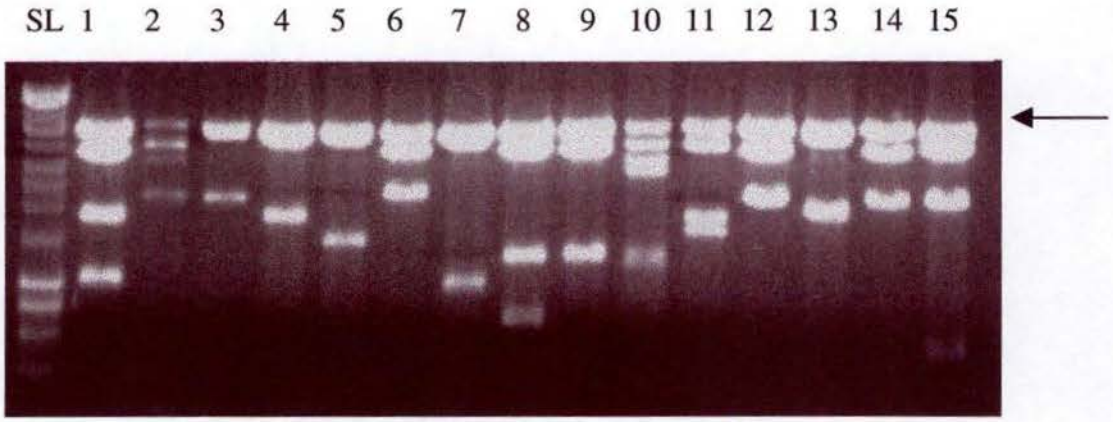

Figure 5 : gel d'agarose des restrictions-diagnostiques sur les minipréparations.
On peut observer une bande à 5053 pb (indiquée par la flèche) en plus de toutes les bandes caractéristiques des inserts.
SL : Ladder (HyperLadder1, Bioline)

Comme montré à la *figure 5*, les profils de restriction sont, pour la plupart, différents. Ceci nous indique que nous avons des clones suppresseurs indépendants.

3.Identification des candidats suppresseurs par séquençage.

Pour identifier, précisément, les candidats suppresseurs, nous utilisons le séquençage, suivi d'une recherche de similarités via un programme informatique Blast. Ce programme va comparer chacune des 47 séquences aux séquences d'une banque de données. La séquence de 46 des inserts se trouve sur le chromosome XI, tout comme *CTK1*. Il s'agit en fait encore de *CTK1*. Cependant les séquences des différents inserts ne commencent pas et ne finissent pas toutes au même endroit, ce qui signifie que la souche Δ*ctk1* n'a pas été transformée par le même plasmide.

La séquence du dernier insert est, quant à elle, localisée sur le chromosome V. Ce clone a été retransformé dans la levure, afin de vérifier qu'il supprime bien et que la suppression n'est pas due à un effet de souche. La restauration de la croissance d'une souche Δ*ctk1* a de nouveau été observée.
La séquence de ce clone contient trois ORFs et un transposon (YERCdelta14) (figure 6).

Les ORFs correspondent au gène GLC7, codant une protéine phosphatase, tronqué dans sa partie carboxy terminale, au gène SNR52, codant un petit ARN nucléaire et au gène PMD1, un régulateur négatif de l'expression des gènes méiotiques précoces, lequel est tronqué dans la majeure partie C-terminale. Ce dernier gène fait à peu près 5 kb mais, dans l'insert présent, nous n'avons que 0,5 kb du N-terminal .

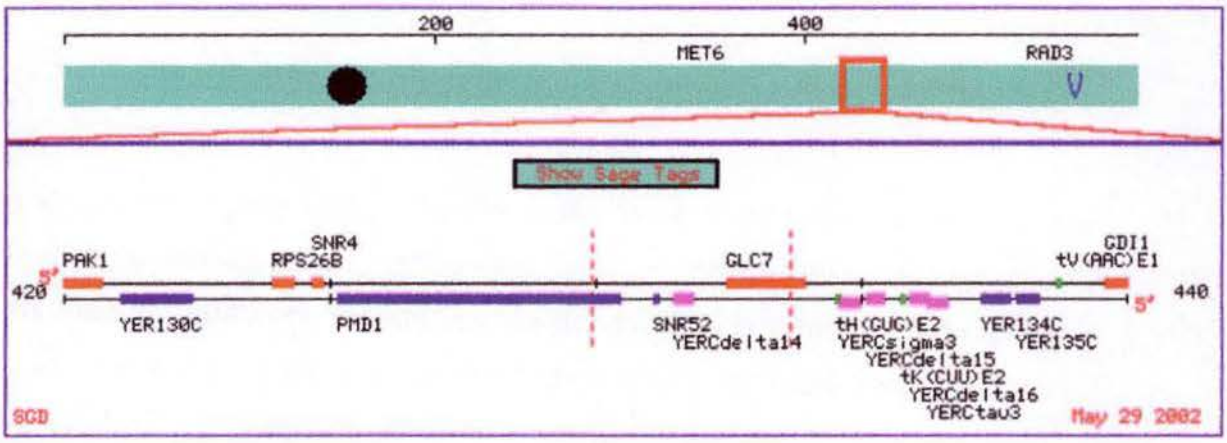

figure 6 : schéma représentant le chromosome V. La portion entre les traits rouges indique le suppresseur identifié, appelé s71.

La question est de savoir laquelle de ces ORF est responsable de la suppression. Des sous-clonages ont été entrepris pour permettre l'isolement des ORF. Ce travail est toujours en cours à l'heure actuelle.

Conclusions et discussion

Conclusions et discussion.

Le domaine carboxy-terminal (CTD) de la plus grande sous-unité de la POL II joue un rôle important dans la transition entre l'initiation et l'élongation et dans la régulation de l'élongation. Le CTD n'est pas phosphorylé dans les complexes d'initiation et est hautement phosphorylé dans les complexes d'élongation. La phosphorylation est médiée par plusieurs kinases, mais leur rôle et le moment où elles interviennent n'est pas clairement défini.

La CTD kinase, à laquelle nous nous sommes intéressés, CTDK-1, est composée de trois sous-unités (α, β, γ). Nous savons que la délétion du gène codant pour la sous-unité α, *CTK1*, est responsable d'un retard de croissance et d'un phénotype cryosensible (Lee et Greenleaf, 1991).
Nous avons donc voulu identifier les suppresseurs d'un mutant *Δ ctk1*. En effet, la suppression par dosage génique ou multicopie, c'est-à-dire le fait qu'un phénotype lié à la mutation d'une protéine puisse être « compensé » par la surexpression d'une autre protéine, indique l'existence de partenaires du gène dont l'effet de la mutation est supprimée.

Nous avions à notre disposition 332 colonies (issus d'un crible de suppression antérieur) parmi lesquels nous allons rechercher les suppresseurs.
Parmi ces 332 colonies, il fallait discriminer préalablement les souches complémentées des vrais suppresseurs. En effet, la restauration de la croissance peut-être due à *CTK1* lui-même. Nous avons donc effectué une série de PCR diagnostiques sur colonies.
Les amorces utilisées étant spécifiques de *CTK1* et, s'agissant d'une délétion, les souches non complémentées par une copie sauvage du

gène n'auront pas d'amplicon visible en gel d'agarose puisque les amorces ne se seront pas hybridées.

Il est apparu que 232 clones avaient été complémentés par la copie sauvage du gène et que 47 clones étaient des candidats suppresseurs. Les 53 clones restants n'ont pu être testés par manque de temps.
Ces 47 candidats suppresseurs ont été identifiés par séquençage automatique. Après comparaison de chacune des 47 séquences à des séquences d'une banque de données, il est apparu que 46 des 47 séquences comprennent une copie sauvage de *CTK1.*
Donc, bien que lors de la PCR aucune bande spécifique n'apparaissait, il semble qu'il y ait quand même eu complémentation et nos candidats suppresseurs s'avèrent être *CTK1*. Il s'agit donc de faux positifs. Rappelons que lors de la restriction diagnostique sur les minipréparations, les différents profils de restriction montraient des clones indépendants. Ce qui a été confirmé lors du séquençage.

Un insert avait une localisation chromosomique différente de *CTK1*. Cet insert est localisé sur le chromosome V. Sa séquence comprend trois ORFs et un transposon. La question est de savoir laquelle de ces ORFs est responsable de la suppression. *GLC7*, une des ORFs présente, est tronquée dans sa partie C-terminale et est une protéine phosphatase. Elle se comporte comme un antagoniste de la protéine kinase *SNF1* dans la répression glucose (Tu et Carlson, 1994) et cette kinase *SNF1* interagit également avec *CTK1* (donnée du laboratoire non publiée). Il s'agit donc d'un candidat particulièrement intéressant puisqu'il suggère une relation entre *CTK1* et la répression glucose.

L'analyse du clone suppresseur consistera à déléter *GLC7* pour qu'il ne comporte plus que *SNR52* et *PMD1* et à tester l'incapacité du plasmide résultant à restaurer la croissance à 18°C. Par ailleurs, le fragment de *GLC7* seul sera cloné dans le plasmide pFL44s (comparable au

pFL44L), afin de vérifier qu'il est à lui seul, capable d'assurer la suppression du *Δ ctk1*.

En parallèle, une copie sauvage de *GLC7* sera également testée afin de déterminer si c'est le gène en entier qui supprime ou si le mutant *glc7*, tronqué dans sa partie C-terminale, suffit.

Selon ces données *CTK1* serait impliqué potentiellement dans la répression glucose. Afin de tester cette hypothèse, il y a lieu de strier un clone Δ *ctk1* sur différentes sources de carbone (galactose, raffinose, glycérol, éthanol) afin de rechercher un phénotype, autre que la cryosensibilité dans ce cas. Si un phénotype est identifié, il faudra alors refaire un test de suppression, c'est-à-dire transformer une souche Δ *ctk1* par une banque sauvage multicopie puis rechercher des candidats suppresseurs parmi les colonies capables de croître sur la source de carbone pour laquelle un phénotype a été identifié,

puis identifier ces éventuels candidats suppresseurs.

Matériels et méthodes

Matériels.

1.les tampons

Tampon de lyse

Triton X-100	2 %
SDS	1 %
NaCl	100 mM
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Tampon TE 10x

Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0	

Tampon TAE 10x (gibco BRL)

Tris-Acetate	400 mM
EDTA	10 mM

Tampon de transformation TB (Transformation Buffer)

Pipes (Piperazine anhydride)	10 mM
$MnCl_2$	55 mM
$CaCl_2$	15 mM
KCl	250 mM

Ajuster à pH 6,7 avec du KOH 5N avant d'ajouter le $MnCl_2$

2.Les solutions

Acides aminés et bases azotées 100x

Adénine sulfate	0,2 g
Uracile	0,2 g
L-Tryptophane	0,2 g
L-Histidine-HCl	0,2 g
L-Leucine	0,3 g
L-Lysine-HCl	0,3 g

Porter, séparément, à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée puis autoclaver. Conserver le tryptophane à 4°C et à l'abri de la lumière afin d'éviter sa dégradation

Agarose 1%

Agarose	1 g

Porter à un volume de 100 ml avec du tampon TAE 1x. Porter à ébullition et laisser refroidir à une température de 55°C. Ensuite, couler le gel sur un support approprié. D'autres concentrations peuvent être réalisées.

Ampicilline 10%

Ampicilline	100 mg

Porter à un volume de 1 ml avec de l'eau distillée puis stériliser par filtration sur un filtre 0,22 µm (Millipore). Conserver à -20°C. Ne pas ajouter à des milieux ayant une température supérieure à 55°C afin de ne pas dégrader l'antibiotique.

Glycérol 10%

Glycérol 100%	1/10ème de volume
Eau distillée	9/10ème de volume

SOC

Tryptone	2 %
Yeast extract	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
$MgCl_2$	10 mM
Glucose	20 mM

Autoclaver, ensuite ajouter du $MgSO_4$, stériliser par filtration, jusqu'à une concentration de 10 mM.

Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10x

LiAc	10,2 g

Dissoudre dans 50 ml d'eau distillée. Ajuster avec de l'acide acétique jusqu'à un pH de 7,5. Ensuite, porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis stériliser par filtration sur un filtre 0,22µm (Millipore).

Polyéthylène Glycol (PEG) 50%

PEG 3350	50 g

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis stériliser par filtration sur un filtre 0,45 µm (Millipore).

Mélange LiAc/TE 1x

LiAC 10x	1/10ème de volume
10x	1/10ème de volume
Eau distillée	8/10ème de volume

Mélange LiAC/TE/PEG 3350

LiAc 10x	1/10ème de volume
TE 10x	1/10ème de volume
PEG 50 %	8/10ème de volume

ADN de sperme de saumon (SS-DNA)

SS-DNA	2 mg

Dissoudre dans 1 ml de TE 1x. Passer dans une seringue pour réduire la taille des brins grâce aux forces de cisaillement. Stériliser par filtration sur un filtre 0,22 µm (Millipore). Conserver à 4°C. Avant chaque utilisation, dénaturer à 100°C pendant 5 minutes.

SDS 10%

SDS	10 g

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

Solution de coloration et d'alourdisseur 10x

Sucrose	50 %
Na_2.EDTA	100 mM
SDS	1 %
Bleu de Bromophénol	0,1 %

Mix d'acides aminés

Adénine Sulfate	0,15 g
L-sérine	2 g
L-Valine	0,75 g
L-Glutamate	0,5 g
L-Lysine	0,25 g
L-Tyrosine	0,3 g
L-Arginine	0,15 g
L-Phénylalanine	0,3 g
L-Isoleucine	0,15 g
L-Proline	0,15 g
L-Méthionine	0,15 g
L-Thréonine	1 g
L-Aspartate	0,6 g

Porter à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée puis autoclaver.

3.Milieux de culture

3.1.Milieux de culture bactériens.

3.1.1.Milieu Luria-Bertani (LB).

Tryptone	10 g/l
NaCl	5 g/l
Yeast Extract	5 g/l

Pour préparer un milieu LB solide, ajouter également :

Agar	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver.
Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C et couler les boîtes de Petri puis les conserver à 4°C.
L'ampicilline peut être ajoutée à une concentration finale de 100 µg/ml au milieu LB liquide ou solide, ayant été autoclavé, puis refroidi à une température de 55°C.

3.1.2.Milieu SOB Liquide.

Tryptone	20 g/l
Yeast extract	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
$MgCl_2$	10 mM
$MgSO_4$	10 mM
pH 6,7-7,0	

3.2.Milieux de culture levuriens.

3.2.1.Milieu YPD.

Glucose	20 g/l
Peptone	20 g/l
Yeast Extract	10 g/l

Pour préparer un milieu YPD solide, ajouter également :

Agar	20 g/l

Porter à volume de l'eau distillée puis autoclaver.

3.2.2.Milieu Casa.

Ce milieu ne contient ni adénine, ni uracile, ni tryptophane, ni tyrosine. Si nécessaire, ajouter l'un ou l'autre selon la nature du milieu souhaité.

Yeast Nitrogen Base	
w/o amino acids	6,75 g/l
Glucose	20 g/l
Casamino acids	1 g/l

Pour préparer un milieu Casa solide, ajouter également :

Agar	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

3.2.3.Milieu glycérol solide.

Yeast Nitrogen Base	
w/o amino acids	6,75 g/l
Glycérol	3 %
Agar	20 g/l
Mix d'acides aminés	100 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclavcer. Ajouter le mix après autoclave.

3.2.4.Milieu éthanol solide

Yeast Nitrogen Base	
w/o amino acids	6,75 g/l
Ethanol	3 %
Agar	20 g/l
Mix d'acides aminés	100 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver. Ajouter le mix après autoclave ainsi que l'éthanol.

3.2.5.Milieu raffinose solide.

Yeast nitrogen Base	
w/o amino acids	6,75 g/l
Raffinose	3 %
Agar	20 g/l
Mix d'acides aminés	100 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver. Ajouter le mix après autoclave.

3.2.6.Milieu galactose solide.

Yeast Nitrogen Base	
w/o amino acids	6,75 g/l
Galactose	2 %
Agar	20 g/l
Mix d'acides aminés	100 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver. Ajouter le mix après autoclave.

3.2.7.Milieu minimum.

Yeast Nitrogen Base	
w/o amino acids	6,75 g/l
Glucose	20 g/l

Pour préparer un milieu minimum solide, ajouter également :

Agar	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

3.2.8.Milieu synthétique.

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant différents acides aminés et bases azotées dans le milieu minimum (1 ml de solution stock pour 100 ml de milieu).

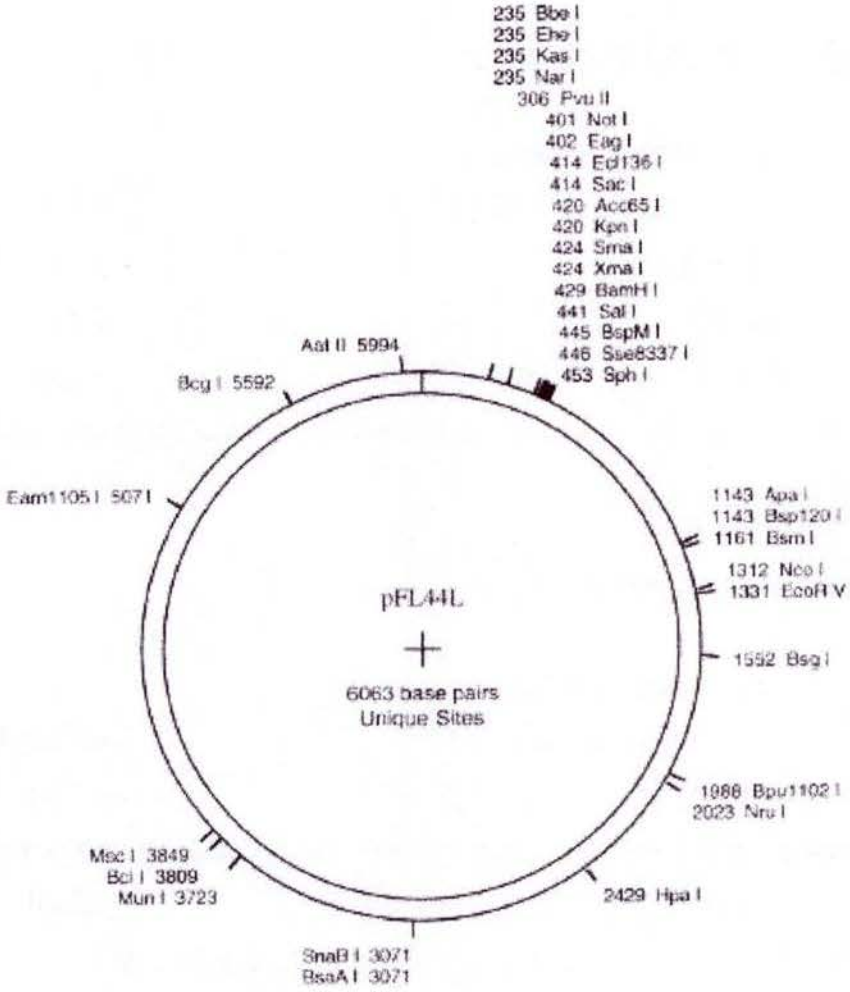

Figure 1 :Schéma du plasmide pFL44L

Méthodes.

1.Souches bactériennes et plasmides.

1.1.Souche bactérienne.

La souche utilisée est DH10B. Son génotype est le suivant : F^- *mcr* A, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ80 dlac,ZΔM15,* Δ lac X74, endA1, recA1, deoR, Δ (ara, leu)7697, araD139, galU galK, nupG, rpsL, λ^-.

Cette souche est utilisée pour la transformation de plasmide ainsi que pour la réalisation des cellules électrocompétentes. Elle est mise en culture à 37°C dans le milieu LB.

1.2.Plasmide.

Le plasmide pFL44L (figure1) est un plasmide multicopie. Le vecteur pFL44L est une matrice navette *E.coli./S. cerevisiae.* En effet, il contient une origine de réplication de bactéries (ori) et de levures (2μ) ainsi qu'un marqueur de sélection de bactéries (amp^R) et de levure (URA3). Ce plasmide a été utilisé lors de la réalisation de la banque où les fragments génomiques d'une taille moyenne de 7kb ont été clonés au site BamHI

2. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.

2.1.Transformation des bactéries par choc thermique.

Pour cette transformation, la paroi et la membrane bactérienne sont rendues perméables à l'ADN : la bactérie est alors dite compétente. Des bactéries Gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ($CaCl_2$). Celui-ci déstabilisa la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule.

a) Préparation de cellules compétentes (Méthode Inoue).

- inoculer 250 ml de milieu SOB avec 5 colonies obtenues sur milieu LB solide.
- incuber la culture liquide à 18°C sous agitation jusqu'à obtention d'une $D.O_{600}$ de 0,6 (24 heures à 36 heures)
- refroidir la culture 10 minutes sur glace.
- centrifuger 15 minutes à 2500 rpm et à 4°C

Dans une pièce froide :

- éliminer le surnageant, puis resuspendre délicatement les cellules dans 80 ml de TB froid
- centrifuger 15 minutes à 2500 rpm et à 4°C
- éliminer le surnageant puis resuspendre délicatement les cellules dans 20 ml de TB froid
- ajouter du DMSO à une concentration finale de 7 %
- conserver les cellules 10 minutes sur glace

- échantillonner les cellules par 100 ml, puis congeler directement dans l'azote liquide
- stocker à -80°C

b) Transformation.
- dégeler un aliquot de cellules sur glace
- mélanger dans un tube Eppendorf 50 µl de cellules et 10 µl d'ADN
- laisser 1/2 heure à 3/4 heure sur glace
- soumettre les cellules à un choc thermique en incubant 1 minute à 42°C
- ajouter 250 µl de SOC
- incuber 1 heure à 37°C
- étaler sur milieu LB solide avec ampicilline

2.2.Transformation des bactéries par électroporation.

Cette méthode consiste à soumettre les bactéries à un choc électrique. Cette décharge déstabilise la membrane cellulaire, ce qui entraîne la formation de pores dans celle-ci, permettant ainsi à l'ADN plasmidique de rentrer.

La préparation de cellules électrocompétentes consiste essentiellement à laver les cellules afin d'éliminer le plus de sels possibles.

a) Préparation des cellules électrocompétentes
- réaliser une préculture une nuit à 37°C dans 5 ml de LB
- inoculer 800 ml de LB au moyen de la préculture
- incuber à 37°C jusqu'à une DO (mesurée à 600 nm) comprise entre 0,5 et 1
- centrifuger la culture 15 minutes à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 800 ml d'eau stérile à 4°C
- centrifuger la culture 15 minutes à 4000rpm et 4° C

- resuspendre le culot dans 400 ml d'eau stérile à 4°C
- centrifuger la culture 15 minutes à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10 % à 4°C
- centrifuger la culture 15 minutes à 4000rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 2 ml de glycérol 10 % à 4°C
- aliquoter dans des tubes Eppendorfs
- stocker les cellules à -80°C

b) L'électroporation

- dégeler un aliquot de cellules sur glace
- Stériliser les cuvettes d'électroporation en les plaçant sous la lampe à UV pendant 3 minutes
- mettre les cuvettes sur glace
- mélanger dans un tube Eppendorf 40 µl de cellules et 1 à 5 µl d'ADN
- laisser 1 minute à 3 minutes sur glace
- transférer le mélange dans la cuvette et remettre sur glace
- régler l'électroporateur (BIO RAD Gene Pulser™) sur :

  capacitance : 25 µF

  différence de potentiel : 2,5 kV

  résistance : 200 Ω
- placer la cuvette dans la chambre d'électroporation
- décharger le condenseur (choc électrique)
- ajouter rapidement 500 µl de SOC
- incuber 1 heure à 37°C
- étaler sur milieu LB solide avec ampicilline
- laisser pousser une nuit à 37°C

3.Techniques relatives à l'utilisation de levures.

3.1.Transformation de levures.

- réaliser une culture dans 100 ml de YPD
- incuber une nuit à 30°C afin d'arriver à une DO de 0,7
- centrifuger 5 minutes à 4500rpm
- resuspendre le culot dans 25 ml d'eau stérile
- centrifuger 5 minutes à 4500 rpm
- resuspendre le culot dans 10 ml de TE/LiAc 1x
- centrifuger 5 minutes à 4500 rpm
- resuspendre dans 1 ml de TE/LiAc 1x
- dans un tube Eppendorf mettre :

  1 µg d'ADN
  25 µl d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 minutes 100°C, puis maintenu sur glace
  50 µl de cellules
  300 µl de PEG/TE/LiAc

- incuber de 30 minutes à 2 heures 30 à 30°C
- soumettre les cellules à un choc thermique en incubant 20 minutes à 42°C
- centrifuger 5 minutes à 8000 rpm
- resuspendre le culot dans 300 µl d'eau stérile
- étaler sur milieu sélectif
- incuber entre 3 et 5 jours à 30°C

4. Techniques relatives à l'ADN.

4.1 Extraction d'ADN de levures.

- réaliser une préculture dans 4 ml de milieu sélectif
- centrifuger 10 minutes à 13200 rpm
- resuspendre le culot dans 100 µl de tampon de lyse
- ajouter 100 µl de bille de verre d'un diamètre de 425 à 600 microns
- ajouter 100 µl de Phénol/Chlorophorme Saturé pH 6,8
- vortexer pendant 2 minutes
- mettre sur glace en attendant les autres échantillons
- centrifuger 20 minutes à 13200 rpm

Pour purifier les plasmides, réalisation des étapes suivantes :

- récupérer la phase supérieure
- ajouter 5 volumes de GX et bien mélanger
- faire passer sur une colonne QIAprep (QIAGEN)
- centrifuger 1 minute à 13200 rpm
- enlever le surnageant
- laver la colonne avec 700 µl de tampon G4
- centrifuger 1 minute à 13200 rpm
- enlever le surnageant
- centrifuger 1 minute à 13200 rpm pour bien enlever les résidus de tampon
- ajouter 75 µl d'eau afin d'éluer l'ADN
- centrifuger 1 minute à 13200 rpm

4.2 Extraction d'ADN plasmidique par minipréparation.

Cette méthode a pour but l'extraction rapide d'une petite quantité d'ADN plasmidique (1-7µg) à partir d'une culture *d'E.coli*.
Le kit utilisé est : CONCERT™Rapid Plasmid Purification Systems

- inoculer 5 ml de milieu LB (+ampicilline) avec une colonie isolée obtenue sur milieu solide
- incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation

Etapes préliminaires : préchauffer un aliquot d'eau distillée entre 65°C et 70°C
ajouter l'ARNase A au tampon de suspension G1
ajouter de l'éthanol au tampon de lavage G4

- centrifuger environ 1 à 5 ml de la culture
- resuspendre le culot dans 250 µl de tampon G1+ARNase A et resuspendre les cellules
- ajouter 250 µl de la solution de lyse G2 et mélanger en inversant le tube 5 fois. Incuber la solution à température ambiante pendant 5 minutes
- ajouter 350 µl du tampon de neutralisation M3 et mélanger en inversant 5 fois le tube. Centrifuger pendant 10 minutes à 12000 rpm
- placer une cartouche à centrifuger dans un tube de 2 ml. Déposer le surnageant obtenu dans l'étape précédente au sommet de la colonne. Centrifuger pendant 1 minute à 12000 rpm. Eliminer la solution sortie de la cartouche
- replacer la cartouche dans un tube de 2 ml. Déposer 700 µl du tampon de lavage G4. Centrifuger pendant 1 minute à 12000 rpm. Eliminer la solution écoulée. Recentrifuger pendant 1 minute à 12000 rpm pour éliminer tous résidus possibles du tampon de lavage

- placer la cartouche de centrifugation dans un tube de récupération de 1,5 ml. Déposer 75 µl d'eau stérile chaude directement au centre de la cartouche. Incuber pendant 1 minute et centrifuger pendant 2 minutes à 12000 rpm.

4.3.Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction).

4.3.1. Principe général

La PCR est utilisée pour amplifier un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues. Des amorces oligonucléotidiques, complémentaires de ces séquences, s'hybrident l'une au brin « sens » et l'autre au brin « anti-sens ». L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces. Une ADN polymérase, telle que la TAQ (Biotools) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire.

Un cycle consiste en 3 étapes :

1. dénaturation des brins d'ADN
2. hybridation des amorces
3. élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire)

En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de fragment cible. La longueur de la séquence cible est déterminée par la distance entre les deux amorces. La température de melting (TM) des amorces se calcule de la façon suivante (pour les oligos d'une taille inférieure à 20 bases) : 4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T :Tm= 4(G+C) +2(A+T).
Cette réaction de PCR étant exponentielle, il est bien entendu très important d'éviter toute contamination des réactifs par de l'ADN qui pourrait être amplifié.

En pratique :

- resuspendre une colonie de levure obtenue sur milieu solide dans un tube Eppendorf contenant 50 µl d'eau stérile
- faire bouillir pendant 5 minutes
- vortexer quelques secondes
- transférer 10 µl dans un tube PCR
- placer dans ce tube PCR :

Composants	Volume	Concentration finale
Tampon PCR 10x	5 µl	1x
Mix dNTPs 5 mM (chacun)	4 µl	0.2mM chacun
Primer 5'	x µl	0,5 µM
Primer 3'	x µl	0,5 µM
ADN matrice	x µl	10 ng-1 µg
Enzyme (Taq polymerase)	1,5 µl	1,5 U

- porter à un volume de 50 µl avec de l'eau stérile
- réaliser le cycle suivant :

Dénaturation 4 minutes à 94°C
Dénaturation 1 minute à 94°C
Hybridation 45 secondes à 49°C
Elongation 1 minute à 72°C
Fin de l'élongation 10 minutes à 72°C

Réaliser 35 cycles.

4.4.Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose.

Cette technique permet :

- de séparer des fragments d'ADN de tailles différentes (dans un but diagnostique ou de purification)
- d'estimer la taille de fragments d'ADN via un marqueur de taille
- d'estimer la concentration d'ADN via un marqueur de masse

Cette technique consiste à soumettre d'ADN à un champ électrique. L'ADN étant chargé négativement, il va migrer vers l'anode.
Les fragments d'ADN sont visualisés au moyen du bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescent, le bromure d'éthidium marque l'ADN et celui-ci est visible sous illumination UV. Il faut noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à la quantité d'ADN présente. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence. Il est à noter qu'il est possible de photographier le gel d'agarose sous UV.

En pratique :

- dissoudre en chauffant une quantité appropriée d'agarose dans du tampon TAE
- ajouter 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium
- couler le gel dans un support plexiglas
- ajouter un ou deux peignes pour former des puits dans le gel
- laisser le gel polymériser
- enlever les peignes et démouler le gel
- placer le gel dans la cuve d'électrophorèse
- immerger complètement le gel dans du tampon TAE

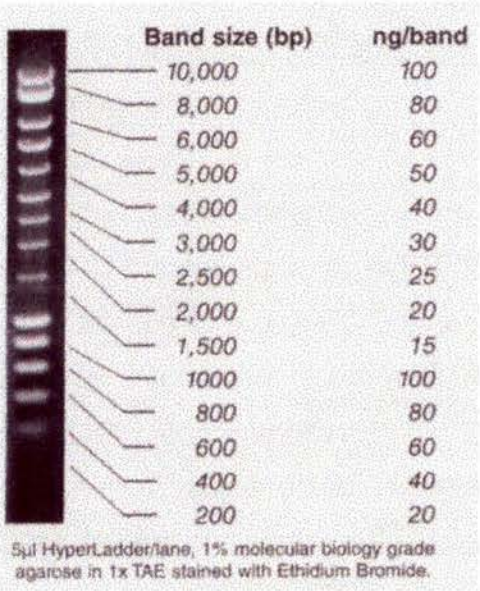

Figure 2 : Marqueur de poids moléculaire HyperLadder 1 (Bioline).

- lacer les échantillons, alourdis par du bleu de bromophénol (solution d'alourdisseur/colorant) à raison de 1/10ème du volume final, dans les puits charger également dans un ou plusieurs puits un marqueur de taille (ou de masse) approprié (Hyperladder1, Bioline, figure2)
- laisser migrer

Il est recommandé de ne pas migrer à un voltage supérieur à 100 Volts pour avoir une bonne séparation des différentes bandes d'ADN.

- visualiser les bandes d'ADN sous UV.

Il est recommandé d'utiliser des gants pour manipuler tout ce qui est, ou a pu, être en contact avec le bromure d'éthidium ainsi que de se protéger les yeux des rayons UV à l'aide d'un casque ou de lunettes en plexiglas.

4.5.Extraction de l'ADN à partir de gel.

Cette technique va permettre d'extraire la bande d'ADN intéressante à partir du gel d'agarose dans lequel il a migré. Dans un premier temps le gel est préparé et les échantillons sont chargés dans les pistes. Après migration et trempage dans une solution de bromure d'éthidium, le gel est révélé une fraction de seconde sur le banc UV. Cette brève révélation permet de repérer la localisation de la bande d'ADN d'intérêt. Cette bande est alors découpée du gel et l'ADN en est extrait. Cette technique permet de se débarrasser des fragments de restriction inutiles ou partiellement restreints. Elle est également utilisée pour éliminer les enzymes de restriction, de ligation, ou autres.

En pratique :

- exciser le plus petit morceau possible de gel contenant la bande d'ADN avec une lame scalpel propre
- ajouter 3 volumes de « binding solution » à ce morceau de gel (300 µl pour 100 mg de gel)
- incuber à 55°C jusqu'à ce que l'agarose soit fondu

- ajouter 5 µl de « silicate powder suspension » (billets sur lesquels s'adsorbent l'ADN)
- vortexer pour resuspendre
- incuber à 55°C en mélangeant toutes les minutes pendant 5 minutes
- centrifuger 15 secondes à 13200 rpm
- enlever le surnageant
- ajouter 500 µl de tampon de lavage
- vortexer
- centrifuger 15 secondes à 13200 rpm
- enlever le surnageant
- ajouter 500 µl de tampon de lavage
- vortexer
- centrifuger 15 secondes à 13200 rpm
- enlever le surnageant
- ajouter 9 µl d'eau
- vortexer
- incuber à 55°C pendant 5 minutes
- centrifuger 15 secondes à 13200 rpm
- récupérer 9 µl de surnageant à transférer dans un nouveau tube Eppendorf
- ajouter 8 µl d'eau dans le tube où se trouve le culot
- vortexer
- incuber à 55°C pendant 5 minutes
- centrifuger 15 secondes à 13200 rpm
- récupérer 8 µl de surnageant, à transférer dans le tube contenant déjà 9 µl
- stocker à -20°C

4.6.Restriction de l'ADN.

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences souvent palindromiques de 4 à 6 paires de bases.

- dans un tube Eppendorf, mélanger :

l'ADN à restreindre

le tampon de restriction 10x concentré (1/10ème du volume final)

l'enzyme de restriction (1 unité d'enzyme par µg d'ADN à restreindre)

- amener au volume final avec de l'eau distillée stérile
- incuber au minimum 1 heure à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C)
- analyser par électrophorèse en gel d'agarose

4.7.Réaction de ligation.

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise ligase du phage T4 (Roche, 1U/µl). Elle catalyse la formation de liens phosphodiesters entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche.

L'enzyme, pour être active, nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{2+}.

En pratique :

- mélanger dans un tube Eppendorf :

  les fragments d'ADN à liguer

  1/10ème du volume final de tampon de ligation 5x

  le nombre d'unités de ligase nécessaire (dépendants de la quantité d'ADN)

- compléter avec de l'eau distillée (si nécessaire)
- incuber à 16°C une nuit

4.8.Le séquençage.

4.8.1. Le séquençage automatique.

Comme le séquençage manuel, le séquençage automatique se base sur la méthode des terminateurs de chaîne (Sanger *et al*, 1977). Les ddNTP ou terminateur de chaîne (« dye-terminators ») sont marqués par des molécules fluorescentes. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend la lecture possible à partir d'une seule réaction avec un seul primer. Les produits PCR sont ensuite purifiés et chargés sur un gel de polyacrylamide. La lecture de ce gel est effectuée par un logiciel, par détection des quatre rayonnements correspondant à chaque base.

En pratique :

a) la réaction de Cycle sequencing :

- mélanger :

Terminator ready reaction Mix 8 µl

Primer (1µM) 3,2 µl

DNA template : - produit PCR +/- 200 ng

- porter à 20 µl avec de l'eau stérile

- réaliser les cycles PCR suivant :

96°C pendant 30 secondes

50°C pendant 15 secondes

60°C pendant 4 minutes

Répéter 25 fois ce cycle

b) Purification des produits de la réaction :

- ajouter au produit PCR 2 µl d'acétate de sodium 3 M pH 4,6 et 50 µl d'éthanol 95 %

- vortexer et mettre sur glace pendant 10 minutes

- centrifuger à 4°C pendant 30 minutes à 14000 rpm

- éliminer l'éthanol

- laver le culot avec 250 µl d'éthanol 70%

- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 14000 rpm

- éliminer l'éthanol

- sécher le culot sous vide

- resuspendre le culot dans 6 µl de tampon de chargement

- dénaturer cet échantillon pendant 2 minutes à 90°C

- déposer 1,5 µl sur gel de polyacrylamide

Bibliographie

Bibliographie

Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M. and Ingles, C.J. (1985) Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell*, **42**, 599-610.

Costa, P.J. and Arndt, K.M. (2000) Synthetic lethal interactions suggest a role for the *Saccharomyces cerevisiae* Rtf1 protein in transcription elongation. *Genetics*, **156**, 535-547.

Hampsey, M. (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 465-503.

Hampsey, M. and Reinberg, D. (1999) RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 132-139.

Hautbergue, G. and Goguel, V. (2001) Activation of the cyclin-dependent kinase CTDK-I requires the heterodimerization of two unstable subunits. *J. Biol. Chem.*, **276**, 8005-8013.

Lee, J.M. and Greenleaf, A.L. (1989) A protein kinase that phosphorylates the C-terminal repeat domain of the largest subunit of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 3624-3628.

Lee, J.M. and Greenleaf, A.L. (1991) CTD kinase large subunit is encoded by *CTK1*, a gene required for normal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Expr.*, **1**, 149-167.

Lee, J.M. and Greenleaf, A.L. (1997) Modulation of RNA polymerase II elongation efficiency by C-terminal heptapeptide repeat domain kinase I. *J. Biol. Chem.*, **272**, 10990-10993.

Sterner, D.E., Lee, J.M., Hardin, S.E. and Greenleaf, A.L. (1995) The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5716-5724.

Tu, J. and Carlson, M. (1994) The *GLC7* type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6789-6796.

Uptain, S.M., Kane, C M. and Chamberlin, M.J. (1997) Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 117-72.