

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Kooperative Wechselwirkungen  
von Transkriptionsfaktoren und Histonen  
mit Promotorelementen der Phosphatasegene *PHO5* und *PHO8*  
in *Saccharomyces cerevisiae***

Martin Münsterkötter

aus

Stadtlohn

München 2001



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinn von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. W. Hörz betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 05. Juni 2001

Dissertation eingereicht am	07.06.2001
1. Gutachter	Prof. W. Hörz
2. Gutachter	PD M. Meisterernst
Mündliche Prüfung am	25.07.2001

Meiner Frau Christine und meiner Tochter Fiona

Die vorliegende Arbeit wurde am Adolf-Butenandt-Institut der Universität München durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Hörz bedanke ich mich für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit und für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Allen Kollegen im Institut möchte ich für die große Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern innerhalb der Arbeitsgruppe, mit deren Hilfe ich zu jederzeit rechnen konnte und die stets bereit waren, Probleme mit mir zu diskutieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind größtenteils veröffentlicht worden:

**Münsterkötter, M., Barbaric, S., and Hörz, W.** (2000). Transcriptional regulation of the yeast *PHO8* promoter in comparison to the coregulated *PHO5* promoter. *J. Biol. Chem.* 275, 22678-22685.

**Gregory, P. D., Schmid, A., Zavari, M., Münsterkötter, M., and Hörz, W.** (1999). Chromatin remodelling at the *PHO8* promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* 18, 6407-6414.

**Barbaric, S., Münsterkötter, M., Goding, C., and Hörz, W.** (1998). Cooperative Pho2-Pho4 interactions at the *PHO5* promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho4 at UASp2. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2629-2639.

**Barbaric, S., Münsterkötter, M., Svaren, J., and Hörz, W.** (1996). The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter. *Nucl. Acids Res.* 24, 4479-4486.



# Inhaltsverzeichnis

1	<a href="#">Einleitung</a>	1
2	<a href="#">Ergebnisse</a>	13
2.1	<a href="#">Einfluß zusätzlicher reprimierender Elemente auf Transkriptionsaktivierung und Chromatinöffnung des <i>PHO5</i>-Promotors</a>	13
2.1.1	<a href="#">Beschreibung von <i>PHO5-lacZ</i>-Reporterplasmiden mit Bindestellen für Chromatin-modulierende Faktoren</a>	13
2.1.2	<a href="#">Der <math>\alpha 2</math>-Repressorkomplex reprimiert die Aktivität des <i>PHO5</i>-Promotors</a>	16
2.1.3	<a href="#">Der <math>\alpha 2</math>-Repressorkomplex erschwert die vollständige Chromatinöffnung des <i>PHO5</i>-Promotors bei der Aktivierung</a>	17
2.1.4	<a href="#">Der <math>\alpha 2</math>-Repressorkomplex benötigt für die vollständige Repression des <i>PHO5</i>-Promotors über den eingebauten <math>\alpha 2</math>-Operator das Mediatorprotein Sin4</a>	20
2.1.5	<a href="#">Eine Pho4-Überexpression wirkt der <math>\alpha 2</math>-Repression entgegen</a>	21
2.1.6	<a href="#">Die Verschiebung des <math>\alpha 2</math>-Operators zur kodierenden Sequenz hin erhöht die Repression</a>	22
2.1.7	<a href="#">Die Verschiebung des <math>\alpha 2</math>-Operators zur kodierenden Sequenz hin erhöht die Nukleosomenstabilität, verändert jedoch nicht deren Position</a>	23
2.1.8	<a href="#">Der Einbau eines <math>\alpha 2</math>-Operators zwischen die beiden UAS-Elemente führt zu einer Repression</a>	25
2.1.9	<a href="#">Einbau einer Bindestelle für den Faktor Reb1 (Grf2) in den <i>PHO5</i>-Promotor hat keinen Effekt auf die <i>PHO5</i>-Promotoraktivität</a>	27
2.1.10	<a href="#">Die native Chromatinstruktur des <i>PHO5</i>-Promotor wird durch Einbau einer Reb1-Bindestelle nicht betroffen</a>	28
2.2	<a href="#">Lassen sich <i>in vitro</i>-Nukleosomen auf dem <i>PHO5</i>-Promotor rekonstruieren?</a>	30
2.2.1	<a href="#">Präparative Isolierung von Mononukleosomen aus Hühnererythrozyten</a>	30
2.2.2	<a href="#">Die Rekonstitution eines Mononukleosoms auf einem 180 Bp-DNA-Fragment des <i>PHO5</i>-Promotors, welches das UASp2-Element enthält, ergibt mehrere unterschiedliche Nukleosomenkomplexe</a>	32
2.2.3	<a href="#">Die erhaltenen Nukleosomenkomplexe sind nicht sehr stabil, da ein dynamisches Gleichgewicht vorherrscht</a>	33
2.2.4	<a href="#">Nachweis einzelner Nukleosomenpositionen</a>	34
2.2.5	<a href="#">Schwierigkeit der Detektion der Nukleosomendisruption durch Transkriptionsfaktoren</a>	36
2.3	<a href="#">Die Rolle der kooperativen Wechselwirkungen von Transkriptionsfaktoren am <i>PHO5</i>-Promotor</a>	36
2.3.1	<a href="#">Bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter Transkriptionsfaktoren über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie</a>	37
2.3.2	<a href="#">In vitro-Untersuchungen der DNA-Bindung des Homöodomänenproteins Pho2 und des basisch-Helix-Loop-Helix Proteins Pho4 am <i>PHO5</i>-Promotor</a>	38
2.3.3	<a href="#">Am <i>PHO5</i>-Promotor befinden sich mehrere Pho2-Bindestellen</a>	38
2.3.4	<a href="#">Pho2 und Pho4 binden kooperativ an ihren überlappenden Bindestellen im UASp1-Element</a>	41
2.3.5	<a href="#">Pho2 und Pho4 binden kooperativ an benachbarte Stellen im UASp2-Element</a>	44
2.3.6	<a href="#">Die DNA-Bindung von Pho2 ist erforderlich für seine Kooperativität mit Pho4</a>	47
2.3.7	<a href="#">Kooperative DNA-Bindung existiert auch an einer neu entdeckten schwachen Pho4-Bindestelle</a>	48

2.3.8	<a href="#">Pho4-Bindung an UAS-Elemente des <i>PHO5</i>-Promotors</a>	50
2.3.9	<a href="#">Die DNA-Interaktion von Pho2 am UASp1-Element ist nötig für die Aktivität dieses Elementes</a>	53
2.3.10	<a href="#">Die zum UASp2-Element benachbarten Pho2-Bindestellen sind ebenfalls für die volle Aktivierung des <i>PHO5</i>-Promotors nötig</a>	56
2.3.11	<a href="#">Die Rolle der Pho2-<i>cis</i>-Elemente bei der Chromatinöffnung des <i>PHO5</i>-Promotors</a>	58
2.3.12	<a href="#">Die Aktivierung des <i>PHO5</i>-Promotors durch Pho2-VP16 benötigt mehrere Pho2-<i>cis</i>-Elemente und darüber hinaus die Interaktion mit Pho4</a>	59
2.3.13	<a href="#">Eine Überexpression von Pho4 vermindert die Notwendigkeit der Pho2-<i>cis</i>-Elemente</a>	61
2.3.14	<a href="#">Ein mutiertes Pho4-Protein ohne Pho2-Interaktionsdomäne zeigt keine kooperative DNA-Bindung mit Pho2</a>	62
2.3.15	<a href="#">Das Pho4-Derivat ohne Pho2-Interaktionsdomäne kann UASp2, aber nicht UASp1 aktivieren</a>	64
2.4	<a href="#">Transkriptionelle Regulation des <i>PHO8</i>-Promotors im Vergleich zu dem koregulierten <i>PHO5</i>-Promotor</a>	67
2.4.1	<a href="#">Beschreibung von <i>lacZ</i>-Reporterplasmiden mit mutierten oder ausgetauschten Proteinbindestellen (UASp-Elementen)</a>	68
2.4.2	<a href="#">Integration von veränderten <i>PHO8</i>-Promotoren in den <i>PHO8</i>-Lokus</a>	68
2.4.3	<a href="#">Die Induktion des <i>PHO8</i>-Promotors ist vollständig von der Pho4-Bindung an das UASp2-Element abhängig</a>	70
2.4.4	<a href="#">Die volle Aktivierung des <i>PHO8</i>-Promotors benötigt Pho2</a>	72
2.4.5	<a href="#">Pho2 trägt nicht signifikant zur Pho4-Bindung an den <i>PHO8</i>-Promotor bei</a>	73
2.4.6	<a href="#">Die Einführung des <i>PHO5</i>-UASp1 erhöht die transkriptionelle Aktivität des <i>PHO8</i>-Promotors</a>	75
2.4.7	<a href="#">Ersetzen des UASp2-Elements durch das <i>PHO5</i>-UASp2-Element schwächt den <i>PHO8</i>-Promotor</a>	76
2.4.8	<a href="#">Die niedrige Aktivität des in den <i>PHO8</i>-Promotor plazierten <i>PHO5</i>-UASp2-Elements ist nicht mit der Unfähigkeit, Pho4 zu rekrutieren, erklärbar</a>	77
2.4.9	<a href="#">Die Pho4-Bindung ist allein nicht ausreichend für eine Chromatin-Umordnung und Aktivierung des <i>PHO8</i>-Promotors</a>	78
2.4.10	<a href="#">Das Ersetzen des basalen <i>PHO8</i>-Promotors durch den basalen <i>PHO5</i>-Promotor erhöht die Aktivität des Hybridpromotors</a>	80
2.4.11	<a href="#">Die durch die Nukleosomen -3 und -2 bedeckte <i>PHO8</i>-Promotorregion bewirkt einen repressiven Effekt</a>	81
2.4.12	<a href="#">Der <i>PHO8</i>-Promotor ist unter Hochphosphatbedingungen nicht völlig reprimiert</a>	83
2.4.13	<a href="#">Untersuchungen zur Gcn5-Abhängigkeit des <i>PHO8</i>-Promotors</a>	86
2.4.14	<a href="#">Der <i>PHO8</i>-Promotor bedarf zur Aktivierung der Acetylierung durch Gcn5</a>	87
2.4.15	<a href="#">Die Bindung des Transaktivators Pho4 an das UASp2 des <i>PHO8</i>-Promotors scheint Gcn5-unabhängig zu sein</a>	88
2.5	<a href="#">Während der Aktivierung des <i>PHO84</i>-Gens kommt es zu einer vollständigen Chromatinöffnung im Promotorbereich</a>	89
3	<a href="#">Diskussion</a>	91
3.1	<a href="#">Einfluß von <math>\alpha 2</math>-Repressorsbindestellen auf Expression und Chromatinöffnung</a>	91
3.1.1	<a href="#">Eine <math>\alpha 2</math>-Repressorsbindestelle flüßauf liegend des <i>PHO5</i>-Promotors reprimiert die Expression und verhindert eine vollständige Chromatinöffnung des Promotors</a>	91



---

3.1.2	<a href="#">Der <math>\alpha</math>2-Repressorkomplex modelliert keine alternativen Nukleosomenkonfiguration am <i>PHO5</i>-Promotor, da die native Chromatinanordnung zu stabil ist</a>	93
3.2	<a href="#">Das <i>in vitro</i> rekonstituierte Nukleosom -2 des <i>PHO5</i>-Promotors zeigt nur geringe Stabilität</a>	94
3.3	<a href="#">Einfluß der DNA-Bindung des Homöodomänenproteins Pho2 und des basisch-Helix-Loop-Helix Proteins Pho4 am <i>PHO5</i>-Promotor</a>	96
3.3.1	<a href="#">„<i>In vitro</i>“-Untersuchungen der DNA-Bindung des Homöodomänenproteins Pho2 und des basisch-Helix-Loop-Helix Proteins Pho4 am <i>PHO5</i>-Promotor</a>	96
3.3.2	<a href="#">Bindungskoopertivität findet auf mehreren Ebenen statt</a>	98
3.3.3	<a href="#">Die Rolle von Pho2 am <i>PHO5</i>-Promotor im Chromatinkontext</a>	100
3.3.4	<a href="#">„<i>In vivo</i>“ wird der <i>PHO5</i>-Promotor über kooperative Interaktionen aktiviert</a>	100
3.3.5	<a href="#">Pho2 ist durch seine kooperative DNA-Bindung mit Pho4 in die Aktivierung des <i>PHO5</i>-Promotors einbezogen</a>	101
3.3.6	<a href="#">UASp1 und UASp2 lassen sich aufgrund unterschiedlicher Abhängigkeit von Pho2-<i>cis</i>-Elementen unterscheiden</a>	102
3.3.7	<a href="#">Ein Pho4-Derivat ohne Pho2-Interaktionsdomäne unterscheidet klar zwischen UASp1 und UASp2</a>	103
3.3.8	<a href="#">Pho2: ein pleiotroper Faktor in Hefe</a>	104
3.3.9	<a href="#">Duale Rolle von Pho2 bei der Aktivierung des <i>PHO5</i>-Promotors</a>	105
3.4	<a href="#">Transkriptionelle Regulation des <i>PHO8</i>-Promotors im Vergleich zu dem koregulierten <i>PHO5</i>-Promotor</a>	106
3.4.1	<a href="#">Eine einzelne Pho4-Bindestelle ist für die Aktivierung des <i>PHO8</i>-Promotors verantwortlich</a>	106
3.4.2	<a href="#">Die Stärke des <i>PHO8</i>-Promotors ist durch ein Gleichgewicht von Transkriptionsfaktor-UAS-Interaktionen und dem Ausmaß der Repression durch Chromatin bestimmt</a>	107
3.4.3	<a href="#">Am <i>PHO8</i>-Promotor ist Pho2 für die Pho4-Bindung und Chromatin-Umordnung nicht absolut nötig</a>	109
3.4.4	<a href="#">Die unterschiedlich starke Pho2-Notwendigkeit könnte eine Rolle in der Feinabstimmung der <i>PHO5</i>- und <i>PHO8</i>-Expression unter reprimierenden Bedingungen spielen</a>	110
3.4.5	<a href="#">Einfluß basaler Promotoren auf die Aktivität von Genen</a>	111
3.4.6	<a href="#">Rolle von Pho4</a>	111
3.4.7	<a href="#">Reprimierender Effekt der nukleosomalen Region (N -2 / N -3) am <i>PHO8</i>-Promotor</a>	113
3.4.8	<a href="#">Proteinkomplexe, die an der Chromatin-Umordnung beteiligt sind</a>	114
3.4.9	<a href="#">Die Genregulation ist durch eine Vielzahl kleiner Beiträge geprägt</a>	115
4	<a href="#">Material und Methoden</a>	117
4.1	<a href="#">Materialien</a>	117
4.1.1	<a href="#">Enzyme</a>	117
4.1.2	<a href="#">Chemikalien</a>	117
4.1.3	<a href="#">Radioaktive Substanzen</a>	119
4.1.4	<a href="#">Sonstiges</a>	119
4.1.5	<a href="#">Medien</a>	119
4.1.6	<a href="#">Oligonukleotidsequenzen</a>	120
4.1.7	<a href="#">Reporter- und Expressionsplasmide</a>	123
4.1.8	<a href="#">Organismen</a>	125
4.2	<a href="#">Methoden</a>	127
4.2.1	<a href="#">Klonierungstechniken in <i>E. coli</i></a>	127
4.2.2	<a href="#">Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>-Bakterien</a>	127

4.2.3	<a href="#">Transformation kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen</a>	127
4.2.4	<a href="#">DNA-Fragmente und Klonierungen</a>	128
4.2.5	<a href="#">Isolierung von Plasmid-DNA</a>	130
4.2.6	<a href="#">DNA-Sequenzierung</a>	130
4.2.7	<a href="#">Hefetransformation</a>	130
4.2.8	<a href="#">Isolierung von chromosomaler Hefe-DNA</a>	131
4.2.9	<a href="#">Messung der <math>\beta</math>-Galaktosidase-Aktivität</a>	131
4.2.10	<a href="#">Messung der sauren Phosphataseaktivität</a>	131
4.2.11	<a href="#">Messung der alkalischen Phosphataseaktivität</a>	132
4.2.12	<a href="#">Isolierung von Hefezellkernen</a>	132
4.2.13	<a href="#">Auftrennung von DNA in Agarosegelen; Southern Transfer auf geladene Nylonmembranen und Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA</a>	133
4.2.14	<a href="#">Analyse von <i>in vivo</i>-Proteinbindung mit Dimethylsulfat (DMS)</a>	133
4.2.15	<a href="#">„<i>In vitro</i>“-DMS-Behandlung von freier Plasmid-DNA</a>	135
4.2.16	<a href="#">Oligonukleotid-Verlängerungsreaktionen</a>	135
4.2.17	<a href="#">Expression und Reinigung von Pho4-HIS und Pho2-HIS-Fusionsproteinen</a>	136
4.2.18	<a href="#">Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese</a>	136
4.2.19	<a href="#">Spezifischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose</a>	137
4.2.20	<a href="#">„<i>In vitro</i>“-DnaseI-Footprints</a>	138
4.2.21	<a href="#">Gelretardationsexperimente</a>	139
4.2.22	<a href="#">Isolierung von Mononukleosomen</a>	139
4.2.23	<a href="#">Rekonstitutionsexperimente mit radioaktiv markierter DNA</a>	140
4.2.24	<a href="#">Nukleoproteingelelektrophorese</a>	140
4.2.25	<a href="#">Isolierung rekonstituierter Partikel aus dem Nukleoproteingel</a>	140
4.2.26	<a href="#">Nukleaseabbau von rekonstituierten Nukleosomen</a>	141
5	<a href="#">Zusammenfassung</a>	143
6	<a href="#">Literaturverzeichnis</a>	147
7	<a href="#">Anhang</a>	161
7.1	<a href="#">Abbildungsverzeichnis</a>	161
7.2	<a href="#">Tabellenverzeichnis</a>	168
7.3	<a href="#">Abkürzungsverzeichnis</a>	169

Lebenslauf

# 1 Einleitung

Die Steuerung eukaryotischer Genexpression geschieht durch das Zusammenspiel *cis*- und *trans*-regulierender Faktoren in einer Chromatinumgebung ((Felsenfeld et al., 1996); (Peterson, 1996); (Wolffe, 1997); (Gregory and Hörz, 1998)). Im folgenden soll die Genregulation in Hinsicht auf Transkriptionsfaktoren und Nichthistonproteine erläutert werden, bevor auf die entscheidende Rolle der Chromatinstruktur eingegangen wird.

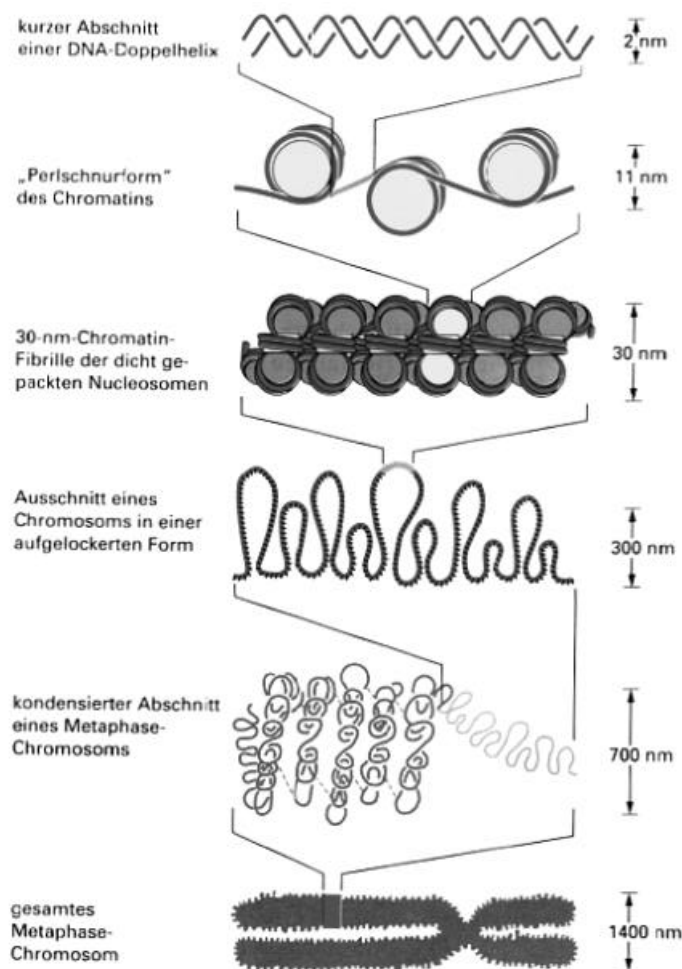
Gene, die für Proteine kodieren, werden von der RNA-PolymeraseII abgelesen. Ihre Promotoren enthalten in proximalen Positionen Elemente in einem festen Abstand und mit bestimmter Polarität, wie das hochkonservierte TATA-Motiv ((Faye et al., 1981); (Breathnach and Chambon, 1981); (Struhl, 1987)), die Pyrimidin-reiche(n) Initiationsstelle(n) (Inr) nahe dem Transkriptionsstart, oder auch Sp1- bzw. Oct1-Bindestellen ((Seipel et al., 1992)). Diese Regionen faßt man als Basalpromotorelement zusammen; definiert wird es auch als minimale Sequenz, die notwendig und ausreichend ist für einen akkuraten Transkriptionsstart durch die RNA-PolymeraseII in einem rekonstituierten zellfreien System. Daneben findet man an entfernten (distalen) Positionen in höheren Eukaryoten regulatorische Elemente, sogenannte „Enhancer und Silencer“, welche entfernungs-, orientierungs- und positionsunabhängig wirken ((Banerji et al., 1981); (Benoist and Chambon, 1981); (Seipel et al., 1992)). Bei den Enhancern der Hefe muß eine Einschränkung gemacht werden, da sie nur in 5'-Richtung und bis etwa 700 Bp Entfernung vor der TATA-Box funktional sind. Sie werden deshalb auch besser als Upstream Activating Sequences (UASs) bezeichnet ((Struhl, 1987); (Guarente, 1988)).

Die basale Transkriptionsmaschinerie ist aus generellen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, B, D, E, F und H) und der RNA-PolymeraseII aufgebaut, wobei sich der TFIID-Komplex zusammensetzt aus dem TATA-bindenden Protein TBP und TBP-assoziierten Faktoren (TAFs; (Dynlacht et al., 1991)). Da *in vitro* ein solcher Komplex bereits zur basalen Transkription führt, ging man anfangs davon aus, daß die basale Transkriptionsmaschinerie schrittweise an das Basalpromotorelement bindet und den sogenannten Präinitiationskomplex ausbildet ((Struhl, 1987); (Buratowski et al., 1989); (Ptashne and Gann, 1990); (Roeder, 1996)). Ein neues Modell entstand, als die Transkriptionsmaschinerie als nativer Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 2 MDa affinitätschromatographisch gereinigt werden konnte. Er besteht aus der RNA-PolymeraseII mit ihren 12 Untereinheiten, generellen Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren, Mediatoren ((Kim et al., 1994)) und SRBs (Suppressor of RNA-PolymeraseB) ((Chao et al., 1996)). Ob dieser als Holoenzym bezeichnete Komplex des

weiteren auch Bestandteile des SWI/SNF-ATPase-Komplex beinhaltet, wie von (Wilson et al., 1996)) gefunden, ist noch umstritten. Andere Gruppen konnten weder eine Assoziation dieses noch eines anderen Chromatin-Remodeling-Complexes (RSC) feststellen ((Cairns et al., 1996a)), obwohl die RSC-Funktion direkt mit der transkriptionellen Kontrolle verknüpft zu sein scheint ((Cairns et al., 1999)).

Die *cis*-regulatorischen Elemente werden von Repressor- oder Aktivatorproteinen gebunden, was zu einer transkriptionsmindernden oder -verstärkenden Wirkung führt (McKnight and Tjian 1986; (Guarente, 1987); (Struhl, 1987); (Ptashne and Gann, 1990); (Lewin, 1990); (Stargell and Struhl, 1996); (Ptashne and Gann, 1997)). Transkriptionsaktivatorproteine bestehen im allgemeinen aus einer DNA-bindenden und einer aktivierenden Domäne. Es gibt verschiedene Klassen von DNA-bindenden Domänen. In der Klasse der basisch-Helix-Loop-Helix (bHLH) Motive findet man Faktoren wie Myc und Pho4, sie binden beide an eine E-Box-Konsensussequenz. In der Klasse der Zinkfinger motive sind Sp1 ((Kuwahara and Coleman, 1990)) und Gal4 ((Corton and Johnston, 1989)) zu finden. In die große Klasse der Homöoproteine gehören bevorzugt entwicklungspezifische Faktoren aus *Drosophila melanogaster*, wie Antennapedia und fushi tarazu ((Winslow et al., 1989); (Gehring, 1992)), aber auch der pleiotrope Hefefaktor Pho2 ((Justice et al., 1997)). Bei den transkriptionsaktivierenden Domänen gibt es zwei unterschiedliche funktionale Klassen. Proximale Aktivierungsdomänen, beispielsweise glutaminreiche Domänen von Oct-1, Oct-2a und Sp1, stimulieren die Transkription nur von Positionen nahe der TATA-Box, meist zusammen mit einem entfernten (remote) Enhancer. Generelle Aktivierungsdomänen, die z. B. in den Transkriptionsfaktoren VP16, Gal4, NFκBp65 und Pho4 vorhanden sind, aktivieren hingegen die Transkription von distalen und proximalen Positionen ((Seipel et al., 1992)). Ihre Domänen enthalten viele saure Aminosäuren und/oder Motive aus mehreren Serinen und Threoninen. Die Prolin-reichen Aktivierungsdomänen von AP2 und CTF/NF1 scheinen eine dritte Klasse zu repräsentieren, die annehmbare Promotoraktivität und niedrige, aber signifikante Enhanceraktivität besitzt ((Seipel et al., 1992)). Transkriptionsfaktoren können ihre aktivierende Funktion durch Wechselwirkung ihrer sauren Domäne mit Bestandteilen der Transkriptionsmaschinerie ausüben ((Kornberg and Lorch, 1991); (Struhl, 1996); (Roeder, 1996); (Ptashne and Gann, 1997)). Die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren wird über ihren Phosphorylierungsgrad gesteuert, der sowohl für die Interaktionsfähigkeit mit anderen Faktoren als auch für die zelluläre Lokalisation des Proteins entscheidend zu sein scheint ((Lenburg and Oshea, 1996); (Lesage et al., 1996)).

Im Gegensatz zu Prokaryoten und zur *in vitro*-Situation ist selbst ein starker basaler Promotor in eukaryotischen Zellen generell allein inaktiv. Die Transkription aller eukaryotischen Gene benötigt Aktivatoren. Eine effiziente Transkription benötigt das synergistische Wirken mehrerer Aktivatoren; in einigen Fällen interagieren deshalb mehrere Aktivatoren miteinander, um einen hochstrukturierten Protein-DNA-Komplex, das „Enhancosom“ zu bilden ((Carey, 1998)). Die Aktivatorbindestellen sind dabei häufig in Gruppen als sogenannte Enhancer zusammengefaßt, die als autonome Regulatoreinheiten fungieren. Die transkriptionelle Aktivierung in Eukaryoten ist kombinatorisch. Jede der zahlreichen möglichen Kombinationen ist biologisch verschieden, wodurch ein einzelner Promotor mit bemerkenswerter Vielfalt und Präzision reguliert werden kann. Der Grund für die generelle Inaktivität eines Promotors liegt in der Chromatinorganisation der eukaryotischen DNA. Der Zugang von Proteinen zur DNA wird aber nicht bereits generell verhindert. Hauptbestandteil des Chromatins ist der Komplex aus negativ geladener DNA, neutralisiert und verpackt durch kleine basische Proteine (Histone).



**Abbildung 1: Modell zur Chromatin-Verpackung.** Diese schematische Zeichnung zeigt einige der zahlreichen Ordnungsprinzipien der Chromatin-Verpackung, um ein hochgradig kondensiertes mitotisches Chromosom entstehen zu lassen.

Die kleinste Einheit stellt das Nukleosomkernpartikel dar. Die Form entspricht einem flachen Zylinder, dessen Kern aus acht Histonen, je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Um dieses Histonoktamer ist die DNA in 1,7 Windungen geschlungen, was 146 Bp entspricht. Im Chromatin sind diese Nukleosomen perlenartig aneinandergereiht (Abbildung 1), mit durchschnittlich 60-70 Bp DNA (bei Hefe 20-30 Bp DNA) dazwischen. Diese nicht an Kernhistone gebundene DNA wird als Linker bezeichnet. Ein Nukleosom ist somit in Abhängigkeit von der Art des Organismus und des Gewebes pro 165-255 Bp DNA zu finden. Die Nukleosomenkette wird in einer 30 nm-Fiber organisiert. Diese 30 nm-Fiber ist im Abstand von 40-100 kbp an der Kernmatrix geheftet, wobei sich Schleifen ausbilden. Diese Schleifen, auch als Chromatindomänen bezeichnet, können sich weiter zur Einheitsfibrille von 300-400 nm Durchmesser auffalten. Durch schraubenförmiges Aufwinden bildet sich das Chromatid (700 nm Durchmesser) eines Chromosoms (1400 nm Durchmesser) (Abbildung 1). An diesen Strukturen höherer Ordnung sind neben Histonen auch Nichthistonproteine beteiligt ((Bun Ya et al., 1991; Kaffman et al., 1998a); (Eisenberg et al., 1985); (Pederson et al., 1986)).

Bisher ist keine klare Funktion für Linkerhiston H1 gefunden worden ((Bresnick et al., 1992); (Oshumi et al., 1993); (Dasso et al., 1994), (Shen and Gorovsky, 1996)). Das Histon H1 schien lange Zeit Voraussetzung für die Chromatinkondensation zu sein ((Shen et al., 1995)), bis gezeigt werden konnte, daß Chromosomen auch ohne H1 kondensieren können ((Wolffe et al., 1997)). H1 hat keinen großen Effekt auf die globale Transkription, kann jedoch als genspezifischer Regulator wirken ((Shen and Gorovsky, 1996); (Sera and Wolffe, 1998)). In Hefe wurde auch ein H1-Homologes gefunden ((Ushinsky et al., 1997)); seine Mutation zeigt jedoch keinen eindeutigen Phänotyp ((Escher and Schaffner, 1997)).

Rekonstitutionsversuche *in vitro* deuten auf reprimierende Einflüsse von Histonen auf die Promotoraktivität hin ((Knezetic and Luse, 1986); (Lorch et al., 1987); Matsui 1987; (Workman and Roeder, 1987); (Knezetic et al., 1988); (Workman et al., 1991); (Becker et al., 1991); (Laybourn and Kadonaga, 1991); (Imbalzano et al., 1994)), wobei Nukleosomen die Initiation der Transkription verhindern. Die reprimierende Wirkung der Nukleosomen auf die Transkription ließ sich ebenfalls *in vivo* nachweisen ((Felsenfeld, 1992); (Svaren and Hörz, 1993); (Hager et al., 1995); (Svaren and Hörz, 1996); (Wolffe and Pruss, 1996)). So verhindert z. B. der Austausch einer Region, die bei der Aktivierung des Promotors von

einem nukleosomalen in einen nichtnukleosomalen Zustand wechselt, gegen eine stark nukleosomenbindende DNA die Aktivierung des Reportergens ((Straka and Hörz, 1991)).

Eine Chromatinspaltung mit unspezifischen Nukleasen wie DNaseI- und Micrococcus-Nuklease zeigte hypersensitive Stellen (HS). Diese weisen auf die Existenz nukleosomenfreier Regionen hin (Wu, 1979), die bei einer Promotoraktivierung erweitert ((Almer et al., 1986); (Almer and Hörz, 1986)) oder transient gebildet werden ((Archer et al., 1992)). Veränderungen der nukleosomalen Organisation im Promotorbereich lassen sich bei der Aktivierung vieler Gene beobachten ((Yaniv and Cereghini, 1986); (Gross and Garrard, 1988); (Elgin, 1988); (Elgin, 1990); (Kornberg and Lorch, 1991); (Felsenfeld, 1992); (Hager et al., 1995)). Modifikationen der Histonproteine brachten Einblicke in das kompetitive Wechselspiel zwischen Transkriptionsaktivatoren und den reprimierenden Einflüssen der Nukleosomen. Die Deletionen jeweils einer Kopie der zwei Histonpaare H2A und H2B haben Auswirkungen auf Wachstum, Sporulation und Hitzeschockantwort der Hefen ((Norris and Osley, 1987)). Disruptionen im hydrophoben Teil der beiden H4-Gene sind letal ((Kayne et al., 1988); (Kim et al., 1988)). Bei der Repression der Synthese des Histons H4 kommt es zur Aktivierung des *PHO5*-Gens unter ansonsten reprimierenden Bedingungen und auch anderer normalerweise reprimierter Gene. Mutationen der Acetylierungsstellen im Aminoterminus des H4-Proteins können die Aktivität regulierter Gene stark reduzieren ((Durrin et al., 1991); (Grunstein, 1992)), und Veränderungen im Aminoterminus von H2A verursachen spezifische Transkriptionsdefekte ((Hirschhorn et al., 1995)).

Da TBP, wie Experimente *in vitro* zeigten, nicht an nukleosomale DNA bindet, ist es nicht überraschend, daß TBP *in vivo* in Abwesenheit von funktionalen Aktivatoren mit den meisten der Hefepromotoren nicht assoziiert ist ((Kuras and Struhl, 1999); (Li et al., 1999)). Dagegen haben Nukleosomen nur einen moderaten inhibitorischen Effekt auf die Fähigkeit einer Vielzahl von Aktivatorproteinen zur Bindung an ihre Erkennungsstellen. Der Beitrag von Nukleosomen, die Interaktion DNA-bindender Proteine an ihre Erkennungssequenzen zu inhibieren, ist deshalb höchst variabel ((Paranjape et al., 1994); (Workman and Kingston, 1998)).

Es gibt zwei Klassen von Mechanismen, durch die eukaryotische Aktivatoren die Assoziation der RNA-PolymeraseII-Maschinerie mit dem Promotor verstärken können. Erstens können sie eine direkte Interaktion mit Komponenten der RNA-PolymeraseII-Maschinerie eingehen ((Ptashne and Gann, 1997)), und zweitens können Aktivatoren indirekt die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie durch Veränderung der Chromatinstruktur erhöhen. Dem zweiten

Fall zuzuordnen sind die an den Aminotermini der Histone stattfindenden dynamischen Acetylierungs- und Deacetylierungsprozesse, die mit der Transkriptionsaktivität einer chromosomalen Domäne korrelieren ((Jeppesen and Turner, 1993); (Hebbes et al., 1994)). Eine Acetylierung von Histonen am Aminoterminus hat *in vitro* Konformationsänderungen der Nukleosomen zur Folge ((Garcia-Ramirez et al., 1995)) und erleichtert die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre nukleosomal verpackten Zielsequenzen ((Lee et al., 1993); (Vettese-Dadey et al., 1996)). Diese Effekte sind das Ergebnis reduzierter Histon-DNA-Affinität ((Wade et al., 1997); (Tse et al., 1998)) und/oder Nukleosomen-Nukleosomen-Interaktionen ((Luger et al., 1997)). *In vivo* erhöht eine Hyperacetylierung der Histone die Expression vieler Gene (Brownell and Alis 1996). Als erstes wurde die Histonacetyltransferase HAT A aus Tetrahymena isoliert. Gcn5 wurde als Hefeprotein mit hoher Homologie zu HAT A gefunden und weist ebenfalls Histonacetyltransferaseaktivität auf ((Brownell et al., 1996)). Es wurde früher als Koaktivator identifiziert ((Berger et al., 1992); (Georgakopoulos and Thireos, 1992); (Marcus et al., 1994)) und ist an zwei großen Proteinkomplexen mit HAT-Aktivität (Ada und SAGA) beteiligt ((Grant et al., 1997); (Pollard and Peterson, 1997); (Saleh et al., 1998); (Kuo et al., 1996); (Candau et al., 1997); (Wang et al., 1998)). Gcn5 acetyliert spezifisch Histone in der Umgebung eines aktivierten Promotors ((Kuo et al., 1998)). *In vitro*-Experimente zeigten, daß Transkriptionsaktivatorproteine diese HAT-Komplexe zum Chromatin führen können und sogar Chromatin für die Stimulierung der Transkriptionsaktivierung benötigen ((Utley et al., 1998); (Kingston, 1999)). *In vivo* wurde demonstriert, daß in Abwesenheit der Gcn5-HAT-Aktivität die komplette Umstrukturierung des Chromatins am *PHO5*-Promotor unter Bedingungen der submaximalen Aktivierung verhindert wird ((Gregory et al., 1998)).

Die Histondeacetylasen hingegen tragen zur Repression bei, indem sie über Korepressoren an die DNA rekrutiert werden ((Alland et al., 1997); (Hassig et al., 1997); (Heinzel et al., 1997); (Kadosh and Struhl, 1998); (Laherty et al., 1997); (Rundlett et al., 1998)). Die Repression durch eine Deacetylase spricht deshalb ebenfalls für eine regulatorische Wirkung der Histone ((Roth and Allis, 1996); (Pazin and Kadonaga, 1997); (Wolffe, 1997)).

Die Zelle verfügt des weiteren über andere Faktoren, die eine Öffnung des Chromatins bewirken. Der hochkonservierte ATP-abhängige SWI-SNF-Komplex (Switch-Sucrose non Fermenting) ist ein solcher Chromatin-Umordnungsfaktor ((Peterson and Tamkun, 1995)). Er spielt in der transkriptionellen Aktivierung einer Anzahl verschieden regulierter Gene wie *INO1*, *SUC2* und *HO* eine Rolle ((Winston and Carlson, 1992); (Peterson and Tamkun, 1995); (Hirschhorn et al., 1992); (Gavin and Simpson, 1997); (Wu and Winston, 1997)).



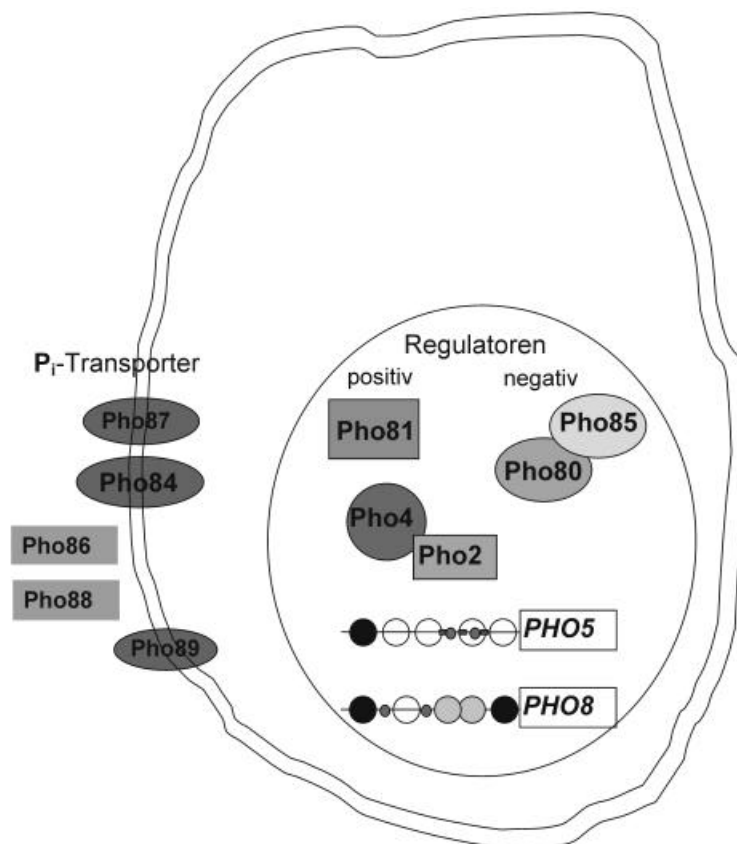
Gegenspieler der Swi/Snf-Proteine sind die Produkte der *SIN*-Gene (Switch independent), welche als Swi/Snf-Suppressormutanten identifiziert wurden, und die *SPT*-Gene (Suppressor of Ty), von denen einige für Histone kodieren ((Winston and Carlson, 1992)). Der RSC-Komplex, der ebenfalls ATPase-Aktivität enthält, zeigt funktionale Redundanz zum Swi/Snf-Komplex ((Cairns et al., 1998)). Einige Proteine sind sowohl am Swi/Snf- als auch am SAGA-Komplex beteiligt ((Pollard and Peterson, 1997)). So ist es weder verwunderlich, daß die funktionalen Überschneidungen zwischen verschiedenen Komplexen zu einer kooperativen Veränderung der Chromatinstrukturen führen, noch daß Promotoren von alternativen Chromatin-Umordnungskomplexen abhängig sind.

Das Wechselspiel zwischen reprimierenden Nukleosomen und transkriptionsaktivierenden Faktoren ist auch für die Regulation des Phosphatasesystems in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* von großer Bedeutung und ein zentrales Thema in unserem Labor. Besonders gut untersucht sind die *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren, bei deren Aktivierung charakteristische Veränderungen im Chromatin zu beobachten sind ((Svaren and Hörz, 1997); (Barbaric et al., 1992)). Die Regulation dieser Promotoren ist abhängig vom Angebot an anorganischem Phosphat, welches über ein komplexes System aus Regulatorgenen zur Genregulation führt ((Vogel and Hinnen, 1990)). Der Phosphatfluß in die Zelle wird hauptsächlich durch den von *PHO84* kodierten Phosphattransporter reguliert ((Bun Ya et al., 1991; Kaffman et al., 1998a)). Zudem gibt es weitere Phosphattransporter wie Pho87 und Pho89, aber auch Regulatoren für den Transportereinbau in Membranen wie Pho86. Das Phosphatsignal wird über einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus weitergegeben, der bei Phosphatmangelbedingungen im Kulturmedium der Hefe die Transkription von vier Phosphatasegenen induziert und bei hohen Phosphatkonzentrationen zur Repression der Gene führt. Drei Produkte dieser Gene sind die im periplasmatischen Raum sezernierten sauren Phosphatasen Pho5, Pho10 und Pho11, das vierte Produkt ist die in der Vakuole befindliche alkalische Phosphatase Pho8. Zwei weitere Phosphatasen – das Produkt des *PHO13*-Gens, einer alkalischen Phosphatase (Kaneko et al., 1989), und das Produkt des *PHO3*-Gens, einer sauren Phosphatase – werden phosphatunabhängig exprimiert.

Der *PHO5*-Promotor ist einer der am stärksten regulierten und zugleich einer der am besten charakterisierten Promotoren in Hefe. Unter Phosphatmangelbedingungen stammen 90 % der sauren Phosphataseaktivität der gesamten Zelle vom *PHO5*-Produkt (Tait-Kamrad, 1986). Der reprimierte Zustand des *PHO5*-Promotors in einem phosphathaltigen Medium ist durch positionierte Nukleosomen charakterisiert, deren regelmäßige Abfolge von einer hypersensitiven Region unterbrochen ist ((Almer and Hörz, 1986)). Die Transkriptionsaktivierung

des *PHO5*-Promotors unter Phosphatmangelbedingungen geht mit einer Öffnung der Chromatinstruktur einher über einen Bereich von je zwei positionierten Nucleosomen flußauf und flußab liegend der hypersensitiven Region. Die Chromatinöffnung ist unabhängig von der DNA-Replikation ((Schmid et al., 1992)) und der Transkription ((Fascher et al., 1993)). Der *PHO8*-Promotor wird fast zehnmal schwächer als der *PHO5*-Promotor aktiviert ((Barbaric et al., 1998)). Seine Aktivierung geht ebenfalls mit einer Chromatin-Umordnung einher ((Barbaric et al., 1992)). Unter reprimierten Bedingungen existiert eine hochgeordnete Chromatinorganisation mit drei hypersensitiven Stellen. Bei der Induktion wird ein Nucleosom zwischen zwei hypersensitiven Regionen zerstört und ein 300 Bp hypersensitiver Bereich erzeugt. Dagegen zeigt die flußab liegende Promotorregion nur eine intermediäre Zugänglichkeit für Nucleasen, übereinstimmend mit dem Vorhandensein von instabilen, teilweise veränderten Nucleosomen.

Genetische Studien zeigten, daß während des „Phosphathungerns“ zwei positive DNA-bindende Transkriptionsfaktoren – das basisch-Helix-Loop-Helix Protein Pho4 und das Homöodomänenprotein Pho2 – für die transkriptionelle Aktivierung des *PHO5*- und *PHO8*-Promotors nötig sind ((Oshima, 1982)).



**Abbildung 2: Das Phosphataseregulon der Hefezelle.** Die Zeichnung zeigt in vereinfachter Weise das Phosphataseregulon der Hefezelle. Dargestellt sind die Phosphatetransporter, welche Phosphat in die Zelle

bringen, die positiv regulatorischen Faktoren Pho2, Pho4 und Pho81 und die negativ regulatorischen Faktoren Pho80 und Pho85, welche die Expression der Phosphatstrukturgene kontrollieren. Aufgeführt sind zudem die stark regulierten Phosphatasestrukturgene *PHO5* und *PHO8* mit schematischer Darstellung der Promotorstruktur bzgl. der Lage der Nukleosomen und Aktivatorbindestellen (Näheres siehe Text).

Das Pho4-Protein ((Koren et al., 1986)) enthält eine basisch-Helix-Loop-Helix(bHLH)-Domäne ((Ogawa and Oshima, 1990), (Berben et al., 1990)), die zur DNA-Bindung ((Murre et al., 1989)) benötigt wird. Der sich an diese bHLH-Domäne anschließende Bereich dient zur Dimerisierung ((Ogawa and Oshima, 1990)). Viele bHLH-Proteine binden eine als E-Box oder G-Box bezeichnete palindromische DNA-Sequenz (CACGTG bzw. CAGCTG); dies ist auch für Pho4 der Fall (CACGTG aber auch CACGTT) ((Fisher et al., 1991)). Die saure Domäne am Aminoterminus ((Ogawa and Oshima, 1990)) ist an der Aktivierung und auch an der Nukleosomendisruption beteiligt ((Svaren et al., 1994)). Pho4 bindet *in vivo* nur unter Phosphatmangelbedingungen an die Elemente UASp1 und UASp2 des *PHO5*-Promotors (Venter et al., 1994). Die Bindung von Pho4 sowohl an UASp1 als auch an UASp2 ist nötig, damit ein Chromatinübergang stattfindet. Dies scheint die Voraussetzung für transkriptionelle Aktivierung zu sein ((Svaren and Hörz, 1997)). Deletionsanalysen des *PHO8*-Promotors ergaben zwei regulatorische Regionen ((Hayashi and Oshima, 1991)), UASp1 und UASp2, welche identisch mit den zwei mittels *in vitro*-„Footprints“ gefundenen Pho4-Bindestellen sind ((Barbaric et al., 1992)). UASp1 ist eine schwachaffine Pho4-Bindestelle mit zwei Abweichungen zu der Pho4-Konsensusbindestelle, während UASp2 eine hochaffine Stelle ist ((Barbaric et al., 1992)). Außerhalb des zentralen Konsensushexanukleotids wurden keine signifikanten Sequenzhomologien zwischen der *PHO5*- und *PHO8*-UASp2-Stelle gefunden. Die nukleosomale Öffnung beider Promotoren ist abhängig von Pho4 ((Fascher et al., 1990); (Barbaric et al., 1992)) und seiner Aktivatorodomäne ((Svaren et al., 1994)). Bemühungen, die chromatinöffnende von der transkriptionsaktivierenden Funktion zu trennen, waren bisher nicht erfolgreich ((McAndrew et al., 1998)). Pho4 bindet auch an andere Promotoren wie *PHO11* ((Venter, 1993)) *PHO81* ((Ogawa et al., 1993)) und *PHO84* ((Ogawa et al., 1995)). Bei hohen intrazellulären Phosphatkonzentrationen wird Pho4 durch einen Komplex aus Pho80, einem Cyclin ((Kaffman et al., 1994)), und Pho85, einer cyclinabhängigen Kinase (CDK) (Uenono et al, 1992), phosphoryliert und inaktiviert. Diese Phosphorylierung wird unter Phosphatmangelbedingungen von Pho81, einem Ankyrinrepeatprotein ((Münsterkötter, 1992)), verhindert ((Lenburg and Oshea, 1996)). Das unphosphorylierte Pho4 wird aktiv mittels des Importin-beta-Familienmitglieds Pse1/Kap121 in den Zellkern importiert ((Kaffman et al., 1998a)) und kann dort seine Transaktivatorrolle ausüben. Die Phosphorylierung des Pho4-Proteins beeinflusst sowohl seine Lokalisation als auch seine

Interaktionsfähigkeit. So ist phosphoryliertes Pho4 im Zytoplasma lokalisiert (O'Neill 1996), dies ist zurückzuführen auf seinen aktiven Export aus dem Zellkern ((Kaffman et al., 1998b) und seinen nicht mehr möglichen Import in den Zellkern ((Kaffman et al., 1998a)). Des weiteren scheint Pho80 durch Phosphat auch die Interaktion von Pho4 mit Pho2 zu verhindern.

*PHO2*, auch als *BAS2* ((Arndt et al., 1987)) beschrieben, kodiert für einen pleiotropen Transaktivator mit Homöodomänen ((Bürglin, 1988); (Berben et al., 1988)) als DNA-Bindungsmotiv ((Justice et al., 1997)). *In vitro* wurde eine Pho2-DNA-Bindung nachgewiesen am *PHO5*- ((Vogel et al., 1989)), *HIS4*- ((Arndt et al., 1987)), *TRP4*- ((Braus et al., 1989); (Vogel et al., 1989)), *ADE1*-, *ADE2*-, *ADE5,7*- und *ADE8*- ((Daignan-Fornier and Fink, 1992)) und *HO*-Promotor ((Brazas et al., 1995)). Des weiteren ist Pho2 auch an der Regulation von *ADE12*, *ADE13*, *URA1*, *URA3*, *HIS1*, *HIS4*, *GLN1*, *SHM2* und *MTD1* beteiligt, was Koregulation der Purinbiosynthese, Glutamin, Glycin und Formyltetrahydrofolatsynthese vermuten läßt ((Denis et al., 1998; Denis and Daignan-Fornier, 1998)). Das *PHO8*-Gen galt hingegen als Pho2-unabhängig ((Kaneko et al., 1985)). In den Promotoren einiger ADE-Gene wurden kooperative Bindungsmechanismen zwischen Pho2 und Bas1 beobachtet ((Rolfes et al., 1997)). Die aktivierende Rolle von Pho2 am *PHO5*-Promotor scheint auch an eine Interaktion mit Pho4 gekoppelt zu sein ((Shao et al., 1996)).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor besser zu verstehen. Im Vordergrund stand dabei die Frage nach der Rolle der Position von UAS-Elementen relativ zum Chromatin, insbesondere die Frage, ob der Unterschied zwischen inter- oder intra-nukleosomaler Lokalisation die Aktivierung beeinflussen kann. Dazu sollten zunächst Versuche unternommen werden, die Stabilität und Position der Nukleosomen zu verändern, um deren Einfluß auf die Aktivität der UAS-Elemente bestimmen zu können. Aus der Literatur war bekannt, daß der  $\alpha 2$ -Repressor im Kontext bestimmter Promotoren eine zum  $\alpha 2$ -Operator benachbarte repressive Chromatinstruktur mit basenpaargenauer Nukleosomenposition ausbildet ((Roth et al., 1990)) und daß das Reb1(Grf2; FaktorY)-Protein ((Fedor et al., 1988)) DNA-Regionen im *GAL1/10*-Promotor nukleosomenfrei halten soll. Deshalb sollten diese Faktoren genutzt werden, um Chromatin auch am *PHO5*-Lokus zu beeinflussen: Zu diesem Zweck wurden Bindestellen für diese Faktoren flussauf des *PHO5*-Promotors eingeführt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Stabilität des Nukleosoms -2 im *PHO5*-Promotor untersucht werden, da dieses Nukleosom die Bindung von Pho4 an UASp2 verhindert. Eine *in*

*in vitro*-Rekonstitution dieser DNA-Region mit Histonen sollte klären, ob die Histon-DNA-Bindung sequenzspezifisch oder von anderen Faktoren bestimmt ist. Außerdem sollte die Abhängigkeit der Stabilität solcher Komplexe von der Bindung durch Transkriptionsfaktoren analysiert werden.

Ein weiteres zentrales Thema war der Mechanismus, durch den der Transkriptionsfaktor Pho2 zur *PHO5*-Regulation beiträgt. Pho2 schien hierbei mehrere Funktionen auszuüben, die bisher nur ansatzweise verstanden waren. Zum einen war zwar die Existenz einer Pho2-Bindestelle im *PHO5*-Promotor nachgewiesen worden ((Vogel et al., 1989)), deren Deletion beeinflusste die *PHO5*-Promotoraktivität jedoch nicht signifikant ((Rudolph and Hinnen, 1987)). Zum anderen war die Aktivierung eines heterologen Promotors durch ein 28 Bp-Fragment mit UASp1-Sequenz abhängig von Pho2, obwohl es keinen Hinweis auf eine Pho2-Bindestelle in diesem Element gab ((Sengstag and Hinnen, 1988)). Schließlich kann die Überexpression des bHLH-Transkriptionsfaktors Pho4 auch in Abwesenheit von Pho2 zu einer deutlichen Aktivierung des *PHO5*-Promotors führen, obgleich Pho2 normalerweise für die *PHO5*-Promotoraktivierung essentiell ist ((Fascher et al., 1990)).

Um die Rolle des Transkriptionsaktivators Pho2 besser zu verstehen, sollte seine Bindung an den *PHO5*-Promotor genauer charakterisiert werden, auch im Hinblick auf mögliche direkte Wechselwirkungen mit Pho4.

Da der *PHO8*-Promotor durch die gleiche Aktivierungskaskade gesteuert wird wie der *PHO5*-Promotor und eine ähnliche Chromatin-Umordnung durchmacht, sollten auch cis- und trans-regulatorisch wirkende Elemente dieses Promotors analysiert werden. Ziel dieser vergleichenden Untersuchungen der beiden verwandten Promotoren war es, neue Einblicke in das Wechselspiel von Transkriptionsfaktoren und Chromatinstruktur bei der Regulation von Promotoren zu erhalten.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Einfluß zusätzlicher reprimierender Elemente auf Transkriptionsaktivierung und Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors

Um die Bedeutung der Chromatinstruktur bei der transkriptionellen Regulation von *PHO5* zu analysieren, sollte die Chromatinorganisation des *PHO5*-Promotors gezielt verändert werden. Hierfür sollten Faktoren verwendet werden, die in der Lage sind, Chromatin zu organisieren. Dafür geeignete Faktoren scheinen der  $\alpha 2$ -Repressor zu sein, der eine repressive Chromatinstruktur mit basenpaargenauer Nukleosomenposition ausbildet ((Roth et al., 1990)), und das Reb1-Protein (auch Grf2 oder Faktor Y genannt), welches DNA-Regionen nukleosomenfrei hält ((Fedor et al., 1988)). Am  $\alpha 2$ -Repressorkomplex ist neben dem  $\alpha 2$ -Protein auch das Mcm1-Protein beteiligt. Bindestellen dieser Faktoren sollten deshalb in den *PHO5*-Promotorkontext gebracht werden. Dafür wurden Plasmide konstruiert, die auf einem von C. Straka hergestellten Plasmid pPZ<sub>LEU</sub> (*PHO5-lacZ*) ((Straka and Hörz, 1991)) basieren. Dieses Plasmid enthält den *PHO5*-Promotor vor einem *lacZ*-Reportergen und wird in der Hefe einmal pro Zelle repliziert. Flußauf des *PHO5*-Promotors wurden in dieses Plasmid Bindestellen für den  $\alpha 2$ -Repressor ((Roth et al., 1990)) oder Reb1 (Grf2; FaktorY) ((Fedor et al., 1988)) eingeführt. Für den  $\alpha 2$ -Repressor wurde neben einem auch drei  $\alpha 2$ -Operatoren nebeneinander eingeführt. In weiteren Konstrukten wurde der Abstand dieser Bindestellen zu den zwei Pho4-Bindestellen verkürzt. Im nativen *PHO5*-Promotor liegt UASp1 zwischen Nukleosom -3 und Nukleosom -2 (internukleosomal) und UASp2 im Nukleosom -2 (intranukleosomal). Durch die Abstandsänderung sollte eine Veränderung der Nukleosomenposition am *PHO5*-Promotor induziert werden, d. h. die UAS-Elemente sollten eine Veränderung ihrer Position von internukleosomal nach intranukleosomal oder umgekehrt erfahren. Die Auswirkungen auf Transkriptionsaktivität und Chromatinstruktur wurden für alle so veränderten Konstrukte untersucht.

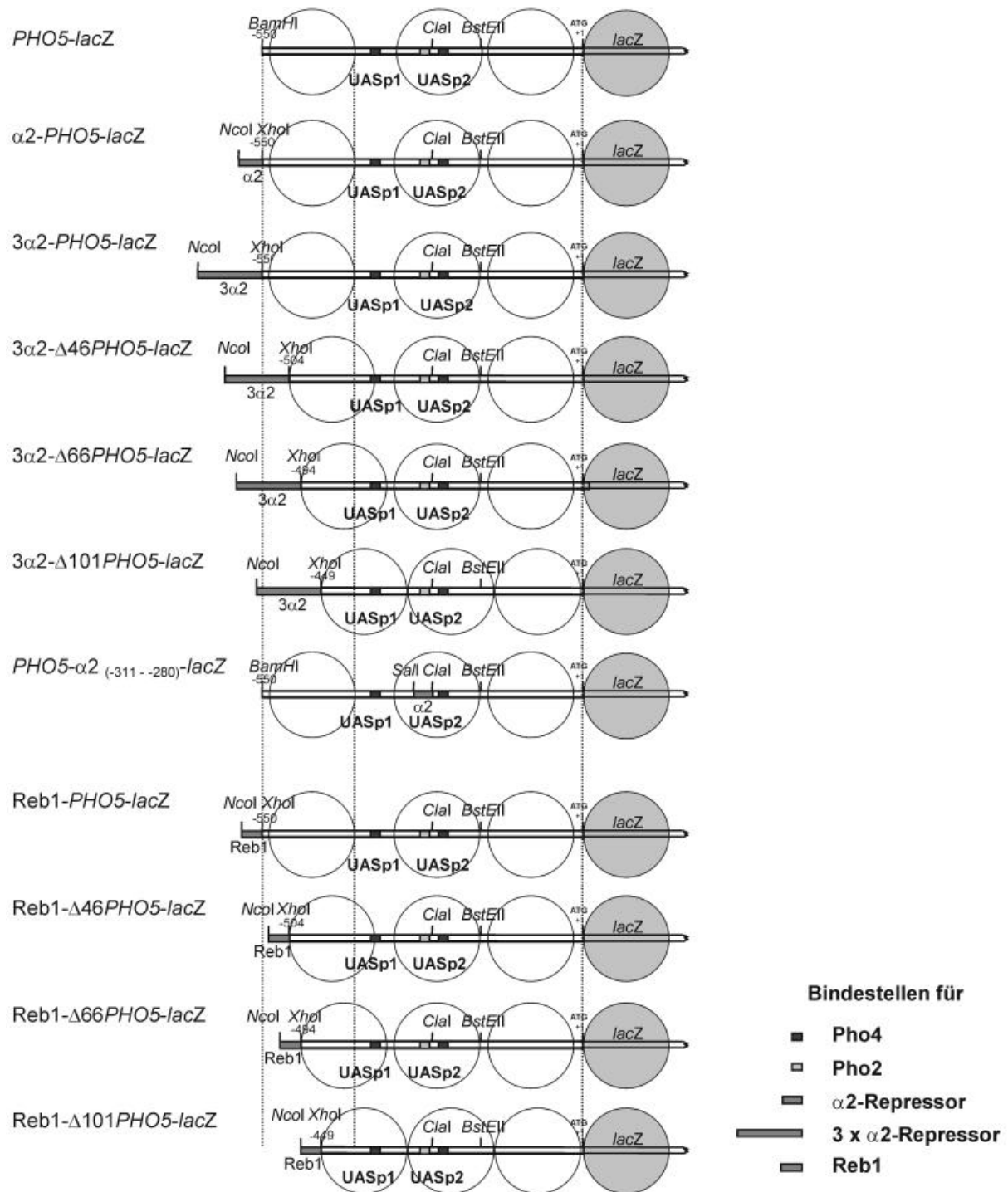
#### 2.1.1 Beschreibung von *PHO5-lacZ*-Reporterplasmiden mit Bindestellen für Chromatin-modulierende Faktoren

Zum Einführen von Bindestellen für die Chromatin-modulierenden Faktoren  $\alpha 2$ -Repressor und Reb1 (Grf2) flußauf des *PHO5*-Promotor wurde ein von Ursula Mader hergestellter Subklon  $\Delta 4$ pPZ (*PHO5-lacZ*) des pPZ<sub>LEU</sub> (*PHO5-lacZ*)-Plasmids verwendet. Dieses Konstrukt weist flußauf von Nukleosom -3 (etwa Position -574 bis -560) je eine singuläre

*NcoI*- und *XhoI*-Restriktionsspaltstelle auf. Über diese Spaltstellen konnten doppelsträngige DNA-Fragmente (synthetisierte Oligonukleotide) mit einer hochaffinen Bindestelle für Reb1 oder den  $\alpha 2$ -Repressor in das Konstrukt gebracht werden. Für Reb1 wurde das 23 Bp-Fragment 5'-CCATGGACATCCGGGTAAGAGACAACAGGCTCGAG-3' verwendet, wie es im Y30-Konstrukt ((Fedor et al., 1988)) zu finden ist, um das Reb1-*PHO5-lacZ*-Konstrukt zu erhalten. Für den  $\alpha 2$ -Repressor wurde das 38 Bp Fragment 5'-CCATGGGTC-GACATGTAATTACCTAATAGGGAAATTTACACGCTCG-AG-3' verwendet, wie es im *STE6*-Promotor zu finden ist. Durch ein- bzw. dreimaligen Einbau wurden die Konstrukte  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ* und  $3\alpha 2$ -*PHO5-lacZ* (114 Bp) erhalten. Weitere Konstrukte mit flußauf verkürzten *PHO5*-Promotoren wurden durch nachfolgende Methode erhalten. Nach *Bal31*-Spaltung des flußauf liegenden *PHO5*-Promotorbereichs wurde dieser an *XhoI*-Adaptoren gekoppelt und anschließend mit der Restriktionsnuklease *SacI* gespalten (singuläre Spaltstelle im *lacZ*). Das so erhaltene Fragment wurde in den *XhoI-SacI* gespaltenen Reb1-*PHO5-lacZ* bzw.  $3\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid kloniert (siehe Abbildung 3).

In den neuen Konstrukten ist der Abstand zwischen den reprimierenden Bindesequenzen und den nativen UAS-Elementen des *PHO5*-Promotors um 46, 66 oder 101 Bp ( $\Delta$ ...) verkürzt (z. B.  $3\alpha 2$ - $\Delta 46$ *PHO5-lacZ*). Mittels der PCR-Methode wurde ein weiteres Konstrukt geschaffen, indem ein  $\alpha 2$ -Operator in die intranukleosomale Region flußauf liegend des UASp2-Elements, d. h. unmittelbar vor die *Clal*-Stelle eingeführt wurde (*PHO5*- $\alpha 2_{(-311--280)}$ -*lacZ*) (siehe Abbildung 3). Alle *PHO5*-Promotormodifikationen wurden in das pPZ(*PHO5-lacZ*)-Plasmid ((Straka and Hörz, 1991)) kloniert.





**Abbildung 3: Konstruktion von *lacZ*-Reporterplasmiden mit Bindestellen für Chromatin-modulierende Faktoren.** Diese schematische Zeichnung zeigt einen Überblick aller erzeugten Hybride des *PHO5*-Promotors mit Bindestellen für Chromatin-modulierende Faktoren. Oben ist zur Orientierung der Wildtyp-*PHO5*-Promotor abgebildet. Die Lage der Transkriptionsfaktorbindestellen sind für das Pho4-Protein durch schwarze Rechtecke und für das Pho2-Protein durch hellgraue Rechtecke markiert. Die Bindestellen für die modulierenden Faktoren  $\alpha 2$ -Repressor bzw. Reb1 sind durch graue Rechtecke markiert. Senkrechte Hilfslinien dienen zur besseren Orientierung und lassen das Ausmaß der 5'-Verkürzung am *PHO5*-Promotoren leichter erkennen. Die Kreise zeigen jeweils die vermutliche Lage der Nucleosomen in der Promotorregion an.

### 2.1.2 Der $\alpha 2$ -Repressorkomplex reprimiert die Aktivität des *PHO5*-Promotors

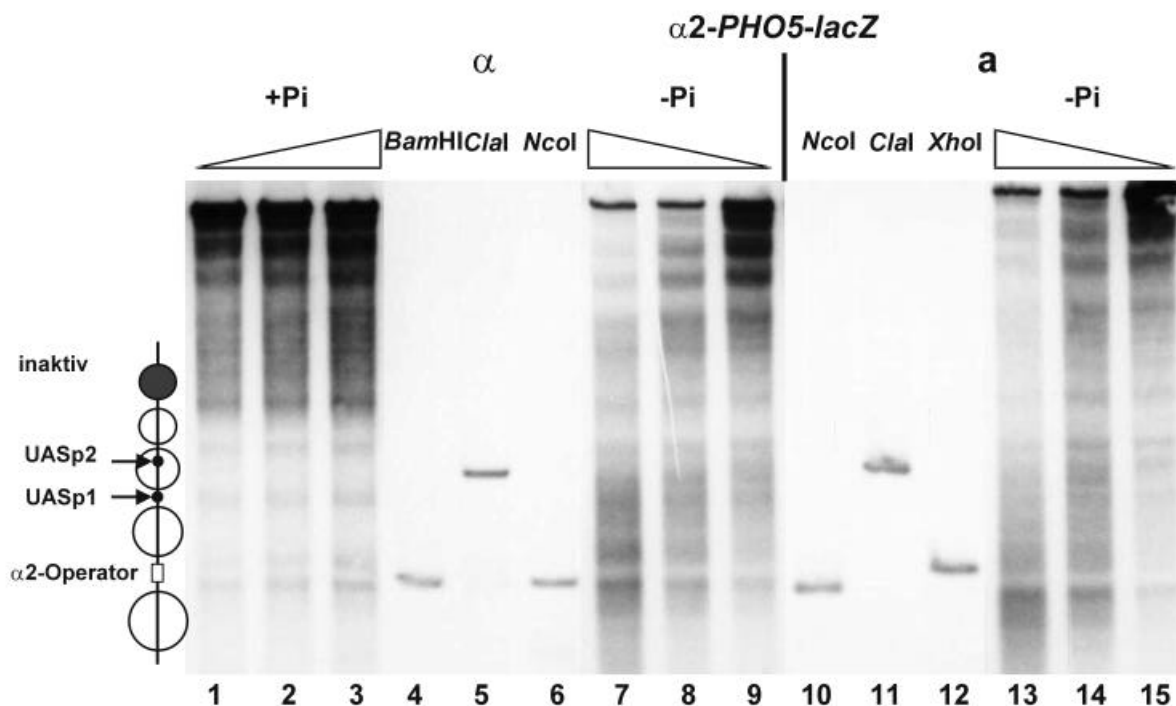
Zur Bestimmung der regulatorischen Eigenschaften wurden die oben beschriebenen neu konstruierten Derivate des pPZ(*PHO5-lacZ*)-Konstrukts in die *S. cerevisiae*-Stämme YS18 $\alpha$  und YS18a transformiert; bestimmt wurde außerdem die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität aus Hefekulturen, welche in einem phosphathaltigen (YNB) und einem phosphatfreien (Minimal-)Medium angezogen wurden. Der  $\alpha 2$ -Repressorkomplex reprimiert das *PHO5*-Promotor-konstrukt mit einem  $\alpha 2$ -Operator ( $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*) unter induzierenden ( $-P_i$ ) Konditionen bereits um einen Faktor 3-4. Dies läßt sich durch Einführen dreier Bindestellen für den  $\alpha 2$ -Repressorkomplex ( $3\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*) auf den Faktor 6 erhöhen (Tabelle 1). Noch deutlicher wird der reprimierende Effekt unter  $+P_i$ -Bedingungen. Die basale Aktivität läßt sich bei  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ* um den Faktor 4 bzw. bei  $3\alpha 2$ -*PHO5-lacZ* um den Faktor 15 verringern. Da im YS18a-Stamm kein  $\alpha 2$ -Protein exprimiert wird, konnte durch Messungen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in diesem Stamm ein möglicher  $\alpha 2$ -unabhängiger Effekt direkt ermittelt werden. Unter „Hochphosphatbedingungen“ ( $+P_i$ ) findet man in diesem Stamm eine gering erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Möglich wäre, daß hier andere Faktoren gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor Mcm1 – da dieser allein nicht direkt an DNA binden kann – zu einer Aktivierung des Promotors führen.

	YS18 $\alpha$ -Zellen		YS18a-Zellen	
	+ $P_i$	- $P_i$	+ $P_i$	- $P_i$
<i>PHO5-lacZ</i>	20	500	50	450
$\alpha 2$ - <i>PHO5-lacZ</i>	5	160	70	420
$3\alpha 2$ - <i>PHO5-lacZ</i>	1-2	90	70	410

**Tabelle 1: Repression des *PHO5*-Promotors durch den  $\alpha 2$ -Repressor.** Bestimmt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von *PHO5-lacZ*-Reporterplasmiden und Varianten mit ein bzw. drei  $\alpha 2$ -Operatoren unter nicht-induzierenden ( $+P_i$ ) und induzierenden ( $-P_i$ ) Bedingungen im  $\alpha$ -Stamm. Es wurden jeweils Messungen dreier unabhängiger Klone durchgeführt; das Ergebnis wurde gemittelt (siehe Material und Methoden). Die Aktivität wurde in Einheiten U ausgedrückt (siehe Material und Methoden). Der a-Stamm, der kein  $\alpha 2$ -Protein produziert, diente jeweils zur Kontrolle.

### 2.1.3 Der $\alpha 2$ -Repressorkomplex erschwert die vollständige Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors bei der Aktivierung

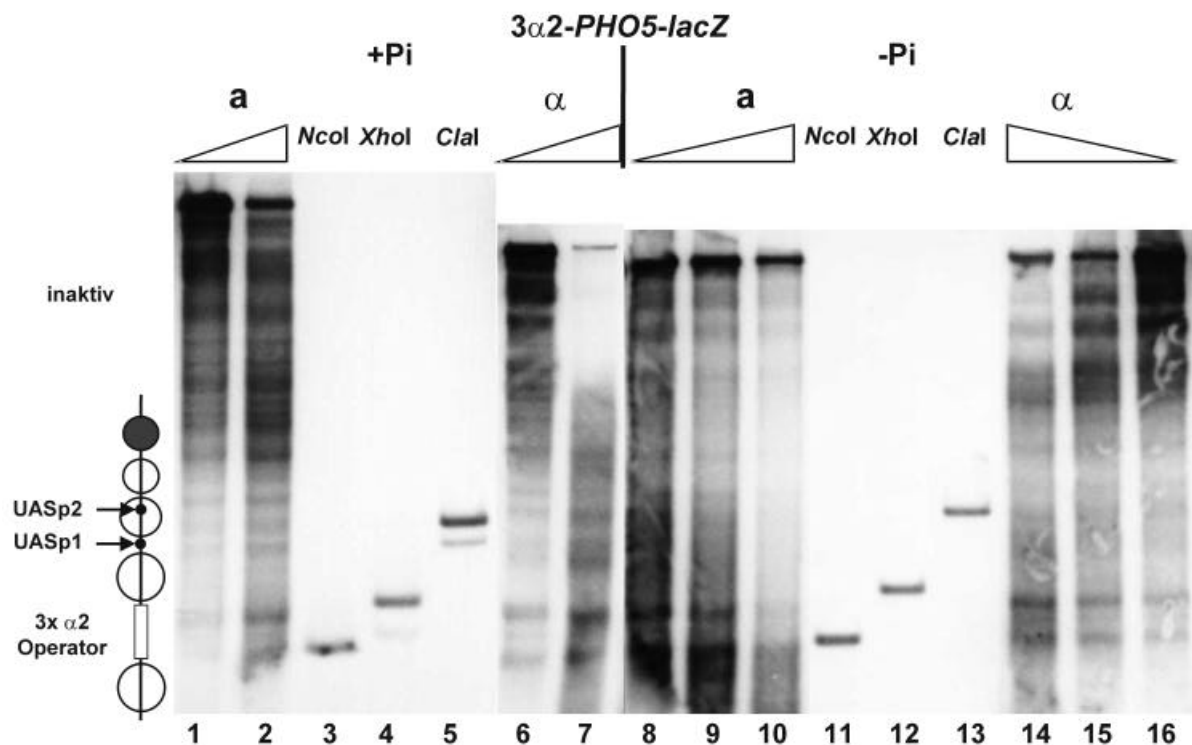
Um einen Einblick in die nukleosomale Organisation des *PHO5*-Promotors während der Repression durch den  $\alpha 2$ -Repressorkomplex zu gewinnen, wurden die Veränderungen der Chromatinstruktur *in vivo* analysiert. Die unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA wurde durch Spaltung mit DNaseI und Restriktionsnukleasen bestimmt. DNA-Sequenzen, die an ein Histonoktamer binden, sind für DNaseI und Restriktionsenzyme sehr viel schlechter zugänglich als nukleosomenfreie Bereiche. Wie DNaseI-Untersuchungen zeigten, findet man im Wildtyp-*PHO5*-Promotor im reprimierten Zustand (+P<sub>i</sub>) vier organisierte Nucleosomen mit einer hypersensitiven Stelle zwischen Nucleosom -3 und -2. Bei der Aktivierung durch „Phosphathungern“ (-P<sub>i</sub>) wird der gesamte Promotorbereich hypersensitiv, was eine drastische Chromatin-Umordnung anzeigt. Der  $\alpha 2$ -Repressorkomplex führt zu keiner Veränderung der Nucleosomenpositionen am *PHO5*-Promotor (Abbildung 4A Spuren 1-3).



**Abbildung 4A: Einfluß des  $\alpha 2$ -Operators auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors.** (A) Einfluß des eingefügten  $\alpha 2$ -Operators auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors. Verwendet wurden Hefezellkerne eines YS18 $\alpha$ -Stamms mit episomalem  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphathaltigen (Spuren 1-3) bzw. einem phosphatfreien Medium (Spuren 7-9) gewachsen waren, und zur Kontrolle Zellkerne eines YS18 $\alpha$ -Stamms mit episomalem  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphatfreien Medium gewachsen war (Spuren 13-15). Die Zellkerne wurden jeweils 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 oder 2 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran

transferiert und mit einer spezifischen flüßauf liegenden pBR-Sequenz enthaltenden Sonde hybridisiert. Zur Positionskartierung wurden die Zellkerne anstatt mit DNaseI mit einer weiteren Restriktionsnuklease gespalten (siehe Beschriftung über den Spuren). Am linken Rand findet sich zur besseren Orientierung eine Schemazeichnung des inaktiven  $\alpha 2$ -*PHO5*-Promotors. Die Kreise sollen die Nukleosomenpositionen repräsentieren; die Position des  $\alpha 2$ -Operator ist durch ein Rechteck, die Positionen der UAS-Elemente sind durch kleinere ausgefüllte Kreise wiedergegeben.

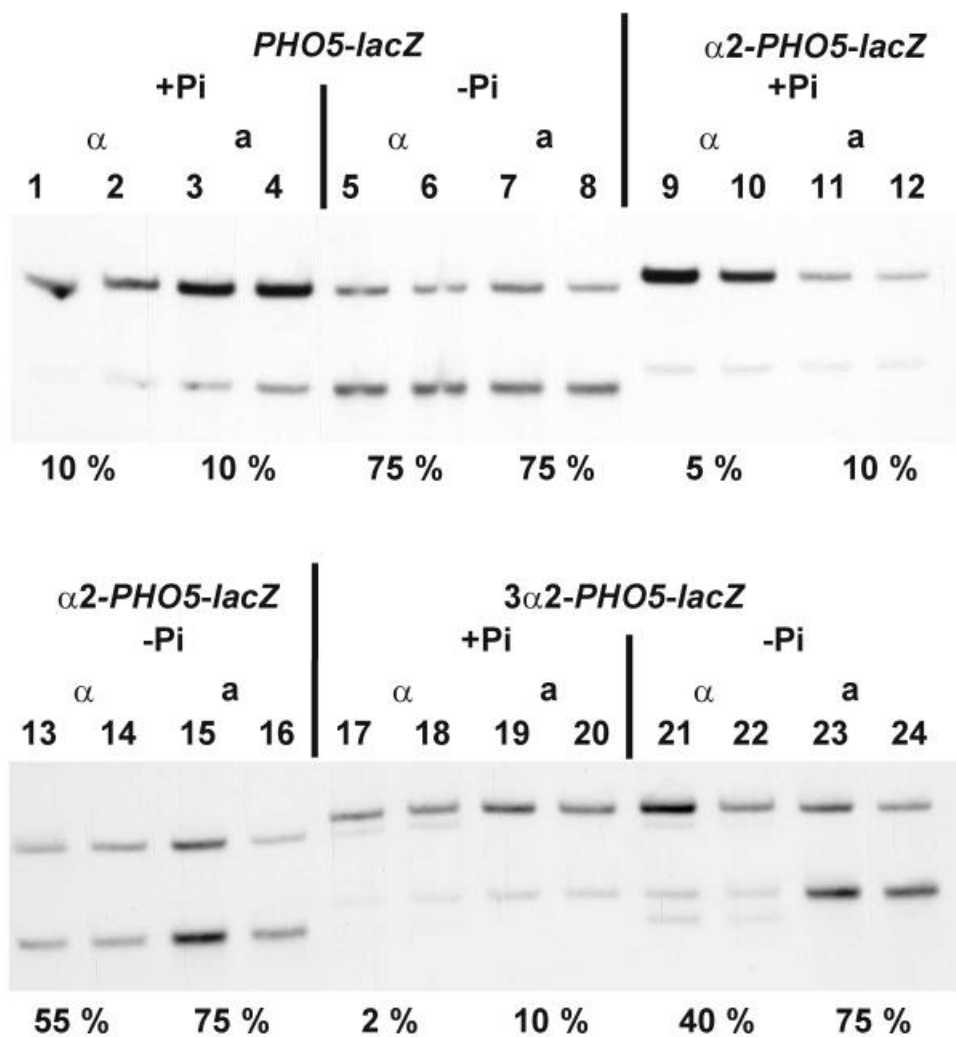
Er verhindert aber die vollständige Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors unter Phosphatmangelbedingungen ( $-P_i$ ) im Bereich der Nukleosomen -3 und -2 (vergleiche Abbildung 4A Spuren 7-9 gegen 13-15). Diese Repression der Chromatinöffnung scheint jedoch nur von partieller Art zu sein. Deutlicher erkennbar ist sie, wenn drei aufeinanderfolgende  $\alpha 2$ -Operatoren vor den *PHO5*-Promotor gebracht werden. In diesem Fall scheint die Region um Nukleosom -3 und -2 im YS18 $\alpha$ -Stamm weit weniger zugänglich als im Vergleich zum YS18a-Kontrollstamm zu sein (vergleiche Abbildung 4B Spuren 8-10 gegen 14-16).



**Abbildung 4B: Einfluß der drei eingefügten  $\alpha 2$ -Operatoren auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors:** (B) Einfluß der drei eingefügten  $\alpha 2$ -Operatoren auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors. Verwendet wurden Hefezellkerne eines YS18 $\alpha$ -Stamms mit episomalem 3  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphathaltigen (Spuren 6-7) bzw. einem phosphatfreien Medium (Spuren 14-16) gewachsen waren, und zur Kontrolle Zellkerne eines YS18a-Stamms mit episomalem  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphathalti-

gen Medium (Spuren 1-2) und einem phosphatfreien Medium gewachsen war (Spuren 8-10). Details bezüglich Behandlung der Zellkerne, Positionskartierung und Schema siehe Abbildung 4A.

Um die geringen Unterschiede in der Chromatinzugänglichkeit genauer fassen zu können, wurde eine Restriktionsnukleasespaltung unternommen. Die *ClaI*-Spaltstelle bei Position -278 zwischen den beiden UAS-Elementen schien gut für diese Untersuchungen geeignet zu sein, da sie im Bereich des Nukleosoms -2 liegt. Die *ClaI*-Zugänglichkeit gibt ein direktes Maß der lokalen Chromatinöffnung in quantitativer Weise an. Im Wildtyp-*PHO5*-Promotor ist sie in phosphathaltigen Medien nur zu 10 % gespalten, während sie bei Phosphatmangel zu 70 bis 90 % zugänglich ist ((Almer et al., 1986)).



**Abbildung 4C: Einfluß des eingefügten  $\alpha 2$ -Operators auf die *ClaI*-Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** Die nukleosomale Struktur des *PHO5*-Promotors wurde in phosphathaltigem (+Pi) und phosphatfreiem (-Pi) Medium untersucht. Zellkerne des YS18 $\alpha$ -Hefestammes ( $\alpha$ ) bzw. des YS18a-Kontrollstammes (a) wurden mit je zwei Konzentrationen 40 U/ml und 160 U/ml des *ClaI*-Restriktionsenzym gespalten. Auf Plasmidebene wurde die Promotorsituation charakterisiert durch eine *HindIII/PvuII*-Nachspaltung und Hybridi-

sierung mit einer Sonde aus dem pBR322-Bereich des pPZ-Plasmides von *Hind*III bis *Bam*HI (Fascher et al, 1993). Aufgetragen sind jeweils zwei Ansätze der in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) und einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsenen Zellen des α- bzw. a-Stammes mit den Plasmid *PHO5-lacZ*: Spuren 1-8, α2-*PHO5-lacZ*: Spuren 9-16 und 3α2-*PHO5-lacZ*: Spuren 17-24. Unten ist jeweils die relative *Clal*-Zugänglichkeit angegeben.

Unsere Messungen zeigten, daß diese Werte sowohl für den Wildtyp-*PHO5*-Promotor im α- und a-Stamm als auch für die Promotorvarianten mit dem eingeführten α2-Operator im a-Stamm (YS18a) zutreffen (siehe Abbildung 4C). Demgegenüber nahm im α-Stamm die Zugänglichkeit unter -P<sub>i</sub> mit Einführen eines α2-Operators auf 55 % ab und bei Einführen dreier α2-Operatoren sogar auf 40 %. Der gleiche Abnahmeeffekt war bereits unter Hochphosphatbedingungen im α-Stamm von 10 % (Wildtyp) auf 5 % (α2) bzw. 2 % (3xα2) zu beobachten (siehe Abbildung 4C).

#### **2.1.4 Der α2-Repressorkomplex benötigt für die vollständige Repression des *PHO5*-Promotors über den eingebauten α2-Operator das Mediatorprotein Sin4**

Das α2-Protein bindet über seine Homöodomänen an DNA. Für kooperative DNA-Bindung durch eine Interaktion mit Mcm1 ist eine der Homöodomänen benachbarte hydrophobe Region nötig, welche ähnlich dem *Drosophila*-Homöodomänen-Interaktions-Motiv ist (Smith and Johnson, 1992; Mead et al., 1996; Tan and Richmond, 1998). Nötig für die Repression sind weitere generelle negative Regulatoren wie Tup1 und Ssn6 (Wahi and Johnson, 1995), welche eine direkte Protein-Protein-Interaktion eingehen. Dabei interagiert die WD-Domäne des Tup1-Proteins direkt mit der TRP-Region des Ssn6-Proteins. Im folgenden sollte untersucht werden, ob darüber hinaus noch weitere Faktoren am α2-Repressorkomplexes beteiligt sind, die in der Lage sind, speziell den *PHO5*-Promotor zu reprimieren. Ein möglicher Kandidat dafür war Sin4 (Suppressor von Swi), ein Protein, welches die globale Transkriptionsregulation negativ durch Effekte auf die Chromatinstruktur ((Jiang and Stillman, 1992)) beeinflussen zu scheint. Ob dieser Faktor auch direkt an der α2-abhängigen Repression beteiligt ist, sollte durch nachfolgende Untersuchungen geklärt werden.

Zur Bestimmung der regulatorischen Eigenschaften der *PHO5*-Promotorvarianten mit dem α2-Operator wurden die *lacZ*-Reporterplasmide in den Sin4-defizienten *S. cerevisiae*-Stamm YS84α (*sin4*) transformiert und die β-Galaktosidase-Aktivität aus Hefekulturen bestimmt, welche in einem phosphathaltigen (YNB) und einem phosphatfreien Medium angezogen wurden. Unter induzierenden Bedingungen (-P<sub>i</sub>) findet man bei dem α2-*PHO5-lacZ*-

Konstrukt im *sin4*-Stamm eine um mehr als das Doppelte erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gegenüber der Messung des gleichen Konstrukts im Wildtyp-Stamm (Tabelle 2). Dies entspricht 60 % der Aktivität des Wildtyp-*PHO5*-Promotors bzw. 25 % für das  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Konstrukt im Wildtyp-Stamm und zeigt einen deutlich verminderten repressiven Effekt des  $\alpha 2$ -Repressors im *sin4*-Stamm. Unter  $+P_i$ -Bedingungen erhält man in einem *sin4*-Stamm bei allen Konstrukten eine deutlich erhöhte basale Aktivität. Der genaue Grund dafür ist bisher noch nicht geklärt. Die Werte belegen somit, daß für die vollständige Repression am *PHO5*-Promotor durch den  $\alpha 2$ -Repressorkomplex das Sin4-Protein benötigt wird.

	YS18 $\alpha$ -Zellen		YS84 $\alpha$ -Zellen ( <i>sin4</i> )	
	$+P_i$	$-P_i$	$+P_i$	$-P_i$
<i>PHO5-lacZ</i>	20	600	120	600
$\alpha 2$ - <i>PHO5-lacZ</i>	5	160	120	350

**Tabelle 2: Die volle Repression über den  $\alpha 2$ -Operator benötigt Sin4.** Bestimmt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von *PHO5-lacZ* Reporterplasmiden und dem Konstrukt mit einem  $\alpha 2$ -Operator unter nichtinduzierenden ( $+P_i$ ) und induzierenden ( $-P_i$ ) Bedingungen in einem Wildtyp- und einem *sin4*-Stamm. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden.

### 2.1.5 Eine Pho4-Überexpression wirkt der $\alpha 2$ -Repression entgegen

Der *PHO5*-Promoter mit  $\alpha 2$ -Operator kann durch den  $\alpha 2$ -Repressorkomplex verhältnismäßig stark reprimiert werden. Inwieweit Transkriptionsfaktoren in der Lage sind, diese Repression aufzuheben, sollte durch Überexpression des Transaktivators Pho4 geklärt werden. Das Labor von A. Hinnen stellte uns das Plasmid YEpP4 zur Verfügung, welches das *PHO4*-Gen auf einem  $2\mu$ -Expressionsplasmid enthält. Diese Plasmide kommen in hoher Kopienzahl in Hefe vor und sorgen so für eine erhöhte Konzentration der Genprodukte. Das *PHO4*-Gen wurde zusätzlich unter die Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors gebracht, und zwar des *TDH3*-Promotors (Triosephosphat-Dehydrogenase, eines von drei Genen, die für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren). Daneben enthielt das Plasmid noch das *URA3*-Gen, das eine Selektion über die Uracil-Auxotrophie erlaubte.

	YS18 $\alpha$ -Zellen		YS18a-Zellen	
	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>
<i>PHO5-lacZ</i>	20	500	50	450
<i>PHO5-lacZ+2<math>\mu</math>PHO4</i>	280	730	-	-
$\alpha$ 2- <i>PHO5-lacZ</i>	5	160	70	420
$\alpha$ 2- <i>PHO5-lacZ+2<math>\mu</math>PHO4</i>	110	430	280	980

**Tabelle 3: Pho4-Überexpression hebt die  $\alpha$ 2-Repression auf.** Bestimmt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von *PHO5-lacZ*-Reporterplasmiden und einer Varianten mit einem  $\alpha$ 2-Operator unter nichtinduzierenden (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen im Wildtyp-YS18a-Stamm und einem  $\alpha$ -Stamm, der den Transkriptionsaktivator Pho4 überexprimiert. Als Kontrolle diente der YS18a-Stamm, der keinen  $\alpha$ 2-Faktor produziert. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden.

Die Pho4-Überexpression (Tabelle 3) führt beim Wildtyp-*PHO5*-Promotor schon unter Hochphosphatbedingungen zu einer 14fachen Induktion, was 50 % der Wildtyp-Aktivität unter Niedrigphosphatbedingungen (-P<sub>i</sub>) entspricht. Unter Phosphatmangelbedingungen (-P<sub>i</sub>) kann dies noch um den Faktor 3 gesteigert werden. Der durch den  $\alpha$ 2-Repressorkomplex reprimierte *PHO5*-Promoter ( $\alpha$ 2*PHO5-lacZ*) wird durch Pho4-Überexpression unter Hochphosphatbedingungen 22fach induziert, was 20 % der Wildtyp-Aktivität unter Niedrigphosphatbedingungen (-P<sub>i</sub>) entspricht. Dies läßt sich unter Phosphatmangelbedingungen (-P<sub>i</sub>) noch um den Faktor 4 steigern. Es entspricht somit der Hälfte der Aktivität des Promotors ohne  $\alpha$ 2-Repressor. Somit kann die Pho4-Überexpression die  $\alpha$ 2-Repression aufheben.

### 2.1.6 Die Verschiebung des $\alpha$ 2-Operators zur kodierenden Sequenz hin erhöht die Repression

Der  $\alpha$ 2-Repressor, der eine repressive Chromatinstruktur induziert, bei der die Nukleosomen basenpaargenau neben den  $\alpha$ 2-Operator positioniert sind ((Roth et al., 1990)), sollte genutzt werden, um am *PHO5*-Promotor spezifische Nukleosomenpositionen herbeizuführen und ihren Einfluß auf die Position der Transkriptionsfaktorbindestellen intra- bzw. internukleosomal zu testen. Da mit drei aufeinander folgenden Bindestellen für den  $\alpha$ 2-Repressorkomplex (114 Bp) ( $3\alpha$ 2-*PHO5-lacZ*) die Chromatinzugänglichkeit deutlich beeinflusst wurde, wurden mittels *Bal31*-Spaltung flüßauf verkürzte *PHO5*-Promotoren an die drei  $\alpha$ 2-Operatoren gekoppelt. Dabei ergaben sich unter anderem drei verkürzte Promotorvarianten, die Verkür-



zungen des Promotors von 46 bis 101 Bp zeigten (z. B.  $3\alpha 2\text{-}\Delta 46\text{PHO5-lacZ}$ ,  $3\alpha 2\text{-}\Delta 66\text{PHO5-lacZ}$ ,  $3\alpha 2\text{-}\Delta 101\text{PHO5-lacZ}$ ), und zwar zwischen den reprimierenden  $\alpha 2$ -Operatorsequenzen und den UAS-Elementen des *PHO5*-Promotors. Es war durchaus anzunehmen, daß der  $\alpha 2$ -Repressorkomplex in der Lage ist, in diesen verkürzten Konstrukten eine Nukleosomenfolge zu formieren, welche nun Nukleosomen auf das UASp1-Element schiebt und im *PHO5*-Promotor die Lage der Elemente im Chromatin (UASp1 internukleosomal und UASp2 intranukleosomal) verändert (siehe Abbildung 3); dies sollte einen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Chromatinöffnung liefern. Alle *PHO5*-Promotormodifikationen wurden wieder in das *PHO5-lacZ*-Plasmid ((Straka and Hörz, 1991)) kloniert und deren Aktivitäten bestimmt (Tabelle 4).

	YS18 $\alpha$ -Zellen		YS18a-Zellen	
	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>
<i>3<math>\alpha 2</math>-PHO5-lacZ</i>	1-2	90	70	410
<i>3<math>\alpha 2</math>-<math>\Delta 46</math>PHO5-lacZ</i>	1-2	62	90	410
<i>3<math>\alpha 2</math>-<math>\Delta 66</math>PHO5-lacZ</i>	1	52	100	430
<i>3<math>\alpha 2</math>-<math>\Delta 101</math>PHO5-lacZ</i>	0,4	41	100	410

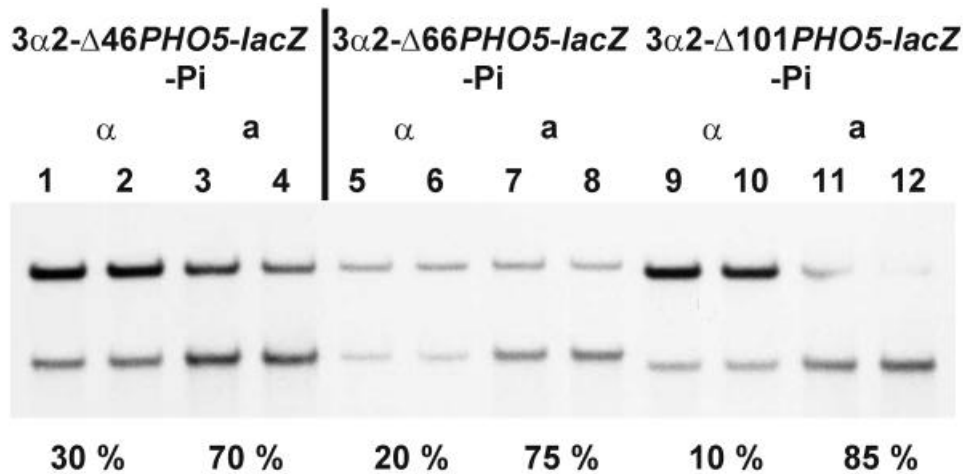
**Tabelle 4: Verschiebung des  $\alpha 2$ -Operators zur kodierenden Sequenz hin erhöht die Repression.** Bestimmt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von *PHO5-lacZ*-Reporterplasmiden mit drei  $\alpha 2$ -Operatoren und Varianten mit verkürztem *PHO5*-Promotor unter nichtinduzierenden (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen im Wildtyp-Stamm. Als Kontrolle diente der YS18a-Stamm, der keinen  $\alpha 2$ -Faktor produziert. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden.

Die schrittweise Verschiebung des  $\alpha 2$ -Operators zur kodierenden Sequenz hin verstärkt die Repression deutlich unter Niedrigphosphatbedingungen (-P<sub>i</sub>) um den Faktor 2,2 und um den Faktor 4 unter Hochphosphatbedingungen (+P<sub>i</sub>). Mit zunehmender Annäherung des Repressors an die Transkriptionsfaktorbindestellen kommt es somit zu einem kontinuierlichen Anstieg der Repression.

### 2.1.7 Die Verschiebung des $\alpha 2$ -Operators zur kodierenden Sequenz hin erhöht die Nukleosomenstabilität, verändert jedoch nicht deren Position

Die abnehmende Aktivität mit zunehmender Annäherung des Repressors an die Transkriptionsfaktorbindestellen sollte mit der Zugänglichkeit des Chromatins in der Region zwischen den beiden UAS-Elementen verglichen werden. Hier bot sich wieder die Spaltung

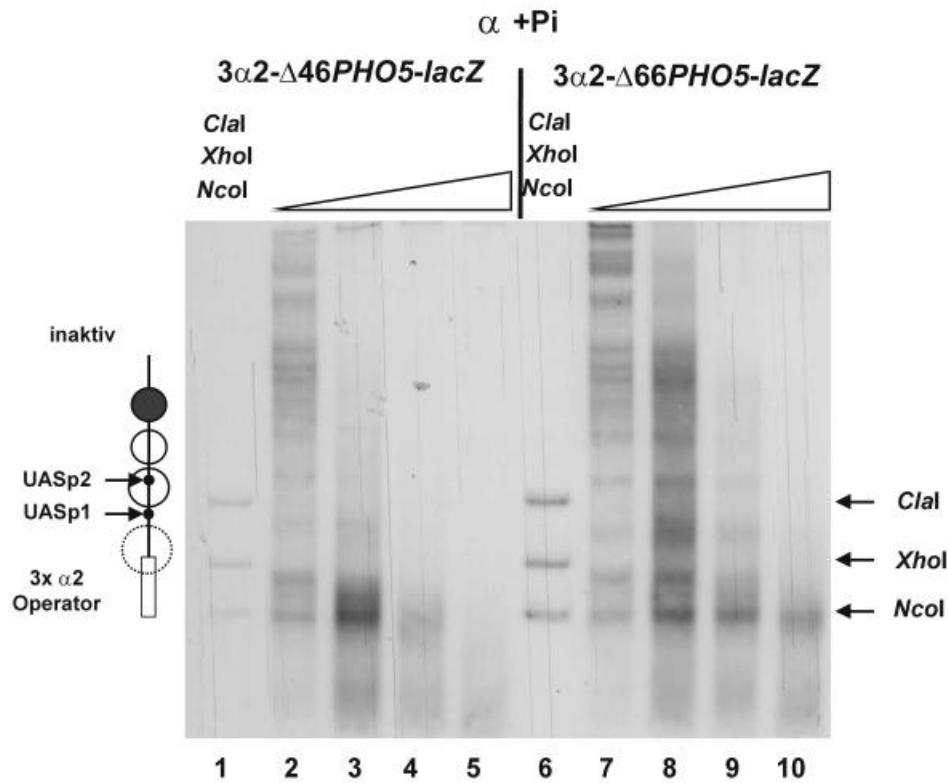
mit der Restriktionsnuklease *ClaI* an. Mit zunehmender Annäherung des  $\alpha 2$ -Operators an die Transkriptionsfaktorbindestellen kommt es unter Niedrigphosphatbedingungen zur Abnahme der Zugänglichkeit von 40 % ( $3\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*) (Abbildung 4C) auf 10 % ( $3\alpha 2$ - $\Delta 101$ *PHO5-lacZ*) (Abbildung 5A), welche in etwa der Zugänglichkeit des Promotors ohne  $\alpha 2$ -Operator im inaktiven Zustand (+ $P_i$ ) entspricht. Die ansteigende Repression spiegelt sich somit direkt in abnehmender Zugänglichkeit der *ClaI*-Stelle in Zellkernen wider, welche aus Kulturen mit niedriger Phosphatkonzentration gewonnen wurden.



**Abbildung 5A: Einfluß der eingefügten Deletionen zwischen  $3\alpha 2$  und den Pho4-Bindestellen auf die *ClaI*-Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** (A) Hergestellt wurden alle Hefezellkerne von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem  $3\alpha 2$ - $\Delta 46$ *PHO5-lacZ*-,  $3\alpha 2$ - $\Delta 66$ *PHO5-lacZ*- oder  $3\alpha 2$ - $\Delta 101$ *PHO5-lacZ*-Konstrukt, welche in einem phosphatfreien (- $P_i$ ) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 30 min bei 37°C mit 40 bzw. 160 U/ml *ClaI* gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* und *PvuII* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden pBR-Sonde hybridisiert. Aufgetragen wurden Zellkerne mit episomalem  $3\alpha 2$ - $\Delta 46$ *PHO5-lacZ* unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 1-2) oder a-Stamm (3-4), Zellkerne mit episomalem  $3\alpha 2$ - $\Delta 66$ *PHO5-lacZ* unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 5-6) oder a-Stamm (7-8), Zellkerne mit episomalem  $3\alpha 2$ - $\Delta 101$ *PHO5-lacZ* unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 9-10) oder a-Stamm (11-12). Unter den Spuren ist jeweils die relative *ClaI*-Zugänglichkeit angegeben.

Anschließende DNaseI-Analysen sollten klären, ob der  $\alpha 2$ -Repressorkomplex in der Lage ist, in diesen verkürzten Konstrukten eine veränderte Nukleosomenfolge zu induzieren. Das Ergebnis zeigte, daß das Nukleosom -2 auch unter Niedrigphosphatbedingungen zu einem gewissen Teil vorhanden ist, wobei seine Position gegenüber der Wildtyp-Position unter Hochphosphatbedingungen nicht verändert erschien. Insgesamt schienen die Nukleosomenpositionen jedoch nicht so eindeutig ersichtlich zu sein. Die Abstandsänderung schien zu

keiner Veränderung der Position der UAS-Elemente im *PHO5*-Promotor bzgl. ihrer Position im Chromatin (UASp1 internukleosomal und UASp2 intranukleosomal) geführt zu haben.



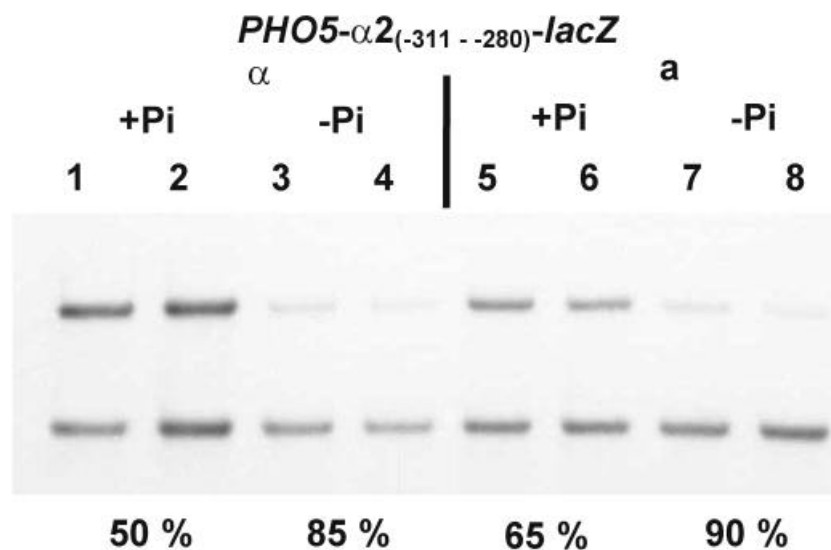
**Abbildung 5B: Einfluß der eingefügten Deletionen zwischen den 3α2-Operator- und den Pho4-Bindestellen auf die Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** (B) Einfluß der flußauf verkürzten Konstrukte des *PHO5*-Promotoren auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors. Hergestellt wurden alle Hefezellkerne von Zellen des YS18α-Stammes mit episomalem 3α2-Δ46*PHO5-lacZ*- (Spuren 2-5) oder 3α2-Δ66*PHO5-lacZ*-Konstrukt (Spuren 7-10), welche in einem phosphathaltigen (+Pi) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 und 2 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden, eine pBR-Sequenz enthaltenden Sonde hybridisiert. Die Spuren (1, 6, 9) repräsentieren eine Mischung von Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *HindIII* und *NcoI*, *XhoI*, und *Clal*.

### 2.1.8 Der Einbau eines α2-Operators zwischen die beiden UAS-Elemente führt zu einer Repression

Außerdem wurde ein Konstrukt mittels PCR geschaffen, in dem sich der α2-Operator in einer intranukleosomalen Region unmittelbar flußauf liegend des UASp2-Elements und damit zwischen beiden UAS-Elementen befindet (*PHO5-α2<sub>(-311 bis -280)</sub>-lacZ*). Messungen der β-Galaktosidase-Aktivität dieses Konstruktes zeigten eine Repression um den Faktor 2, sowohl unter Hochphosphatbedingungen als auch unter Niedrigphosphatbedingungen. Der Sequenz-

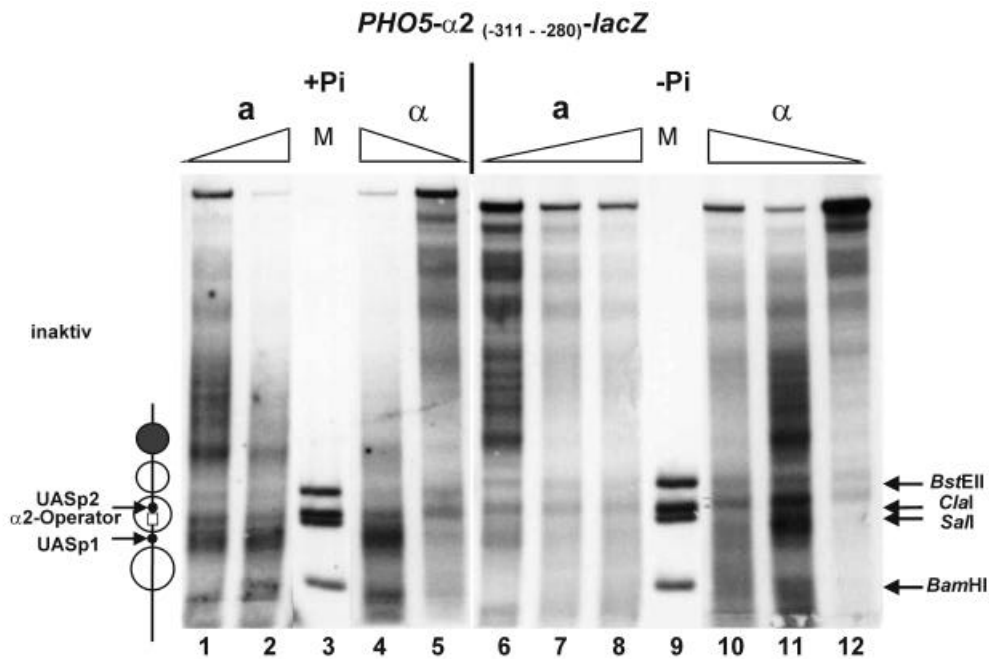
austausch allein schien die Promotoraktivität nicht besonders zu beeinflussen, wie aus Messungen im Kontrollstamm YS18a hervorgeht.

Abweichend hiervon scheint die *ClaI*-Zugänglichkeit im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied aufzuweisen, der Repression widerspiegelt. Sowohl im  $\alpha$ - als auch im a-Stamm liegt sie bei 50 bis 65 % unter Phosphatanwesenheit (+P<sub>i</sub>) und bei 85 bis 90 % unter Phosphatabwesenheit (-P<sub>i</sub>).



**Abbildung 6A: Einfluß des eingefügten  $\alpha$ 2-Operators zwischen den Pho4-Bindestellen auf die Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** (A) Alle Hefezellkerne wurden von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem *PHO5- $\alpha$ 2*<sub>(-311 bis -280)</sub>-*lacZ*-Konstrukt hergestellt, welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) oder einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 30 min bei 37°C mit 40 und 160 U/ml *ClaI* gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* und *PvuII* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden pBR-Sonde hybridisiert. Gewonnen wurden Zellkerne mit episomalem *PHO5- $\alpha$ 2*<sub>(-311 bis -280)</sub>-*lacZ* unter Hochphosphatbedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 1-2) und a-Stamm (3-4) sowie unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 5-6) und a-Stamm (7-8). Unten ist jeweils die relative *ClaI*-Zugänglichkeit angegeben.

Es scheint bereits eine erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins um die *ClaI*-Stelle unter +P<sub>i</sub> zu existieren. Dafür könnte jedoch vor allem die durch Einführen des  $\alpha$ 2-Operators veränderte Sequenz verantwortlich sein. Dieser Effekt scheint aber lokal begrenzt zu sein. Dies scheinen DNaseI-Analysen zu bestätigen (Abbildung 6B), welche die anderen Nukleosomenpositionen weitgehend unverändert zeigen.



**Abbildung 6B:** Einfluß des zwischen den Pho4-Bindestellen eingefügten  $\alpha 2$ -Operators auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors. Alle Hefezellkerne wurden von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem *PHO5*- $\alpha 2$  ( $_{-311}$  bis  $_{-280}$ )-*lacZ*-Konstrukt hergestellt, welche in einem phosphathaltigen (+Pi) oder einem phosphatfreien (-Pi) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 und 2 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden pBR-Sonde hybridisiert. Die Spuren (3 und 9) repräsentieren einen Mix von Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *HindIII* und *BamHI*, *SalI*, *ClaI*, und *BstEII*. Aufgetragen wurden Zellkerne von einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 4-5) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 10-11) sowie als Kontrolle Zellkerne von einem a-Stamm unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 1-2) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 6-8). Links befindet sich zur Orientierung das Schema des reprimierten Promotors mit  $\alpha 2$ -Operator.

### 2.1.9 Einbau einer Bindestelle für den Faktor Reb1 (Grf2) in den *PHO5*-Promotor hat keinen Effekt auf die *PHO5*-Promotoraktivität

In einer separaten Serie von Experimenten testete ich die Fähigkeit von Reb1 (Grf2), die Nukleosomenpositionen am *PHO5*-Promotor zu verändern. Von Reb1 wurde berichtet, daß es an die Konsensussequenz 5'-YNNYYACCCG-3' ((Fedor et al., 1988)) bindet, die benachbarte Regionen in einen nukleosomenfreien Zustand ((Chasman et al., 1990)) versetzen und daneben positionierte Nukleosomen initiieren kann ((Fedor et al., 1988)). Hierfür wurden die oben beschriebenen Promotorkonstrukte verwendet, welche eine Reb1-Bindesequenz flußauf liegend des *PHO5*-Promotors aufweisen, seine Promotorvarianten verfügen über einen flußauf verkürzten *PHO5*-Promotor, wie in Absatz 2.1.1 Abbildung 3 beschrieben. Reb1 hat, wenn überhaupt, nur einen sehr gering aktivierenden Effekt auf die basale *PHO5*-

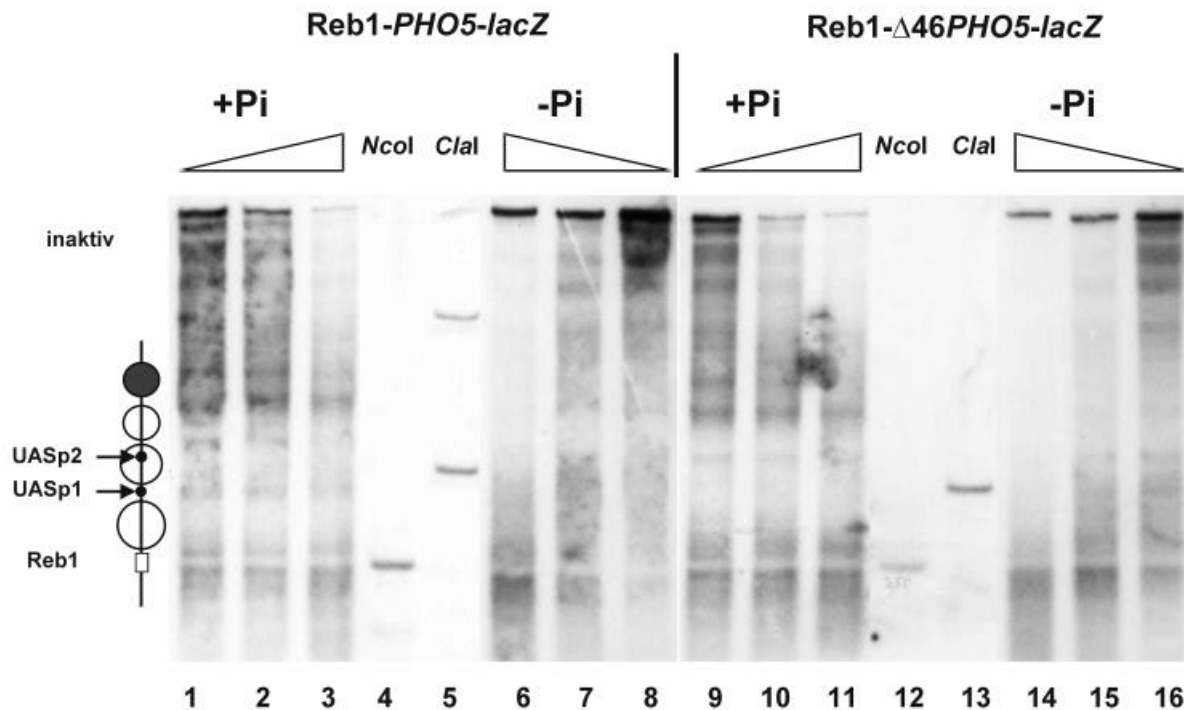
Expression unter Hochphosphatbedingungen und beeinflusst die *PHO5*-Promotoraktivität nicht unter induzierenden Bedingungen (Tabelle 5).

	YS18 $\alpha$ -Zellen	
	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>
<i>PHO5-lacZ</i>	30	650
Reb1- <i>PHO5-lacZ</i>	50	590
Reb1- $\Delta$ 46- <i>PHO5-lacZ</i>	45	630
Reb1- $\Delta$ 66- <i>PHO5-lacZ</i>	30	580

**Tabelle 5: Reb1-Bindestellen führen zu keiner Veränderung der *PHO5*-Promotoraktivität.** Bestimmt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von *PHO5-lacZ* Reporterplasmiden und Varianten mit Reb1-Bindestelle vor dem nativen bzw. verkürztem *PHO5*-Promotor unter nichtinduzierenden (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen im Wildtyp-Stamm. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden.

#### **2.1.10 Die native Chromatinstruktur des *PHO5*-Promotor wird durch Einbau einer Reb1-Bindestelle nicht betroffen**

Da das Einführen der Reb1-Bindestelle fast keine Veränderungen der Aktivität des *PHO5*-Promotors herbeiführt, stellte sich die Frage, ob die Chromatinorganisation des *PHO5*-Promotors überhaupt durch Reb1 verändert wird. Die Experimente zeigen, daß das Reb1 Protein die Nukleosomenpositionierung am *PHO5*-Promotor durch seine Bindung flußauf liegend von Nukleosom -3 nicht verändert. Durch Verschieben der Reb1-Bindestelle flußab in Richtung der UAS-Elemente wird auch hier kein Nukleosom über das UASp1-Element positioniert (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Chromatinanalyse von *PHO5*-Promotorvarianten mit flußauf liegender *Reb1*-Bindestelle.**

Alle Hefezellkerne wurden von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem *Reb1-PHO5-lacZ*- oder *Reb1-PHO5-lacZ*-Konstrukt gewonnen, welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) oder einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 und 2 U/ml DNaseI gespalten, die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden, pBR-Sequenz enthaltenden Sonde hybridisiert. Die Spuren (4, 5, 12, 13) repräsentieren einen Mix von Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *HindIII* und *NcoI* oder *ClaI*. Verwendet wurden Zellkerne von einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 1-3) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 6-8) mit episomalem *Reb1-PHO5-lacZ*, sowie unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 9-11) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 14-16) mit episomalem *Reb1- $\Delta$ PHO5-lacZ*.

Statt dessen bleibt die hypersensitive Region erhalten oder wird sogar flußauf erweitert, wenn sie die restliche DNA-Sequenz des Nukleosoms -3 einschließt. Somit ist *Reb1* an keinen Chromatin-Umordnungen im *PHO5*-Promotor beteiligt, wenn man von der Schaffung einer lokalen hypersensitiven Region im unmittelbaren Bereich seiner Bindestelle absieht. Auch sein früher im *GALI-10*-Promotor beschriebener Effekt, eine DNA-Region nukleosomenfrei zu halten und im Anschluß daran Nukleosomen zu positionieren, trifft für den *PHO5*-Promotor nicht zu.

## 2.2 Lassen sich *in vitro*-Nukleosomen auf dem *PHO5*-Promotor rekonstruieren?

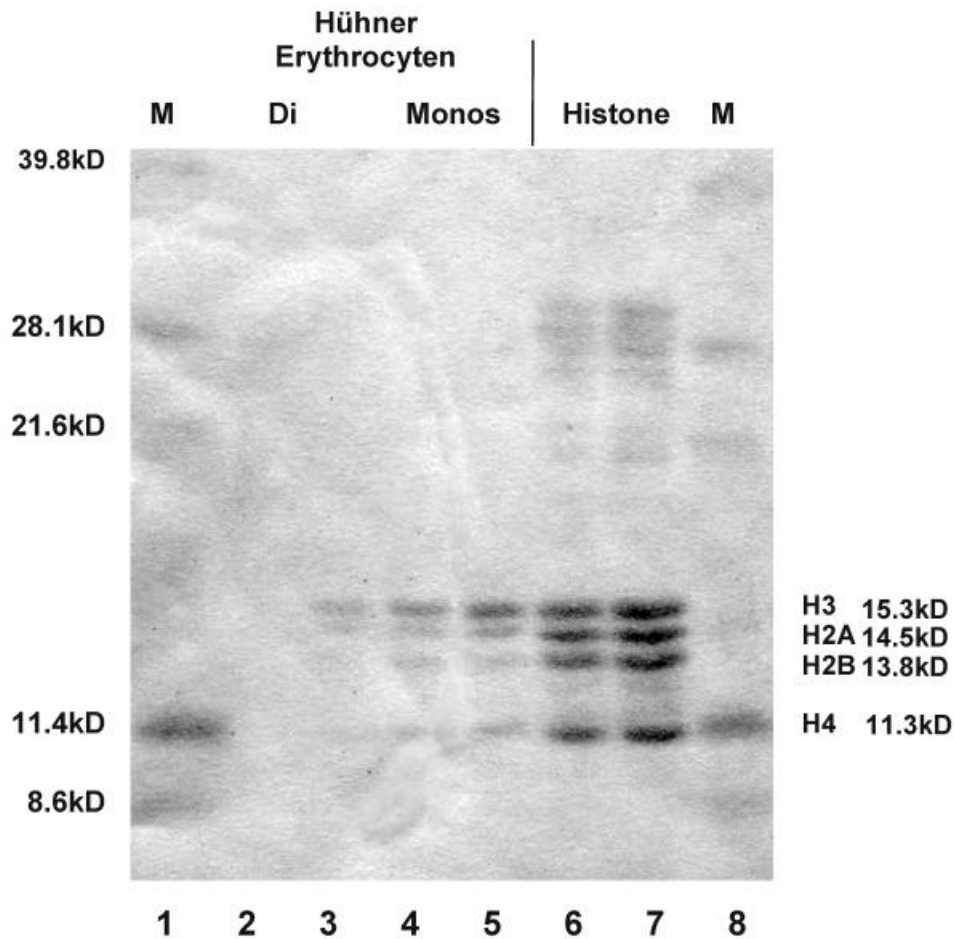
Bei der Aktivierung des *PHO5*-Promotors kommt es zur Ausbildung eines hypersensitiven Bereichs in einer Region, die sonst durch vier Nukleosomen (bezeichnet mit N-1 bis N-4) bedeckt ist. Für diese Nukleosomentransition ist der Transkriptionsfaktor Pho4 essentiell, der an die beiden UAS-Elemente UASp1 (internukleosomal zwischen N-3 und N-2) und UASp2 (intranukleosomal N-2) bindet. Um zu untersuchen, welche Rolle Nukleosomen bei der Repression des *PHO5*-Promotors spielen, sollte versucht werden, Nukleosomen *in vitro* stabil und positionsgetreu zu rekonstituieren. Dabei ging es zunächst darum, ein Nukleosom *in vitro* auf einem DNA-Fragment des *PHO5*-Promotors zu rekonstituieren, welches *in vivo* von einem Nukleosom besetzt ist und das UASp2-Element enthält. Bereits 1979 wurde von Tatchell und Holde gezeigt, daß bis zu einer Größe von 161 Bp die Position der Nukleosomen von den Enden des DNA-Fragmentes bestimmt wird. Bei großen DNA-Fragmenten wird die Neigung zur Besetzung mit Dinukleosomen beobachtet. Da zwar die Möglichkeit gegeben sein sollte, ein Nukleosom verschieden zu positionieren, jedoch nicht zwei Nukleosomen binden zu lassen, wurde ein 180 Bp-DNA-Fragment gewählt, mit dem rekonstituiert werden sollte. Die nukleosomalen Kernpartikel sollten *in vitro* mittels der Salzdialysemethode auf dieses DNA-Fragment des *PHO5*-Promotors rekonstituiert werden. Mononukleosomen gewährleisten das physiologisch korrekte DNA:Histon- und das Histon:Histon-Verhältnis (Abbildung 8), wenn weniger als 1 % der DNA aus dem zu rekonstituierten Fragment besteht; aus diesem Grund sollten Mononukleosomen als Histonquelle verwendet werden. Dazu wurde das DNA-Fragment mit  $\gamma\text{ATP}^{32}$  radioaktiv endmarkiert und in Gegenwart von 2 M NaCl mit Mononukleosomen zusammengemischt. Die Ionenstärke wurde langsam in linearer Weise auf 5-10 mM erniedrigt. Nach der Rekonstitution sollte die genaue Position und die Stabilität des rekonstituierten Nukleosoms bestimmt werden.

### 2.2.1 Präparative Isolierung von Mononukleosomen aus Hühnererythrozyten

Benötigt wurde eine große Menge an Mononukleosomen. Da frühere Studien von Linxweiler ((Linxweiler and Hörz, 1985)) an der  $\alpha$ -Satelliten-DNA zeigten, daß heterologe Histone die gleiche Nukleosomenpositionierung ergeben wie homologe, sollten diese aus Hühnerblut gewonnen werden. Aus Hühnererythrozyten, welche nur eine einzige einfache Membran – die Plasmamembran – und keine Organellen besitzen und sich in hypotischen Medien leicht lysieren lassen, sind große Mengen Chromatin zu gewinnen. Im Gegensatz zu den Erythrozyten aus Säugern ist hier noch ein Zellkern mit dem Chromatin vorhanden. Um Mono-



nukleosomen (Histonoktamer mit DNA, ohne Linkerhistone) zu isolieren, wurde nach dem osmotischen Aufschluß der Zellen das Chromatin bei 150 mM NaCl mit Mikrokokkus-Nuklease in Nukleosomen gespalten.

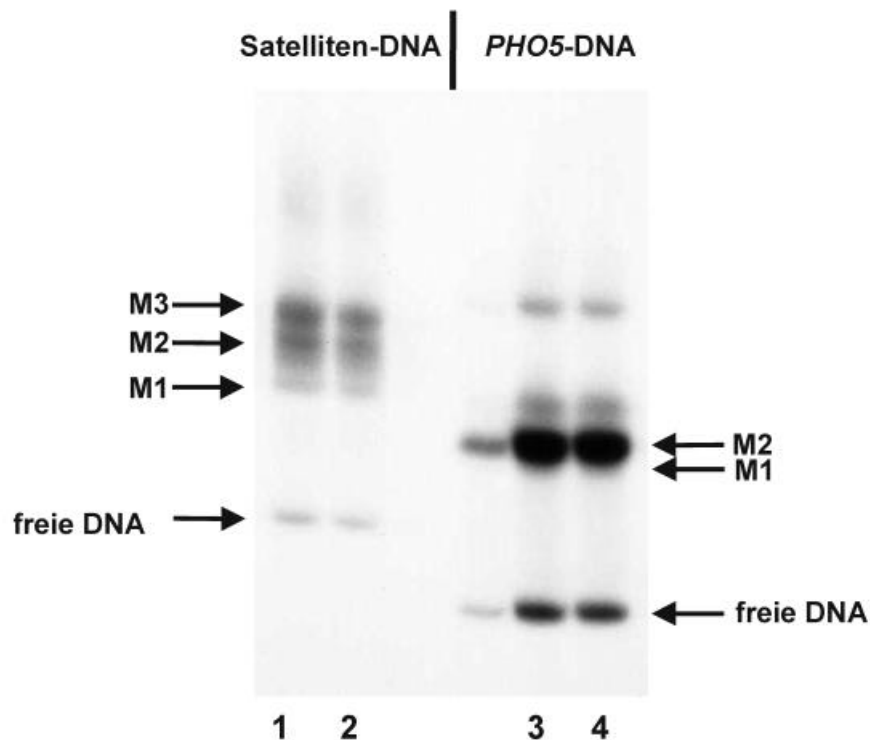


**Abbildung 8: Histonzusammensetzung der Mono- und Dinucleosomen aus Hühnererythrozyten.** Nach Auftrennung der Hühnererythrozyten in einem Dichtegradienten und Analyse der Fraktionen auf einem Agarosegel wurden die Dinucleosomen (Spuren 2 und 3) und Mononucleosomen (Spuren 4 und 5) auf einem 18%igen SDS-Polyacrylamidgel in ihre Komponenten aufgetrennt. Als Vergleich diente ein 1:1:1:1-Gemisch der von Boehringer erworbenen Histone H3 (15,3 kDa), H2A (14,8 kDa), H2B (14,3 kDa) und H4 (11,5 kDa) aus Kalbsthymus (siehe Spuren 6 und 7) sowie ein Molekulargewichtstandard (Spuren 1 und 8).

Die Mononucleosomen- und Dinucleosomenpartikel wurden anschließend im Succhrose-dichtegradienten aufgereinigt. Der Typ (Mono, Di, usw.) und die Konzentration ließ sich mittels gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel gegenüber einer standardisierten Auftrag von Mono-, Di- usw. Nucleosomen bestimmen (nicht gezeigt).

### 2.2.2 Die Rekonstitution eines Mononukleosoms auf einem 180 Bp-DNA-Fragment des *PHO5*-Promotors, welches das UASp2-Element enthält, ergibt mehrere unterschiedliche Nukleosomenkomplexe

Die gewonnenen nukleosomalen Kernpartikel mit dem Fragment des *PHO5*-Promotors wurden anschließend genauer untersucht. Als besonders günstig erwies sich die Methode, das rekonstituierte Material gelelektrophoretisch unter nichtdissoziierenden Bedingungen aufzutrennen, da eine hohe Auflösung im mononukleosomalen Größenbereich erzielt werden konnte. Bereits relativ geringe Schwankungen in der Histonstöchiometrie und dem Histon/DNA-Verhältnis beeinflussen die Zusammensetzung des rekonstituierten Materials; deshalb wurde nur eine geringe Menge radioaktiv markierter DNA mit nativen Mononukleosomen, welche keine Linkerhistone mehr enthielten, gemischt und mittels Salzgradientendialyse rekonstituiert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich das durch viele Versuche gut untersuchte 234 Bp- $\alpha$ -Satelliten-DNA-Fragment für die Rekonstitution verwendet.



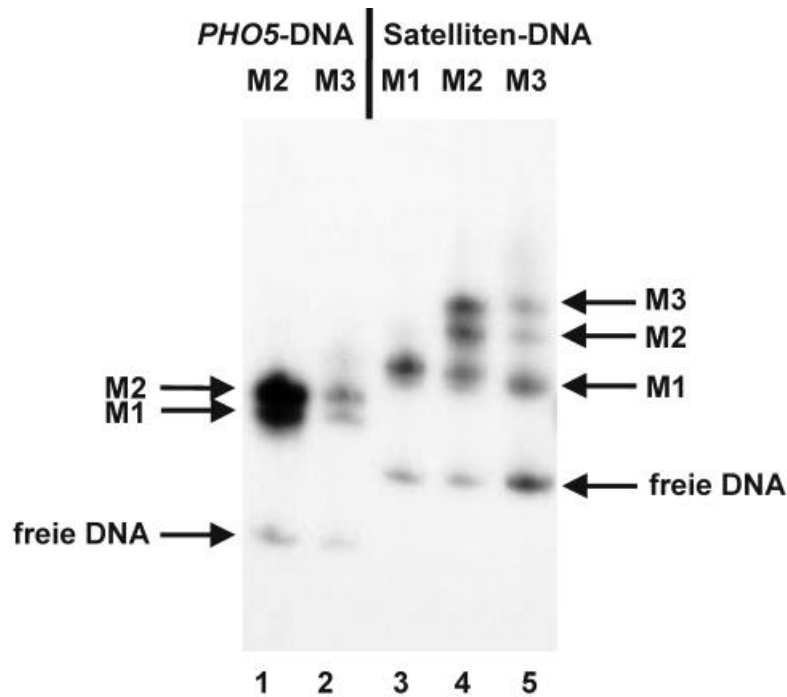
**Abbildung 9: Analyse der Nukleosomenrekonstitution auf der  $\alpha$ -Satelliten-DNA und der *PHO5*-Promotor-DNA.** Rekonstituiertes Material wurde auf einen 4%igen PAG aufgetrennt. Die linken Spuren zeigen mit der  $\alpha$ -Satelliten-DNA rekonstituiertes Material, rechts befindet sich das mit der *PHO5*-Promotor-DNA rekonstituierte Material. Die freie DNA erscheint jeweils im unteren Teil des Gels. Mit M1 ist die Bande bezeichnet, die das Nukleosom endständig trägt; bei M2 handelt es sich um interne Nukleosomenpositionen.

Das rekonstituierte Material wurde in der Gelelektrophorese bei niedriger Ionenstärke analysiert (Abbildung 9). Freie DNA befindet sich im unteren Teil des Gels, während die rekonstituierten Partikel eine reduzierte Mobilität zeigen und daher im oberen Teil zu finden sind. Gleichzeitig trennt sich das rekonstituierte Material im Fall der verwendeten  $\alpha$ -Satelliten-DNA in drei Banden auf (Partikel M1, M2 und M3). Längere DNA-Fragmente lassen sich besser rekonstituieren, das Mengenverhältnis der Banden ist größenabhängig und verschiebt sich bei längeren DNA-Fragmenten nach M3. Mittels ExonukleaseIII aus *E. coli* konnte bei der 5' markierten  $\alpha$ -Satelliten-DNA, welche mit Mononukleosomen rekonstituiert wurde, die Lage des Histonoktamers auf dem DNA-Fragment bestimmt werden. Beim M1-Partikel findet man das Histonoktamer endständig, bei M2 liegen interne Position des Histonoktamers (Population von Histonoktameren in definierten Positionen) vor, während bei M3 eine vollständige Besetzung der DNA mit Histonenproteinen vorliegt. Bei der Rekonstitution von der *PHO5*-Promotor-DNA erhält man überwiegend den M2-Partikel, neben etwa 10 % des M1-Partikels und äußerst wenig vom M3-Partikel.

### **2.2.3 Die erhaltenen Nukleosomenkomplexe sind nicht sehr stabil, da ein dynamisches Gleichgewicht vorherrscht**

Die – wie im oberen Abschnitt beschrieben – erhalten rekonstituierten Partikel wurden anschließend aus dem Gel isoliert. Dazu wurden die entsprechenden Gelstücke ausgeschnitten, durch ein feinmaschiges Nylonnetz zentrifugiert und mit zweifachen Volumen an Elutionspuffer versetzt (siehe Material und Methoden).

Nach der Elution wurden Aliquots der isolierten Partikel nochmals auf einem Nukleoprotein-gel aufgetrennt und ein Autoradiogramm angefertigt. Das Autoradiogramm zeigte bei den einzelnen Fraktionen M1, M2 und M3 wiederum eine Aufteilung auf die Partikel M1, M2 und M3 und freie DNA (siehe Abbildung 10). Offenbar stellt sich zwischen den einzelnen Partikeln relativ schnell ein Gleichgewicht ein.

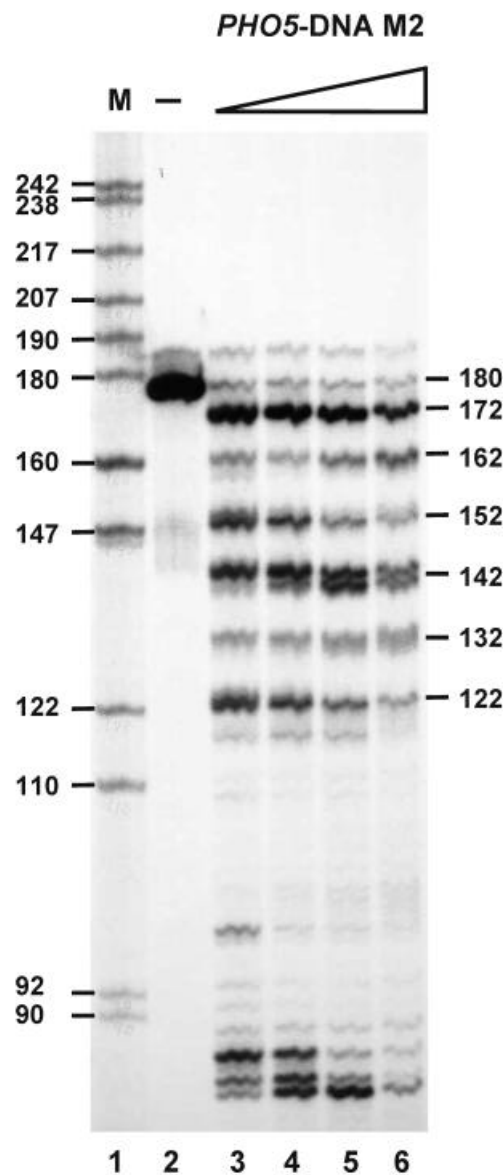


**Abbildung 10: Stabilität der isolierten Nucleosomenpartikel mit *PHO5*-Promotor-DNA und  $\alpha$ -Satelliten-DNA.** Die aus dem Nucleoproteingel durch Diffusion isolierten Nucleosomen wurden wiederum auf ein Nucleoproteingel aufgetrennt. Auf den ersten beiden Spuren wurden die Partikel M2 (Spur 1) und M3 (Spur 2) von der *PHO5*-Promotor-DNA aufgetragen, danach wurde M1 (Spur 3), M2 (Spur 4) und M3 (Spur 5) von der  $\alpha$ -Satelliten-DNA aufgetragen. Die freie DNA erscheint jeweils unten im Gel. Mit M1 ist die Bande bezeichnet, die das Nucleosom endständig trägt, bei M2 handelt es sich um interne Position, und M3 weist völlige Besetzung der DNA mit Histonproteinen auf.

#### 2.2.4 Nachweis einzelner Nucleosomenpositionen

Es schien wenig aussichtsreich, die genaue Position des nucleosomalen Partikels M2 von der *PHO5*-Promotor-DNA zu bestimmen, da bereits bei der Elution die Gleichgewichtseinstellung zwischen verschiedenen Partikeln stattfand. Um jedoch trotzdem die genaue Basenpaarposition des nucleosomalen Partikels M2 auf der *PHO5*-Promotor-DNA bestimmen zu können, wurde eine andere Strategie verwendet. Das rekonstituierte Material, das in diesem Fall nur an einem Ende markiert wurde, wurde bereits vor der Auftrennung auf dem Nucleoproteingel partiell mit DNaseI gespalten. Da die DNaseI-Spaltung hauptsächlich nur zu Einzelstrangbrüchen führt, war die Nucleosomenstruktur dieses mit DNaseI behandelten Materials noch erhalten. Nach seiner Auftrennung auf einem Nucleoproteingel wurde das M2-Partikel aus dem Gel isoliert, die Proteine mit Proteinase K zerstört und die DNA auf einem Acrylamidgel aufgetrennt (siehe Abbildung 11). Das Muster der DNaseI-Spaltung zeigt eine Hauptbande bei etwa 175 Bp mit einer anschließenden 10 Bp-Leiter, wie sie typischer-

weise für nukleosomale DNA zu finden ist. Dies läßt darauf schließen, daß feste Nukleosomenpositionen im M2 eingenommen werden, welche lateral um jeweils eine DNA-Windung (10 Bp) zueinander verschoben sind. Auch ExonukleaseIII-Experimente scheinen diese Positionen zu bestätigen (nicht gezeigt). *In vivo* findet sich eine Position, die einer der *in vitro*-Nukleosomenpositionen entspricht und gegenüber der Hauptposition um 10 Bp verschoben ist. Wegen der Heterogenität und mangelnden Stabilität wurde darauf verzichtet, die Bindung von Pho4 an das rekonstituierte Material zu untersuchen.



**Abbildung 11: Analyse des M2-Partikels von der *PHO5*-Promotor-DNA mit DNaseI.** Am linken Rand (Spur 1) befindet sich ein zur Größenorientierung mit *HpaII* gespaltenen pUC20BM-Vektor. Auf Spur 2 ist die *PHO5*-Promotor-DNA aufgetragen. Auf den folgenden Spuren ist nukleosomal rekonstituiertes Material der *PHO5*-Promotor-DNA nach Spaltung mit steigenden Konzentrationen an DNaseI auf einem Nukleoproteingel aufgetrennt und nach der Isolierung des M2-Partikels auf dieses Sequenzgel aufgetragen worden.

### 2.2.5 Schwierigkeit der Detektion der Nukleosomendisruption durch Transkriptionsfaktoren

Es konnte ein Nukleosomenkomplex auf einem endmarkierten 180 Bp-DNA-Fragment der Region des Nukleosoms -2 mit dem UASp2-Element rekonstituiert werden. An dieses UASp2-Element kann *in vivo* unter aktivierenden Bedingungen ( $-P_i$ ) der Transkriptionsfaktor Pho4 ein bHL-DNA-bindendes Protein binden; mittels seiner sauren Aktivator-domäne sorgt er für eine Chromatinmodifizierung, die zu einem hypersensitiven *PHO5*-Promotorbereich führt. Gab man im Versuch ein rekombinantes Pho4-Protein zu dem 180 Bp rekonstituierten Material, so nahm die Menge der Nukleosomenfraktion zwar leicht ab, aber es konnten keine neuen Komplexe – bestehend aus einem Nukleosom mit Pho4 oder freie DNA mit Pho4 – beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies konnte viele Ursachen haben, von Schwierigkeiten bei der Gleichgewichtseinstellungen bis hin zur exakten Wahl der Reaktionsbedingungen. Wie sich später herausstellte, waren die Bindebedingungen des Pho4-Proteins an DNA entscheidend, jedoch bisher noch nicht näher untersucht worden. Deshalb begann ich mich näher mit der Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA zu beschäftigen.

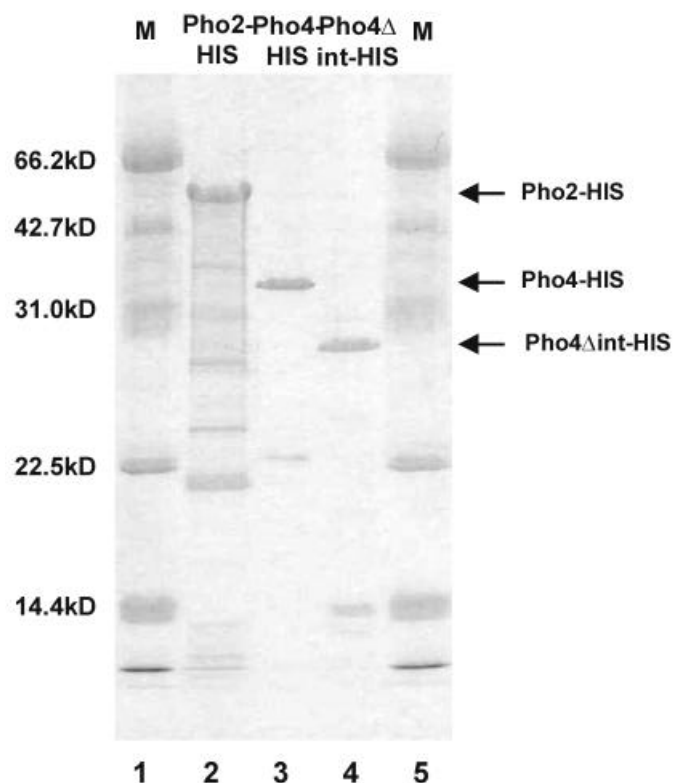
### 2.3 Die Rolle der kooperativen Wechselwirkungen von Transkriptionsfaktoren am *PHO5*-Promotor

Deletionsanalysen des *PHO5*-Promotors brachten zwei regulatorische Elemente, UASp1 und UASp2, hervor ((Rudolph and Hinnen, 1987)), an welche Pho4 – wie *in vitro* gezeigt – bindet ((Vogel et al., 1989)). *In vivo*-Footprintexperimente bestätigten, daß Pho4 an beiden Stellen unter Phosphathungerbedingungen bindet, jedoch nicht unter Hochphosphatbedingungen ((Venter et al., 1994)). Im Kontrast zu dem existierenden klaren Bild von Pho4 war die Rolle von Pho2, dem anderen Aktivator der *PHO5*-Regulation, weitaus schwieriger zu umschreiben. Für Pho2 wurde bisher gezeigt, daß es sich um ein Homöodomänenprotein handelt, das eine Reihe verschiedener Gene reguliert. Im *PHO5*-Promotor war durch *in vitro*-Footprints das Vorhandensein einer einzelnen Pho2-Bindestelle zwischen den zwei Pho4-Bindestellen gezeigt worden ((Vogel et al., 1989)). Die Rolle von Pho2 bei der *PHO5*-Regulation schien jedoch verwunderlich, da eine Deletion dieser Pho2-DNA-Bindestelle die *PHO5*-Promotoraktivität nicht signifikant beeinflusste ((Rudolph and Hinnen, 1987)), jedoch eine Zerstörung des Pho2-Proteins zu einem inaktiven *PHO5*-Promotor bewirkte. Daher sollte näher untersucht werden, auf welchen Prinzipien das Zusammenspiel dieser zwei Transkriptionsfaktoren

beruht und wie es zu Chromatin-Umordnungen kommt, was die Voraussetzung für die Genaktivierung ist.

### 2.3.1 Bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter Transkriptionsfaktoren über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Zunächst sollten die beiden Transkriptionsfaktoren Pho4 und Pho2 in ihrer Wildtyp-Form sowie eine Mutante, auf die später genauer eingegangen wird, in ausreichender Menge und möglichst rein und funktionell zur Verfügung stehen. Deshalb beschloß ich, beide Proteine in *E. coli* zu exprimieren. Um sie besser von nativen *E. coli*-Proteinen trennen zu können, wurden ihre Gene in einen Expressionsvektor (pET) kloniert, der sechs Histidine C-terminal an das Protein anfügt. Proteine mit einem solchen Hexa-Histidin-Anhang lassen sich an ein Ni<sup>2+</sup> enthaltendes Säulenmaterial komplexieren und durch Imidazol wieder eluieren. Sie sind damit leicht von anderen Proteinen abzutrennen und zu reinigen (siehe Material und Methoden).



**Abbildung 12: SDS-PAGE-Analyse der rekombinanten HIS-Proteine.** Analyse auf Reinheit der Hexa-HIS-Proteine Pho2 ~57kD (Spur 2), Pho4 ~35kD (Spur 3) und Pho4 $\Delta$ int ~31kD (Spur 4) auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mittels Anfärbens mit Coomasis Blue sichtbar gemacht. Zum Größen- und Mengenvergleich befindet sich auf den Spuren 1 und 5 je ein  $\mu$ g der Proteine Rinderserumalbumin

(66,2 kD), Ovalalbumin (42,7 kD), Carboanhydrase (31,0 kD), Sojabohnentrypsininhibitor (22,5 kD) und  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kD) (SDS-PAGE-Molekulargewichtsmarker von USB). Bei den mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Banden handelt es sich um das proteolytische Abbauprodukt des Pho4-Proteins, wie durch Westernblot bestätigt (nicht gezeigt bzw. siehe Abbildung 16).

Im weiteren wurden in gleicher Weise auch Derivate des Pho4-Proteins – wie das Pho4 $\Delta$ int, dem die interne Pho2-Interaktionsdomäne fehlt, und andere verkürzte Pho4-Proteine – gewonnen. Da in *E. coli* keine Phosphorylierung der Proteine stattfindet, durch die Pho4 *in vivo* inaktiviert werden kann, wurde erwartet, native funktionelle Proteine zu erhalten. In Abbildung 12 sieht man eine SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Pho2-HIS-, Pho4-HIS- und Pho4 $\Delta$ int-HIS-Proteine. Das Pho4-HIS-Protein (312AA) wandert gemessen an seiner Größe deutlich langsamer als erwartet, was wohl auf eine interne positive Ladungsanhäufung im Protein zurückzuführen ist (Brendel and Karlin, 1989; (Legrain et al., 1986)).

Die Zusatzbanden beim Pho4-HIS und Pho4 $\Delta$ int-HIS zeigen das proteolytische Abbauprodukt der Proteine (Spaltung etwa 70 Bp vom Aminoterminus), das bei der Proteinisolierung entstand und sich später als sehr hilfreich bei der Identifizierung der Proteine in höheren Komplexen darstellte.

### **2.3.2 *In vitro*-Untersuchungen der DNA-Bindung des Homöodomänenproteins Pho2 und des basisch-Helix-Loop-Helix Proteins Pho4 am PHO5-Promotor**

Es sollte *in vitro* untersucht werden, an welche Elemente die Transkriptionsfaktoren Pho4 ein basisch-Helix-Loop-Helix(bHLH) Protein und Pho2 ein Homöodomänenprotein binden, welche Affinitäten diese Elemente zu den Proteinen aufweisen und ob Wechselwirkungen zwischen den an diesen Elementen bindenden Proteinen bestehen, die zu kooperativen Effekten führen können.

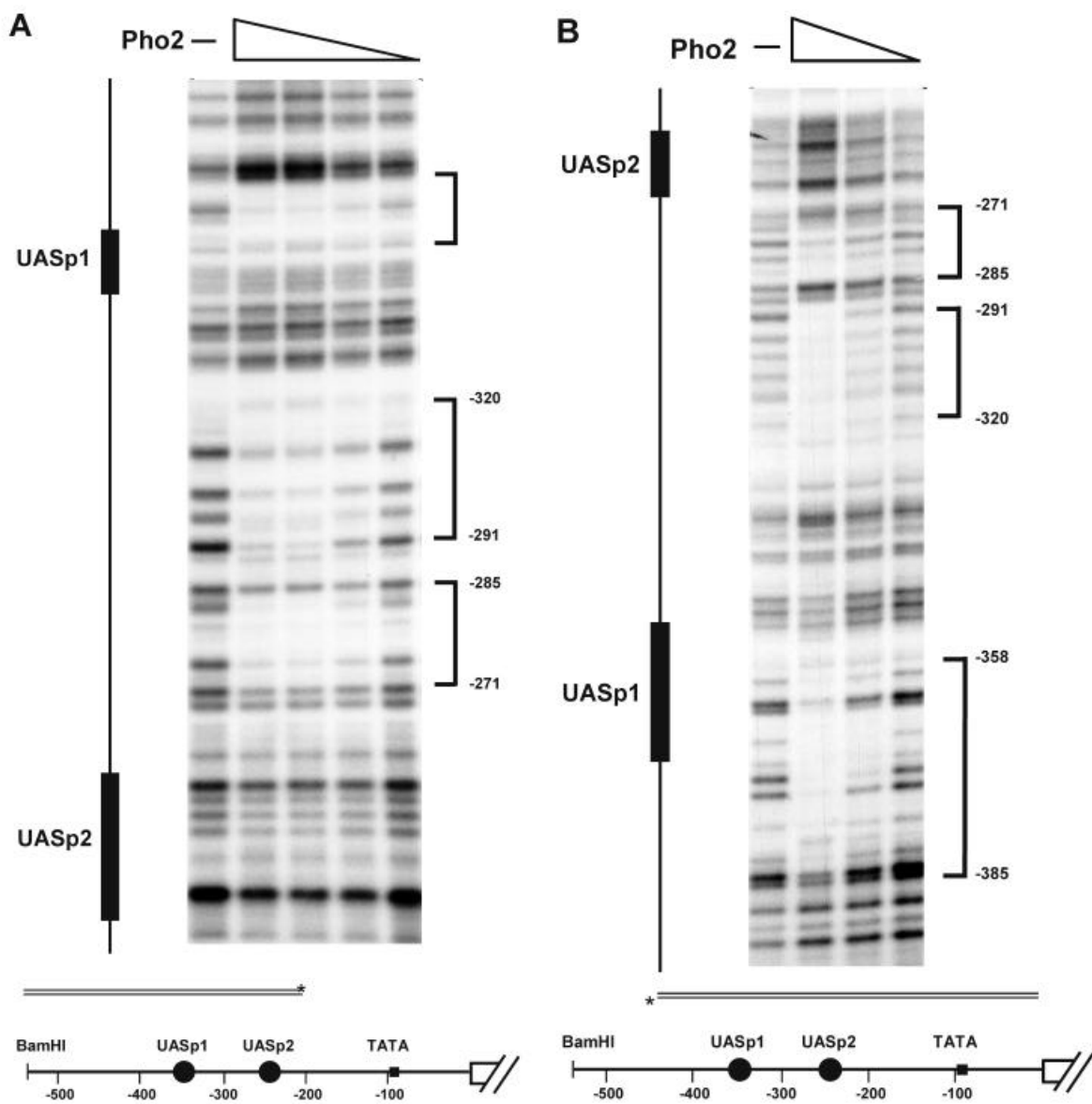
### **2.3.3 Am PHO5-Promotor befinden sich mehrere Pho2-Bindestellen**

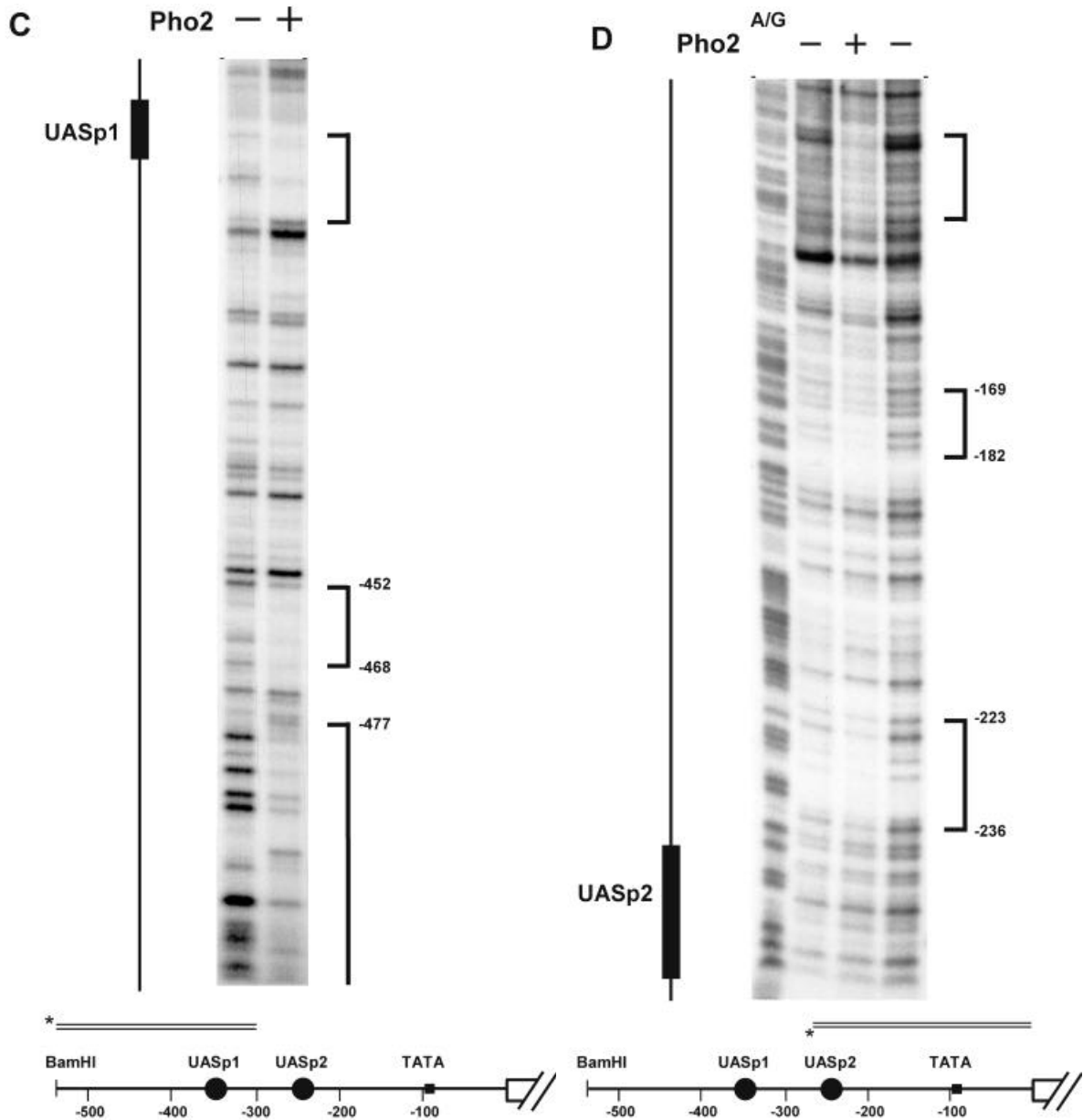
Um nach weiteren Pho2-Zielen im *PHO5*-Promotor zu suchen, wurde Pho2 verwendet, das ebenfalls über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt wurde. DNA-Fragmente, welche die beiden Pho4-Bindestellen UASp1 und UASp2 enthalten, wurden mittels *in vitro*-DNaseI-Footprints von Barbaric auf Pho2-Bindung untersucht. Wie in Abbildung 13 gezeigt, erkennt man einige geschützte Regionen auf beiden, den oberen und den unteren Strang in Anwesenheit von Pho2. Zwei Footprints, getrennt durch eine kurze ungeschützte Region, wurden zwischen UASp1 und UASp2 von -271 bis -285 und von -291 bis -320 gefunden



(Abbildung 13A). Diese Region enthielt die früher entdeckte Pho2-DNA-Bindestelle (-277 bis -296) ((Vogel et al., 1989)).

Zusätzlich zu diesen zwei Regionen beobachtete man einen Pho2-Schutz über eine Sequenz von Position -358 bis -385 (Abbildung 13B), die partiell mit dem UASp1 überlappt. Eine stufenweise Verringerung der Pho2-Konzentration resultierte im gleichzeitigen Verlust des Pho2-Schutzes an allen drei Regionen. Dies deutete etwa ähnliche Affinitäten von Pho2 für diese Bindestellen an (Abbildung 13A und B). Ein Pho2-Schutz (und Verstärkung) wird auch flußauf von UASp1 sowie flußab liegend von UASp2 beobachtet. Um diese Stellen präziser zu bestimmen, wurden passende DNA-Fragmente untersucht.

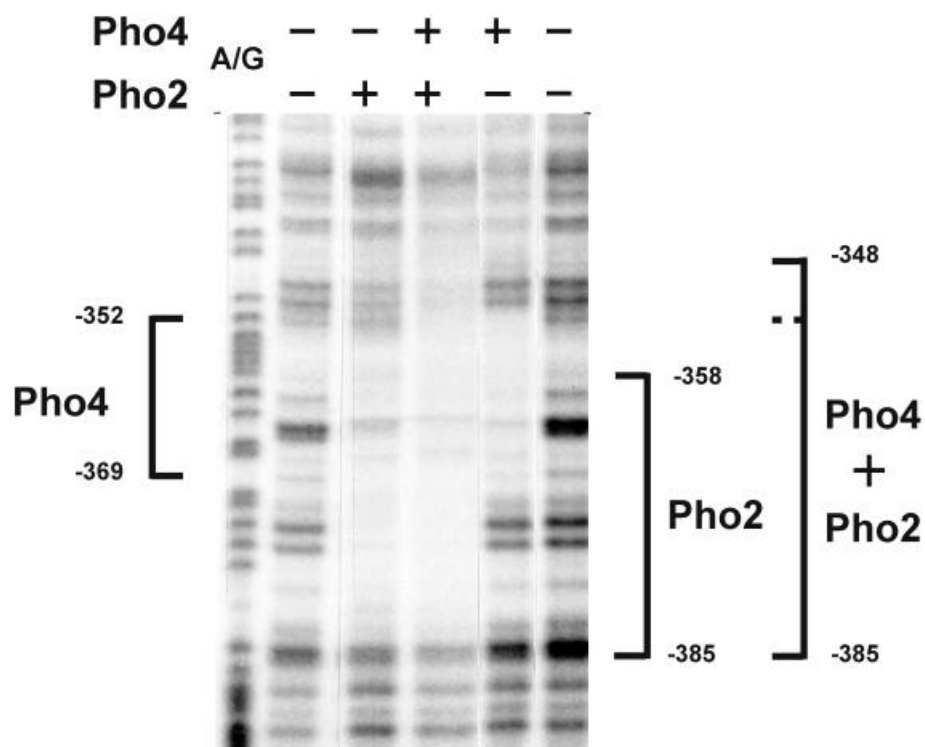




**Abbildung 13: DNaseI-Footprintanalyse des *PHO5*-Promotors mit Pho2.** Die DNaseI-Footprints wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der obere Strang eines *SfuI*(-206)-*Bam*HI(-542)-Fragments wurde an der *SfuI*-Stelle markiert (A), der untere Strang eines *Bsa*HI(-444)-*Bam*HI(+9)Fragments an der *Bsa*HI-Stelle (B), der obere Strang eines *Bam*HI(-542)-*Eco*RI(-324)-Fragments an der *Bam*HI-Stelle (C) und der untere Strang eines *Hind*III(-287)-*Bam*HI(+9)-Fragments an der *Hind*III-Stelle. Alle Fragmente stammen von *PHO5-lacZ*-Derivaten ab (siehe Material und Methoden). Die Fragmente sind schematisch relativ zum gesamten Promotor jeweils unten eingezeichnet. Die durch Pho2 geschützten Regionen sind am rechten Rand markiert. In (C) ist eine zusätzliche Verstärkung bzw. ein zusätzlicher Schutz durch DNaseI-Spaltstellen nicht in die Abbildung eingezeichnet. Die -291- bis -320- und die -358- bis -385-Regionen scheinen konsistent mit zwei benachbarten oder teilweise überlappenden Pho2-Bindestellen zu sein. Ein partielles Purin-spezifisches Abbaumuster auf der linken Seite dient in (D) zur besseren Orientierung.

Wie in Abbildung 13C gezeigt, enthält die Region flüßauf liegend von UASp1 zusätzlich zu der partiell UASp1 überlappenden mehrere durch Pho2 geschützte, eng benachbarte Stellen. Zwei Stellen wurden flüßab liegend von UASp2 an Position -223 bis -236 und -169 bis -182 gefunden und eine weitere geschützte Region um -110 (Abbildung 13D). Wie in Abbildung 22 zusammengefaßt, kann Pho2 mit verschiedenen Affinitäten (siehe unten) an multiple Stellen zwischen der TATA-Box und der flüßauf liegenden *Bam*HI-Stelle binden. Eine der starken Pho2-Bindestellen überlappt partiell die früher entdeckte Pho4-Bindestelle am UASp1, was mit einem Bericht übereinstimmt, daß aus einem Hefeextrakt gewonnenes Pho2 ein Oligonukleotid binden kann, das die UASp1 Sequenz enthält ((Parent et al., 1994)). Zusätzlich gibt es zwei Pho2-Bindestellen, die UASp2 flankieren. Es war hierbei von Interesse, zu bestimmen, ob Pho4 und Pho2 gleichzeitig sowohl an UASp1 als auch an UASp2 binden können, und ob die Bindung von einem der Proteine die Bindung des anderen beeinflußt.

### 2.3.4 Pho2 und Pho4 binden kooperativ an ihren überlappenden Bindestellen im UASp1-Element

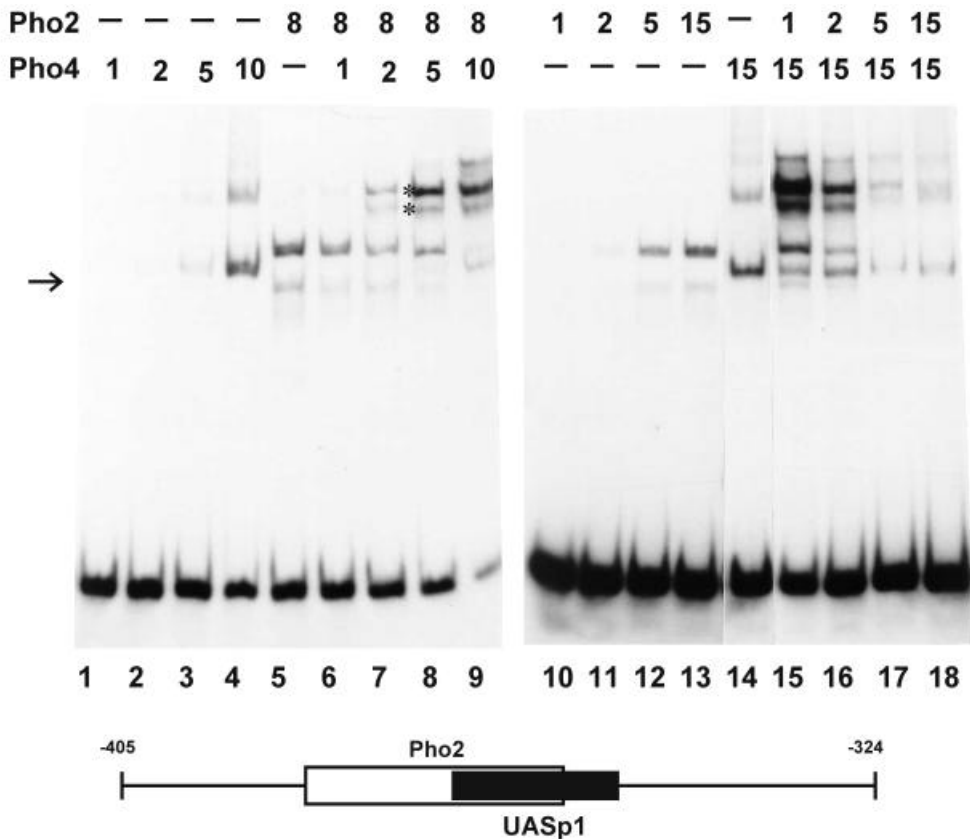


**Abbildung 14: Pho2 und Pho4 können gleichzeitig an überlappenden Stellen am UASp1 binden.** DNaseI-Footprints wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der untere Strang eines *Bsa*HI-(-444)-*Bam*HI-(+9)-Fragments wurde an der *Bsa*HI-Stelle markiert. Pho4 und Pho2 wurden, wie oben angezeigt,

einzelnen oder zusammen zugefügt. Ein partielles Purin-spezifisches Abbaumuster auf der linken Seite dient zur besseren Orientierung. Die geschützten Regionen sind am rechten Rand eingetragen.

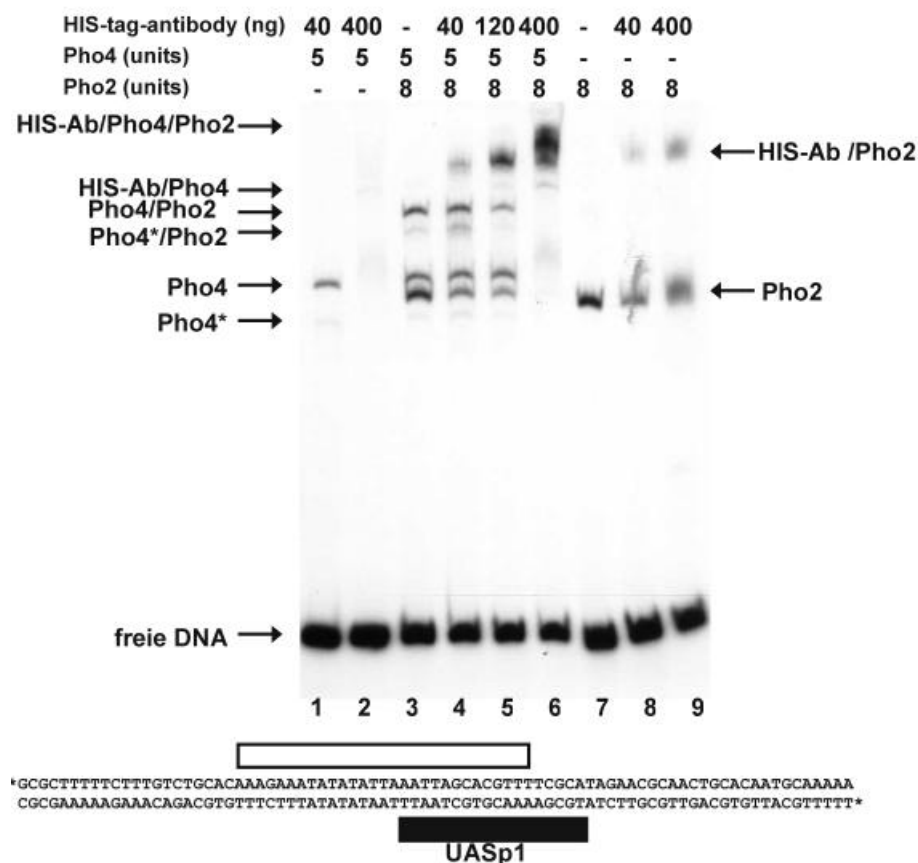
Barbaric untersuchte die Bindung von Pho2 und Pho4 an ein DNA-Fragment, welches das UASp1 enthält (Abbildung 14). Die zwei Proteine schienen fähig zu sein, gleichzeitig an UASp1 zu binden, obwohl ihre individuellen Footprints signifikant miteinander überlappen. Dabei sind 11 von 19 Nukleotiden, welche durch Pho4 am unteren Strang geschützt sind, ebenfalls durch Pho2 geschützt. Der geschützte Bereich, der bei Anwesenheit beider Proteine gefunden wird, ist größer als die Summe der individuellen Bereiche.

Die Möglichkeit einer kooperativen DNA-Bindung durch Pho2 und Pho4 wurde mittels Gelretardationsexperimenten untersucht. Ein mittels PCR erzeugtes DNA-Fragment mit UASp1 und der überlappenden Pho2-Bindestelle wurde mit steigenden Mengen von Pho4 in Abwesenheit oder Anwesenheit konstanter Mengen des Pho2-Proteins inkubiert (Abbildung 15 Spuren 1-9). Parallel dazu wurde die Menge von Pho2 in Anwesenheit und Abwesenheit konstanter Pho4-Mengen variiert (Spuren 9-18). Das Hinzufügen von Pho4 und Pho2 gemeinsam zu der DNA läßt einen langsamer wandernden Protein-DNA-Komplex entstehen (Spuren 6-9 und 15-18).



**Abbildung 15: Kooperative DNA-Bindung von Pho2 und Pho4 am UASp1.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Verwendet wurde – wie schematisch oben gezeigt – ein markiertes 81 Bp-PCR-erzeugtes Fragment (-324 bis -405), das UASp1 und die überlappende Pho2-Bindestelle(n) beinhaltend. Pho4 und Pho2 wurden, wie oben angezeigt, einzeln oder zusammen zugefügt. Die Menge des zugefügten Proteins zu einem Reaktionsansatz ist in imaginären Einheiten angegeben (siehe Material und Methoden). Der höher mobile Protein-DNA-Komplex, den man beobachtet, wenn Pho4 allein zugegeben wird, repräsentiert an DNA gebundenes, proteolytisch abgebautes Pho4-Protein (durch einen Pfeil markiert). Durch Sternchen gekennzeichnet ist die Position der ternären Komplexe, bestehend aus entweder vollständigen oder degradierten Produkten des Pho4-Proteins.

Da die Footprintdaten zeigen, daß beide Proteine an diesem DNA-Fragment gleichzeitig binden können (Abbildung 14), schlossen wir, daß der Niedrigmobilitätskomplex einen ternären Pho2-Pho4-DNA-Komplex repräsentiert. Alle DNA-Protein-Komplexe können mit einem HIS-tag-Antikörper supershiftet werden (Abbildung 16), welches zeigt, daß dieser Komplex nur aus an DNA gebundenen Pho2 und/oder Pho4 besteht.



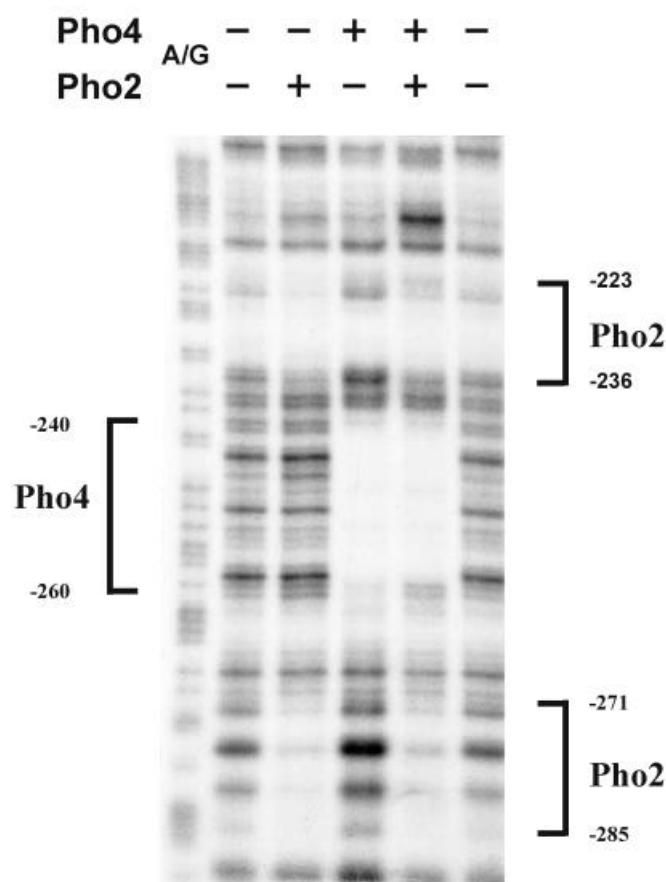
**Abbildung 16: Supershift mit HIS-tag-Antikörpern.** Die experimentellen Bedingungen entsprechen denen von Abbildung 14. Ein 81 Bp-PCR-erzeugtes Fragment (-324 bis -405 Bp) mit UASp1 und der überlappenden Pho2-Bindestelle(n) wurde für die Bindereaktion benutzt. Die HIS-tag-Antikörper wurden zusammen mit den Pho4/Pho2-Proteinen 5 min bei RT im Bindepuffer vorinkubiert. Das 81 Bp-endmarkierte DNA-Fragment wurde zusammen mit unspezifischer Kompetitor-DNA (poly dI-dC) zu dem Reaktionsansatz gegeben und

weitere 10 min bei RT inkubiert und einer PAGE-Analyse unterzogen. Das Muster, das mit Pho4 und DNA in Abwesenheit von HIS-tag-Antikörpern beobachtet wird, entspricht dem von Spur 1. Bei Pho4\* handelt es sich um das proteolytische Abbauprodukt von Pho4, wie bereits in Abildung 15 beschrieben.

Der Vergleich der Pho4-Bindung in Abwesenheit (Spuren 1-4) und Anwesenheit (Spuren 6-9) von Pho2 deutet darauf hin, daß die auftretende Affinität von Pho4 für dieses DNA-Fragment in Anwesenheit von Pho2 ansteigt. Dies kann auch in den Spuren 6-9 beobachtet werden, wo ein Anstieg der Disproportionalität in der Menge vom ternären relativ zum binären Komplex stattfindet, der nur Pho4 allein enthält. In ähnlicher Weise stimuliert umgekehrt die Zugabe von Pho4 die Bindung von Pho2 (vergleiche Spuren 10-13 mit Spuren 15-18).

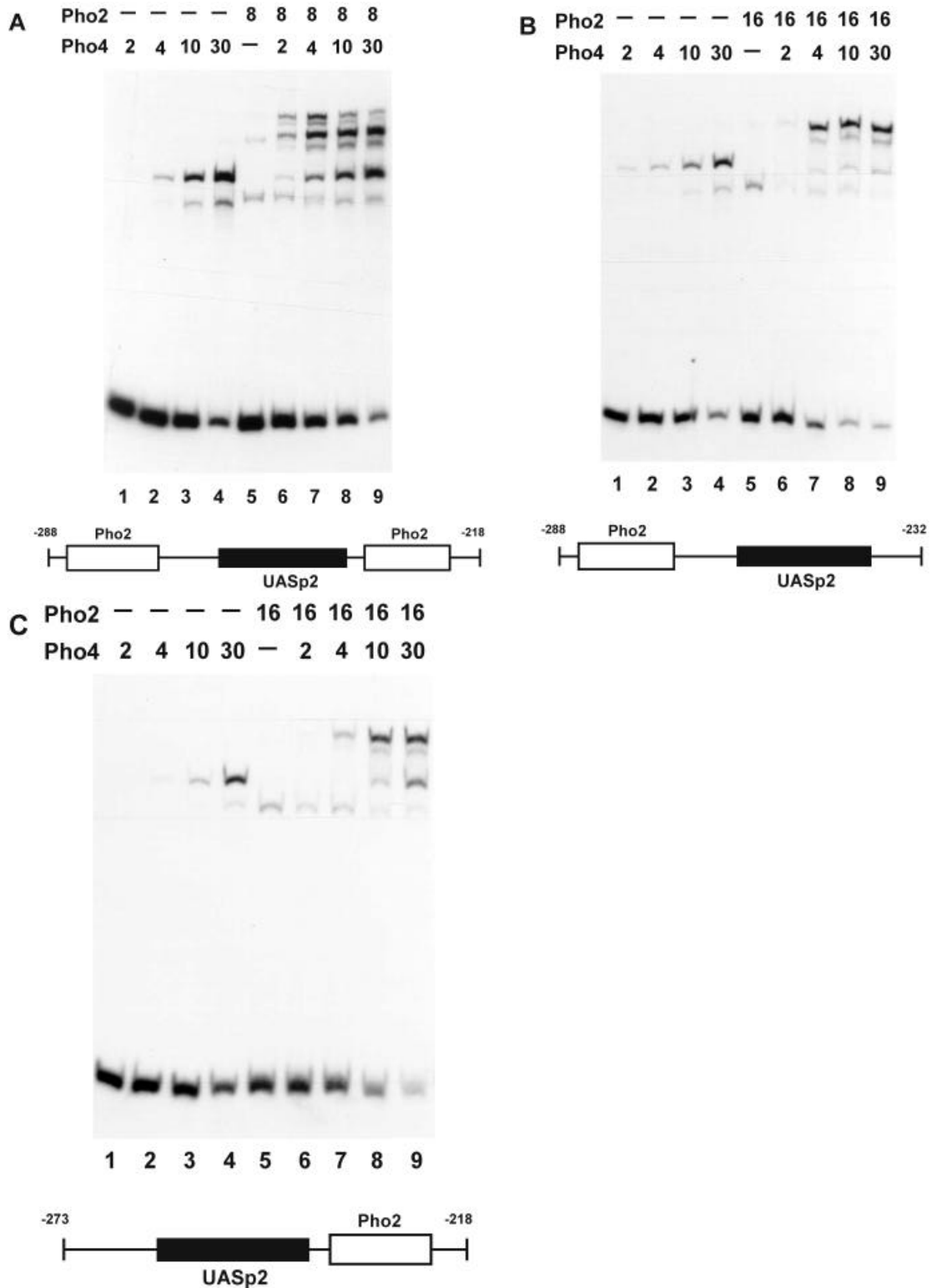
### 2.3.5 Pho2 und Pho4 binden kooperativ an benachbarte Stellen im UASp2-Element

Wie Experimente von Barbaric zeigten, überlappte die Pho4-Bindestelle am UASp2 nicht mit einer Pho2-DNA-Bindestelle, aber Pho2-Bindestellen befanden sich direkt benachbart dazu (Abildung 14). Es lagen nur 2 bis 5 ungeschützte Nukleotide zwischen der Pho4 und der abwärtsigen Pho2-geschützten Region, während der aufwärtige Pho2-Footprint 7 Nukleotide entfernt vom Pho4-Footprint lag. Keiner der Footprints wurde qualitativ geändert, wenn beide Proteine Pho2 und Pho4 in der Bindereaktion präsent waren.



**Abbildung 17: Pho2-DNA-Bindestellen sind eng benachbart zu der am UASp2 lokalisierten Pho4-Bindestelle.** DNaseI-Footprints wurden durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben. Der untere Strang eines *NcoI*(-345)-*BstEII*(-174)-Fragments wurde an der *NcoI*-Stelle markiert. Ein partielles Purinspezifisches Abbaumuster auf der linken Seite dient zur Orientierung. Die geschützten Regionen sind an den Seiten eingetragen.

Die kooperative DNA-Bindung von Pho4 und Pho2 an UASp2 wurde durch Gelretardationsexperimente mit einem Fragment untersucht, welches das UASp2 und die zwei flankierenden Pho2-Bindestellen enthält. Wie in Abbildung 18A gezeigt, wird die Bindung von Pho4 an UASp2 durch Anwesenheit von Pho2 verstärkt. Darüber hinaus verstärkt die Anwesenheit von Pho4 die beobachtete Affinität von Pho2 für seine Bindestellen (nicht gezeigt). Um zu bestimmen, ob die Bindung von Pho2 zu jeder dieser einzelnen Stellen für Kooperativität ausreicht, wurden zwei weitere Restriktionsfragmente analysiert. Jedes enthielt nur eine der beiden Pho2-Bindestellen neben dem UASp2. An die flüßauf liegende Pho2-Bindestelle schien Pho2 einiges stärker zu binden als an die flüßab liegende (vergleiche das Verhältnis von gebundener gegenüber freier DNA jeweils in den Spuren 5 von Abbildung 18B und C). Jede Stelle für sich allein kann zu kooperativer DNA-Bindung von Pho4 und Pho2 führen. Es gibt Anzeichen dafür, daß Pho2 auch allein kooperativ an das DNA-Fragment bindet, welches beide Pho2-Bindestellen enthält. Es werden zwei Pho2-DNA-Komplexe beobachtet (Abbildung 18B Spur 5). Das Verschwinden des langsamer wandernden Protein-DNA-Komplexes, in dem wahrscheinlich zwei Moleküle Pho2 an DNA gebunden vorliegen, basiert auf dem Verschwinden des schneller wandernden Komplexes mit einem an DNA gebundenen Pho2-Molekül; der rein statistisch zu erwartende Wert wird dabei übertroffen. Der Niedrigmobilitätskomplex scheint jedoch nicht durch eine oligomere Form von Pho2 an einer einzelnen Stelle gebunden zu entstehen. Bei einer zweifach höheren Konzentration von Pho2 entsteht nämlich fast nichts von einem solchen Komplex mit den Fragmenten, die eine einzelne Pho2-Bindestelle enthalten (Spur 5, Abbildung 18B und C). Deshalb scheint der mit dem DNA-Fragment, welches das UASp2 mit zwei Pho2-Bindestellen enthält, beobachtete Effekt ein mehr kumulativ kooperativer Effekt zu sein, der zum einen zwischen Pho2 mit sich selbst und zum anderen zwischen Pho2 mit Pho4 stattfindet.

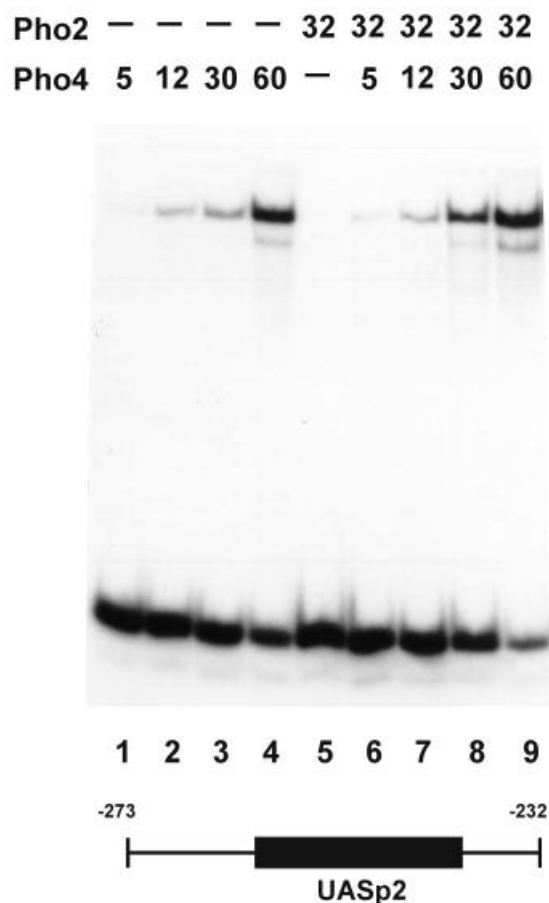


**Abbildung 18: Pho2 und Pho4 binden kooperative an DNA-Sequenzen an UASp2.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Benutzt wurden drei verschiedene Promotorfragmente, wie schematisch unten gezeigt: (A) *Xho*I(-288)-*Ava*II(-218)-Fragment mit UASp2 und Pho2-Bindestellen flüßauf und flüßab liegend von der Pho4-Bindestelle lokalisiert; (B) *Xho*I(-288)-*Apo*I(-232)-Fragment, mit UASp2 und der flüßauf liegenden Pho2-Bindestelle; (C) *Cla*I(-273)-*Ava*II(-218)-Fragment mit UASp2 und der flüßab liegenden Pho2-Bindestelle.



### 2.3.6 Die DNA-Bindung von Pho2 ist erforderlich für seine Kooperativität mit Pho4

Geklärt werden sollte die Frage, ob Proteininteraktionen zwischen Pho2 und Pho4 ausreichend sind, um ternäre Komplexe zu erzeugen und/oder um die DNA-Bindungsaktivität von Pho4 zu verstärken. Hierfür untersuchte ich die Bindung von Pho4 in Abwesenheit und Anwesenheit von Pho2 an einem 41 Bp-Restriktionsfragment von UASp2, das nur die Pho4-Bindestelle enthält (Abbildung 19). Dies ist möglich, da im Gegensatz zu UASp1 die Pho2- und Pho4-Bindestellen am UASp2 nicht überlappen. Die Pho4-Bindung an dieses Fragment war in Anwesenheit und Abwesenheit von Pho2 identisch. Es wurde weder ein Hinweis auf eine Bindung von Pho2 beobachtet noch irgendein ternärer Komplex detektiert, obwohl sogar höhere Pho2-Konzentrationen als in den Experimenten zuvor (siehe Abbildung 18) eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die DNA-Bindung von Pho2 für die Formation eines stabilen ternären Komplexes und für kooperative Interaktionen mit Pho4 benötigt wird.

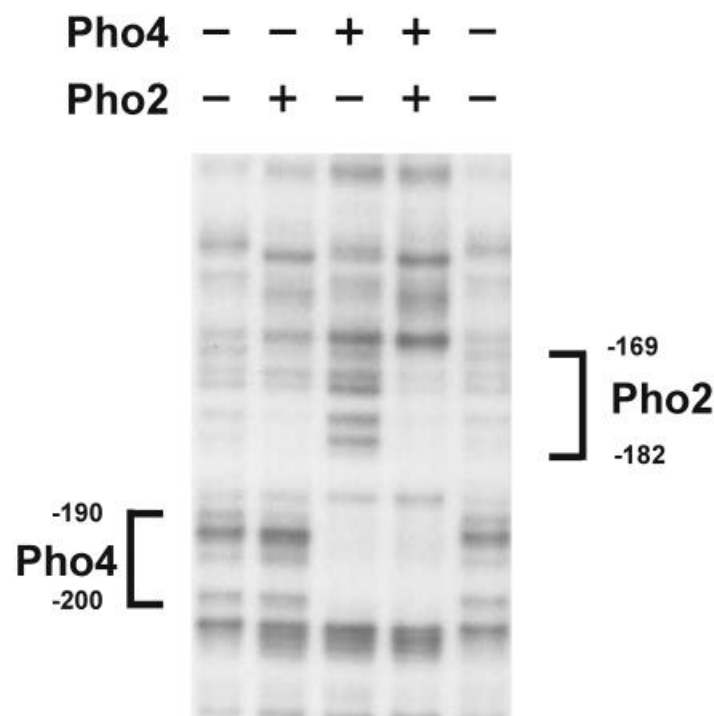


**Abbildung 19: Effekt von Pho2 beim Binden von Pho4 zu einem Fragment mit UASp2 ohne benachbarte Pho2-Bindestellen.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Gezeigt wird die stattfindende Bindung von Pho4 in Abwesenheit und Anwesenheit von Pho2 an ein *Cla*I(-273)-*Apo*I(-232)-Promotorfragment (schematisch unten gezeigt) mit UASp2, aber ohne Pho2-Bindestellen.

### 2.3.7 Kooperative DNA-Bindung existiert auch an einer neu entdeckten schwachen Pho4-Bindestelle

Wie in Abbildung 13D von Prof. Barbaric gezeigt, ist eine durch Pho2-geschützte Region 70 Bp abwärts von UASp2 (bei Position -169 bis -182) zu erkennen. Benachbart zu der Pho2-geschützten Region befindet sich eine Sequenz -CACATG-, die in bezug auf die Pho4-Konsensussequenz (CACGTG) nur eine Abweichung aufweist.

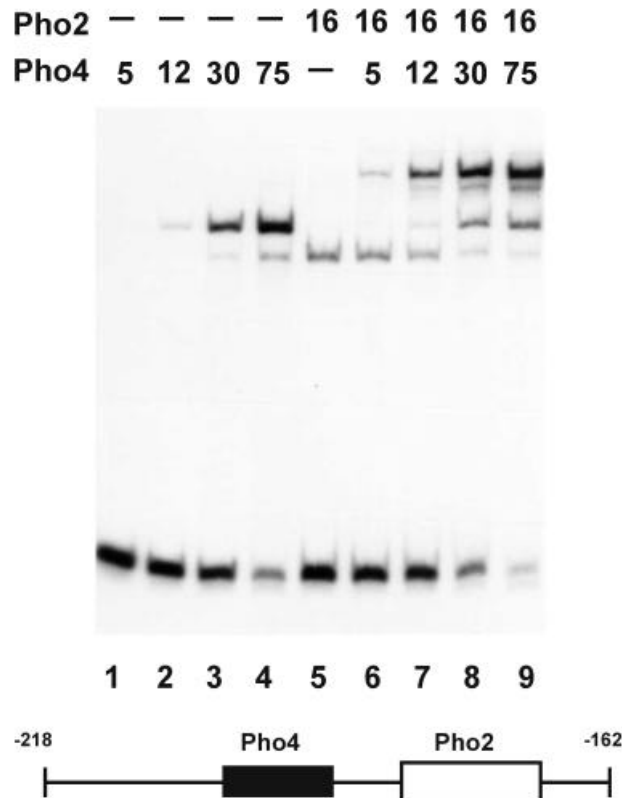
Experimente von Prof. Barbaric, welche die Bindung sowohl von Pho2 als auch von Pho4 an diese Region untersuchten, ergaben: Bei niedrigen Pho4-Konzentrationen – die jedoch ausreichen, um klare Footprints an UASp1 und UASp2 zu erhalten – ist eine Pho4-Bindung nicht nachweisbar (nicht gezeigt). Bei höheren Pho4-Konzentration erhält man einen Footprint von Position -190 bis -200, der von einem benachbarten Pho2-Footprint nur durch wenige Nukleotide getrennt ist (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Eine dritte Pho4-Bindestelle wurde flussab liegend von UASp2 gefunden.** Der untere Strang eines *HindIII*(-292)-*BamHI*(+9)-Fragments (Abbildung 13D) wurde an der *HindIII*-Stelle markiert und für DNaseI Footprint-Experimente in Anwesenheit von Pho4 und/oder Pho2, wie oben angezeigt, verwendet. Geschützte Regionen sind seitlich angezeigt.

In Gelretardationsexperimenten bindet Pho4 an ein Fragment, welches diese Region enthält (Abbildung 21), mit jedoch eindeutig niedrigerer Affinität wie zu UASp1 (Abbildung 15) und

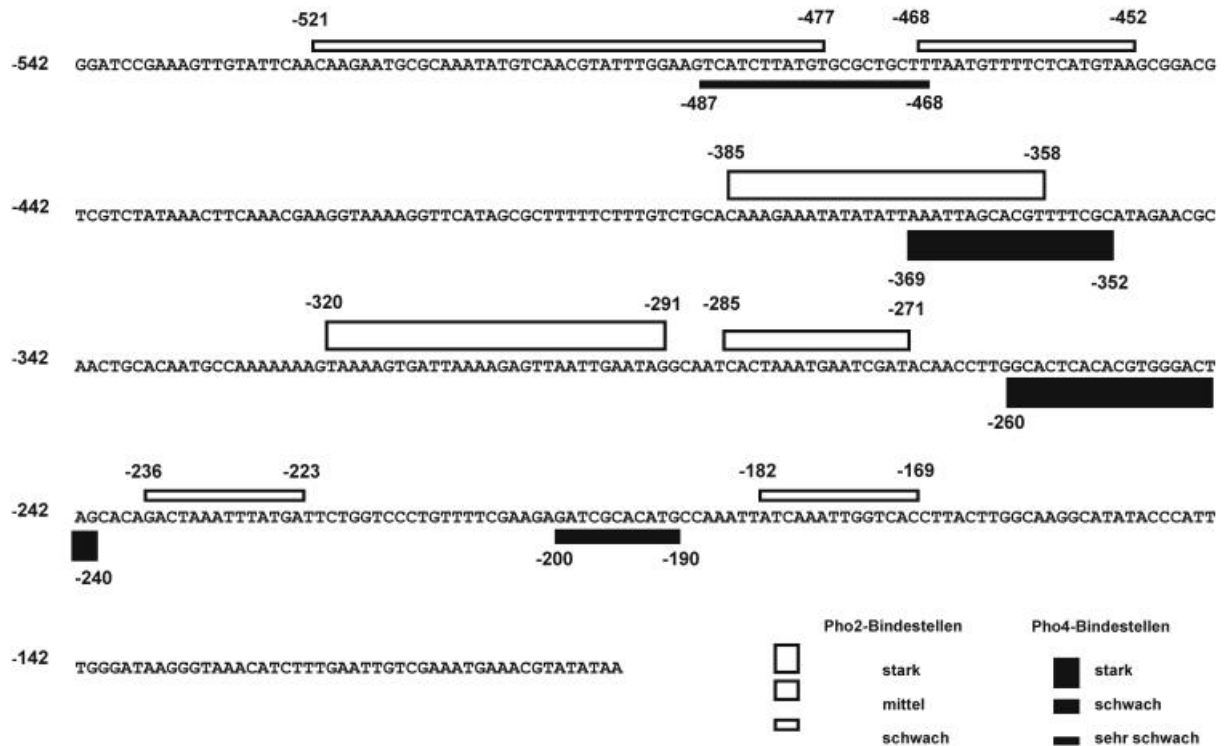
UASp2 (Abbildung 18A) vergleicht man jeweils die Menge geschifteten Fragments in den Spuren 1-4 der Abbildungen. Die Bindung an diese Stelle bei hohen Mengen von Pho4 wurde bereits früher erwähnt ((Ogawa et al., 1994)). Pho2 bindet an dieses Fragment mit ähnlicher Affinität wie zu der UASp2-benachbarten Pho2-Bindestelle. Wenn die zwei Proteine zusammen zugegeben werden, wird die Pho4-Bindung durch die Anwesenheit von Pho2 signifikant erhöht.



**Abbildung 21: Kooperative Bindung zwischen Pho2 und Pho4 wird ebenfalls beobachtet an der neu erkannten Pho4-Bindestelle.** Bindung von Pho4 und Pho2 an ein *AvaII*-(-218)-*Acc65*(-162)-Fragment mit der in Abbildung 20 gezeigten Pho4-Bindestelle und der benachbarten Pho2-Bindestelle wurde mittels Gelretardationsexperimenten wie in Material und Methoden beschrieben untersucht.

Interessanterweise überlappt die um -185 zentrierte mit einer 19 Bp palindromischen Konsensussequenz, von der vermutet wurde, daß sie ein durch Phosphat reguliertes UAS-Element sei ((Rudolph and Hinnen, 1987)), mit den Pho4- und Pho2-DNA-Bindestellen. Vier solcher Elemente wurden im *PHO5*-Promotor identifiziert, eingeschlossen UASp1, UASp2 und die -185-Region. In dieser Arbeit wurde bereits das Auftreten von kooperativer Bindung von Pho4 und Pho2 an drei dieser Elemente gezeigt. Ich untersuchte nun das vierte Element (um -469) auf Pho4- und Pho2-DNA-Bindung. Ein äußerst schwacher Footprint bei Position -468 bis -487 wurde nachgewiesen, jedoch nur bei sehr hohen Pho4-Konzentration (nicht gezeigt).

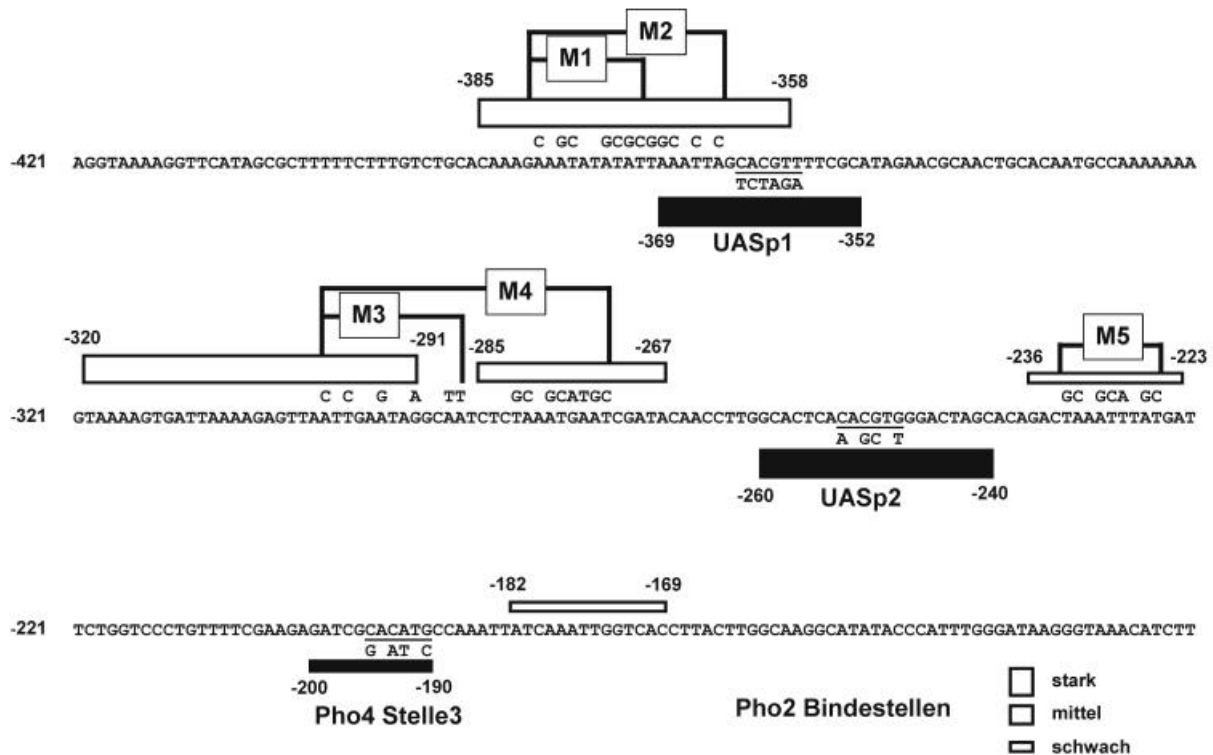
Diese Region enthält die Sequenz TATGTG (Position -471 bis -481), die zwei Abweichungen von der Pho4-Konsensusbindestelle aufweist. Dieser schwache Pho4-Footprint liegt zwischen zwei Pho2-DNA-Bindestellen und überlappt sie teilweise (Abbildung 22). All ihre ungefähren relativen Affinitäten sind in der Abbildung angezeigt.



**Abbildung 22: Karte von Pho4- und Pho2-Bindestellen am *PHO5*-Promotor.** Die Lokalisation der Bindestellen, wie sie in diesen Studien entdeckt wurden, sind im Schema angezeigt. Die Höhe der Balken beschreibt die relative Affinität der Bindestellen, wie sie durch Gelretardationsexperimente ermittelt wurde.

### 2.3.8 Pho4-Bindung an UAS-Elemente des *PHO5*-Promotors

In einer Linkerscanninganalyse der *PHO5*-flußauf liegenden Region hatten Rudolf und Hinnen früher zwei Regionen entdeckt, die essentiell für die Aktivierung des Promotors bei Phosphatmangel sind ((Rudolph and Hinnen, 1987)). Jede dieser Regionen enthält – wie später gefunden – eine Pho4-Bindestelle; sie wurden als UASp1 und UASp2 bezeichnet ((Vogel et al., 1989)). Unsere *in vitro*-Bindungsstudien verdeutlichten, daß Pho2 kooperativ mit Pho4 an einigen Stellen, UASp1 und UASp2 flankierend, bindet. Darüber hinaus fanden wir eine neue, 60 Bp flußab liegend von UASp2 lokalisierte Pho4-Bindestelle niedriger Affinität; an dieser Stelle war ebenfalls Kooperativität zwischen Pho4 und Pho2 zu finden (Abbildung 21 bzw. (Barbaric et al., 1996)).



**Abbildung 23: Mutationen von Pho2- und Pho4-Bindestellen am PHO5-Promotor.** Die Lokalisation der Pho4- und Pho2-Bindestellen, wie durch *in vitro*-Footprints bestimmt ((Barbaric et al., 1996)), sind durch gefüllte und offene Balken angezeigt, wobei die Höhe der Balken mit der relativen Affinität des Faktors für diese Stelle korrespondiert. Mutierte Regionen in den Pho2-Bindestellen sind in den Rahmen (M1 bis M5) und die ausgetauschten Nukleotide über der Wildtyp-Sequenz dargestellt. Mutationen in der Pho4-Konsensussequenz sind unter der Wildtyp-Sequenz angezeigt und referenziert als UASp1-mut, UASp2-mut, und Pho4-Stelle3-mut.

Promotor	β-Galaktosidase-Aktivität (%) <sup>b</sup>
wt	100
UASp1-mut	14
UASp2-mut	7
Pho4-Stelle3-mut	71
UASp1-mut + UASp2-mut	1
UASp1-mut + Pho4-Stelle3-mut	10

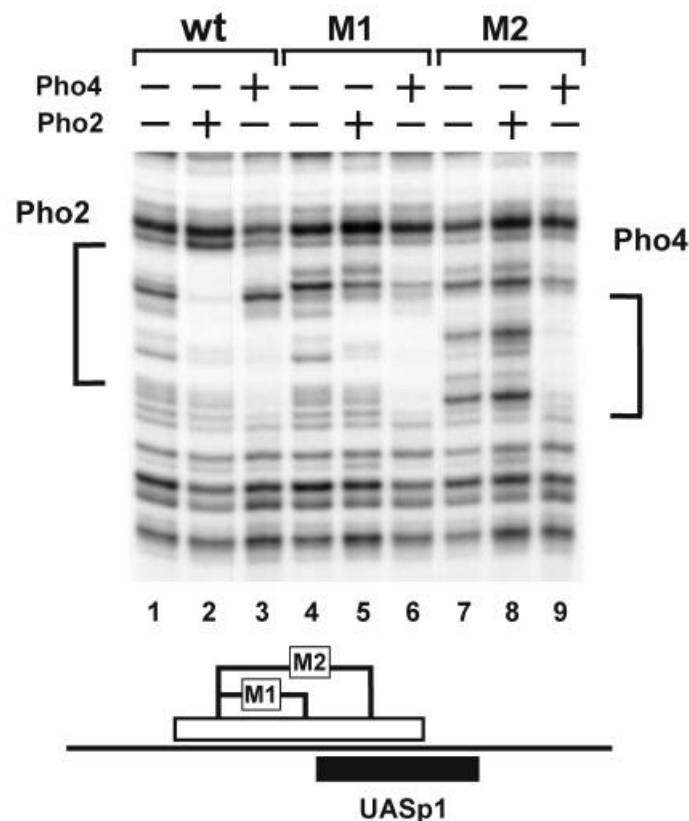
**Tabelle 6: Beitrag der einzelnen Pho4-Bindestellen zur PHO5-Promotoraktivität.** (<sup>a</sup>Pho4-Bindestellen am PHO5-Promotor wurden wie in Abbildung 23 gezeigt mutiert. <sup>b</sup>Aktivitäten der mutierten Promotoren relativ zur Aktivität des Wildtyp-Promotors.)

Pho4 bindet *in vivo* an die niedrig-affine Stelle unter dereprimierten Bedingungen (hier nicht gezeigt), so wie es – dies hatten wir früher schon gezeigt – für die Bindung von Pho4 an UASp1 und UASp2 zutrifft ((Venter et al., 1994)). Um quantitative Informationen über den Beitrag jeder dieser drei Stellen – von denen wir gezeigt haben, daß sie *in vivo* Pho4 binden – zu erhalten, wurden Aktivitätsmessungen von *PHO5*-Promotorvarianten mit Mutationen in jeder Pho4-Bindestelle durchgeführt (Abbildung 23); die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Mutationen von jeder der Pho4-Bindestellen, UASp1 und UASp2, führen zu einer dramatischen Abnahme der Promotoraktivität (ungefähr 10fach). Sie sind Anzeichen für kooperative Aktion der zwei Stellen im Aktivierungsprozeß und stimmen mit den früheren Deletionsanalysen der *PHO5* flußauf liegenden Region überein ((Fascher et al., 1993); (Rudolph and Hinnen, 1987)). Eine Mutation der dritten Pho4-Bindestelle hat im Vergleich dazu einen weitaus geringeren Effekt und senkt die Aktivität nur auf etwa 70 % des Wildtyp-Niveaus. Ebenfalls sind die verbleibenden 14 % einer geschwächten Promotorvarianten, die nur durch UASp2 getrieben wird, nicht in starkem Maße von der dritten Pho4-Bindestelle abhängig, wie bereits für den Wildtyp-Promotor gezeigt werden konnte. Eine Variante mit fehlendem funktionellen UASp1 wie auch UASp2, aber mit der dritten Pho4-Bindestelle war praktisch inaktiv (1 % Restaktivität [Tabelle 6]).

Wir haben früher gezeigt, daß Pho4 für die Transition der Promotor-Chromatinstruktur zum offenen Zustand als vorausgehender Schritt für transkriptionelle Aktivierung absolut nötig ist ((Fascher et al., 1990)). Es war deshalb denkbar, daß die dritte Pho4-Bindestelle, welche *in vivo* während der Promotoraktivierung besetzt ist, zur Nukleosomendisruption beitragen könnte und den offenen Zustand stabilisiert. Ich untersuchte hierfür den Zustand von Nukleosom -2, welches die dritte Pho4-Bindestelle enthält, in einem Promotorkonstrukt, in der diese Stelle mutiert worden war, durch Messung der Zugänglichkeit einer Nuklease zu einer *ClaI*-Stelle. Unter induzierenden Bedingungen war die Zugänglichkeit zu *ClaI* ununterscheidbar von der des Wildtyp-Promotors (nicht gezeigt; (Almer et al., 1986)). Daraus ergab sich, daß die Bindung von Pho4 zu dieser dritten Pho4-Bindestelle keine signifikante Rolle im Prozeß der Chromatin-Transition spielt und daß diese Stelle – im Gegensatz zu den Pho4-Bindestellen in UASp1 und UASp2 – nicht essentiell für die Aktivierung des *PHO5*-Promotors ist.

### 2.3.9 Die DNA-Interaktion von Pho2 am UASp1-Element ist nötig für die Aktivität dieses Elementes

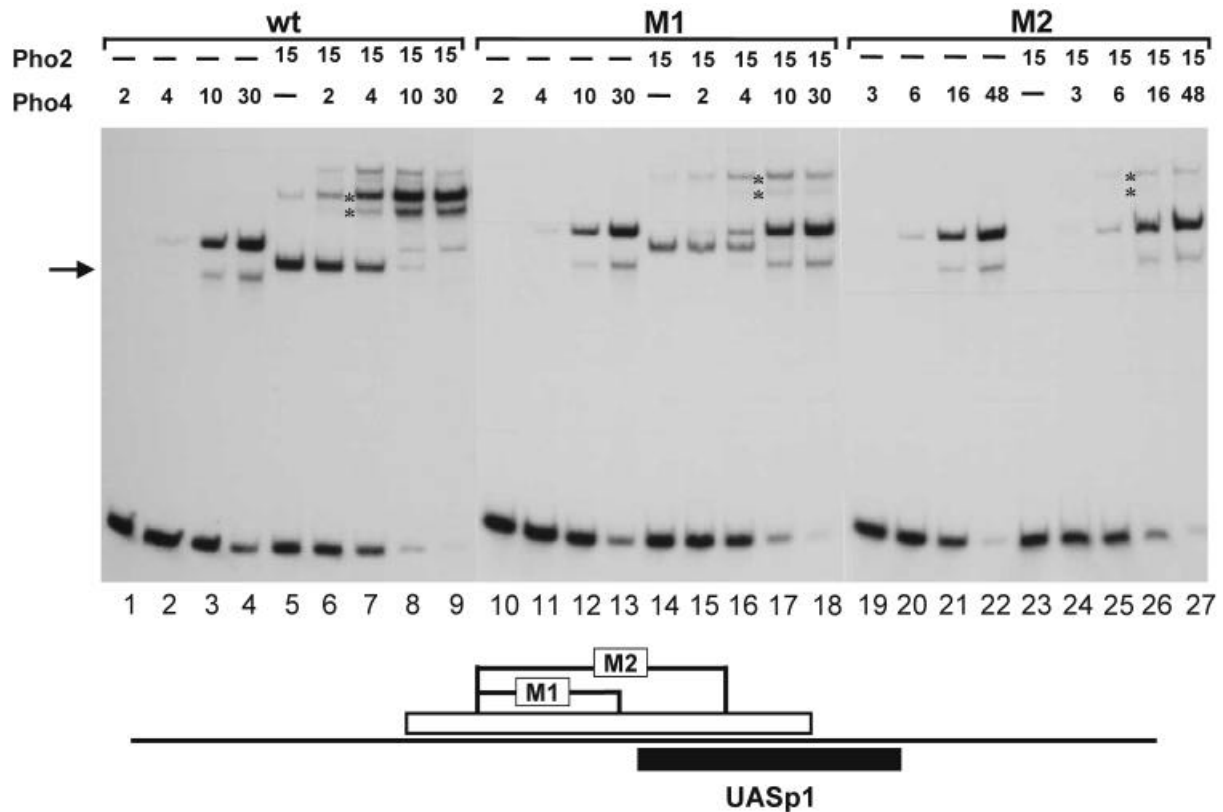
Wir wechselten als nächstes zu den neulich entdeckten Pho2-Bindestellen und analysierten ihre funktionelle Rolle *in vivo*. Daher wurden die Pho2-Bindestellen einzeln oder in Kombination mutiert (Abbildung 23); außerdem wurden die Effekte auf kooperative DNA-Bindung von Pho2 und Pho4 als auch auf Aktivität der mutierten Promotorvarianten bestimmt. Wir testeten zunächst die Funktion der starken bei UASp1 gefundenen Pho2-Bindestelle, die teilweise die Pho4-Bindestelle überlappt. Zwei Mutationen, wie in Abbildung 23 und im Schema in Abbildung 24 gezeigt, wurden in dieser Stelle eingeführt. In der kürzeren Mutation (M1) wurden in der durch Pho2 geschützten Region aufwärts des Pho4-Footprints 7 Basen ausgetauscht, während in der längeren (M2), welche sich bis in den Pho4-DNaseI-Footprint ausdehnte, zusätzlich 5 Basen mutiert wurden. Die Bindung von Pho2 und Pho4 an die mutierten Promotorfragmente wurde von Prof. Barbaric *in vitro* mittels DNaseI-Footprints nachgewiesen.



**Abbildung 24:** Effekt der Mutationen M1 und M2 auf Pho2- und Pho4-Bindung *in vitro*. DNaseI-Footprints wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der obere Strang eines *SfuI*(-206)-*Bam*HI(-542)-Fragments – vom Wildtyp-Promotor oder mutierten Promotor – wurde an der *SfuI*-Stelle markiert. Wie oben gezeigt, wurde Pho4 oder Pho2 zugefügt. Die Regionen, die im Wildtyp-Promotor geschützt sind, sind

seitlich angezeigt. Der Ort der M1- und M2-Mutationen (Abbildung 23) in den Pho2-Bindestellen ist schematisch unten gezeigt.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, resultiert M1 in dem Verlust des Schutzes der flussauf liegenden Hälfte der Pho2-Binderegion, während M2 den kompletten Verlust des Pho2-Schutzes mit sich bringt. Dies ist ein Anzeichen dafür, daß die früher bestimmte Pho2-geschützte Region von -385 bis -358 (Abbildung 13; (Barbaric et al., 1996)) sogar zwei benachbarte Pho2-Bindestellen repräsentiert. Keine dieser Mutationen beeinflusst den DNaseI-Footprint von Pho4 (Abbildung 24). Um zu sehen, ob ein partieller oder kompletter Verlust der Pho2-Bindung in dem Verlust der kooperativen Bindung von Pho2 und Pho4 resultieren würde, wurde die Ausbildung des ternären Komplexes an den Promotorvarianten durch Gelretardationsexperimente untersucht; die Ergebnisse wurden mit denen des Wildtyp-Promotors verglichen.

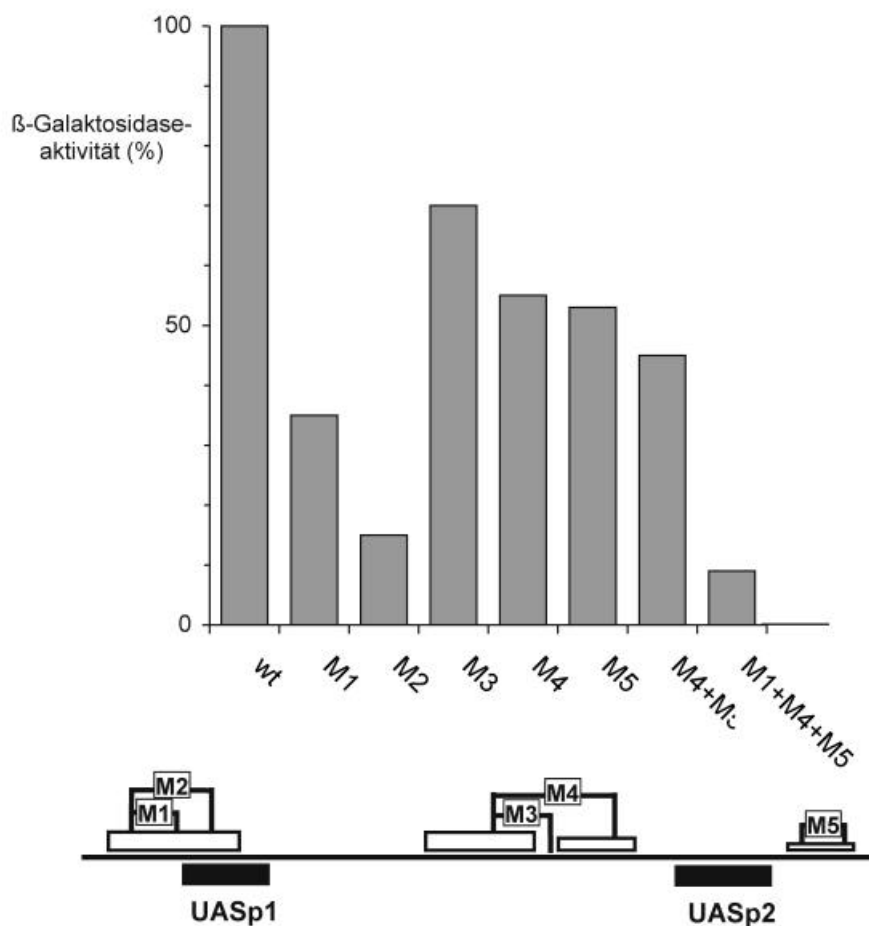


**Abbildung 25: Pho2-Bindung ist nötig für Kooperativität zwischen Pho2 und Pho4 an UASp1.** Die Binde-reaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Ein markiertes 81 Bp-PCR-Promotorfragment (-324 bis -405) wurde mit Wildtyp-Promotorsequenzen entweder der M1- oder der M2-Mutation benutzt (siehe Abbildung 23); dies ist unten schematisch gezeigt. Die Menge des zugefügten Proteins zu einem Reaktionsansatz ist in imaginären Einheiten angegeben. Eine Einheit von Pho4 und Pho2 entspricht ungefähr 5 und 6 ng Protein, so genau, wie durch Natriumdodecylsulfatgelelektrophorese bestimmt werden konnte. Den höher mobilen Protein-DNA-Komplex, den man beobachtet, wenn Pho4 allein zugegeben wird, repräsentiert proteolytisch abgebautes Pho4-Protein an DNA gebunden (durch einen Pfeil



markiert). Durch Sternchen gekennzeichnet ist die Position des ternären Komplexes, bestehend aus entweder vollständigen oder degradierten Produkten des Pho4-Proteins. Ein niedriger mobiler Komplex mit nur Pho2 (Spur 5) wandert etwa an der gleichen Stelle wie der ternäre Komplex. Die Anwesenheit eines ternären Komplexes mit dem proteolysierten Pho4-Protein (niedrigere Bande mit Stern) macht es möglich, eindeutig den ternären Komplex zu identifizieren.

Festgestellt worden war – wie in Abildung 25 gezeigt – weniger ein binärer Pho2-DNA-Komplex und damit übereinstimmend ein Verlust des ternären Komplexes mit dem Promotorfragment, welches die kleinere Mutation (M1) enthält. Die Bindung von Pho4 selbst war bei dieser Mutation nicht betroffen. Wenn das Promotorfragment mit der größeren Mutation (M2) benutzt wurde, gab es keinen binären Pho2-DNA-Komplex, und der ternäre Komplex war nicht nachweisbar. Es sollte erwähnt werden, daß die Bindung von Pho4 selbst zu dem M2-Fragment geringfügig schwächer war (die 1,5- bis 2fach höhere Pho4-Konzentration wurde für das gleiche Maß an binärem Komplex benötigt).



**Abildung 26: Mutationen in den Pho2-Bindestellen betreffen die PHO5-Promotoraktivität unterschiedlich.** Die Aktivität des Wildtyp-PHO5-Promotors fusioniert an das lacZ-Gen ((Straka and Hörz, 1991)), und Promotorvarianten mit Mutationen in den Pho2-Bindestellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben

gemessen. Die Aktivitäten der mutierten Promotorvarianten sind relativ zum Wildtyp-Promotor (920 U) angegeben. Die Mutationen sind schematisch unten angezeigt.

Die Aktivität der mutierten Promotorvarianten wurde von den *PHO5-lacZ*-Fusionskonstrukten gemessen. Wie in Abbildung 26 gezeigt, war die Aktivität des Promotors, der M1 beinhaltet, auf 35 % und desjenigen, der M2 enthielt, auf 15 % reduziert. Die übrige Aktivität des M2-Promotors steht in Übereinstimmung mit der Aktivität des M2-Promotors mit einer mutierten Pho4-Bindestelle am UASp1 (Tabelle 6). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die kooperative Bindung von Pho2 und Pho4 an UASp1 entscheidend für die Aktivität von diesem Element ist. Da die Disruption des *PHO2*-Gens die Promotoraktivität auf weniger als 1 % reduziert (Abbildung 27), ist es klar, daß Pho2 mehr vermag, als nur die Bindung von Pho4 an UASp1 zu ermöglichen.

### **2.3.10 Die zum UASp2-Element benachbarten Pho2-Bindestellen sind ebenfalls für die volle Aktivierung des *PHO5*-Promotors nötig**

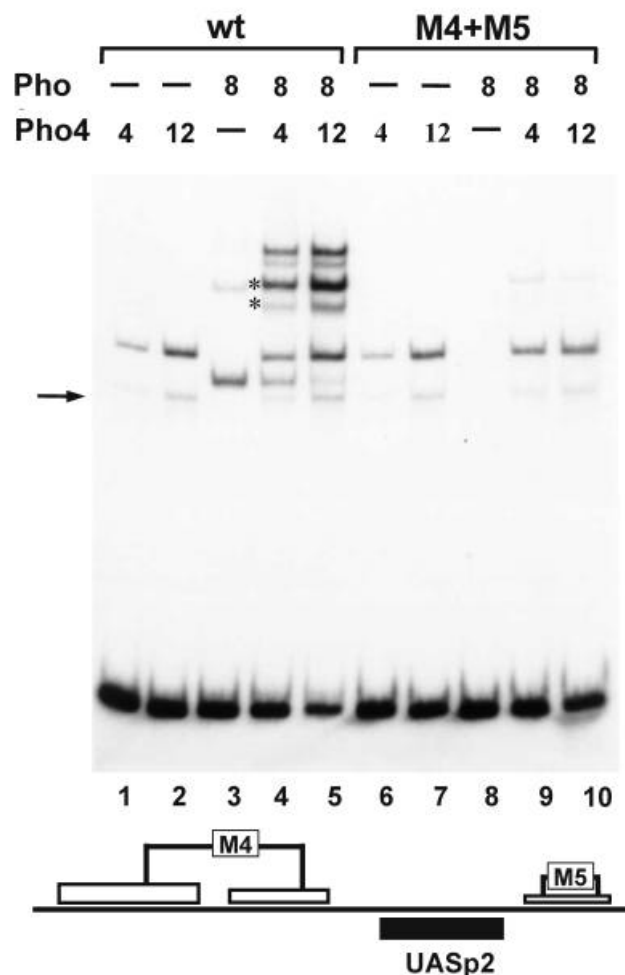
*In vitro*-Bindestudien am UASp2 haben die Existenz von Pho2-Bindestellen in enger Nachbarschaft zu der Pho4-Bindestelle gezeigt. Pho2 bindet alleine zu jeder dieser Stellen, was Anzeichen für kooperative DNA-Bindung der beiden Proteine ist (Abbildung 18 bzw. (Barbaric et al., 1996)). Deshalb war es wichtig zu untersuchen, ob Mutationen in diesen Pho2-Bindestellen auch in einem Verlust der kooperativen DNA-Bindung und damit einhergehend in einem Abfall der Promotoraktivität resultieren würde.

Die kooperative DNA-Bindung von Pho2 und Pho4 zu dem Promotorfragment mit dem UASp2-Element, welches die mutierten Pho2-Bindestellen flußauf und flußab liegend von der Pho4-Bindestelle aufweist (siehe Schema in Abbildung 27), wurde mittels Gelretardationsexperimenten untersucht. Wie in Abbildung 27 gezeigt, wurde keine Bindung von Pho2 zu dem Fragment mit den M4+M5-Mutationen beobachtet, noch wurde irgendein ternärer Komplex detektiert (vergleiche Spuren 8 und 10 mit Spuren 3 und 5). Dies zeigt klar, daß die Pho2-DNA-Bindung ein vorausgehender Schritt für die kooperative Bindung von Pho2 und Pho4 ist. Die Bindung von Pho4 allein ist hierbei nicht durch die M4+M5-Mutationen betroffen.

Wenn die Aktivitäten der Promotorkonstrukte mit mutierten Pho2-Bindestellen flußauf und/oder flußab liegend von UASp2 gemessen wurden, konnte ein signifikanter Verlust der Aktivität auf 55 % für jede der zwei Punktmutationen (M4+M5) und auf 45 % bei Kombination der zwei Mutationen beobachtet werden (Abbildung 26). Diese verbleibende Aktivität

war signifikant höher als die Aktivität eines Promotors mit einer mutierten Pho4-Bindestelle, wie der Mutation von UASp2 (7 %; Tabelle 6). Diese Ergebnisse zeigen deshalb, daß die zu UASp2 benachbarte Pho2-Bindestelle, obwohl sie zur Promotorstärke beiträgt, nicht die gleiche Wichtigkeit wie bei UASp1 hat.

Weiter wurden Promotorvarianten mit kombinierten Pho2-Mutationsstellen an beiden – UASp1 und UASp2 (M1+M4+M5) – konstruiert. Die Aktivität dieses Promotors war drastisch reduziert worden, und zwar auf weniger als 10 % des Wildtyp-Promotors (Abbildung 26). Sie war damit ähnlich der Aktivität eines Promotors mit einer mutierten Pho4-Bindestelle, wie UASp1 oder UASp2 (Tabelle 6).



**Abbildung 27: Pho2-DNA-Bindung ist nötig für Kooperativität zwischen Pho2 und Pho4 auch am UASp2.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Benutzt wurde ein markiertes 109 Bp-PCR-erzeugtes Promotorfragment (-316 bis -208) mit UASp2 und entweder Wildtyp(wt)-Sequenz oder kombinierter M4+M5-Mutation, wie schematisch unten gezeigt. Die Menge hinzugefügten Proteins zum Reaktionsansatz ist in imaginären Einheiten oben angezeigt. Weitere Details – wie die Bedeutung der Pfeile und Sterne – sind in der Legende zu Abbildung 25 erläutert.

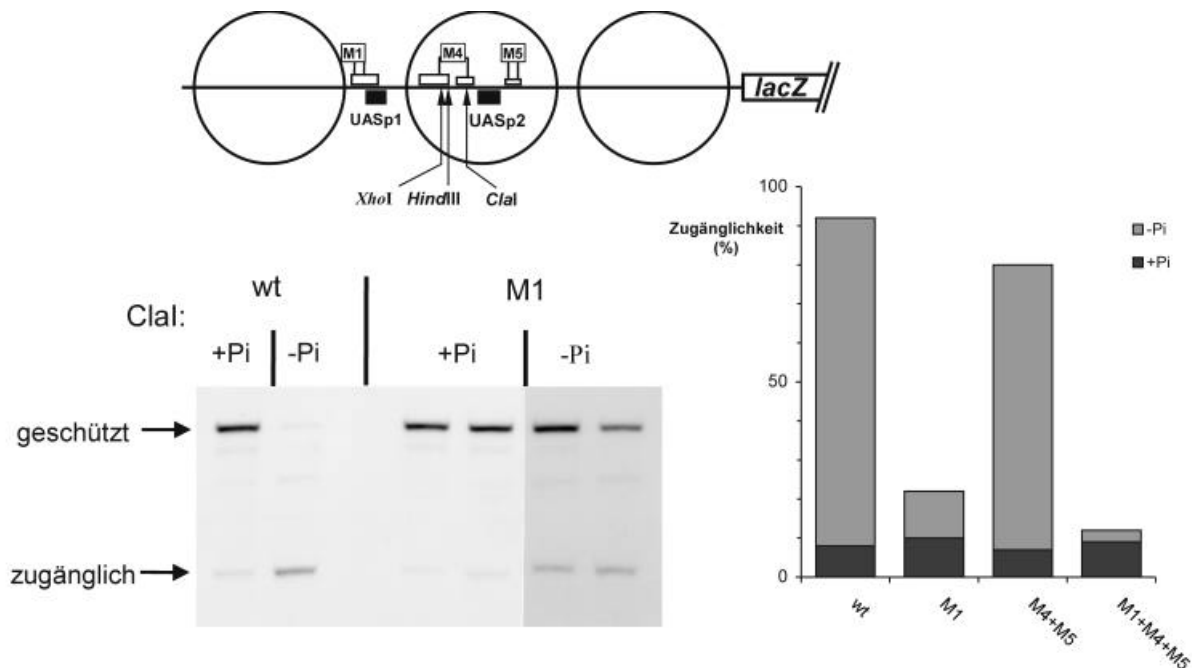
Diese Ergebnisse zeigen, daß die Bindung von Pho2 zu seinen UASp1- und UASp2-benachbarten Zielstellen für die Aktivierung des *PHO5*-Promotors benötigt wird. Eine der stärksten Pho2-Bindestellen befindet sich zwischen UASp1 und UASp2, doch die bisher analysierten Mutationen hatten keinen Beitrag dieser Stelle alleine zur Promotoraktivität *in vivo* gezeigt. Die Mutationen von 6 Bp (M3 in Abbildung 23) verhindert die Interaktion dieser Region mit Pho2. Davon ausgenommen ist eine kurze Pho2-geschützte Region, die sehr wohl direkt flußab liegend existiert (nicht gezeigt). Die Aktivität der *PHO5*-Promotorkonstrukte mit dieser M3-Mutation war um 30 % reduziert (Abbildung 26). Dies zeigt, daß die Bindung von Pho2 zu dieser Stelle einen Beitrag zur Aktivierung des *PHO5*-Promotors leistet.

### **2.3.11 Die Rolle der Pho2-*cis*-Elemente bei der Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors**

Ich habe früher gezeigt, daß die zu UASp1 und UASp2 benachbarten Pho2-Bindestellen für die kooperative Bindung von Pho2 und Pho4 an DNA *in vitro* benötigt werden ((Barbaric et al., 1996)). Nun konnten wir zeigen, daß Mutationen dieser Pho2-Bindestellen die Aktivität des Promotors *in vivo* signifikant reduzieren, besonders wenn Stellen um UASp1 mutiert werden. Die Chromatinöffnung am Promotor bei der *PHO5*-Aktivierung benötigt die Bindung von Pho4 zu beiden UASp1 und UASp2 ((Svaren and Hörz, 1997)) und die Anwesenheit des Pho2-Proteins ((Fascher et al., 1990)). Es war deshalb wichtig zu bestimmen, welche Konsequenz die Mutationen in den Pho2-Bindestellen für die Chromatinöffnung des Promotors unter aktivierenden Bedingungen haben würde.

Die Chromatinstruktur der unterschiedlichen Promotorvarianten mit mutierten Pho2-Bindestellen wurde durch Messung der Zugänglichkeit von Restriktionsstellen in Nukleosom -2 unter induzierenden Bedingungen analysiert. Die in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse zeigen einen klaren Unterschied der Chromatinstruktur zwischen der M1- und der M4+M5-Varianten. Nach Restriktionsspaltungen war das Nukleosom -2 in den M4+M5-Varianten im fast gleichen Ausmaß wie der Wildtyp-Promotor disruptiert, während die Zugänglichkeit in der M1-Varianten auf 20 % erniedrigt war. Weiterhin war das Chromatin der Promotorvarianten mit kombinierter M1 und M4+M5-Mutation geschlossen und durch diesen Versuch nahezu ununterscheidbar von der Struktur des reprimierten Wildtyp-Promotors. Diese Ergebnisse lassen deshalb vermuten, daß *in vivo* die Bindung von Pho4 an UASp1 stark durch die Mutationen der benachbarten Pho2-Bindestelle (M1) reduziert wird, während die Bindung an UASp2 in dem M4+M5-Promotor noch produktiv ist, wenn auch um einen bestimmten

Teil geschwächt. Angedeutet wird dies durch das geschlossene Chromatin des M1+M4+M5-Promotors im Vergleich zu dem partiell geöffneten M1-Promotor.



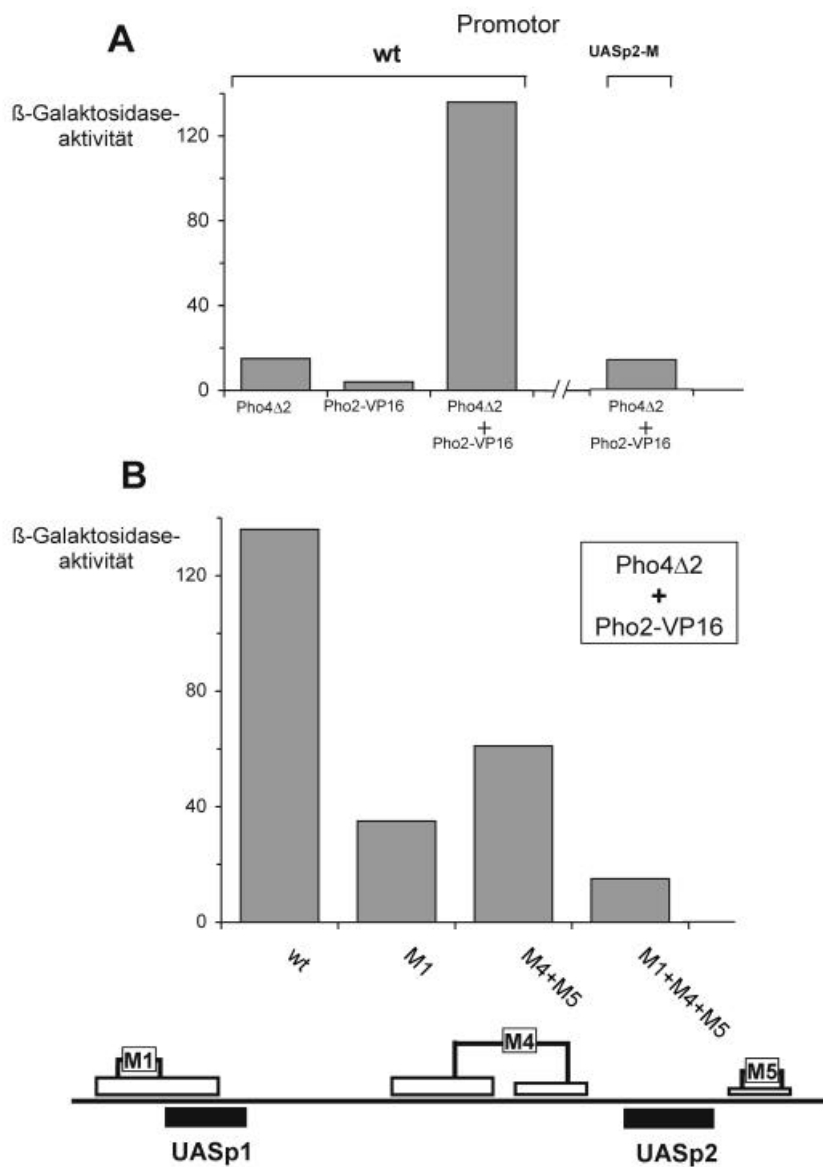
**Abbildung 28: Chromatinöffnung am *PHO5*-Promotor hängt von den *Pho2-cis*-Elementen benachbart zu *UASp1*, aber nicht zu *UASp2* ab.** Hefestämme mit entweder dem Wildtyp(wt)- oder dem *PHO5-lacZ*-Plasmid oder Plasmiden mit Promotorvarianten wurden im Medium mit  $P_i$  (+ $P_i$ ) oder ohne  $P_i$  (- $P_i$ ) wie gezeigt kultiviert und ihre Zellkerne isoliert. Diese wurden für 60 min bei 37°C in 200µl Puffer mit 100 U *ClaI* oder 200 U *HindIII* und *XhoI* gespalten (die M4-Mutationen fügten eine *HindIII*- und *XhoI*-Stelle ein, wobei die *ClaI*-Stelle zerstört wurde). Um eine Spaltung durch die Restriktionsnuklease nachzuweisen – angezeigt in dem oberen Schema –, wurde die DNA isoliert, mit *RsaI* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel analysiert, transferiert und hybridisiert mit einem *RsaI-BamHI*-Fragment, welches zu der Region direkt flußab liegend der *BamHI*-Stelle hybridisiert. Ein 1,46 kbp-*RsaI*-Fragment wurde erzeugt, wenn vor der Restriktionsnuklease geschützt wird. Ein Fragment von halber Länge entsteht, wenn die Stelle zugänglich ist. Die Analyse des Wildtyp-Promotors und des M1-Promotors ist oben gezeigt. Zugänglichkeitswerte des Wildtyp-Reporters und des M1-, wie auch des M4+M5- und des M1+M4+M5-Promotors sind in dem Diagramm daneben gezeigt. Die Messungen für M4+M5 und M1+M4+M5 wurden aus *XhoI*- und *HindIII*-Spaltungen erhalten, die Werte ergaben, welche sich um weniger als 5 % unterschieden.

### 2.3.12 Die Aktivierung des *PHO5*-Promotors durch *Pho2-VP16* benötigt mehrere *Pho2-cis*-Elemente und darüber hinaus die Interaktion mit *Pho4*

Es wurde früher gezeigt, daß die *Pho2-VP16*-Fusion die Transkription der endogenen sauren Phosphatase nur aktivieren konnte, wenn sie mit einem DNA-bindenden *Pho4*-Derivat koexprimiert wurde, das alleine inaktiv war, da ihm eine Aktivierungsdomäne fehlte ((Hirst et al., 1994)). Dieser Befund zeigte, daß *Pho2-Pho4*-Interaktionen benötigt werden, um *Pho2*-

VP16 an die DNA zu bringen. Es war aufgrund dieser Ergebnisse nicht klar, ob entweder das Pho2-VP16-Hybrid direkt an DNA gebunden war oder ob Protein-Protein-Interaktionen ausreichend waren, um das Pho2-VP16-Hybridmolekül zum Promotor zu rekrutieren.

Um diese Frage anzugehen, haben wir die Aktivität gemessen von Pho2-VP16 in Anwesenheit von Pho4 $\Delta$ 2, einen transkriptionell inaktiven Derivat von Pho4 ((Svaren et al., 1994)) in einem *pho2-pho4*-Stamm, durch Verwendung von *PHO5*-Promotorkonstrukten mit mutierten Pho2-Bindestellen. In Übereinstimmung mit früheren Befunden aktivieren Pho2-VP16 und Pho4 $\Delta$ 2 zusammen, aber nicht einzeln den Wildtyp-Promotor, wie in Abbildung 29A gezeigt.



**Abbildung 29: Pho2-cis-Elemente sind nötig für die Aktivierung des *PHO5*-Promotors durch Pho2-VP16 und ein transkriptionell inaktives Pho4-Derivat.** (A) Die Aktivierung des Wildtyp-*PHO5*-Promotors oder einer Promotorvarianten mit einer mutierten Pho4-Bindestelle bei UASp2 (UASp2-M) durch Pho4 $\Delta$ 2 und Pho2-

VP16, wie sie in den Stämmen YS22 (*pho4*) oder YS27 (*pho4, pho2*) gemessen wurde. (B) Die Aktivierung der *PHO5*-Promotorvarianten mit mutierten Pho2-Bindestellen, schematisch unten gezeigt, durch Pho4 $\Delta$ 2 und Pho2-VP16, welche zusammen in YS27 (*pho4, pho2*) exprimiert wurden.

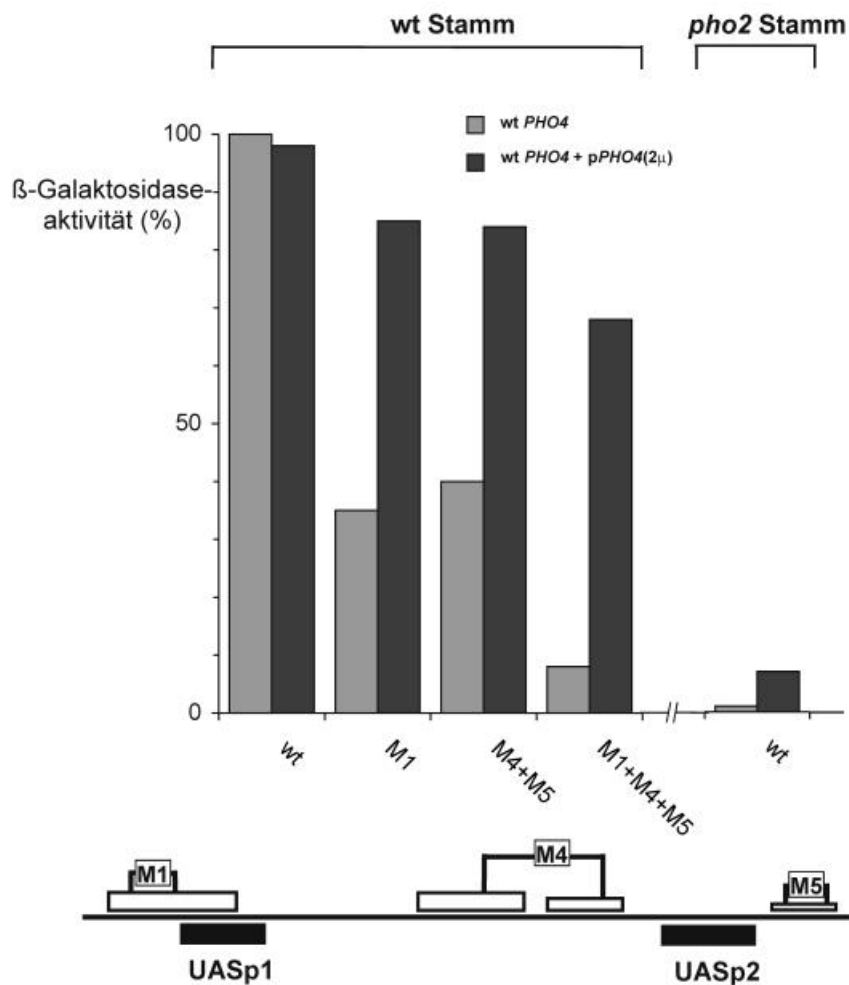
Die Aktivierung benötigt nicht nur das Pho4-Proteinderivat, sondern auch Pho4-Bindestellen. Der Grad der Aktivierung war nach Mutation der entweder zu UASp1 oder UASp2 benachbarten Pho2-Bindestellen signifikant reduziert (siehe Abbildung 29B) und sehr ähnlich den Ergebnissen, die beobachtet wurden, wenn die Aktivierung durch Pho4 von den gleichen mutanten Promotoren gemessen wurde (siehe Abbildung 26). Der weitaus dramatischste Effekt wurde mit mehreren Pho2-Bindestellenmutationen beobachtet. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlußfolgerung, daß ein direkter Pho2-DNA-Kontakt zusammen mit einer Pho2-Pho4-Interaktion benötigt wird, um den *PHO5*-Promotor zu aktivieren, und zeigen, daß die *in vitro* gefundenen vielen Pho2-Bindestellen *in vivo* funktionell sind.

### 2.3.13 Eine Überexpression von Pho4 vermindert die Notwendigkeit der Pho2-*cis*-Elemente

Wir haben früher gezeigt, daß eine Überexpression von Pho4 einem *pho2*-Stamm die Fähigkeit zurückverleiht, die Nukleosomen im *PHO5*-Promotor zu disrupieren; dies ist ein Zeichen für die produktive Bindung von Pho4 an die UAS-Elemente. Unter solchen Bedingungen war die Phosphataseaktivität in den Mutanten weitaus niedriger als im Wildtyp ((Fascher et al., 1990)). Dieser Befund erhob die Frage, ob die Überexpression von Pho4 in einem *PHO2*-Stamm die Notwendigkeit der Pho2-*cis*-Elemente ersetzen konnte oder für etwas anderes kompensiert.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, erhöht die Überexpression von Pho4 die Aktivität der Promotoren mit Mutationen in den Pho2-Bindestellen um beide UASp1 und UASp2 (M1+M4+M5) von 9 % auf 65-70 % des Wildtyp-Spiegels. Weiterhin erreichen die Aktivitäten der Promotorvarianten mit mutierten Pho2-Bindestellen die Wildtyp-Höhe nur bei UASp1 oder UASp2 in Anwesenheit von überexprimierten Pho4. Auf der anderen Seite ergab die Überexpression von Pho4 mit einem Wildtyp-Reporter in einem *pho2*-Hintergrund weniger als 10 % Aktivität in Parallelmessungen. Daher scheint die Notwendigkeit der Pho2-Bindestellen in *cis* durch Überexpression von Pho4 in einem weitaus größeren Maß ersetzt werden zu können als die Notwendigkeit von Pho2 als einen *trans*-agierenden Faktor. Diese Befunde deuten auf eine komplexere Rolle von Pho2 beim Aktivierungsprozeß am *PHO5*-

Promotor hin, welche über das Ermöglichen der Bindung von Pho4 zu seinen Zielstellen hinausgeht.



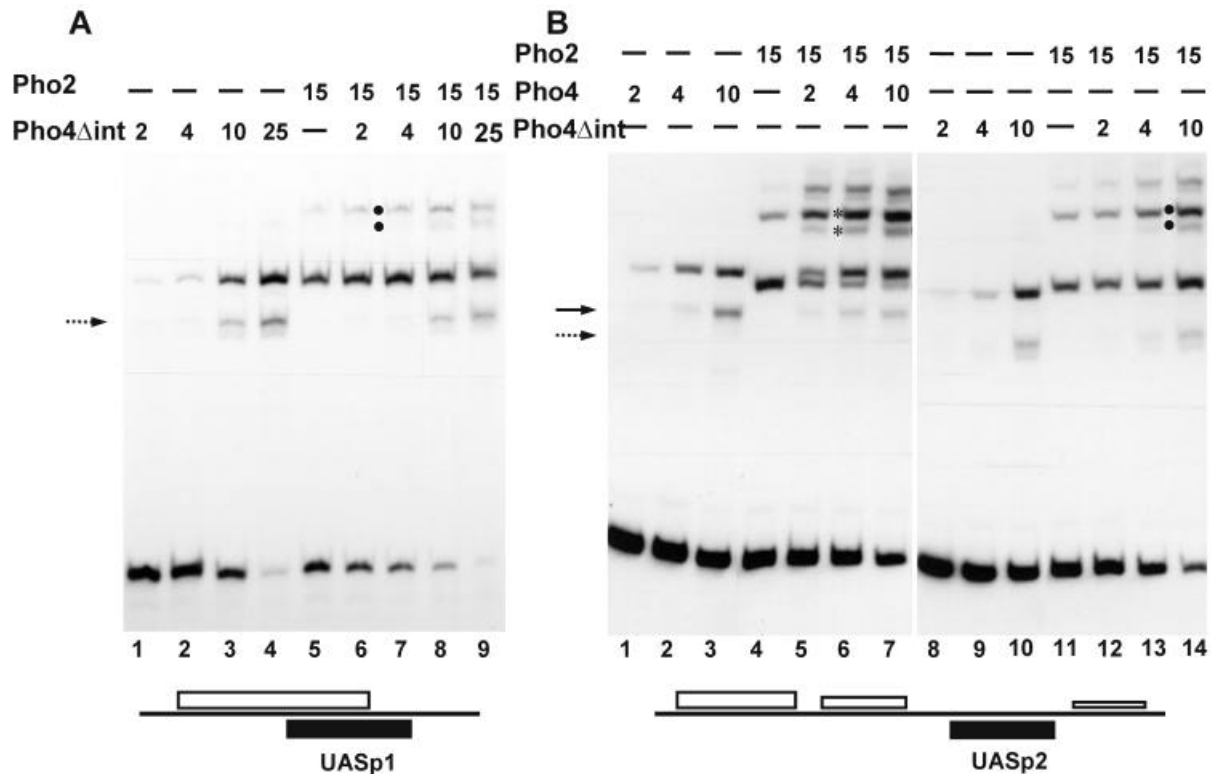
**Abbildung 30: Überexpression von Pho4 kompensiert die Notwendigkeit für Pho2-*cis*-agierende Elemente.** Die Aktivierung von *PHO5*-Promotorvarianten mit mutierten Pho2-*cis*-Elementen, schematisch unten angezeigt, wurde gemessen in dem Wildtyp(wt)-Stamm YS18 und im gleichen Stamm, der zusätzlich Pho4 von einem Multikopienplasmid (2 $\mu$ ) exprimiert. Die Aktivierung des Wildtyp-Reporters in einem *pho2*-Stamm (YS19) ist rechts gezeigt.

### 2.3.14 Ein mutiertes Pho4-Protein ohne Pho2-Interaktionsdomäne zeigt keine kooperative DNA-Bindung mit Pho2

Durch Verwendung des Two-Hybrid-Systems wurde *in vivo* die Interaktion von Pho4 und Pho2 gezeigt und das für diese Interaktion essentielle Pho4-Segment bestimmt. Ein Pho4-Protein, welchem die Aminosäuren 200 bis 247 fehlen (Pho4 $\Delta$ int), ist nicht in der Lage, mit Pho2 zu interagieren ((Hirst et al., 1994)). Um die Wichtigkeit von spezifischen Pho4-Pho2-Interaktionen für die kooperative DNA Bindung der zwei Proteine zu testen, wurden Gel-



retardationsexperimente mit Pho4 $\Delta$ int durchgeführt. Wie in Abbildung 31A gezeigt, war keine signifikante Kooperativität mit Pho4 $\Delta$ int und Pho2 zu beobachten, wenn die Bindung zu einem UASp1 enthaltenden Promotorfragment getestet wurde.



**Abbildung 31: Die kooperative DNA-Bindung mit Pho2 ist fast vollständig abwesend bei einer Pho4-Varianten ohne Pho2-Interaktionsdomäne.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Proteine wurden einzeln oder in Kombination in unten angezeigter Menge (imaginäre Einheiten, wie in Abbildung 15; mit 1 U von Pho4 $\Delta$ int entspricht etwa 5 ng Protein) zu einem radioaktiv markierten Fragment zugefügt. Verwendet wurde hierfür zum einen das 81 Bp-PCR-erzeugte Promotorfragment (-324 bis -405), welches das UASp1 und die überlappende Pho2-Bindestelle (A) enthält, und zum anderen das 109 Bp-PCR-erzeugte Fragment (-316 bis -208), welches das UASp2 und die benachbarten Pho2-Bindestellen enthält (B) (siehe Schemata unten). Der Pfeil markiert binäre Komplexe, die von proteolytisch abgebautem Pho4 (volle Pfeile) und Pho4 $\Delta$ int (unterbrochene Pfeile) stammen. Ternäre Komplexe mit vollständigem Pho4 und seinem Degradationsprodukt sind durch Sterne markiert, die für Pho4 $\Delta$ int in analoger Weise durch einen Punkt markiert sind.

Dagegen war eine starke Kooperativität mit dem Pho4wt und Pho2 im gleichen Experiment zu beobachten, wie bereits in Abbildung 25 gezeigt. Ein bestimmtes Maß an Kooperativität zwischen Pho4 $\Delta$ int und Pho2 blieb erhalten, wenn das Promotorfragment analysiert wurde, welches UASp2 mit seinen benachbarten Pho2-Bindestellen enthält. Jedoch war die Kooperativität im Vergleich zum Pho4wt signifikant reduziert (Abbildung 31B). Beobachtet wurden ähnliche Ergebnisse mit Promotorfragmenten, welche UASp2 mit nur einer Pho2-Bindestelle

(5' oder 3') enthalten (nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, daß spezifische Protein-Protein-Interaktionen für die kooperative Bindung der zwei Proteine am *PHO5*-Promotor wichtig sind.

### 2.3.15 Das Pho4-Derivat ohne Pho2-Interaktionsdomäne kann UASp2, aber nicht UASp1 aktivieren

Wir wollten als nächstes die Fähigkeit von Pho4 $\Delta$ int testen, die *PHO5*-UAS-Elemente zu aktivieren, um zu sehen, ob der Verlust der kooperativen DNA-Bindung von Pho4 und Pho2 mit der transkriptionellen Aktivierung korreliert. Unsere *in vivo*-Aktivitätsmessungen des *PHO5*-Promotors zeigten, daß beide UAS-Elemente für die Aktivierung synergieren mußten und differentielle Effekte an nur einem der Elemente schwierig zu detektieren waren. Wir fügten deshalb jedes UAS-Element flüßauf liegend eines *CYC1*-minimal-Promotors in ein *lacZ*-Reporterplasmid ein und maßen die Aktivität dieser Konstrukte mit Pho4 $\Delta$ int und nativem Pho4. Es stellte sich heraus, daß Pho4 $\Delta$ int nicht in der Lage war, UASp1 zu aktivieren. Hingegen konnte eine signifikante Aktivierung von UASp2 gemessen werden, welche den mit nativem Pho4 beobachteten Wert erreichte (Tabelle 7).

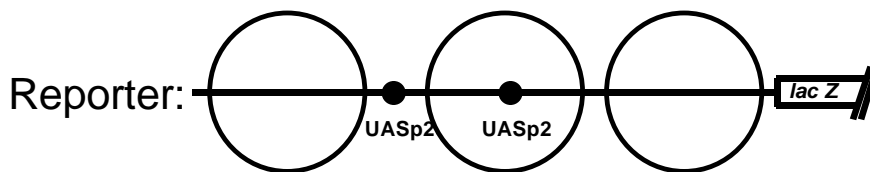
Reporter	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (U) <sup>a</sup>	
	Pho4 $\Delta$ int	Pho4wt
<i>PHO5-lacZ</i>	55	920
UASp1 <sub>(PHO5)</sub> - <i>CYC1-lacZ</i>	<5	622
UASp2 <sub>(PHO5)</sub> - <i>CYC1-lacZ</i>	99	199

**Tabelle 7: Ein mutiertes Pho4-Protein ohne die Pho2-Interaktionsdomäne (Pho4 $\Delta$ int) kann UASp2 aktivieren, aber nicht UASp1.** <sup>a</sup>Die Aktivität des *PHO5*-Promotors und die Aktivität von heterogenen Promotorkonstrukten mit einzelnen *PHO5*-UAS-Elementen wurde in einem Stamm gemessen, der entweder Pho4wt oder Pho4 $\Delta$ int exprimiert. Die Aktivitätswerte mit reinen *CYC1-lacZ*-Plasmid betragen < 5 U.

Die Aktivierung von UASp2 durch Pho4 $\Delta$ int geschieht jedoch nicht aufgrund der *in vitro* beobachteten restlichen Kooperativität mit Pho2 (siehe oben), da die gleiche Aktivierungshöhe auch in Pho2-Abwesenheit gefunden wurde (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, daß hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei UAS-Elementen besteht. Pho4 $\Delta$ int kann an UASp2 binden und die Transkription aktivieren, während es nicht an UASp1 binden kann. Dies demonstriert, daß die Pho4-Bindung zu diesem UAS-Element

strikt von der Interaktion mit Pho2 abhängig ist. Aufgrund dieser Befunde kann die geringe Aktivierung des *PHO5*-Promotors durch *Pho4Δint* (Tabelle 7) mit seiner Unfähigkeit UASp1 zu binden (und zu aktivieren) erklärt werden, da – wie vorher gezeigt (Tabelle 6) – eine UASp1-Mutation den Promotor inaktiviert.

Um die Aktivierung von UASp2 durch *Pho4Δint* und nativen Pho4 im Hintergrund des *PHO5*-Promotors zu untersuchen, entschlossen wir uns, UASp1 im *PHO5*-Promotor zu ersetzen und eine Variante zu konstruieren, die 2 x UASp2 enthält. Wie erwartet, wurde diese Promotorvariante signifikant durch *Pho4Δint* aktiviert und damit in Pho2-unabhängiger Weise (Tabelle 8).

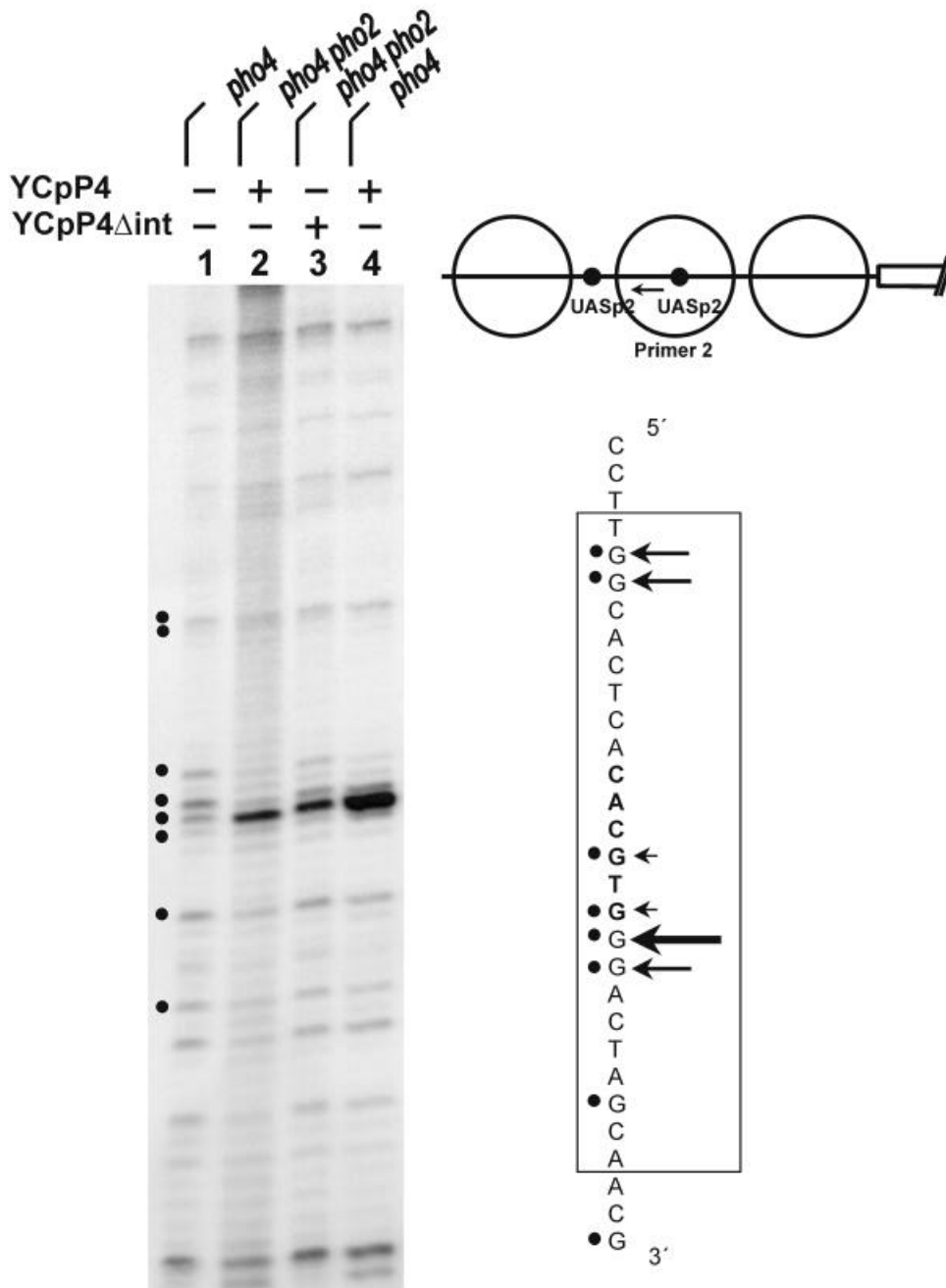


Derivate	β-Galaktosidase-Aktivität (U) <sup>a</sup>	
	<i>PHO2</i>	<i>pho2</i>
Pho4wt	960	85
Pho4Δint	189	214

**Tabelle 8: Aktivierung einer *PHO5*-Promotorvarianten mit 2 x UASp2.** <sup>a</sup>Die Aktivität der Promotorvarianten mit 2 x UASp2 (siehe Material und Methoden) wurde mit Pho4wt oder Pho4Δint in einem YS22(*pho4*)- und einem YS27(*pho2, pho4*)-Stamm gemessen.

Die Aktivierung dieses Reporters durch das native Pho4 war im *PHO2*-Hintergrund höher. Der Effekt von Pho2 scheint die Fähigkeit von Pho4, DNA besser zu binden und/oder besser zu transaktivieren, zu beeinflussen. Um diese Frage anzugehen, wurden von Prof. Barbaric *in vivo*-Footprints durchgeführt. Bestimmt wurde die Besetzung des neu eingefügten UASp2 durch entweder natives Pho4 oder Pho4Δint. Entgegen dem nativen UASp2-Element war das neue auch unter reprimierenden Bedingungen im Zellkern zugänglich ((Svaren et al., 1994)), da es sich in einer konstitutiv hypersensitiven Chromatinregion des Promotors befindet ((Almer et al., 1986)). Die Bindung von nativem Protein ist in der Tat in Anwesenheit von Pho2 erhöht (vergleiche Spuren 2 und 4 in Abbildung 32). Wie erwartet, ist die Bindung von Pho4Δint in Anwesenheit von Pho2 in Übereinstimmung mit dem Aktivierungsergebnis (Tabelle 8) nicht erhöht (nicht gezeigt).

Die Footprints für Pho4 und Pho4 $\Delta$ int (Spuren 2 und 3 in Abbildung 32) waren praktisch identisch, was zeigt, daß beide Moleküle mit ähnlicher Effizienz an dieses UAS-Element binden. Da eine weitaus höhere Aktivität unter diesen Bedingungen mit Pho4 $\Delta$ int im Vergleich zu nativem Pho4 gemessen wurde, muß dies bedeuten, daß die Fähigkeit von Pho4 zu transaktivieren bereits positiv modifiziert wurde.



**Abbildung 32: DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an UASp2.** Untersucht worden ist die Bindung des Pho4wt und von Pho4 $\Delta$ int an das flussauf liegende UASp2-Element (siehe Schema) im YS22 (*pho4*) oder YS27 (*pho2, pho4*), und zwar in der *PHO5*-Promotorvarianten, in der UASp1 durch UASp2 ersetzt wurde.

Eine mögliche Erklärung dafür ist die Anwesenheit einer reprimierenden Domäne im Pho4-Protein, die im Pho4 $\Delta$ int zumindest partiell entfernt zu sein scheint und die normalerweise unter physiologischen Bedingungen mit Pho2 wechselwirkt. Eine ähnliche Rolle von Pho2 in der Verstärkung des Aktivierungspotentials von Pho4 war kürzlich von Shao et al. ((Shao et al., 1996)) angenommen worden. Zusammenfassend können wir nicht eindeutig sagen, inwieweit die ansteigende Aktivierung über UASp2 durch Pho4wt und Pho2 aufgrund verbesserter DNA-Bindung oder erhöhter Transkriptionsaktivierung geschieht. Unsere Ergebnisse mit Pho4 $\Delta$ int zeigen, daß Pho2 auch einen Effekt auf die Fähigkeit von Pho4 zu transaktivieren hat. Weiterhin besteht ein klarer Unterschied zwischen den beiden UAS-Elementen, der bei früheren Versuche nicht erkannt worden ist. An UASp1 ist die Bindung von Pho4 der limitierende Schritt, während an UASp2 die Rolle von Pho2 sehr viel weniger die Bindung betrifft; statt dessen erhöht Pho2 effektiv das Aktivierungspotential von Pho4.

#### **2.4 Transkriptionelle Regulation des *PHO8*-Promotors im Vergleich zu dem koregulierten *PHO5*-Promotor**

Das *PHO8*-Gen kodiert für eine alkalische Phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*, dessen Transkription durch die Phosphatkonzentration des Mediums reguliert ist. Dies geschieht durch die Aktion verschiedener positiver und negativer regulatorischer Proteine, welche ebenfalls involviert sind in die Regulation von anderen Mitgliedern der Phosphatasegenfamilie (*PHO5*, *PHO11*, *PHO12* = *PHO10*, *PHO81* und *PHO84*). Eine zentrale Rolle spielt Pho4, das Gen, welches für ein DNA-bindendes Regulatorprotein kodiert. Spaltungsexperimente mit DNaseI, Mikrokokus-Nuklease und 20 verschiedenen Restriktionsnukleasen zeigten, daß unter Bedingungen der *PHO8*-Repression eine hochgeordnete Chromatinstruktur am Promotor existiert, die aus drei hypersensitiven Regionen – etwa 820-690, 540-510 und 230-160 Bp flußauf liegend des Initiationskodons – besteht. Diese hypersensitiven Stellen sind umgeben von in Nukleosomen organisierter DNA. Gelretardationsanalysen und *in vitro*-Footprintexperimente ergaben die Anwesenheit von zwei Pho4-Bindestellen am *PHO8*-Promotor: eine wenig affine Stelle bei -728 und eine hochaffine Stelle bei -532. Jede einzelne befand sich in einer hypersensitiven Stelle. Während der Derepression von *PHO8* verändert sich die Chromatinstruktur signifikant: Die zwei flußauf liegenden hypersensitiven Stellen mit den Pho4-Bindestellen gehen ineinander über, was in einer langen Region von Hypersensitivität resultiert. Diese Transition ist Pho4-abhängig. Es wird nicht der ganze Promotor nukleosomenfrei, sondern statt dessen gelangt der Promotor zu einem neuen Aussehen. Dabei entstehen Regionen von intermediärer Zugänglichkeit flußauf und flußab liegend der dritten

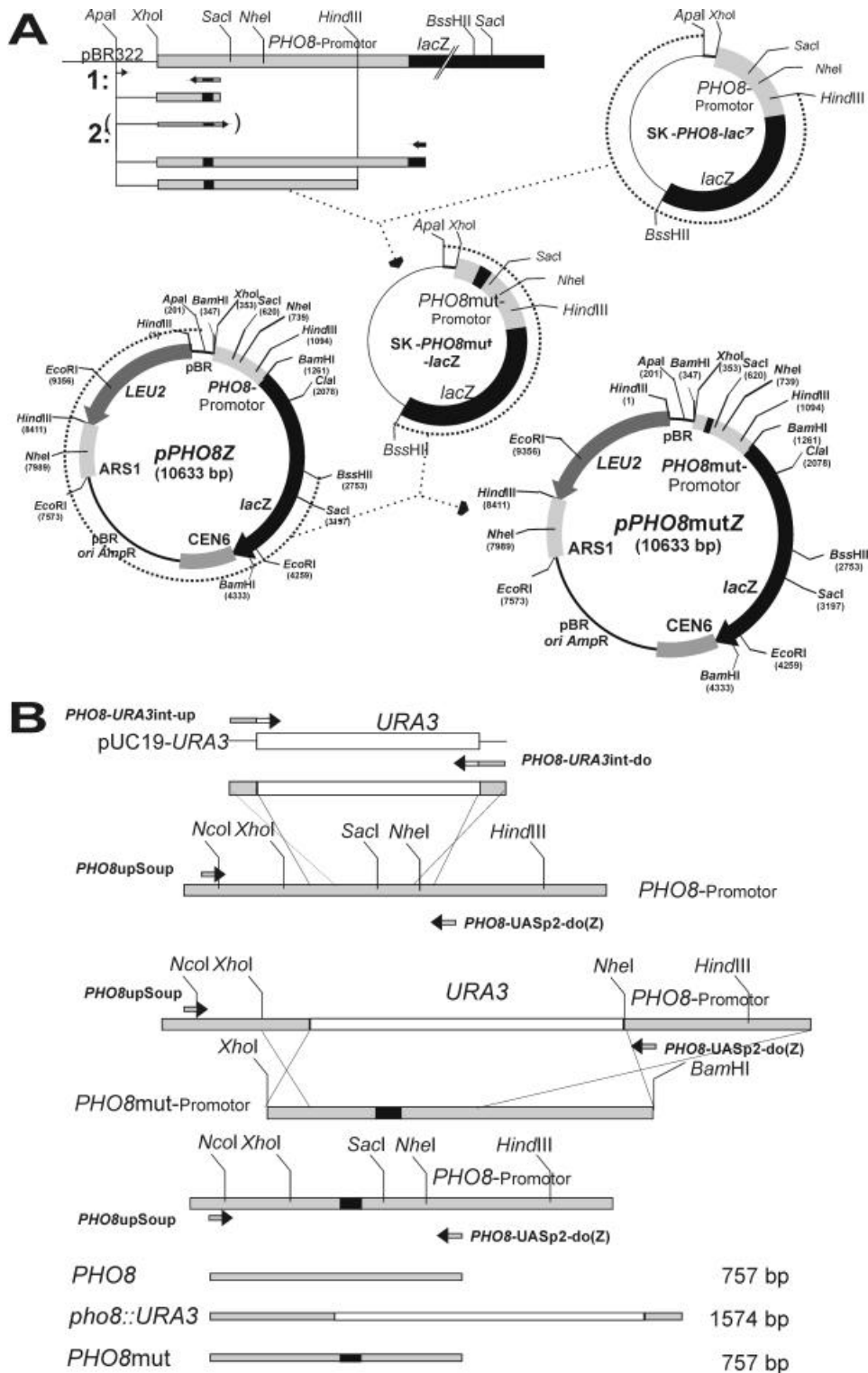
hypersensitiven Stelle auf, die bis an die TATA-Box anschließen. Die erhaltenen Daten passen bestens in ein Konzept, daß diese Regionen in instabilen oder teilweise entfaltenen Nukleosomen organisiert sind ((Barbaric et al., 1992)).

#### **2.4.1 Beschreibung von *lacZ*-Reporterplasmiden mit mutierten oder ausgetauschten Proteinbindestellen (UASp-Elementen)**

Zur Einführung von Veränderungen im *PHO8*-Promotorbereich (Abbildung 33A) wurde zunächst eine PCR am *PHO8*-Promotor mit einem flußab liegenden Oligonukleotid durchgeführt, welches neben einer an beiden Enden homologen *PHO8*-Sequenz die gewünschte Veränderung aufwies (z. B. *PHO8* UASp1(*PHO5*)-do), sowie mit einem flußauf liegenden Oligonukleotid mit homologer *pPHO8-lacZ*-Sequenz (pPZ-up(*ApaI*)). In einer zweiten PCR wurde der erzeugte „Megaprimer“ zusammen mit einem flußab liegenden Oligonukleotid mit homologer *pPHO8-lacZ*-Sequenz (*lacZ*-down) zur Amplifikation des mutierten *PHO8*-Promotors verwendet. Das Produkt wurde mit *ApaI* und *HindIII* gespalten und über *ApaI* und *HindIII* in das Plasmid SK-*PHO8-lacZ* bzw. seine Variante SK-*PHO8*-UASp2(*PHO5*)-*lacZ* (Schmidt und Svaren) eingebaut. Danach wurde der veränderte *PHO8*-Promotor mit anschließendem *lacZ*-Gen als *ApaI*-*BssHIII* Fragment aus dem Plasmid herausgespalten und über *ApaI* und *BssHIII* in eine *pPHO8Z*-Variante mit einer neu eingeführten *ApaI*-Spaltstelle gebracht. Da – wie durch Sequenzierung gefunden – bereits das SK-*PHO8-lacZ*-Plasmid (bzw. seine Variante) eine 1 bp-Insertion hinter dem ATG trug, die zu einem „Frameshift“ führte und damit auch in den neuen Konstrukten vorlag, wurde von diesen das *SacI*-*SacI*-Fragment in das *pPHO8Z*-Plasmid (bzw. seine Variante) gebracht, um wieder funktionale Plasmide ohne Frameshift zu erhalten.

#### **2.4.2 Integration von veränderten *PHO8*-Promotoren in den *PHO8*-Lokus**

Für die Integration von Veränderungen des *PHO8*-Promotors in den chromosomalen *PHO8*-Lokus wurde dieser im ersten Schritt im Bereich der UASp-Elemente durch das *URA3*-Gen ersetzt. Hierfür wurde ein DNA-Fragment verwendet, das an seinen Enden jeweils eine etwa 40 bp-homologe *PHO8*-Sequenz und in der Mitte die Sequenz eines funktionalen *URA3*-Gens enthielt. Gewinnen ließ sich dieses mittels der Oligonukleotide *PHO8-URA3*int-up und *PHO8-URA3*int-do unter Verwendung einer Vorlage mit funktionalem *URA3*-Gens (pUC19-*URA3*). Die Integration des *URA3*-Gens in den Bereich der *PHO8*-UASp-Elemente wurde nach Transformation des *pho8::URA3*-Fragments in Stämmen mit Uracil-Prototrophie bestimmt.



**Abbildung 33: Graphische Darstellung der Konstruktion von episomalen Reporterplasmiden mit verändertem *PHO8*-Promotor und Integration der veränderten Promotoren in den chromosomalen *PHO8*-Lokus.** (A) Graphische Darstellung der Konstruktion von episomalen Reporterplasmiden mit Veränderungen des *PHO8*-Promotors. Die Erstellung des veränderten Promotorfragments mittels zweier PCR-Reaktionen mit anschließender Nachspaltung ist oben beschrieben. Zur besseren Orientierung sind die Restriktionsspaltstellen eingezeichnet. Die jeweils zur Klonierung verwendeten Fragmente der Plasmide sind durch gestrichelte Bögen angezeigt. (B) Zweischnittintegration von veränderten *PHO8*-Promotoren in den chromosomalen *PHO8*-Lokus. Die Orte der Rekombination sind durch Kreuze gekennzeichnet. Zum *PHO8*-spezifischen Nachweis dient die

Oligonukleotide *PHO8*upSoup und *PHO8*-UASp2-do(Z). Es entstanden Fragmente von 757 bp bei *PHO8* und *PHO8*mut sowie von 1574 bp bei *pho8::URA3*. Die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide und deren Beschreibung finden sich in Abschnitt 4.1.6..

Hierfür mußte bei erfolgreicher *URA3*-Integration in einer PCR direkt aus Hefezellen mit den *PHO8*-spezifischen Oligonukleotiden *PHO8*upSoup und *PHO8*-UASp2-do(z) ein Fragment von 1574 bp (*pho8::URA3*) erhalten werden, anstatt eines Fragmentes von 757 bp, wie es bei einem Wildtyp (*PHO8*) der Fall wäre. Im zweiten Schritt wurde ein *XhoI*-*BamHI*-Fragment (Klenow-behandelt) eines veränderten *PHO8*-Promotors (*PHO8*mut) in den oben beschriebenen Stamm (*pho8::URA3*) gebracht und seine Integration nach Verlust der Uracil-Prototrophie (FOA) mittels des oben beschriebenen Nachweises bestimmt. Bei erfolgreicher Integration entstand wieder ein 757 bp-Fragment (*PHO8*mut) (siehe Abbildung 33B).

### 2.4.3 Die Induktion des *PHO8*-Promotors ist vollständig von der Pho4-Bindung an das UASp2-Element abhängig

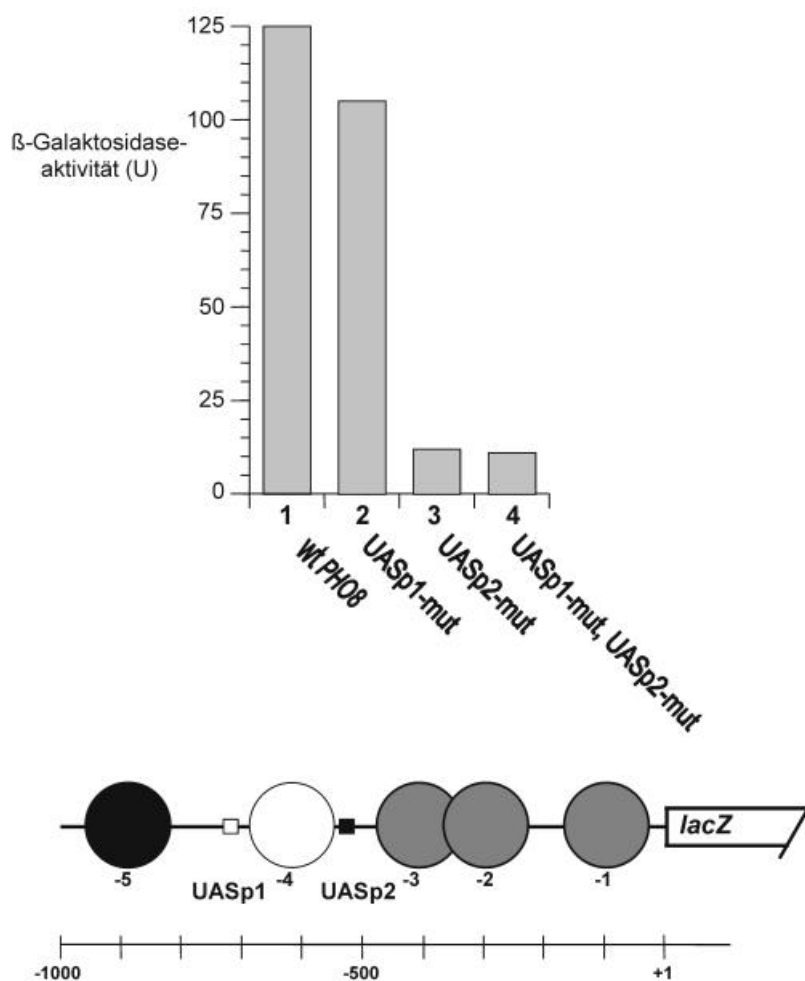
Die alkalische Phosphatase-Aktivität von Hefezellen, welche in einem phosphatfreien Medium transferiert wurden, steigt um das 2,5- bis 3fache und ist Pho4-abhängig (Tabelle 9). Eine signifikante Phosphatase-Aktivität, die in *pho4*-Zellen gemessen wird, rührt von der Präsenz einer phosphatunabhängig regulierten alkalischen Phosphatase her, kodiert vom *PHO13*-Gen (Kaneko et al. 1989). Durch Gebrauch eines *PHO8*-Promotor-*lacZ*-Konstruktes wurde ein etwa 6- bis 7facher Anstieg der Aktivität unter induzierenden Bedingungen gemessen, welcher Pho4-abhängig ist (Tabelle 9). Dies zeigt, daß die Eigenschaft des Promotors treffender durch Nutzung des *lacZ*-Konstruktes reproduziert wird. Das Ausmaß der Induktion, gemessen in *lacZ*-Konstrukten oder mittels mRNA-Spiegeln, ist um eine Größenordnung niedriger als für *PHO5* (Abbildung 24 bzw. nicht gezeigte Daten).

Stamm	Phosphataseaktivität (U)		β-Galaktosidase-Aktivität (U) <sup>a</sup>	
	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>
YS18 (wt)	40	105	19	125
YS22 ( <i>pho4</i> )	27	29	12	12

**Tabelle 9: Die Induktion des *PHO8*-Promotors ist vollkommen Pho4-abhängig.** Bestimmt wurde die Aktivität des *PHO8*-Promotors in einem Wildtyp(wt)- und einem *pho4*-Stamm unter repressiven (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen durch Messung der endogenen alkalischen Phosphataseaktivität oder durch Gebrauch eines *PHO8*-Promotor-*lacZ*-Konstruktes.



Unsere *in vitro*-Footprintexperimente erkannten zwei Pho4-Bindestellen am *PHO8*-Promotor, eine hochaffine Stelle (-521 bis -540), als UASp2 bezeichnet, mit der Pho4-Hexanukleotidkonsensussequenz, 5'CACGTG3', und eine niedrigaffine Stelle UASp1 (5'-AGCGTG-3'), mit zwei Abweichungen zum Konsensushexanukleotid, 200 Bp weiter flüßauf liegend lokalisiert ((Barbaric et al., 1992)). Sogar im reprimierten Promotor befinden sich beide Stellen in nicht-nukleosomalen hypersensitiven Regionen (siehe Schema in Abildung 34) ((Barbaric et al., 1992)). Um *in vivo* die Signifikanz von jeder der Pho4-Bindestellen zu untersuchen, wurden sie mutiert und die Aktivitäten der mutierten Promotorderivate bestimmt. Wie in Abildung 34 gezeigt, hat die Mutation der niedrigaffinen Stelle UASp1 keinen besonderen Einfluß auf die Promotoraktivität. Auf der anderen Seite verhinderte eine Mutation von UASp2 komplett die Induzierbarkeit des Promotors (siehe Abildung 34). Wie erwartet, wurde kein weiterer Effekt durch Kombinieren der Mutationen von UASp1 und UASp2 beobachtet.



**Abildung 34: Die Mutationen in den Pho4-Bindestellen UASp1 und UASp2 treffen den *PHO8*-Promotor in sehr unterschiedlicher Weise.** Gemessen wurde die Aktivität der Wildtyp- und der mutierten *PHO8*-Promotor-

varianten, jeweils fusioniert an das *lacZ*-Gen. Die Positionen von UASp1 und UASp2 als auch die Nukleosomenstruktur für den reprimierten Promotor sind unten schematisch gezeigt. Die Schattierung der Nukleosomen reflektiert den Grad des DNA-Schutzes gegen Restriktionsnukleasespaltung: schwarz = 95 %, grau = 80 %, weiß = 50 % geschützt ((Barbaric et al., 1992)).

Die Fähigkeit der beiden UAS-Elemente, die Transkription zu aktivieren, wurde ebenfalls in heterologen Konstrukten mit einem *CYCI*-minimal-Promotor gemessen, der das *lacZ*-Reportergen antreibt. In Übereinstimmung mit der Mutationsanalyse wurde gefunden, daß unter Phosphathungerbedingungen UASp2 die Transkription in Pho4-abhängiger Weise 100fach aktiviert, während keine Aktivierung mit UASp1 gemessen wurde (Tabelle 10). Diese Ergebnisse (Abbildung 34 und Tabelle 10) zeigen, daß die Induktion des *PHO8*-Promotors unter Phosphathungerbedingungen vollkommen von der Pho4-Bindung an das UASp2-Element abhängig ist, während UASp1 für die Promotoraktivität *in vivo* nicht relevant zu sein scheint.

Reporter	Stamm			
	wt		<i>pho4</i>	
	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>
UASp1 <sub>(PHO8)</sub> - <i>CYC1-lacZ</i>	4	3	4	6
UASp2 <sub>(PHO8)</sub> - <i>CYC1-lacZ</i>	5	502	4	8

**Tabelle 10: *PHO8*-UASp1 ist allein nicht aktiv, wenn es mit einem *CYCI*-minimal-Promotor getestet wird.**

Die Fähigkeit von *PHO8*-UAS-Elementen, die Transkription zu aktivieren, wurde durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in heterologen Konstrukten mit einem *lacZ*-Gen bestimmt, das durch einen *CYCI*-minimal-Promotor getrieben ist.

#### 2.4.4 Die volle Aktivierung des *PHO8*-Promotors benötigt Pho2

Es wurde berichtet, daß im Gegensatz zur sauren Phosphatase die Expression der alkalischen Phosphatase Pho2-unabhängig sei ((Oshima, 1982)). Unsere Messungen entweder der alkalischen Phosphataseaktivität (nicht gezeigt) oder des *PHO8-lacZ*-Konstrukts zeigen, daß Pho2 für die volle Induktion von *PHO8* nötig ist (Tabelle 11). In einem *pho2*-Stamm steigt die Aktivität des *PHO8*-Promotors während des Phosphathungerns nur 2- bis 2 ½fach; dies resultiert in einer deutlich niedrigeren Aktivität, als sie in einem wt-Stamm gemessen wird. Ein ähnlicher Effekt wird in einem *pho80*-Stamm beobachtet (Tabelle 11), welcher die Möglichkeit von nicht spezifischen Effekten in der Signaltransduktionsweg flußauf liegend von Pho80/85 eliminiert.

Stamm	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (U) <sup>a</sup>	
	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>
YS18 (wt)	19	125
YS19 ( <i>pho2</i> )	16	38
YS31 ( <i>pho80</i> )	70	146
YS32 ( <i>pho2, pho80</i> )	25	51

**Tabelle 11: Volle Aktivierung des *PHO8*-Promotors benötigt Pho2.** Um den Effekt von Pho2 auf die *PHO8*-Promotoraktivierung zu bestimmen, wurde die Aktivität des *PHO8-lacZ*-Konstruktes in Stämmen mit einem disruptierten *PHO2*-Gen (YS19 und YS32) und in den zugehörigen Wildtyp-Stämmen (YS18 und YS31) gemessen.

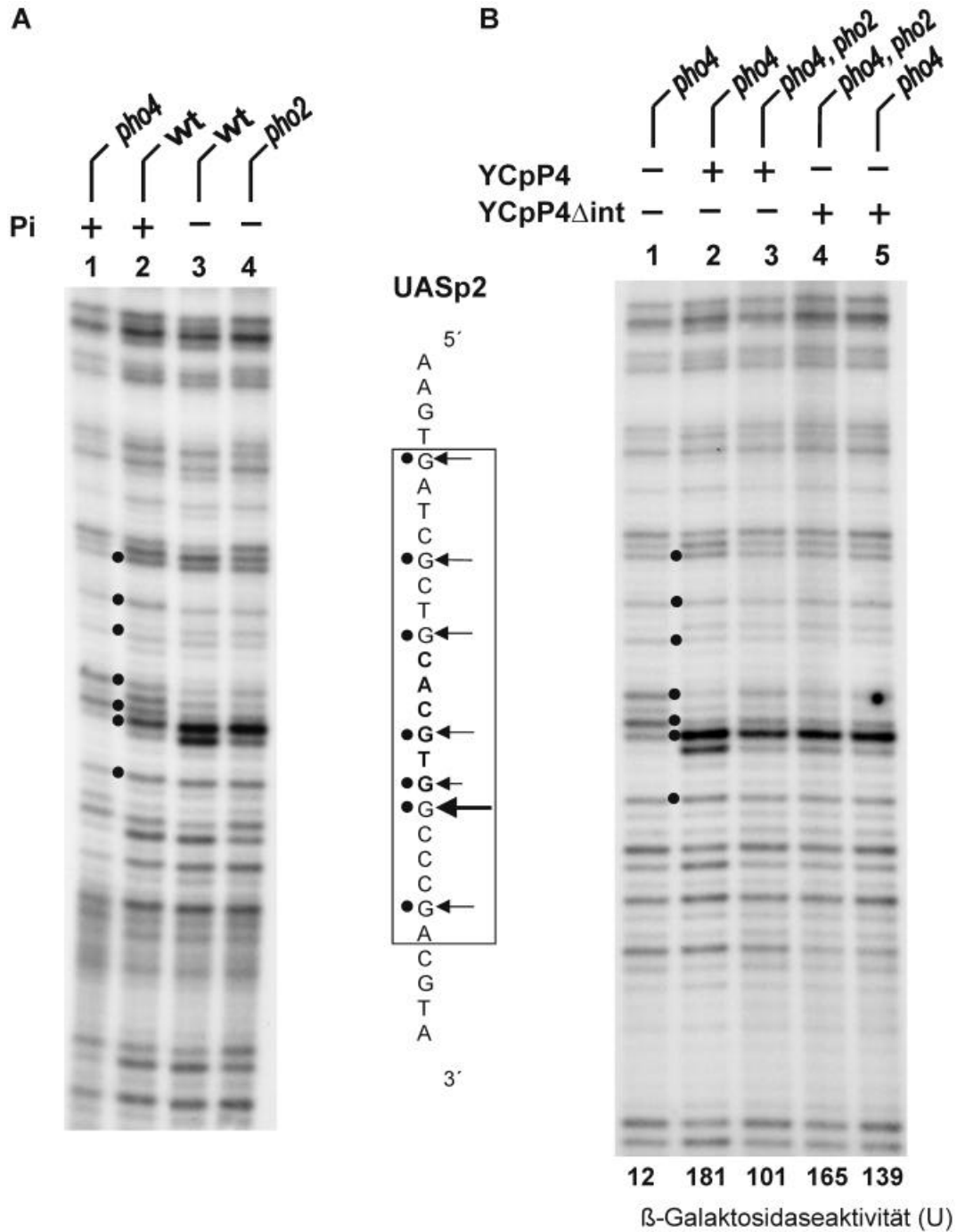
#### 2.4.5 Pho2 trägt nicht signifikant zur Pho4-Bindung an den *PHO8*-Promotor bei

Um zu bestimmen, ob Pho2 an der Aktivierung des *PHO8*-Promotors durch kooperative DNA-Bindung mit Pho4, wie am *PHO5*-Promotor demonstriert wurde, teilnimmt (Abbildung 15 und Abbildung 18 bzw. (Barbaric et al., 1998)), wurde die Bindung von Pho4 an das UASp2 des *PHO8*-Promotors in einem Wildtyp- und einem *pho2*-Stamm durch *in vivo*-DMS-Footprintanalyse untersucht (Abbildung 35A). Unter induzierenden Bedingungen gab es einen klaren Pho4-abhängigen DMS-Footprint. Die Pho4-Bindung induziert einen signifikanten Abfall in der Reaktivität des Guanin-Restes am 3'-Ende des Konsensushexanukleotids, 5'CACGTG 3' und verstärkt sehr stark die Reaktivität des benachbarten Guanins (vergleiche Spur 3 mit 1). Unter reprimierten Bedingungen wird ein intermediäres Muster beobachtet (Spur 2); dieses ähnelt mehr dem *pho4*-Muster, ist aber nicht identisch mit ihm, und zeigt eine schwache Pho4-Bindung an.

In einem *pho2*-Stamm ist die Bindung von Pho4 unter induzierenden Bedingungen wahrlich stark, und die Besetzung erreicht fast den Grad des Wildtyp-Stammes (vergleiche Spuren 4 und 3 in Abbildung 35A). Deshalb zeigen diese Experimente, daß die Rolle von Pho2 in der Aktivierung des *PHO8*-Promotors nicht unbedingt bei der Pho4-DNA-Bindung zum Tragen kommt; dies ist damit ein bemerkenswerter Unterschied zu *PHO5* ((Barbaric et al., 1998)).

Die Tatsache, daß die Pho4-Bindung am *PHO8*-Promotor größtenteils Pho2-unabhängig ist, führt zu der Vermutung, daß das Pho4-Derivat (Pho4 $\Delta$ int) – dem die Pho2-Interaktions-

domäne fehlt (Aminosäuren 200 bis 247) und das unfähig ist, die *PHO5*-Transkription zu aktivieren ((Barbaric et al., 1998)) – hier binden und den *PHO8*-Promotor aktivieren sollte. Dies ist in der Tat der Fall: Pho4 $\Delta$ int bindet stark an den *PHO8*-Promotor in Pho2-unabhängiger Weise und kann den Promotor fast so gut aktivieren wie natives Pho4 in einem Wildtyp-Stamm (Abbildung 35B).



**Abbildung 35: Pho4 bindet an das *PHO8*-UASp2-Element in Pho2-unabhängiger Weise.** Pho4-Bindung unter reprimierenden (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen (A) oder Pho4 $\Delta$ int Bindung unter induzierenden Bedingungen (B) an UASp2 in einem Wildtyp- und einem *pho2*-Stamm mittels DMS-Footprinttechnik

analysiert. Die benutzten Hefestämme waren YS45 (wt), YS46 (*pho4*), YS42 (*pho2*) und YS78 (*pho2, pho4*). Alle Stämme tragen eine *CPF1*-Deletion, um eine mögliche Cpf1-Bindung an diese Stelle zu verhindern. Die Stämme exprimieren Pho4wt oder Pho4 $\Delta$ int von Centromer-Expressionsplasmiden. Die durch DNaseI-Footprints bestimmte Sequenz der Pho4-Bindestelle ((Barbaric et al., 1992)) ist im Kästchen auf der Seite gezeigt. Guanine sind durch Punkte und Pfeile markiert; mittlere Pfeile kennzeichnen Guanine, deren Reaktivität sich durch DMS nicht veränderte; die kleinen Pfeile beschreiben Guanine, die durch Pho4 geschützt sind. Die großen Pfeile kennzeichnen Guanine, welche hypersensitiv gegenüber DMS werden. Oben angezeigt ist die Defizienz benutzter Stämme und zusätzlich die Proteinexpression für jede Spur. Die *lacZ*-Aktivität des *PHO8*-Promotors in den unterschiedlichen Stämmen ist unter dem Gel gezeigt (B).

In einem *pho2*-Stamm aktiviert Pho4 $\Delta$ int stärker als Pho4wt; dies zeigt das Aktivierungspotential von Pho4 $\Delta$ int in Abwesenheit von Pho2 an, welches früher bereits für das UASp2 des *PHO5*-Promotors dargestellt worden ist (siehe Diskussion bzw. (Barbaric et al., 1998)). Wir schlossen deshalb, daß die vorrangige Rolle von Pho2 am *PHO8*-Promotor darin besteht, das Aktivierungspotential von Pho4 zu erhöhen.

#### **2.4.6 Die Einführung des *PHO5*-UASp1 erhöht die transkriptionelle Aktivität des *PHO8*-Promotors**

Der *PHO8*-Promotor ist bei genauerer Betrachtung nur durch ein UAS-Element aktiviert (Abbildung 34), während zwei UAS-Elemente, UASp1 und UASp2, kooperativ den *PHO5*-Promotor aktivieren (Tabelle 6). Deshalb könnten die Unterschiede in der Stärke der beiden Promotoren eine Konsequenz der Anzahl und der Qualität ihrer UAS-Elemente sein.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden *PHO8*-Promotorderivate durch Ersetzen ihrer UAS-Elemente gegen die korrespondierenden Elemente von *PHO5* konstruiert. Das Einführen des UASp1-Elements des *PHO5*-Promotors am Ort des korrespondierenden *PHO8*-Elements resultierte in einer 2fach höheren Promotoraktivität (Abbildung 36).

Dieses Ergebnis zeigt, daß Pho4 an das UASp1-Element des *PHO5*-Promotors binden kann, auch wenn es in den Kontext des *PHO8*-Promotors eingegliedert ist. Der Einbau des UASp1-Elements des *PHO5*-Promotors in einer andererseits inaktiven *PHO8*-Promotorvarianten, die ein mutiertes UASp2-Element enthält, zeigt, daß ein UASp1 des *PHO5*-Promotors allein für sich selbst nicht die Transkription aktivieren kann (Abbildung 36). Deshalb muß die höhere Aktivität des Hybridpromotors das Ergebnis der kooperativen Interaktionen zwischen dem *PHO5*-UASp1 und dem *PHO8*-UASp2 sein.

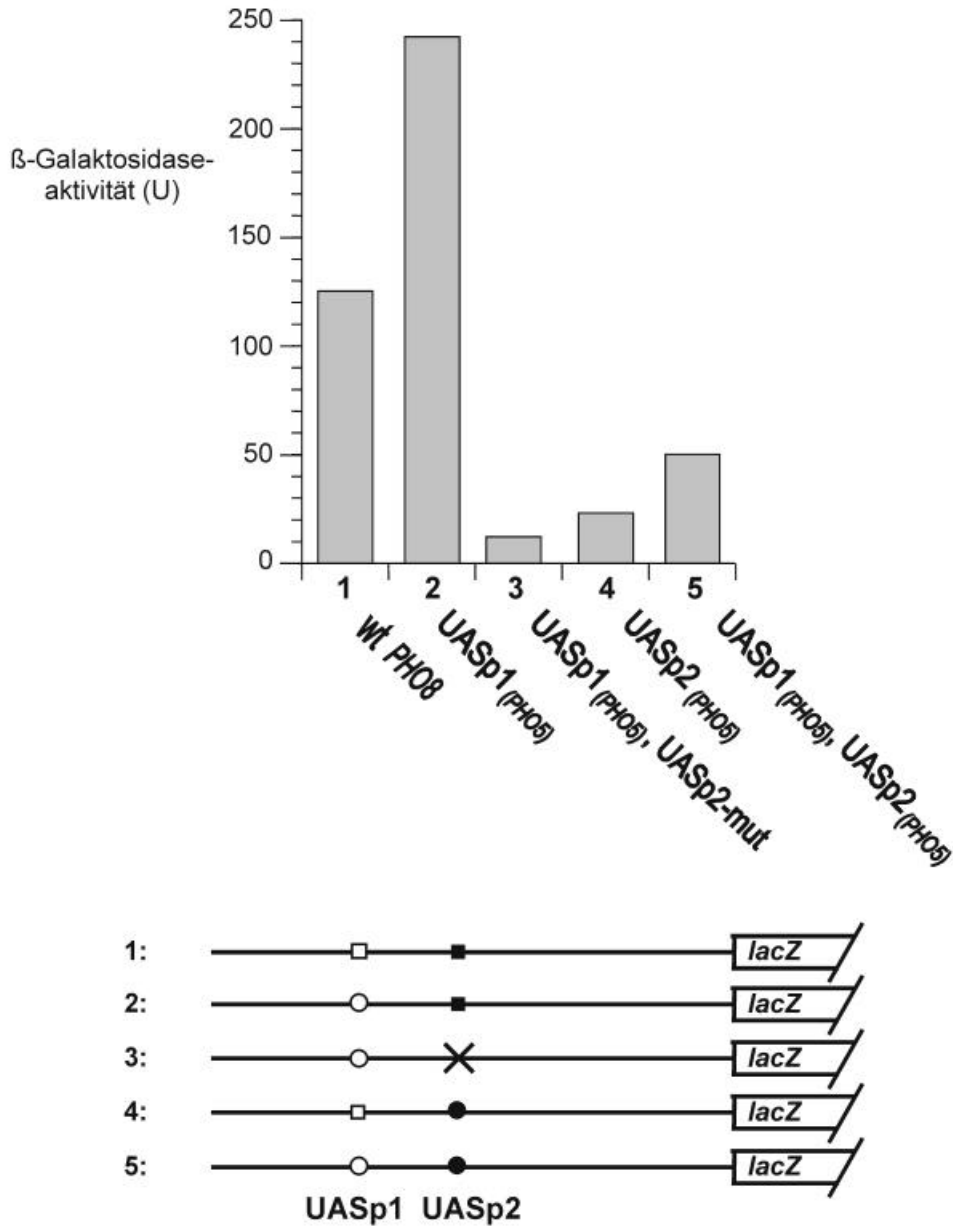


Abbildung 36: Aktivitäten der *PHO8*-Promotorvarianten mit UAS-Elementen des *PHO5*-Promotors. Der Wildtyp-Promotor und Promotorvarianten mit UAS-Elementen vom *PHO5*-Promotor sind schematisch unten gezeigt. Die offenen und gefüllten Rechtecke repräsentieren jeweils *PHO8*-UASp1 und -UASp2 und die Kreise die zugehörigen Elemente von *PHO5*.

### 2.4.7 Ersetzen des UASp2-Elements durch das *PHO5*-UASp2-Element schwächt den *PHO8*-Promotor

Obwohl die Aktivität des *PHO8*-Promotors signifikant durch das Einführen des *PHO5*-UASp1 anstieg, ist sie noch weit von der *PHO5*-Promotoraktivität entfernt. Es wurde gezeigt, daß UASp1 am *PHO5*-Promotor seine volle Aktivität durch kooperative Interaktion mit UASp2 entwickelt (diese Arbeit und (Barbaric et al., 1998)). Deshalb hoffte ich bestimmen zu

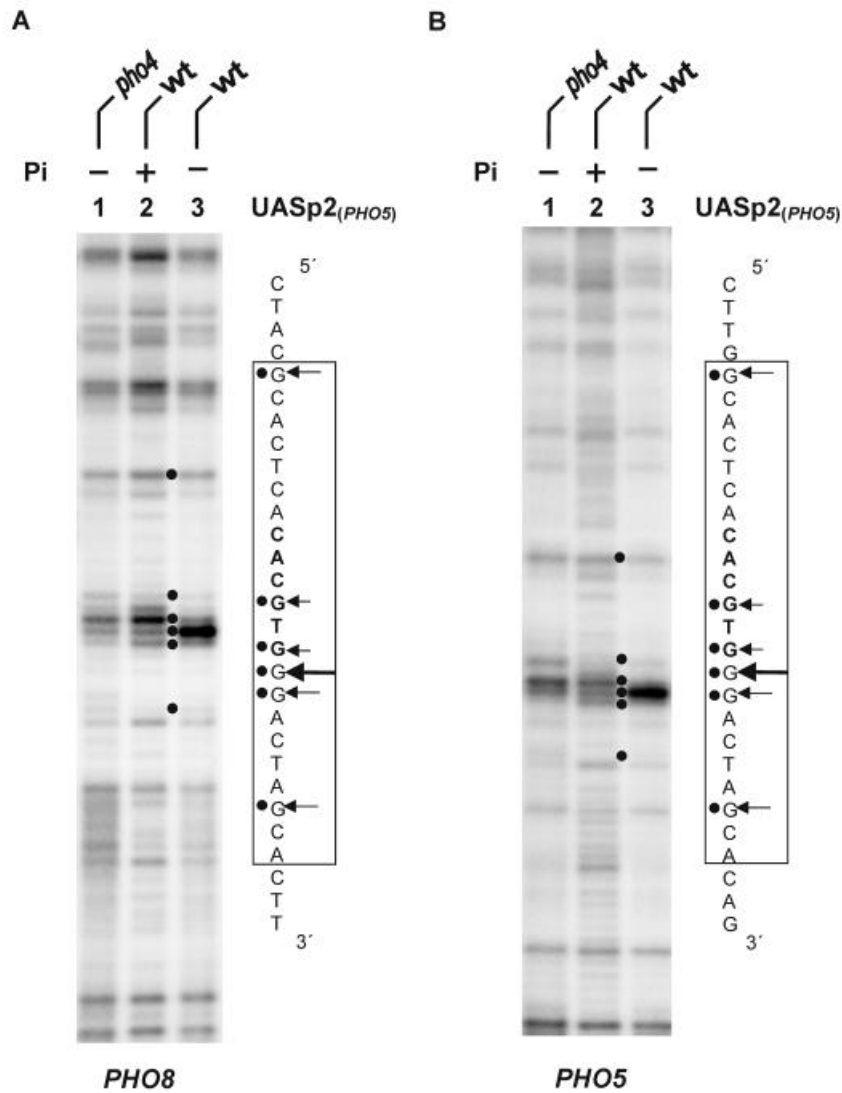
können, ob durch das Einführen von beiden UAS-Elementen UASp1 und UASp2 von *PHO5* ein höherer kooperativer Effekt und korrespondierend dazu eine höhere Aktivität erzielt würde. In einem ersten Schritt ersetzen wir das *PHO8-UASp2* durch das *PHO5-UASp2*. Überraschenderweise inaktivierte dieser Austausch fast vollständig den Promotor (Abbildung 36), und sogar das Einführen beider *PHO5-UAS*-Elemente in den *PHO8*-Promotor ergab nur 20 % der Aktivität, wie mit der Promotorvarianten mit dem UASp1-Element des *PHO5*-Promotors und dem nativen UASp2-Element bestimmt werden konnte (Abbildung 36). Diese Ergebnisse zeigen, daß in der Umgebung des *PHO8*-Promotors das UASp2-Element des *PHO5*-Promotors bei weitem schwächer ist als das UASp2 von *PHO8*, obwohl beide Elemente dasselbe Konsensushexanukleotid enthalten und zur gleichen Klasse von hochaffinen Pho4-Bindestellen gehören ((Ogawa et al., 1994)).

Ferner sollte bestimmt werden, ob die großen Unterschiede im Aktivierungspotential zwischen dem UASp2-Elementen der *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren eine intrinsische Eigenschaft dieser Elemente oder abhängig vom Promotorkontext sind. Hierfür wurden beide Elemente in einem *CYCI*-Minimal-Promotor mit anschließendem *lacZ*-Reporter gen getestet. Das UASp2 des *PHO5*-Promotors ergab eine 2,5fach geringere Aktivierung als das UASp2 des *PHO8*-Promotors (nicht gezeigt und Tabelle 10), was nur teilweise die sehr geringe Aktivität des *PHO8*-Promotorderivats mit dem UASp2 des *PHO5*-Promotors erklärt.

#### **2.4.8 Die niedrige Aktivität des in den *PHO8*-Promotor plazierten *PHO5-UASp2*-Elements ist nicht mit der Unfähigkeit, Pho4 zu rekrutieren, erklärbar**

Die geringe Aktivität, die mit dem *PHO8*-Promotorderivat mit dem UASp2-Element von *PHO5* (Abbildung 36) auftritt, könnte ein Ergebnis einer ineffizienten Bindung von Pho4 an dieses Element in der *PHO8*-Promotorumgebung sein. Deshalb wurde diese Promotorvariante in den chromosomalen Lokus integriert und die Pho4-Bindung an dieses Element *in vivo* durch DMS-Footprintanalyse bestimmt.

Wie in Abbildung 37 gezeigt, gibt es eine starke Bindung von Pho4 an das *PHO8*-Promotorderivat, welche ununterscheidbar von der Pho4-Bindung an das gleiche Element am nativen *PHO5*-Promotor ist. Dies zeigt, daß die Ineffizienz der *PHO8*-Promotorvarianten nicht von der Unfähigkeit des Pho4-Proteins herrührt, an seine Zielsequenz zu binden.

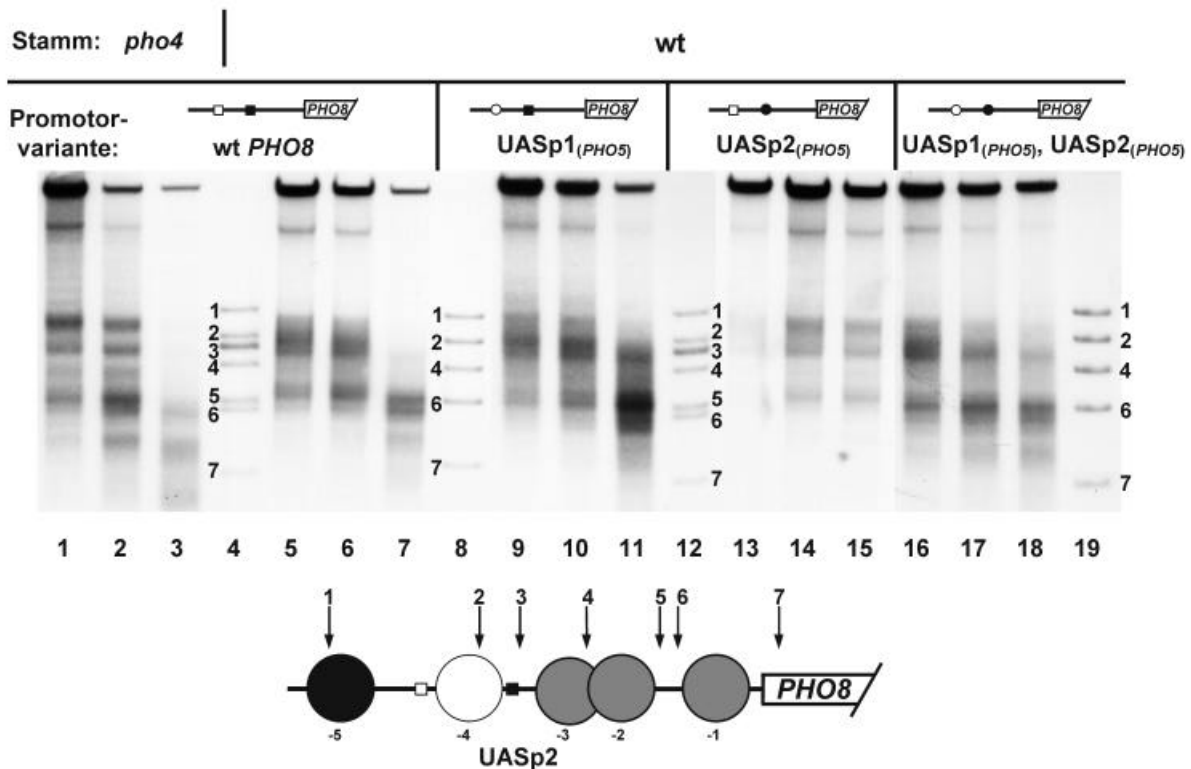


**Abbildung 37: Pho4 bindet auch im Kontext des *PHO8*-Promotors effizient an *PHO5*-UASp2.** Die DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an das in den *PHO8*-Promotor gebrachten *PHO5*-UASp2 (A), oder an das gleiche Element in seiner natürlichen Lokalisation im *PHO5*-Promotor (B). Für Details siehe Abbildung 35.

#### 2.4.9 Die Pho4-Bindung ist allein nicht ausreichend für eine Chromatin-Umordnung und Aktivierung des *PHO8*-Promotors

Die Induzierung des *PHO8*-Promotors resultiert in einer Umordnung der Chromatinstruktur des Promotors ((Barbaric et al., 1992)). Im Gegensatz zum *PHO5*- ist die Umordnung am *PHO8*-Promotor nur partiell; die niedrigere Aktivität des *PHO8*-Promotors (Repression) scheint hier durch das übriggebliebene Chromatin verursacht zu sein. Das Einführen von *PHO5*-UAS-Elementen in den *PHO8*-Promotor ergab Varianten von ganz unterschiedlicher Aktivität und ermöglichte eine Korrelation der Pho4-DNA-Bindung mit dem Grad der Chromatin-Umordnung und Promotoraktivierung.





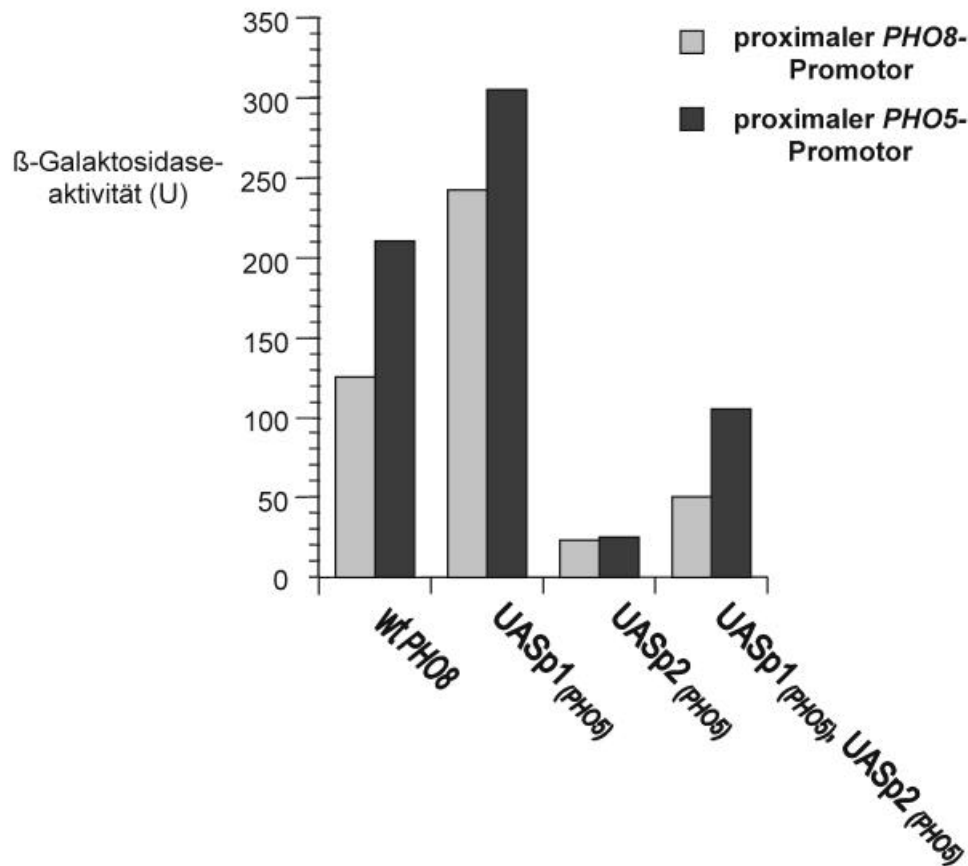
**Abbildung 38: Chromatin-Umordnungen bei der Induktion des Wildtyp-*PHO8*-Promotors oder von Promotorvarianten mit *PHO5*-UAS-Elementen.** Alle Hefezellkerne wurden von Stämmen gewonnen, welche in einem phosphatfreien Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit ansteigenden DNaseI-Konzentrationen (0,25, 0,5 und 1 U/ml in jeden Fall) gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *Bgl*III gespalten, in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt, transferiert und mit dem *Pvu*II/*Xho*I-Fragment hybridisiert. Die Markerbanden enthalten Doppelspaltungen gereinigter genomischer DNA mit *Bgl*III und entweder *Eco*RV (1), *Hpa*I (2), *Pml*I (3), *Nhe*I (4), *Rsa*I (5), *Hind*III (6) oder *Xho*I (7). Die nukleosomale Struktur des Promotors unter repressiven Bedingungen ist unten gezeigt; sie enthält zusätzlich die Positionen der Restriktionsstellen, die gebraucht wurden, um Markerfragmente zu generieren. Während der Induktion durchlaufen Nucleosom -5 (schwarzer Kreis) keine, Nucleosomen -1, -2 und -3 (graue Kreise) teilweise und Nucleosom -4 (weißer Kreis) eine komplette Chromatin-Umordnung ((Barbaric et al., 1992)).

Die Chromatinstruktur von den Promotorvarianten mit den *PHO5*-UAS-Elementen wurde durch DNaseI-Analyse bestimmt, die Ergebnisse sind in Abbildung 38 gezeigt. Das Einführen des *PHO5*-UASp1 in den *PHO8*-Promotor resultierte in einer zweifach höheren Promotoraktivität (Abbildung 36) und in einer – verglichen mit dem nativen Promotor – extensiveren Chromatin-Umordnung (Abbildung 38, Spuren 9-11 vs 5-7). Die erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins wird bestätigt durch Analysen mit Restriktionsnucleasen, welche einen etwa 20%igen Anstieg der Zugänglichkeit in der Region zeigt, die von Nucleosom -3 und -2 besetzt ist (nicht gezeigt). Das Einführen des UASp1-Elements des *PHO5*-Promotors resultierte in der Tat nicht in einer komplett offenen Chromatinstruktur. Eine solche ist typisch für den *PHO5*-Promotor ((Almer et al., 1986)), da dort weiter ein signifikanter Schutz

in der Region existiert, welche durch die Nukleosomen -3 und -2 bedeckt ist. Auf der anderen Seite ähnelt die Chromatinstruktur der schwach aktiven *PHO8*-Promotorvarianten mit dem UASp2-Element des *PHO5*-Promotors der Struktur des reprimierten Promotors, wie sie in *pho4*-Zellen gefunden wird (vergleiche Abbildung 38, Spuren 13-15 vs. Spuren 1-3) Dies ist der Fall, obwohl die *in vivo*-Footprintdaten eine gute Bindung von Pho4 an dieses UAS-Element zeigen. Das zusätzliche Einführen des *PHO5*-UASp1 in diese Promotorvariante erhöhte seine Aktivität 2- bis 3fach und vergrößerte die Chromatin-Umordnung auf das Maß des Wildtyp-Promotors. Diese Daten unterstützen deshalb stark die Ansicht, daß nicht die Pho4-Bindung an den Promotor als der kritische Schritt in der *PHO8*-Promotoraktivierung zu sehen ist, sondern seine Fähigkeit, Chromatin umzuordnen.

#### **2.4.10 Das Ersetzen des basalen *PHO8*-Promotors durch den basalen *PHO5*-Promotor erhöht die Aktivität des Hybridpromotors**

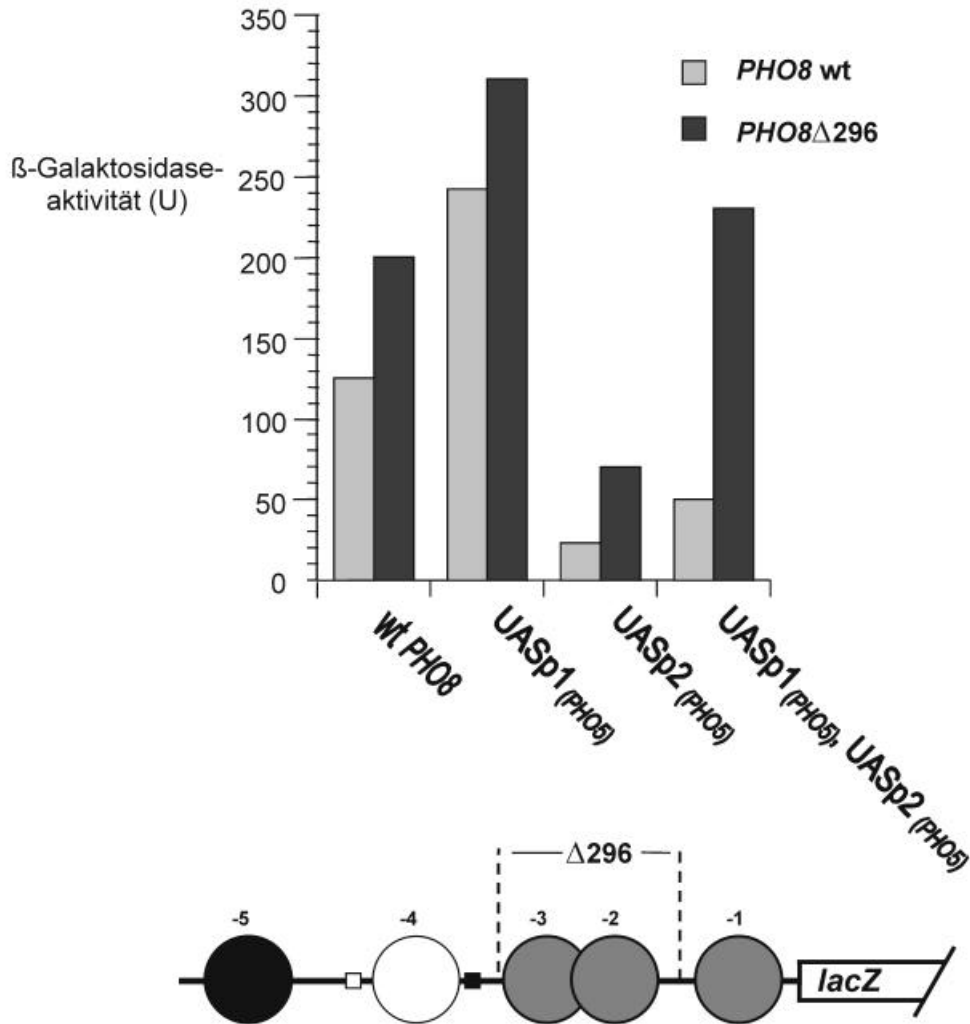
Die Gesamtaktivität von Promotoren hängt nicht nur von der Anzahl und Qualität der UAS-Elemente, sondern auch vom jeweiligen basalen Promotor ab. Um den Beitrag im Falle von *PHO8* zu erhalten, ersetzte ich den basalen *PHO8*- durch den basalen *PHO5*-Promotor. Das Ergebnis – präsentiert in Abbildung 39 – zeigt, daß durch die Substitution die Aktivität der Hybridpromotoren um fast einen Faktor 2 erhöht ist, und dies gegenüber beiden, dem Wildtyp-Promotor als auch der Variante mit den zwei UAS-Elementen des *PHO5*-Promotors. Auf der anderen Seite profitiert die Aktivität einer bereits sehr starken Promotorvarianten mit dem nativen basalen Promotor und dem UASp1-Elements des *PHO5*-Promotors zusammen mit dem nativen UASp2 von *PHO8* viel weniger vom *PHO5*-Basalpromotor, da seine Aktivität nur um zusätzliche 20-30 % steigt. Die schwache Promotorvariante mit dem *PHO5*-UASp2 war nicht im geringsten durch den heterologen basalen Promotor betroffen. Der Grund für das Fehlen irgendeiner Stimulation mag in der Schwierigkeit von Pho4 liegen, mit dem „core“-Promotor zu interagieren, da reprimierende Nukleosomen (siehe Abbildung 39, Spuren 13-15) den Promotor besetzen. Dieses Ergebnis macht es unwahrscheinlich, daß der positive Effekt des *PHO5*-Basalpromotors in der *PHO8*-Umgebung von einer unterschiedlichen Stabilität der geformten Nukleosomen über der TATA-Region herrührt.



**Abbildung 39:** Das Ersetzen des basalen *PHO8* durch den basalen *PHO5*-Promotor erhöht die Promotoraktivität. Der proximale Promotor (Position -142 bis -1) des *PHO8*-Promotors und Varianten daraus wurde durch ein 159 Bp-proximales Promotorfragment von *PHO5* ersetzt, und die Aktivitäten dieser Konstrukte wurden gemessen.

#### 2.4.11 Die durch die Nukleosomen -3 und -2 bedeckte *PHO8*-Promotorregion bewirkt einen repressiven Effekt

Die Chromatinstrukturanalysen und Aktivitätsmessungen der Promotorvarianten, die analysiert wurden, zeigten bisher eine enge Korrelation zwischen dem Grad der Chromatin-Umordnung und der Promotoraktivität. Im Detail: Die Existenz der Nukleosomen -3 und -2 im Kontrast zu dem Nukleosom -4 ((Barbaric et al., 1992) und Abbildung 38, Spuren 5-7) mag einen repressiven Effekt auf den Promotor aufzeigen. Deshalb entschied ich mich, zu untersuchen, wie sich eine Deletion dieser Promotorregion auf die Promotoraktivität auswirken würde.



**Abbildung 40: Deletion der *PHO8*-Promotorregion besetzt durch die Nukleosomen -3 und -2 erhöht die Promotoraktivität.** Verglichen wurden die Aktivitäten des Wildtyp-Promotors und Varianten mit ausgetauschten UAS-Elementen mit den korrespondierenden Promotorkonstrukten mit Deletion der Region, die normal durch die Nukleosomen -3 und -2 bedeckt ist, *PHO8* $\Delta$ 296 (siehe Schema unten).

Abbildung 40 zeigt, daß diese Deletion in einem fast 2fachen Anstieg der Promotoraktivität resultiert. Ebenfalls betroffen ist die Aktivität der stärkeren Promotorvarianten mit dem *PHO5*-UASp1, welche bereits ein höheres Ausmaß der Umordnung im Bereich der Nukleosomen -3 und -2 als der Wildtyp-Promotor zeigt (siehe Abbildung 38, Spuren 9-11 vs. 5-7). Dies ist aber, wie erwartet, in einem weit geringeren Umfang (~25 %) der Fall und steht in Übereinstimmung mit der geringeren Chromatinrepression in diesem Kostrukt. Auf der anderen Seite ist die Aktivität der schwächeren Promotorvarianten mit dem *PHO5*-UASp2, das fast keine Chromatin-Umordnung zeigt (siehe Abbildung 38, Spuren 13-15), durch diese Deletion 4fach erhöht. Die Ergebnisse zeigen eine gute Korrelation zwischen der Resistenz von Chromatin gegenüber Pho4-vermittelter Umordnung und dem Grad der Stimulierung

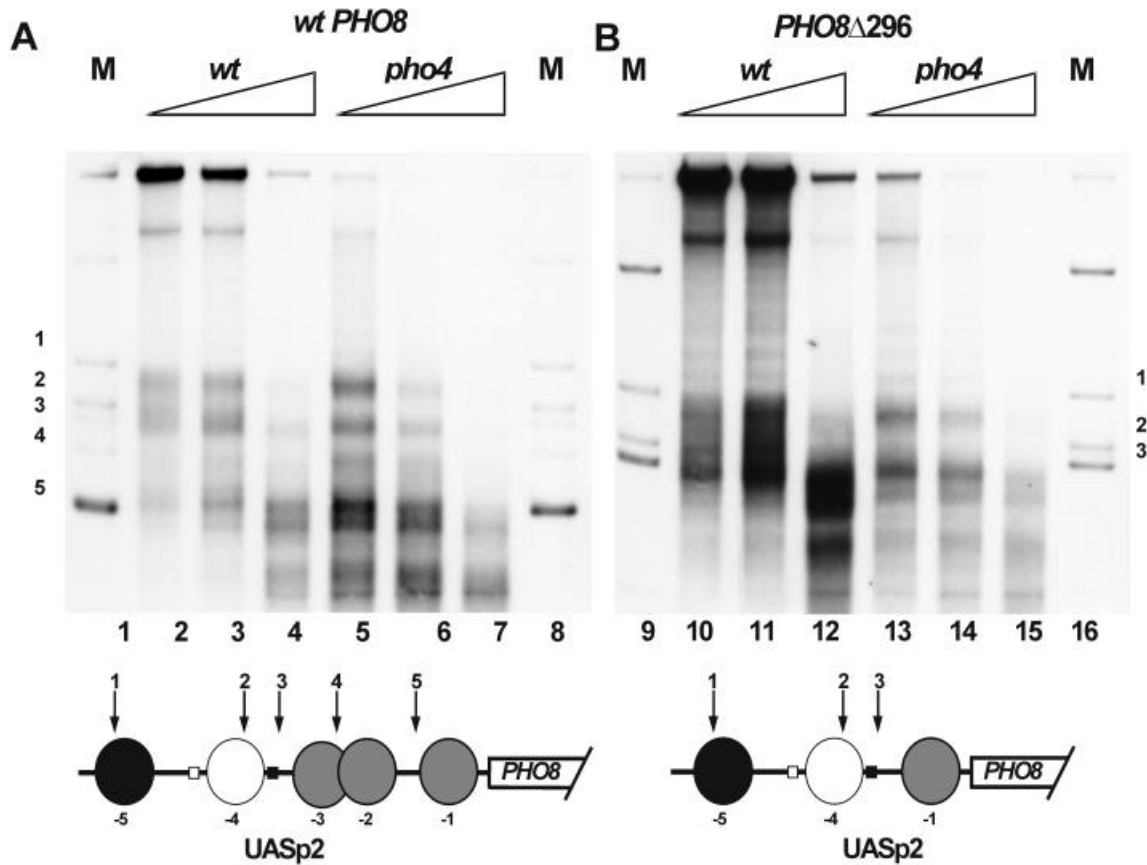
durch das Entfernen der Nukleosomen -2 und -3. Sie sind vereinbar mit der Auffassung, daß der Effekt der Deletion bei weitem eher eine Konsequenz der Verminderung der Chromatinrepression als nur ein reiner Abstandseffekt ist.

#### **2.4.12 Der *PHO8*-Promotor ist unter Hochphosphatbedingungen nicht völlig reprimiert**

Wie bereits gezeigt, besteht unter absoluter *PHO8*-Repression (*pho4*) eine hochgeordnete Chromatinstruktur am Promotor, bestehend aus drei hypersensitiven Regionen, etwa 820-690, 540-510 und 230-160 Bp flüßauf liegend des Initiationskodons, umgeben von in Nukleosomen organisierter DNA. Die zwei Pho4-Bindestellen am *PHO8*-Promotor – eine wenig affine Stelle bei -728 und eine hochaffine Stelle bei -532 Bp – befinden sich in hypersensitiven Stellen.

Es stellt sich die Frage, wie starr diese hochgeordnete Chromatinstruktur unter nichtinduzierenden Bedingungen (+P<sub>i</sub>) ist, da bereits eine geringe Aktivierung unter Hochphosphatbedingungen auftrat (siehe Tabelle 9), die Pho4- und auch Pho2-abhängig zu sein scheint. Für die Aktivität des *PHO5*-Promotors ist, wie aus Abbildung 34 ersichtlich, das UASp2-Element von entscheidender Bedeutung. Wie aus Abbildung 35B ersichtlich, besteht bereits unter Hochphosphatbedingungen eine deutliche Bindung (20 %) des Pho4-Proteins an das UASp2-Element. Chromatinanalysen des *PHO8*-Promotors zeigen bereits unter Hochphosphatbedingungen (Abbildung 41A) ein unterschiedliches Bild.

Die Chromatinstruktur ist teils nicht absolut geschlossen, d. h. es kommt zu einer flüßauf liegenden Erweiterung der zweiten hypersensitiven Region (HS2), in der sich das UASp2-Element befindet. Diese Erweiterung der HS2 konnte in einem *pho2*-Stamm unter Hochphosphatbedingungen nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Das ließ bereits die geringe Aktivität vermuten (ähnlich der Aktivität in einem *pho4*-Stamm), die in diesem Stamm auftrat. Diese Erweiterung der HS2 hat eine Destabilisierung des Nukleosoms -4 zur Folge; eine weitere Destabilisierung des Nukleosoms -4 ist in dem Stamm zu beobachten, der eine *PHO8*-Promotorvariante mit einer Deletion der Region enthält, die normalerweise von den Nukleosomen -3 und -2 besetzt ist. Die Destabilisierung des Nukleosoms -4 ist Pho4-abhängig und bedarf auch hier wiederum der Hilfe des Pho2-Proteins (siehe Abbildung 41B).



**Abbildung 41: Lokale Chromatin-Umordnung unter Hochphosphatbedingungen am Wildtyp-*PHO8*-Promotor und der Promotorvarianten mit der Deletion des Bereichs von Nukleosom -3 und -2.** Chromatinanalysen unter Hochphosphatbedingungen am Wildtyp-*PHO8*-Promotor (A) und der Promotorvarianten mit der Deletion des Bereichs von Nukleosom -3 und -2 (B). Alle Hefezellkerne wurden von Stämmen gespalten, die in Anwesenheit von Phosphat gewachsen sind, und zwar 20 min bei 37°C mit ansteigenden DnaseI-Konzentrationen (0,25, 0,5 und 1 U/ml in jeden Fall). Die DNA wurde isoliert, mit *Bgl*III gespalten, in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt, transferiert und hybridisiert mit dem *Pvu*II/*Xho*I-Fragment. Die Markerbanden enthalten Doppelspaltungen gereinigter genomischer DNA mit *Bgl*III und entweder *Eco*RV (1), *Hpa*I (2), *Pml*I (3), *Nhe*I (4), oder *Hind*III (5). Unten gezeigt ist die nukleosomale Struktur des Promotors unter repressiven Bedingungen mit den Positionen der Restriktionsstellen, die gebraucht wurden, um Markerfragmente zu generieren. Während der Induktion durchlaufen Nukleosom -5 (schwarzer Kreis) keine, Nukleosomen -1, -2 und -3 (graue Kreise) teilweise, und Nukleosom -4 (weißer Kreis) eine komplette Chromatin-Umordnung ((Barbaric et al., 1992)).

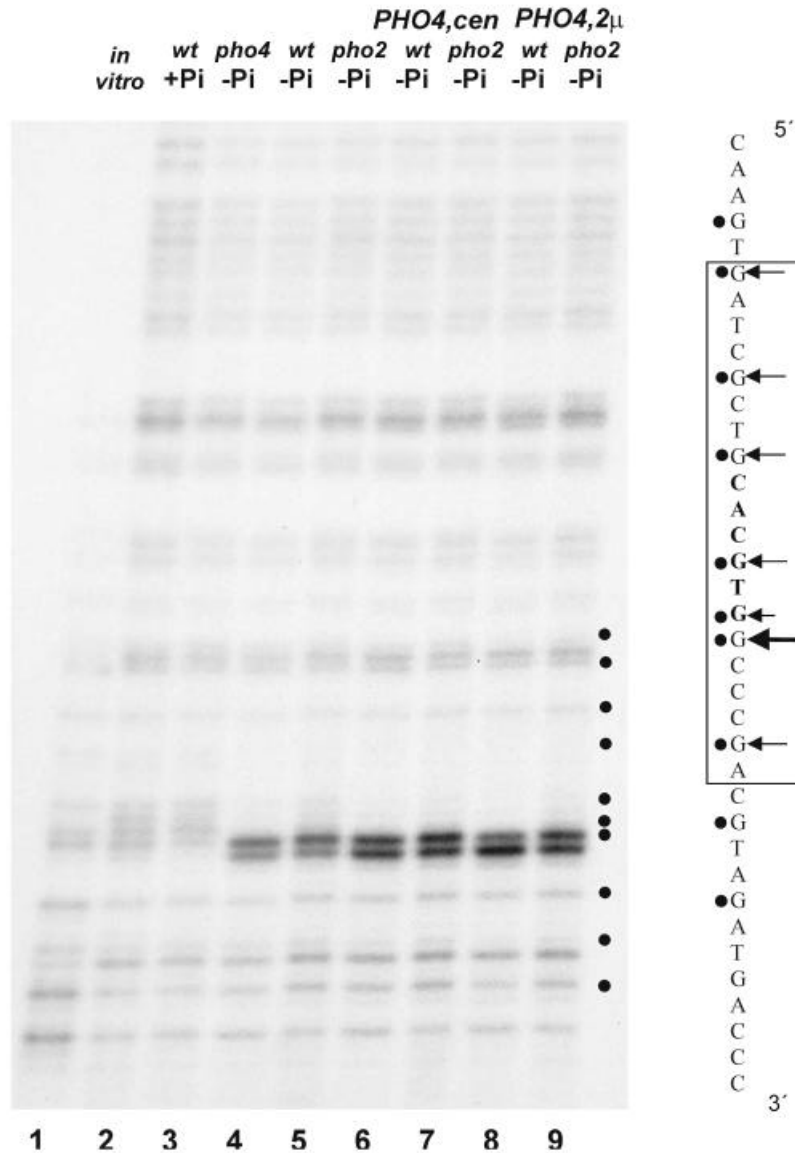
In Stämmen, die *Pho4*-episomal auf Hefeexpressionsplasmiden (cen bzw. 2 $\mu$ ), mit 1-3 bzw. 50-60 zusätzlichen Kopien pro Zelle exprimierten, nahm die Aktivität deutlich zu und war in weit geringerem Maße von *Pho2*-abhängig (siehe Tabelle 12).

Stamm	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (U) <sup>a</sup>	
	Wt	<i>pho2</i>
YS18 (wt)	125	38
YS18+ <i>PHO4</i> (cen)	190	120
YS18+ <i>PHO4</i> (2 $\mu$ )	285	255

**Tabelle 12: Auswirkung einer Pho4-Überproduktion auf die *PHO8*-Promotoraktivität.** Bestimmt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von *PHO8-lacZ* Reporterplasmiden unter nichtinduzierenden (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen im Wildtyp-Stamm und einem *pho2*-Stamm, welche zusätzlich ein Pho4-Expressionsplasmid enthielten, das auf cen- bzw. 2 $\mu$ -Level exprimierte, im Vergleich zur chromosomalen Pho4-Expression. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden.

Es war zu vermuten, daß die Konzentration von Pho4 in der Zelle starken Einfluß auf seine Bindung an das UASp2-Element des *PHO8*-Promotors hat und Pho2 unterschiedlich stark zu dessen Bindung beitragen kann. Es wurden deshalb *in vivo*-Footprintanalysen von Stämmen mit erhöhtem Pho4-Gehalt im Wildtyp und *pho2*-Hintergrund durchgeführt. Das Experiment zeigte Folgendes (siehe Abbildung 42): Stärker exponiert wird nicht nur das G (Guanin), welches dem zentralen Hexanukleotid angeschlossen ist, sondern vor allem das nächste Nukleotid, was somit auch eine qualitative Änderung der Bindung widerspiegeln dürfte. In *pho2*-Stämmen kommt es im Vergleich zum Wildtyp-Stamm jeweils nur zu einer geringen Veränderung dieser oben erläuterten qualitativen Änderung.

Dies kann als Beweis dafür verstanden werden, daß Pho2 – neben dem entscheidenden Beitrag bei der Exponierung des Aktivierungspotentials – auch eine Aufgabe bezüglich der Art oder Qualität der Bindung zugeschrieben werden kann. Diese Aufgabe der „Qualitätssicherung“ bei der Bindung scheint insbesondere bei schwacher Pho4-Bindung mit drastischen Aktivitätssteigerungen verknüpft zu sein.



**Abbildung 42: Pho4-Überexpression erhöht die Bindung an das UASp2 des *PHO8*-Promotors in Wildtyp- und *pho2*-Stämmen.** Die DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an das *PHO8*-UASp2 in Wildtyp-Stämmen und *pho2*-Stämmen. Für Details siehe Abbildung 35.

**2.4.13 Untersuchungen zur Gcn5-Abhängigkeit des *PHO8*-Promotors**

Der *PHO8*-Promotor besitzt nur ein effizientes hochaffines UAS-Element: das UASp2, rund 532 Bp flüßauf liegend der Initiationsstelle in einer hypersensitiven Region gelegen. Obwohl eine signifikante Umordnung der Chromatinstruktur des *PHO8*-Promotors stattfindet, bedarf es zur Chromatinöffnung nicht der Hilfe des Pho2-Proteins. Während der Derepression von *PHO8* gehen die zwei flüßauf liegenden hypersensitiven Stellen mit den Pho4-Bindestellen ineinander über; diese Transition ist Pho4-abhängig. Es bestehen Regionen mit intermediärer Zugänglichkeit flüßauf und flüßab liegend der dritten hypersensitiven Stelle, an deren



weiteren Verlauf später die TATA-Box anknüpft. Es scheint, daß diese Regionen in instabile oder teils entfaltenen Nukleosomen organisiert sind. Auch Deletionsanalysen (siehe Abbildung 40) zeigen deutlich den repressiven Chromatineffekt dieser Region. In Hefe können zwei unterschiedlich wirkende Komplexe einen Beitrag zur Chromatin-Umordnung leisten: der HAT-Aktivität beinhaltende SAGA-Komplex mit der HAT Gcn5 und der mittels ATPase-Aktivität wirkende Swi/Snf-Komplex. Da Gcn5 immerhin eine Rolle bei der submaximalen Aktivierung des *PHO5*-Promotors spielt, war zu vermuten, daß deutlich größere Effekte bei dem *PHO8*-Promotor zu erwarten sind, der den Kriterien für Gcn5- bzw. Snf2-Abhängigkeit (schwacher Promotor mit einem UASp-Element und reprimierender Chromatinstruktur) weitaus besser entspricht.

#### 2.4.14 Der *PHO8*-Promotor bedarf zur Aktivierung der Acetylierung durch Gcn5

Um zu testen, ob die Histonacetylierung durch Gcn5 von Bedeutung für die Aktivierung des *PHO8*-Promotors ist, wurde das *GCN5*-Gen im YS18 deletiert. In diesen *gcn5*-Stamm wurde ein episomales *PHO8-lacZ*-Hybridkonstrukt eingebracht und die Aktivität bestimmt. Wie aus Tabelle 13 ersichtlich, ist der *PHO8*-Promotor im *gcn5*-Stamm um den Faktor 8 unter normalerweise induzierenden Bedingungen reprimiert, was nur der basalen Aktivität unter nichtinduzierenden Bedingungen (+P<sub>i</sub>) entspricht. Doch selbst die unter Hochphosphatbedingungen existierende basale Aktivität läßt sich noch um einen Faktor 3 im *gcn5*-Stamm reprimieren. Dies scheint ein Anzeichen dafür zu sein, daß die Aktivität unter Hochphosphatbedingungen bereits als leichte Aktivierung zu deuten ist, da Pho4 zudem bereits zu 10 bis 20 % an UASp2 bindet (siehe Abbildung 43).

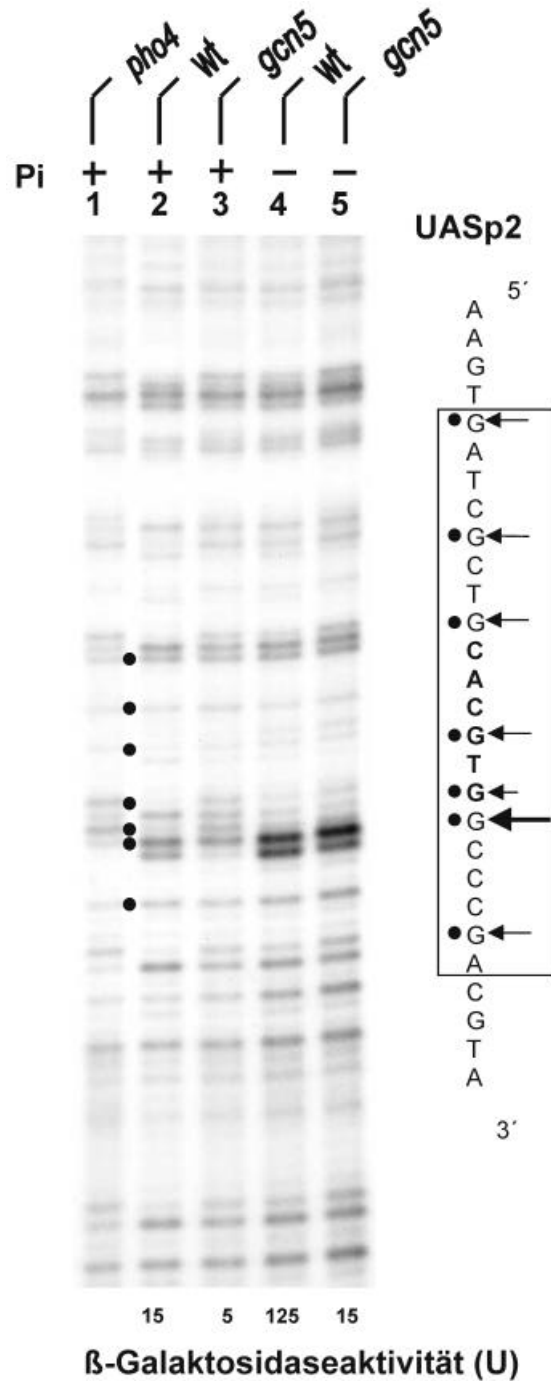
	YS18 $\alpha$ -Zellen		YS518 $\alpha$ -Zellen ( <i>gcn5</i> )	
	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>	+P <sub>i</sub>	-P <sub>i</sub>
<i>PHO8-lacZ</i>	15	125	5	15

**Tabelle 13: Aktivitäten des *PHO8*-Promotors in einem *gcn5* Stamm.** Um den Effekt von Gcn5 auf die *PHO8*-Promotoraktivierung zu bestimmen, wurde die Aktivität des *PHO8-lacZ*-Konstruktes in Stämmen mit einem disruptierten *GCN5*-Gen (YS518 $\alpha$ ) und in dem zugehörigen Wildtyp-Stamm (YS18 $\alpha$ ) gemessen.

Mit diesen Aktivitätswerten scheint in Einklang zu stehen, daß die Chromatinstruktur des *PHO8*-Promotors im *gcn5*-Stamm unter induzierenden Bedingungen des Phosphathungerns (-P<sub>i</sub>) der reprimierten Chromatinstruktur im Wildtyp-Stamm sehr ähnlich ist ((Gregory et al., 1999)).

### 2.4.15 Die Bindung des Transaktivators Pho4 an das UASp2 des *PHO8*-Promotors scheint Gcn5-unabhängig zu sein

Bisher war noch nicht geklärt, welcher Schritt des Aktivierungsprozesses durch die Nicht-acetylierung der Histone betroffen ist. Das vorherrschende Modell des Aktivierungsprozesses basierte auf einen Mehrschrittmechanismus.



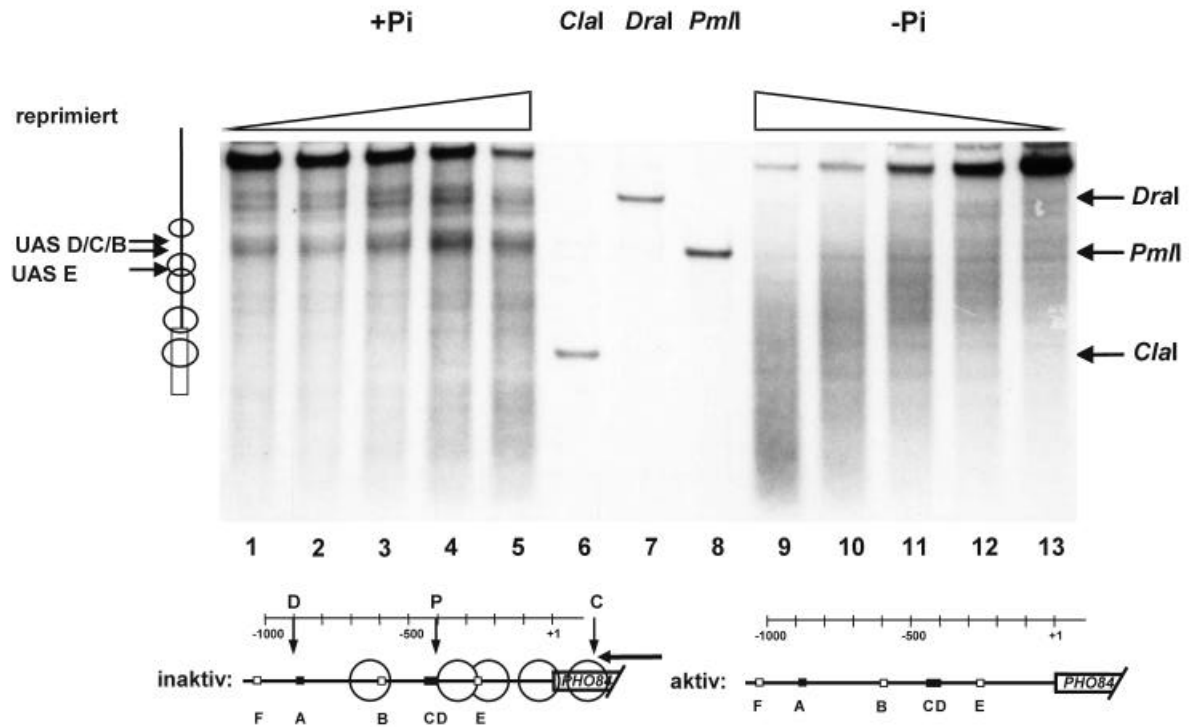
**Abbildung 43:** *In vivo*-DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an das UASp2 des *PHO8*-Promotors im *gcn5*-Stamm. Bestimmt wurde das DMS-Modifizierungsmuster der Pho4-Bindung an das UASp2-Element im *PHO8*-Promotor unter nichtinduzierenden (+P<sub>i</sub>) (Spur 2 und 3) und induzierenden Bedingungen (-P<sub>i</sub>) (Spur 4

und 5) in einem YS18(Wildtyp)- und einem *gcn5*-Stamm. Der Pho4-defiziente YS22(*pho4*)-Stamm wurde als Kontrolle für fehlende Bindung verwendet. Die Punkte markieren die DMS-modifizierte Guanin-Stellen. Die kurzen Pfeile induzieren Guanine, welche durch Pho4 geschützt sind, die mittleren Pfeile zeigen Guanine, deren Reaktivität durch DMS nicht verändert wurde, und der breite Pfeil kennzeichnet ein Guanin, welches hypersensitiv zu DMS während der Pho4-Bindung wird. Der Kasten zeigt den DNaseI-Footprint der Pho4-Bindung an das UASp2-Element unter phosphatfreien Bedingungen. Alle Stämme sind zusätzlich Cpf1-defizient. Für Einzelheiten der DMS-Footprintmethode und der benutzten Oligonukleotide siehe das untere Schema und Material und Methoden.

Der Schritt der Pho4-Bindung an seine UAS-Elemente galt als vorausgehender Schritt für die Umordnung der Chromatinstruktur. Im Anschluß kommt es zu einer Exponierung der Pho4-Aktivierungsdomäne, bevor es zur Rekrutierung des Präinitiationskomplexes (PIC) kommt, um die Transkription zu initiieren. An welcher genauen Stelle die Acetylierung in den Prozeß eingriff, war noch nicht bekannt. Um zu prüfen, ob die Nichtacetylierung der Histone bereits auf den anfänglichen Schritt der Bindung des Pho4-Proteins an das UASp2-Element des *PHO8*-Promotors Einfluß nimmt, wurden *in vivo*-DMS-Footprintexperimente unternommen. Es konnte gezeigt werden (siehe Abbildung 43), daß Pho4 sehr wohl auch im *gcn5*-Stamm an das UASp2 des *PHO8*-Promotors binden kann. Somit scheint die Quantität der Bindung von Pho4 an UASp2 nicht durch die Acetylierung betroffen zu sein. Ob es dennoch Unterschiede in der Bindungsqualität gibt, die sich direkt auf nachfolgende Schritte der Chromatin-Umordnung im *gcn5*-Stamm auswirken, konnte nicht ausgeschlossen werden.

## **2.5 Während der Aktivierung des *PHO84*-Gens kommt es zu einer vollständigen Chromatinöffnung im Promotorbereich**

Das *PHO84*-Gen kodiert für einen Phosphatetransporter. Der *PHO84*-Promotor wird durch den Phosphatgehalt des Mediums reguliert; dabei spielen die gleichen Faktoren wie in der *PHO5*-Regulation eine Rolle. Es befinden sich sechs Pho4-Bindestellen im Promotorbereich, an die Pho4 mit etwa ähnlicher Affinität bindet. Aufgrund der Anzahl von sechs hochaffinen Pho4-Bindestellen wurde vermutet, daß es zu einer vollständigen Chromatinöffnung während der Aktivierung kommen sollte. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden DNaseI-Untersuchungen des chromosomalen *PHO84*-Promotors im reprimierten (+P<sub>i</sub>) und induzierten (-P<sub>i</sub>) Zustand durchgeführt (Abbildung 44). Als Sonde für die indirekte Endmarkierung wurde ein flußab liegendes Fragment aus der kodierenden Region von *PHO84* verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß während der Aktivierung des *PHO84*-Gens eine vollständige Chromatinöffnung im Promotorbereich stattfindet, ähnlich wie sie bei *PHO5*, *PHO11* und *PHO81* beobachtet wurde.



**Abbildung 44: Chromatinöffnung des *PHO84*-Promotors während der Aktivierung.** Alle Hefezellkerne stammen von Zellen des IH2-Wildtyp-Stamms, welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) oder in einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,25, 0,5, 1, 2 und 4 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *NcoI* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen *PHO84*-Flußab-Sonde (*ClaI/NcoI*-Restriktionsfragment) hybridisiert. Die Spuren (6-8) zeigen zur Orientierung Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *NcoI* und *ClaI*, *DraI*, oder *PmlI*. Aufgetragen wurden Zellkerne eines unter Phosphatanwesenheit gewachsenen Stammes (+P<sub>i</sub>) (Spuren 1-5) sowie Zellkerne eines unter Phosphatabwesenheit gewachsenen Stammes (-P<sub>i</sub>) (Spuren 9-13). Die unteren gezeigten Schemata zeigen den *PHO84*-Promotor unter inaktiven und aktiven Bedingungen und verdeutlichen die Disruption der Nukleosomen vom *PHO84*-Promotor unter Phosphatmangelbedingungen. Als Sonde für die indirekte Endmarkierung wurde ein flußab liegendes-Fragment aus der kodierenden Region von *PHO84* verwendet.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Einfluß von $\alpha 2$ -Repressorsbindestellen auf Expression und Chromatinöffnung

##### 3.1.1 Eine $\alpha 2$ -Repressorsbindestelle flußauf liegend des *PHO5*-Promotors reprimierte die Expression und verhindert eine vollständige Chromatinöffnung des Promotors

Frühere Daten hatten gezeigt, daß die Repression von  $\alpha$ -spezifischen Genen in  $\alpha$ -Zellen durch den  $\alpha 2$ -Mcm1-Transkriptionsrepressorkomplex vermittelt wird. Am  $\alpha 2$ -Operator bindet der  $\alpha$ -zelltyp-spezifische  $\alpha 2$ -Repressor kooperativ mit dem nicht zelltyp-spezifischen Protein Mcm1 (SRF-ähnlich) ((Keleher et al., 1988)). Mcm1 bindet hierbei nicht direkt an DNA, aber arrangiert die Orientierung und Phase des  $\alpha 2$ -Proteins. Dieses resultiert in einer sehr spezifischen Bindung des Komplexes ((Smith and Johnson, 1992)).

Bei der Transformation von *PHO5-lacZ*-Plasmiden mit einem  $\alpha 2$ -Operator flußauf liegend des *PHO5*-Promotors in  $\alpha$ -Zellen fand ich eine 4- bis 5fache Repression der Aktivierung des *PHO5*-Promotors durch den  $\alpha 2$ -Operator. Dieser Effekt war unter inaktivierenden (+P<sub>i</sub>) und aktivierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen zu beobachten und konnte durch mehrere  $\alpha 2$ -Operatoren weiter verstärkt werden. Im Vergleich dazu ist dieser Effekt in  $\alpha$ -Zellen nicht zu beobachten, was die  $\alpha 2$ -Spezifität der Repression dokumentierte. Für die Repression ist es notwendig, daß der  $\alpha 2$ -Mcm1-Komplex die Faktoren Ssn6 (ein TRP-Protein) und Tup1 (ein  $\beta$ -Transducin-Repeat-Protein) zur DNA rekrutiert ((Keleher et al., 1992)). Ssn6 und Tup1 sind allgemeine Transkriptionsrepressoren, die beteiligt sind bei der durch Mig1/Ssn1 ((Vallier and Carlson, 1994)) vermittelten Repression in Antwort auf Glucose ((Nehlin et al., 1991)), bei der durch Rox1 vermittelten Repression in Antwort auf Sauerstoff ((Zitomer and Lowry, 1992)) und bei der Repression der durch DNA-Zerstörung induzierten Gene ((Zhou and Elledge, 1992)). Die Rolle von Ssn6 und Tup1 als generelle Transkriptionsrepressoren erinnert an den Rpd3-Sin3-Deacetylasekomplex. Beide Komplexe reprimieren aktiv die Transkription, aber keiner der Komplexe bindet direkt an die Promotor-DNA ((Keleher et al., 1992); (Kadosh and Struhl, 1997)).

Noch war offen, wie der weitere Wirkmechanismus der  $\alpha 2$ -abhängigen Repression aussah. Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse mit dem  $\alpha 2$ -*PHO5* Promotorkonstrukt, daß sich

unter sonst induzierenden  $-P_i$ -Bedingungen die Aktivität verminderte und nur eine unvollständige Disruption der Nukleosomen am *PHO5*-Promotor stattfand. Damit übereinstimmend wurde gefunden, daß Tup1 direkt mit den Aminotermini der Histone H3 und H4 interagiert und diese Interaktion für die Tup1-Funktion benötigt wird ((Edmondson and Roth, 1996)). Darüber hinaus supprimieren Mutationen in den Aminotermini von H3 und H4 die Tup1-Ssn6 vermittelte Repression ((Huang et al., 1997)). Diese Ergebnisse zeigen, daß Ssn6-Tup1 die Transkription über einen direkten Effekt auf Chromatinebene reprimiert. In der Tat verändern *ssn6*- und *tup1*-Mutationen auch die *SUC2*-Chromatinstruktur ((Gavin and Simpson, 1997)). Darüber hinaus kann dieser Effekt wiederum durch eine *swi1*-Mutation supprimiert werden, was jedoch nicht verwundert, da es sich bei Ssn6 und Tup1 um Suppressoren von *SNF1* und *SNF2* handelt. Auch weitere Experimente lassen ein Zusammenspiel zwischen Swi/Snf-Chromatin-Umordnungskomplexen und dem Ssn6-Tup1-Repressorkomplex vermuten ((Gavin and Simpson, 1997)). Ob eine Redundanz zwischen dem Ssn6-Tup1-Komplex und den Histondeacetylasekomplexen besteht, bleibt noch offen.

Die Zugänglichkeit des  $\alpha 2$ -*PHO5*-Hybrid-Promotors für DNaseI ist gegenüber dem Wildtyp-Promotor signifikant vermindert, aber trotzdem ist sie noch deutlich über der des nicht induzierten Promotors. Das DNaseI-Spaltungsmuster läßt Nukleosomen eher errahnen, als sie deutlich zu zeigen. Dies deutet darauf hin, daß noch ein weiterer Wirkmechanismus zu existieren scheint. Hierbei scheinen Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie mit dem Ssn6-Tup1-Komplex zu interagieren. Dieses belegen auch *in vitro*-Experimente, die zeigen, daß der Ssn6-Tup1-Komplex die Transkription einer freien DNA reprimiert ((Herschbach et al., 1994); (Redd et al., 1997)). Es konnte in unseren Experimenten gezeigt werden, daß sich die  $\alpha 2$ -vermittelte Repression am *PHO5*-Promotor, an der Ssn6 und Tup1 beteiligt sind, durch eine Überexpression von Pho4 kompetitieren ließ. Die Repression unter inaktivierenden ( $+P_i$ ) und aktivierenden ( $-P_i$ ) Bedingungen ist signifikant vermindert, was vermuten läßt, daß es hier über eine höhere Rekrutierung von Faktoren der Transkriptionsmaschinerie ((Oshima, 1997)) zur Kompensation der Repression kommen kann.

Die entgegengesetzten Ergebnisse der  $\alpha 2$ -abhängigen Repression über den Ssn6-Tup1-Komplex lassen auch am *PHO5*-Promotor auf einen Konsensus beider Mechanismen schließen, d. h. die Repression wirkt auf Chromatin- (Interaktionen mit Histonen) und Transkriptionsebene (Interaktion mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie).

Bisher wurden *in vivo* einige der Komponenten des SRB/Mediator-Komplexes – wie Rox3, Sin4 und Srb8 bis Srb11 – genetisch als Komponenten des Ssn6-Tup1-Repressionsweges identifiziert ((Chen et al., 1993); (Kuchin et al., 1995); (Rosenblum-Vos et al., 1991); (Song et al., 1996); (Wahi and Johnson, 1995)). Untersuchungen der Aktivität des *PHO5*-Promotors mit  $\alpha 2$ -Operator in *sin4*-defizienten Stämmen zeigten keine volle Repression durch den  $\alpha 2$ -Repressorkomplex unter induzierenden Bedingungen (-P<sub>i</sub>). Dies zeigt, daß Sin4 als Bestandteil des Transkriptions-Mediator-Komplexes zur  $\alpha 2$ -vermittelten Repression am *PHO5*-Promotor beiträgt. Die an der  $\alpha 2$  induzierten Repression beteiligten Komponenten scheinen darüber hinaus weitere Aufgaben zu erfüllen, da eine direkte Verbindung zwischen dem SSN- und SRB-System besteht. So sind *SSN3* und *SSN8* mit *SRB10* und *SRB11* identisch ((Kuchin et al., 1995); (Hengartner et al., 1995)) und ebenfalls mit den Genen *UME5* und *UME3*, kodierend für Meiose-spezifische Regulatoren ((Cooper et al., 1997); (Surosky et al., 1994)). In einem *sin4*-Stamm wird unter nichtinduzierenden Bedingungen die  $\alpha 2$ -abhängige Repression am *PHO5*-Promotor nicht nur aufgehoben, sondern es findet eine deutliche Erhöhung der basalen Promotoraktivität statt. Den ambivalenten Effekt zeigt diese – als *tsf3/sin4* identifiziert – Mutante am *GAL1/GAL10*-Promotor; sie kann die induzierte Repression vermindern und erhöht die Expression UAS-defizienter Promotoren ((Chen et al., 1993); (Jiang and Stillman, 1992)). Dies scheint Sin4 auch die allgemeinere Aufgabe zuzuschreiben, eine nichtinduzierte (basale) Transkription zu verhindern ((Jiang and Stillman, 1992)). Gal11, Sin4/Ssn4, Rgr1 und Med3 befinden sich gemeinsam in einem Subkomplex des SRB/Mediators. Deletionen der entsprechenden Gene zeigen einen ähnlichen Phänotyp von transkriptionellen Defekten, d. h. positive und negative Effekte auf die Expression, einbeziehend die verminderte Transkription der *GAL*, *Ty* und *MATa* Gene. Der Mediatorkomplex besitzt positive und negative Effekte auf die Genexpression ((Fassler et al., 1991); (Jiang et al., 1995); (Aihara et al., 1998)) und sollte daher als Mediator der transkriptionellen Regulation bezeichnet werden ((Li et al., 1995)).

### **3.1.2 Der $\alpha 2$ -Repressorkomplex modelliert keine alternativen Nukleosomenkonfiguration am *PHO5*-Promotor, da die native Chromatinanordnung zu stabil ist**

Frühere Arbeiten zeigten an, daß Pho4 durch seine Bindung an DNA die Voraussetzung für die Disruption der Nukleosomen am *PHO5*-Promotor schafft ((Fascher et al., 1990)). Dabei schien die Lage der Pho4-Bindestelle intern (nukleosomal) gegenüber extern (internukleosomal) von Bedeutung zu sein. Der  $\alpha 2$ -Komplex schien Nukleosomen basenpaargenau

benachbart zum  $\alpha 2$ -Operator zu positionieren ((Shimizu et al., 1991)). Aus diesem Grund wurden einige Promotorkonstrukte mit reduziertem Abstand zwischen der  $\alpha 2$ -Bindestelle und den Pho4-Bindestellen hergestellt. Ich fand bei Verschiebung der  $\alpha 2$ -Bindestelle näher zu den Pho4-Bindestellen eine zunehmende Repression. Im direkten Bindebereich des  $\alpha 2$ -Repressors konnte kein Nukleosom binden, jedoch unmittelbar flußab liegend davon. Das Nukleosom -3 ließ sich leicht flußauf, aber nicht flußab auf den hypersensitiven Bereich, in dem sich das UASp1-Element befindet, verschieben. Die internukleosomale Pho4-Bindestelle wurde deshalb nicht in ein Nukleosom verpackt, und die Position von Nukleosom -2, in der dem sich die zweite Pho4-Bindestelle befand, blieb stabil. Wenn der Platz zwischen dem  $\alpha 2$ -Operator und der hypersensitiven Region für ein Nukleosom nicht mehr ausreichte, schien es zunächst zu einer Art interner Umordnung des Nukleosoms zu kommen. Bei weiterer Annäherung schien dies in eine Disruption des Nukleosoms zu enden.

Die Zugänglichkeit der *Clal*-Restriktionsspaltstelle im Nukleosom -2 ist mit Abnahme der Entfernung zum  $\alpha 2$ -Operator beträchtlich vermindert, was impliziert, daß es in unmittelbarer Nähe zum  $\alpha 2$ -Repressorkomplex zu Interaktionen mit dem Chromatin kommt. Die Positionen, welche die Nukleosomen einnehmen, sind davon nicht direkt betroffen, sondern scheinen vorrangig von der DNA-Sequenz des Promotors abhängig zu sein. Es scheint, daß der  $\alpha 2$ -Komplex in der Konkurrenz mit Faktoren, welche die native Nukleosomenpositionierung am *PHO5*-Promotor festlegen, größtenteils unterliegt. Somit kommt es zu keiner Entstehung einer positionierten Nukleosomenkette über den gesamten *PHO5*-Promotor. Welche Faktoren diesen nativen Zustand am *PHO5*-Promotor erhalten, ist bisher noch nicht geklärt.

### **3.2 Das *in vitro* rekonstituierte Nukleosom -2 des *PHO5*-Promotors zeigt nur geringe Stabilität**

Da die Histone zu den evolutionär am höchsten konservierten Proteinen gehören und auch Rekonstitutionsuntersuchungen mit der  $\alpha$ -Satelliten-DNA keine Unterschiede zwischen Histonen aus unterschiedlichen Organismen zeigten, schien auch für unsere Versuche die Wahl der Histonquelle nicht auf Hefe beschränkt zu sein. Da nicht sehr aufwendig, wurden deshalb Mononukleosomen aus Hühnererythrozyten isoliert. Als zu rekonstituierende DNA wurde ein 180 Bp-Fragment des *PHO5*-Promotors gewählt, der das UASp2-Element enthält und *in vivo* unter nichtinduzierenden Bedingungen von dem Nukleosom -2 bedeckt ist. Es wurde *in vitro* mittels der Salzgradientendialyse mit Mononukleosomen aus Hühnererythro-



zyten rekonstituiert. Die Rekonstitution eines Mononukleosoms auf dieser freien DNA war mit über 90 % recht erfolgreich (Rest freie DNA und Dinukleosomen). Es gab jedoch verschiedene ternäre Partikel (d. h. unterschiedliche Positionen des Histonoktamers auf der DNA). Neben einer recht hohen 30%igen Präferenz der Histonoktamere für DNA-Enden (M1) fand man Histonoktamere in der mittleren Region (M2). In M2 war hauptsächlich ein Nukleosompartikel zu finden, dessen Histonoktamer etwa 10 Bp flußauf (um eine Position translational verschoben) der nativen Situation lag. Jedoch gab es weitere Positionen von Histonoktameren, die translational dazu verschoben schienen, darunter auch die native Position. Leider waren die Komplexe sehr instabil und wandelten sich schnell untereinander um, was es unmöglich zu machen schien, einen Komplex alleine stabil zu isolieren. Diese Instabilität schien vorrangig mit der gelelektrophoretischen Auftrennung und Analyse zusammenzuhängen. Direkt mit DNaseI behandelte rekonstituierte Nukleosomen zeigten nach Auftrennung auf einem Nukleoproteingel und nach Isolierung der M2-Partikels und Analyse seiner DNA auf einem Sequenzgel ein absolut einheitliches Muster.

Es ist ohne weiteres möglich, auf kurze lineare DNA-Fragmente Nukleosomen zu rekonstituieren. Es kommt zu keiner einheitlichen Positionierung des Nukleosoms, da neben der bevorzugten Endpositionierung eine Reihe von thermodynamisch günstigen Positionen eingenommen werden können. *In vivo* sind darüber hinaus noch die Positionen benachbarter Nukleosomen für Nukleosom-Nukleosom-Interaktionen von Bedeutung, sowie das Vorhandensein von an der Chromatinorganisation beteiligten Proteinen für die Chromatinordnung. Häufig wirken Proteine wie Ssn6-Tup1 oder Sir4 über Interaktionen mit den Histontermini von H3 und H4 und führen zu Chromatinstrukturen höherer Ordnung.

Stabiles Chromatin scheint nur an DNA-Sequenzen wie der  $\alpha$ -Satelliten-DNA, an welche Nukleosomen sehr stark binden, besonders gut rekonstituierbar zu sein. Um die Stabilität von Nukleosomen mit anderen DNA-Sequenzen zu erhöhen, scheint es nötig zu sein, spezielle Plasmide zu verwenden, die ein Element enthalten, an das Komplexe (wie ARS) binden, die Interaktionen zu Histonoktameren schaffen. Um am effektivsten Nukleosomen auf einer gewünschten DNA-Sequenz zu positionieren, wäre ein zusätzlicher Einbau mehrere Wiederholungen von einer DNA-Sequenz – wie der synthetischen 5SDNA, an welche Nukleosomen sehr stark binden – flußauf und flußab der gewünschten DNA-Sequenz erforderlich.

### 3.3 Einfluß der DNA-Bindung des Homöodomänenproteins Pho2 und des basisch-Helix-Loop-Helix Proteins Pho4 am *PHO5*-Promotor

#### 3.3.1 „*In vitro*“-Untersuchungen der DNA-Bindung des Homöodomänenproteins Pho2 und des basisch-Helix-Loop-Helix Proteins Pho4 am *PHO5*-Promotor

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, hatten frühere Daten nahegelegt, daß Pho2 für die *PHO5*-Aktivität benötigt würde, ohne an irgendein UAS-Element im *PHO5*-Promotor direkt zu binden ((Fascher et al., 1990)). Ein solches Modell basierte auf der strikten Pho2-Abhängigkeit des *PHO5*-Promotors sowie darauf, daß die Mutation aller entdeckten Pho2-Bindestellen im *PHO5*-Promotor etwas anders bedeutet als nur die Abwesenheit einer einzelnen Bindestelle, die vernachlässigbar für die *PHO5*-Promotoraktivität ist (siehe Abbildung 26). Wir haben nun gefunden, daß es mehrere Pho2-Bindestellen am *PHO5*-Promotor gibt. Es ist schwierig, natives Pho2 aus *Escherichia coli*-Extrakten zu reinigen, und nur nach Gebrauch der HIS-tag-Technologie waren wir in der Lage, hochgereinigtes natives Pho2 zu erhalten. Unsere früheren Schwierigkeiten, klare Pho2-Footprints zu erhalten, und das Auffinden nur einer Pho2-Bindung an einer Region des *PHO5*-Promotors, wo wir nun ein „cluster“ von starken Bindestellen nachweisen konnten, war deshalb wohl auf die mangelhafte Reinigung zurückzuführen. Ich habe nun zeigen können, daß eine Bindungskoopertivität zwischen Pho2 und Pho4 an beiden Pho4-Bindestellen existiert und diese durch Mutation der Pho2-Stelle verschwindet. Dies scheint somit den Widerspruch bezüglich der Pho2-Abhängigkeit des *PHO5*-Promotors zu lösen.

Eine frühere Veröffentlichung von Hirst *et al.* ((Hirst et al., 1994)) demonstrierte, daß ein Pho2-VP16 Fusionprotein den *PHO5*-Promotor aktivieren konnte, wenn es mit einem Pho4-Derivat ohne Aktivierungsdomäne koexprimiert wurde. Diese Ergebnisse zeigten, daß das Pho2-VP16-Fusionsprotein DNA zwar kontaktierte, aber eine Interaktion mit Pho4 entscheidend ist, um stabil und effektiv an den *PHO5*-Promotor gebracht zu werden. Die Daten implizieren, daß zum einen die DNA-Bindung von Pho2 nötig ist um an den Promotor rekrutiert zu werden und zum anderen durch die Pho2-Bindung die Affinität von Pho4 für jede seiner Bindestellen erhöht wird.

Von den verschiedenen Mechanismen, die zur Erklärung der Rolle von Pho2 bei der Aktivierung anderer Promotoren diskutiert werden, scheint der von D. Stillman der für den *PHO5*-Promotor relevanteste zu sein. In ihren Studien zum *HO*-Promotor zeigten sie die

kooperative Bindung von Pho2 mit dem DNA-bindenden Zinkfingerprotein Swi5 ((Brazas et al., 1995)). Darüber hinaus verdeutlichten sie, daß beide Proteine für die Aktivierung des *HO*-Promotors *in vivo* wichtig sind. Im Gegensatz dazu waren Versuche erfolglos, kooperatives DNA-Binden von Pho2 und Bas1 am *HIS4*-Promotor *in vitro* zu zeigen ((Arndt et al., 1987)). Im *TRP4*-Promotor konnte für Pho2 gezeigt werden, daß es an eine Stelle bindet, die mit der Gcn4-Bindestelle überlappt. Hier bindet Pho2 jedoch keinesfalls kooperativ, sondern die zwei Proteine scheinen in einer wechselseitig exklusiven Art zu binden ((Braus et al., 1989)).

Durch Sequenzvergleich der Pho2-geschützten Regionen am *PHO5*-Promotor als auch derer an den *HO*-, *HIS4*- und *TRP4*-Promotoren ergibt sich die folgende Konsensussequenz für Pho2-Bindung: 5´-(T/C)TAA(T/A)T(T/G)AAT-3´((Barbaric et al., 1996)). Am *PHO5*-Promotor enthalten die Pho2-geschützte Region, welche mit UASp1 überlappt, und die zwei geschützten Regionen, die zwischen den UASp1 und UASp2 lokalisiert sind, Sequenzen, welche vollkommen mit der vorgeschlagenen Konsensussequenz übereinstimmen. Die Pho2-Bindestelle auf der 3´-Seite von UASp2 und der 3´-Seite der neu entdeckten Pho4-Bindestelle zeigen ein bzw. zwei Abweichungen davon. Die erscheinende relative Affinität von Pho2 für Bindestellen am *PHO5*-Promotor, errechnet aus Gelretardationsexperimenten, korreliert des weiteren gut mit dem Ausmaß der Übereinstimmung der Sequenzen mit der vorgeschlagenen Konsensussequenz.

Ein weitverbreitetes Motiv, gefunden in den Bindestellen für viele Homöodomänenproteine, ist die TAAT-Sequenz ((Laughon, 1991)). Darüber hinaus ist klar, daß Sequenzen außerhalb dieses Kerns zur Bindungsspezifität von einzelnen Homöodomänenproteinen beitragen ((Levine and Hoey, 1988); (Hoey and Levine, 1988); (Hayashi and Scott, 1990)). Die Oct-Homöodomänenproteine als auch einige andere Homöodomänenproteine binden spezifisch an die Konsensussequenz TNATTTGCAT ((Levine and Hoey, 1988); (Thali et al., 1988)). Die *Drosophila*-Homöodomänenproteine *eve*, *zen*, *en*, *prd*, und *ftz* binden an die Konsensussequenz TCAATTAAAT ((Hoey and Levine, 1988); (Desplan et al., 1988)). Beide Konsensussequenzen sind ähnlich (mit zwei Abweichungen) zu der hier für die Pho2-Bindung vorgeschlagenen. Die ähnliche Bindungsspezifität von Pho2 und den *Drosophila*-Homöodomänenproteinen steht in Übereinstimmung mit der großen Ähnlichkeit von Pho2, *eve* und *prd* in ihrer dritten Erkennungs-Helix ((Bürglin, 1988)).

### 3.3.2 Bindungskooperativität findet auf mehreren Ebenen statt

Viele Homöodomänenproteine sind unterschiedlich in ihrer Kapazität, DNA kooperativ mit entweder homologen oder heterologen Homöodomänenproteinen und/oder Nicht-Homöodomänenproteinen zu binden. Kooperative Bindung von Pho2 mit dem Zinkfingerprotein Swi5 wurde bereits früher gezeigt ((Brazas and Stillman, 1993)). Hier berichte ich über die kooperative Bindung von Pho2 mit dem bHLH-Protein Pho4, welches zeigt, daß das Pho2-Protein kooperative Interaktionen mit verschiedenen Klassen von Nicht-Homöodomänenproteinen eingehen kann. Ein interessanter Aspekt der Pho4-Pho2-Bindungskooperativität ist, daß sie relativ insensitive zu den Abständen zwischen den Pho4- und Pho2-Bindestellen zu sein scheint. Pho2 ermöglicht DNA-Bindung durch Pho4, unabhängig davon, ob die Stellen in einem signifikanten Ausmaß überlappen (UASp1) oder ob sie durch bis zu 12 Bp getrennt sind (UASp2). In dem *HO*-Promotor beeinflusste das Erhöhen des Abstandes zwischen der Pho2- und Swi5-DNA-Bindestelle um 10 Bp weder das kooperative Binden dieser zwei Proteine *in vitro* noch die Promotoraktivität *in vivo* ((Brazas et al., 1995)). Man nahm an, daß die Interaktionsdomänen von Pho2 und Swi5 sehr flexibel sind; das gleiche mag auch sehr wohl auf Pho2 und Pho4 zutreffen. Die alternative Erklärung, daß Pho2-Pho4-Interaktionen allein ausreichend für die Formation eines stabilen ternären Komplexes sind, wurde widerlegt durch das Experiment, welches zeigt, daß Bindestellen für beide Proteine nötig sind, um einen ternären Komplex und eine kooperative Bindung zu erhalten (Abbildung 19). Interaktionen zwischen Pho2 und Pho4 wurden *in vivo* durch einen Two-Hybrid-Versuch festgestellt ((Hirst et al., 1994)); er zeigt, daß Pho2 und Pho4 sich sogar in Abwesenheit einer DNA-Bindung beider Proteine gegenseitig binden konnten. Das Hefe-Two-Hybrid-System ist ein sehr sensibler Nachweis für Protein-Protein-Interaktionen, welcher sogar eine Interaktion zwischen einer Kinase und seinem Substrat nachweisen kann ((Fields and Sternglanz, 1994)). Deshalb reflektieren die Hefe-Two-Hybrid-Daten höchstwahrscheinlich eine Interaktion, die normalerweise erst stattfindet, wenn beide Proteine an DNA gebunden sind.

Von Pho4 wurde berichtet, daß es an ein Oligonukleotid bindet, welches UASp1 enthält, im Vergleich zu einem UASp2-enthaltenden mit niedrigerer Affinität ((Fisher et al., 1991)). Hier wurde Folgendes gezeigt: Wenn statt dessen längere Promotorfragmente benutzt werden, die UASp1 oder UASp2 enthalten, bindet Pho4 an beide Stellen mit gleicher Affinität. Im Vergleich dazu ist die Bindung zu einem Fragment, welches die neu entdeckte Pho4-Bindestelle enthält, etwa drei- bis viermal schwächer. Mit Ausnahme der Kernkonsensus zeigt diese Stelle keine Homologie, weder zu UASp1 noch zu UASp2. Die Deletion ((Rudolph and

Hinnen, 1987)) oder Mutation dieser Stelle in einem Wildtyp-Promotor führt andererseits nicht zu einem signifikanten Abfall der Promotoraktivität (unveröffentlicht). Dies ist eindeutig verschieden von der Situation, welche man bei UASp1 und UASp2 findet. Eine Einzelmutation von jedem der zwei Elemente führt zu einer 90%igen Reduktion der Promotorstärke (Tabelle 6). Trotz der stark kooperativen Bindung von Pho2 und Pho4 an dieser neu erkannten Pho4-Bindestelle zeigen Daten nicht, daß sie *in vivo* funktionell ist.

Die Rolle von Pho2, zur Erhöhung der Affinität von Pho4 für seine Zielstellen beizutragen, steht in direkter Übereinstimmung mit den früheren *in vivo*-Ergebnissen. Die Disruption von *PHO2* beläßt das Chromatin am *PHO5*-Promotor ständig geschlossen, dies sogar unter Phosphatmangelbedingungen ((Fascher et al., 1990)). Darüber hinaus fehlt in *pho2*-Stämmen die Bindung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor, wie durch *in vivo*-DMS-Footprints gezeigt wurde ((Venter, 1993)). Durch Pho4-Überexpression in Abwesenheit von Pho2 erlangt Pho4 die Fähigkeit zurück, an seine Stellen zu binden und die Nukleosomenstruktur im *PHO5*-Promotor auflösen zu können. Dies zeigt die Bindung von Pho4 an seinen UAS-Elementen an. Jedoch beträgt die Expression des *PHO5*-Genes nur 25 % des Wildtyp-Spiegels ((Fascher et al., 1993)). Dies erklärt eine Rolle von Pho2 nicht nur bei der Unterstützung von Pho4 im Binden seiner Zielstellen, sondern auch im Verstärken der transkriptionellen Aktivierung. Ein kürzlicher Bericht schlug vor, daß Interaktionen zwischen Pho2 und Pho4 zur Erhöhung der Zugänglichkeit der Aktivierungsdomäne von Pho4 führen könnten, der angenommenen zweiten Rolle von Pho2 ((Shao et al., 1996)). Homöodomänenproteine binden oft an mehrere aufeinanderfolgende Stellen ihrer Zielpromotoren. Fünf Bindestellen für das *bcd*-Protein wurden aufwärts des *hunchback*-Genes gefunden ((Driever and Nusslein Volhard, 1989)). In ähnlicher Weise wurde gefunden, daß das Ubx-Protein kooperativ „Cluster“ seiner Bindestellen in einigen Promotoren bindet ((Beachy et al., 1993)). In vielen dieser Fälle wurde gezeigt, daß die Bindung des Homöodomänenproteins an diesen Stellen kooperativ ist. Unsere Bindungsversuche zeigen, daß Pho2 selbst kooperativ an ein *PHO5*-Promotorfragment bindet, welches zwei oder mehr Pho2-Bindestellen enthält, auch wenn diese Bindestellen durch mehr als 50 Bp getrennt sind. Die kooperative Bindung zu distalen Stellen – so wurde postuliert ((Beachy et al., 1993)) – geschehe bei anderen Homöoboxproteinen über einen DNA-Looping-Mechanismus.

### 3.3.3 Die Rolle von Pho2 am *PHO5*-Promotor im Chromatinkontext

Um vollständig den Aktivierungsprozeß am *PHO5*-Promotor zu verstehen, muß die Chromatinstruktur des Promotors mit einbezogen werden. Der reprimierte *PHO5*-Promotor ist mit vier positionierten Nukleosomen besetzt, welche während der Promotoraktivierung in einem Pho4-abhängigen Prozeß disrumpiert werden ((Svaren and Hörz, 1995)). Obwohl die Bindung von Pho4 an UASp1 und UASp2 benötigt wird, damit die Chromatinöffnung und transkriptionelle Aktivierung geschieht ((Venter et al., 1994)), ist es denkbar, daß der Aktivierungsprozeß am *PHO5*-Promotor durch UASp1 initiiert wird. Begründen ließe sich dies dadurch, daß UASp1 in einer kurzen nukleosomenfreien Region im reprimierten Promotor lokalisiert und deshalb für die Proteinbindung unter reprimierenden Bedingungen zugänglich ist ((Venter et al., 1994)). Dagegen ist UASp2 in der Mitte von Nukleosom -2 lokalisiert, welches im reprimierten Zustand die Bindung von Pho4 an dieser Stelle verhindert ((Venter et al., 1994)). Auf der Basis des Befundes, daß Homöoproteine Kontakte in der großen als auch der kleinen Furche der DNA machen, wurde vorgeschlagen, daß Nukleosomen Homöodomänenproteine von der Bindung ausschließen könnten ((Kissinger et al., 1990)). Deshalb ist im reprimierten *PHO5*-Promotor nur die Stelle, welche UASp1 überlappt, für Pho2 zugänglich und deshalb eventuell von besonderer Wichtigkeit in der *PHO5*-Regulation. Kooperative Bindung von Pho2 und Pho4 – zusammen mit kooperativer Bindung von Pho2 mit sich selbst – könnte den Promotor besonders sensitiv für kleine Schwankungen in der Konzentration dieser zwei regulatorischen Proteine machen.

### 3.3.4 „*In vivo*“ wird der *PHO5*-Promotor über kooperative Interaktionen aktiviert

Die strikte Abhängigkeit der *PHO5*-Promotoraktivierung von Pho2 war seit 25 Jahren ((Oshima, 1982)) bekannt, aber erst kürzlich waren Hinweise zu seinem zugrunde liegenden Mechanismus aufgekommen. Unsere *in vitro*-Studien zeigten die Existenz mehrerer Pho2-Bindestellen in enger Nachbarschaft mit den Pho4-Bindestellen am *PHO5*-Promotor. Darüber hinaus wurde die kooperative DNA-Bindung von Pho2 und Pho4 an UASp1 und UASp2 gezeigt (Abbildung 15 und Abbildung 18, bzw. (Barbaric et al., 1996)). Danach haben wir die funktionelle Relevanz der neu bestimmten Pho2-Bindestellen untersucht und uns gefragt, ob die Kooperativität zwischen den zwei Proteinen eine Rolle in der Aktivierung des Promotors *in vivo* spielt. Um dieser Frage nachzugehen, haben wir eine Serie von verschiedenen Promotorvarianten mit einer oder mehreren Mutationen in den Pho2-Bindestellen konstruiert. Die Notwendigkeit von UASp1 und UASp2 für die Chromatindisruption am *PHO5*-Promotor

und der daraus folgenden transkriptionellen Aktivierung wurde früher bereits durch Deletionsanalysen des Promotors gezeigt ((Fascher et al., 1993); (Rudolph and Hinnen, 1987)) und hier durch Analysieren des Effekts von gezielten Mutationen bestätigt. Im Gegensatz zu den zwei UAS-Elementen spielt die kürzlich entdeckte niedrigaffine Pho4-Bindestelle ((Barbaric et al., 1996)) keine entscheidende Rolle im Aktivierungsprozess. Obwohl sie *in vivo* unter dereprimierenden Bedingungen besetzt ist, ist sie für die Chromatindisruption verzichtbar (Daten nicht gezeigt) und liefert nur einen kleinen Beitrag zur Gesamtpromotoraktivität (Tabelle 6). Wir haben deshalb unsere Bemühungen auf die zu UASp1 und UASp2 benachbarten Pho2-Bindestellen fokussiert.

### **3.3.5 Pho2 ist durch seine kooperative DNA-Bindung mit Pho4 in die Aktivierung des *PHO5*-Promotors einbezogen**

Mutationen der zu UASp1 oder UASp2 benachbarten Pho2-Bindestellen resultieren *in vitro* in dem Verlust der kooperativen-DNA Bindung von Pho2 und Pho4 (siehe Abbildung 25 und Abbildung 27). Der Befund, daß die Mutation jeder individuellen Pho2-Bindestelle eine moderate bis starke Reduktion der *PHO5*-Promotoraktivität verursacht, ließ annehmen, daß die kooperative Bindung der zwei Proteine ebenfalls essentiell für die Aktivität des *PHO5*-Promotors *in vivo* ist. Darüber hinaus wurde ein dramatischer Effekt bei den kombinierten Mutationen der den UASp1 und UASp2 benachbarten Pho2-Bindestellen beobachtet, welcher ähnlich zu dem Effekt der Mutation von UASp1 oder UASp2 selbst war (Tabelle 6 und Abbildung 26). Die funktionelle Wichtigkeit der Pho2-Bindestellen *in vivo* wurde in weiteren Experimenten bestätigt, in welchen der *PHO5*-Promotor aktiviert werden konnte durch ein Pho2-VP16-Hybridprotein zusammen mit einem transkriptionell inaktiven Pho4-Derivat, das jedoch weiterhin DNA binden konnte. Promotorvarianten mit mutierten Pho2-Bindestellen konnten jedoch nicht effizient durch Pho2-VP16 aktiviert werden (Abbildung 29B). Zusammengefaßt ergeben diese Ergebnisse die ersten direkten Hinweise darauf, daß Pho2 in die Aktivierung des *PHO5*-Promotors als ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein involviert ist. Gleichzeitig zeigt dies, daß die Bindung von Pho2 an DNA Interaktionen mit Pho4 benötigt, da in Abwesenheit des Pho4-Derivats oder einer Pho4-Bindestelle Pho2-VP16 transkriptionell inaktiv ist.

Die Verhaltensweisen von Pho2 sind typisch für Mitglieder der Familie der Homöodomänenproteine, zu denen Pho2 gehört. In vielen Fällen binden solche Proteine *in vitro* an mehrere DNA-Stellen mit relativ geringer Sequenzspezifität, und man nimmt an, daß sie ihre Selektion

tivität über Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Faktoren erhalten ((Laughon, 1991)). Die gesammelten Ergebnisse lassen mit großer Wahrscheinlichkeit vermuten, daß Pho2 zur *PHO5*-Aktivierung als ein DNA-Bindfaktor beiträgt, der an spezifische Sequenzen des *PHO5*-Promotor kooperativ mit Pho4 bindet (Abbildung 15, Abbildung 18 und Abbildung 21, bzw. (Barbaric et al., 1996)).

### 3.3.6 UASp1 und UASp2 lassen sich aufgrund unterschiedlicher Abhängigkeit von Pho2-*cis*-Elementen unterscheiden

Das Verhindern von Pho2-Interaktionen mit seinen Zielsequenzen resultiert im Verlust von kooperativer DNA-Bindung der Proteine Pho4 und Pho2 und führt zu progressiver Schwächung des *PHO5*-Promotors. Wie sich durch die abnehmende Promotoraktivität zum einen und die verringerte Chromatinöffnung zum anderen herausstellte, hat die Wechselwirkung der Pho4- mit der Pho2-Bindung am UASp1 einen stärkeren Effekt als die am UASp2. Das UASp1-Element wird für die Disruption der vier Nukleosomen am Promotor unbedingt benötigt ((Fascher et al., 1993)). In ähnlicher Weise verhindert die M1-Mutation, in welcher ein Teil der Pho2-Bindestelle nahe des UASp1 mutiert ist, die Chromatinöffnung, wobei die Zugänglichkeit der *Cla*I-Stelle in Nukleosom -2 von 90 % auf 20 % reduziert wird (Abbildung 28). Die M2-Mutation, welche die Pho2-Bindung vollständig eliminiert, hat einen noch stärkeren Effekt auf Aktivität und Chromatinöffnung (nicht gezeigt). Diese Mutation dehnt sich jedoch auf die Region aus, in welcher die Pho2- und Pho4-Bindestellen überlappen, und führt *in vitro* auch zu einer geringen Abnahme der Pho4-Bindung, sogar in Abwesenheit von Pho2; deshalb wurde dies nicht weiter untersucht.

In Kontrast dazu beeinflussen Mutationen der zwei zu UASp2 benachbarten Pho2-Bindestellen (M4+M5) die Promotoraktivität *in vivo* nur in geringeren Maße, wobei das Nukleosom -2 beinahe vollständig disrumpiert wird, wie der Effekt der M4+M5-Mutation im Chromatinversuch zeigt. Wenn diese mit der M1-Mutation kombiniert wird, ist das Chromatin beinahe vollständig geschlossen, im Gegensatz zu der nur partiellen Öffnung des Promotors mit der M1-Mutation allein. Die Bindung von Pho4 an UASp2 im M4+M5-Promotorkonstrukt ist damit nicht so stark wie die im Wildtyp-Promotor, reicht aber gerade noch aus, um die Nukleosomen zu disrumpieren (Abbildung 28). Deshalb scheint es, daß die Bindung von Pho4 an UASp2 durch kooperative Interaktion mit Pho2 zwar auch erhöht ist, aber – im Gegensatz zu UASp1 – nicht absolut abhängig von dieser ist.



Die Weiterexistenz von Nukleosom -2 in einem *pho2*-Stamm ((Fascher et al., 1990)) zeigt direkt die Nichtbesetzung von UASp2 durch Pho4, da wir gezeigt haben, daß Nukleosomen die Bindung von Pho4 an seinen Zielstellen verhindert ((Venter et al., 1994)). Die Konstruktion einer *PHO5*-Promotorvarianten mit zwei UASp2-Elementen, wobei eines das UASp1 ersetzt, macht es möglich, direkt die Bindung von Pho4 an dem in der nukleosomenfreien Region lokalisierten UASp2 zu bestimmen. Mit diesem Konstrukt konnten wir zeigen, daß in Übereinstimmung mit den Chromatindaten Pho4 in Abwesenheit von Pho2 stark an das internukleosomale UASp2 binden kann (Abbildung 32).

### **3.3.7 Ein Pho4-Derivat ohne Pho2-Interaktionsdomäne unterscheidet klar zwischen UASp1 und UASp2**

Es wurde früher gezeigt, daß ein Pho4-Derivat ohne die Aminosäuren 200 bis 247, Pho4 $\Delta$ int, nicht in der Lage ist, mit Pho2 im Two-Hybrid-System zu interagieren ((Hirst et al., 1994)), und daß Pho4 $\Delta$ int *in vitro* einen Defekt bezüglich der kooperativen DNA-Bindung mit Pho2 hat (Abbildung 31). Darüber hinaus kann Pho4 $\Delta$ int die *PHO5*-Transkription nur sehr gering aktivieren (etwa 6 % der Höhe, welche mit nativem Pho4 erreicht wird), was die Wichtigkeit der Kooperativität zwischen Pho2 und Pho4 in der physiologischen Aktivierung wiedergibt. Aktivitätsmessungen zeigen einen eindeutigen Unterschied zwischen den zwei UAS-Elementen, wenn sie außerhalb ihrer natürlichen Umgebung getestet werden. UASp2 wurde deutlich durch Pho4 $\Delta$ int aktiviert, während UASp1 nicht aktiviert wurde. Eine Aktivierung von UASp2 mit Pho4 $\Delta$ int war Pho2-unabhängig. Dies zeigte, daß die *in vitro* beobachtete (Abbildung 31B) geringe kooperative Bindung von Pho4 $\Delta$ int und Pho2 *in vivo* keine Rolle spielt. Konsistent mit diesem Unterschied zwischen UASp1 und UASp2 ist, daß die *PHO5*-Promotorvariante, in der UASp1 durch UASp2 ersetzt wurde, in Abwesenheit von Pho2 eine signifikante Aktivierung mit Pho4 $\Delta$ int zeigt. Überraschenderweise aktiviert unter diesen Bedingungen (in Abwesenheit von Pho2) Pho4wt dieses Konstrukt nur sehr gering, obwohl es in bezug auf die Bindung an UASp2 ununterscheidbar von Pho4 $\Delta$ int ist. Dieses Ergebnis gibt neue Einblicke in die Transaktivierung durch Pho4 und läßt es als wahrscheinlich erscheinen, daß Pho4 durch eine interne Repressordomäne in seiner Fähigkeit zu transaktivieren negativ reguliert wird. Die einfache Deletion des mit Pho2 interagierenden Pho4-Segments ist ausreichend, um zumindest partiell diese Repression zu umgehen, etwas, was ansonsten durch die Pho2-Interaktion geschieht.

Die Pho2-unabhängige Aktivierung von UASp2 wird unterstützt durch das Ergebnis der kürzlich beschriebenen Pho4-Mutanten, welche eine Deletion in der basischen Region (Aminosäuren 252 bis 265) enthält. Von ihr wird vermutet, daß sie funktionelle Interaktion mit Pho2 vermittelt ((Shao et al., 1996)). Eine solche Deletion resultiert in Pho2-unabhängiger Aktivierung des *GALI*-Promotors durch ein Gal4(DBD[für DNA-Bindedomäne])-Pho4 $\Delta$ 252-265-Hybridprotein, während natives Pho4, fusioniert an die Gal4-DNA-Bindedomäne, Pho2 für die Aktivierung benötigt. Da eine Gal4-DNA-Bindedomäne benutzt wurde, spielte die Fähigkeit von Pho2, die Pho4-DNA-Bindung zu beeinflussen, keine Rolle. Die Autoren schlagen ein Modell vor, in dem die *Pho4*-Aktivierungsdomäne mit der basischen Region interagiert und dadurch maskiert wird. Die Rolle von Pho2 wäre dann, diese interne Interaktion zu disruptieren, die Aktivierungsdomäne zu exponieren und ein transkriptionell kompetentes Molekül zu generieren. Im Rahmen dieses Modells würde die Deletion der Aminosäuren 200-247 ein Interagieren des modifizierten Pho4-Proteins mit Pho2 unmöglich machen. Da die interne Protein-Protein-Interaktion in dem Pho4-Proteinderivat zerstört ist, würde die Aktivierungsdomäne exponiert werden und damit die Pho2-Notwendigkeit umgangen.

Eine zweite Rolle von Pho2 kann durch unseren Befund gezeigt werden, daß nämlich der Verlust der Promotoraktivität in Übereinstimmung mit der Mutation der Pho2-*cis*-Elemente fast vollständig kompensiert wird durch Pho4-Überexpression in einem *PHO2*-Stamm. Dagegen trifft das gleiche für den Verlust der Promotoraktivität bei der Eliminierung von Pho2 selbst nicht zu. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Anwesenheit von Pho2 in *trans* in einer höheren transkriptionellen Aktivität resultiert als die in einem *pho2*-Stamm gemessene. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die zusätzliche Rolle von Pho2 in der transkriptionellen Aktivierung.

### 3.3.8 Pho2: ein pleiotroper Faktor in Hefe

Pho2 ist in der Regulation einiger Gene involviert, und in allen Fällen scheint bisher das Prinzip zu herrschen, daß es mit Gen-spezifischen Faktoren interagiert. Am *HO*-Promotor befindet sich eine Pho2-Bindestelle neben einer Swi5-DNA-Bindestelle; es wurde *in vitro* gezeigt, daß die zwei Proteine an ihren Stellen kooperativ binden ((Brazas et al., 1995)). Kürzlich publizierte *in vivo*-Daten zeigen, daß die Rolle von Pho2 in der *HO*-Regulation komplex ist ((McBride et al., 1997)). Im Fall des *HIS4*-Promotors überlappt größtenteils eine Pho2 (Bas2)-geschützte Region den Bas1-Footprint. Obwohl Bas2 und Bas1 an diese Region

gleichzeitig binden können, wurde keine kooperative Interaktion zwischen den beiden Proteinen detektiert ((Arndt et al., 1987)). In Gegensatz dazu überlappt am *TRP4*-Promotor eine Pho2-Bindestelle komplett mit einer der beiden Gcn4-Bindestellen, und man fand, daß die beiden Proteine DNA in sich gegenseitig ausschließender Weise binden ((Braus et al., 1989)). Untersuchungen der Rolle von Pho2 (Bas2) bei der Aktivierung der *ADE*-Gene wurden kürzlich wieder angegangen ((Rolfes et al., 1997); (Zhang et al., 1997)). Die Transkriptionsaktivierung dieser Gene benötigt die konzertierte Aktivität von Bas1 und Pho2 und wird durch Adenin herunterreguliert. Von ihren Studien schlossen die Autoren, daß Pho2 (Bas2) beides stimuliert, die DNA-Bindung und die durch Bas1 hervorgerufene Aktivierung des *ADE5,7*-Promotors. Interessanterweise war ein mutiertes Pho2-Protein, dem die DNA-Bindedomäne fehlte, mit Bas1 zusammen zum Teil auch funktional in der *ADE5,7*-Aktivierung. Dies steht im Widerspruch zum Mechanismus der Aktivierung am *PHO5*-Promotor, da unsere Ergebnisse zeigen, daß die DNA-Bindung absolut notwendig für die Pho2-Funktion ist. Dieser Unterschied konnte auch in der kürzlichen Studie von Justice et. al. ((Justice et al., 1997)) gezeigt werden. Dort verhinderten Mutationen der Pho2-DNA-Bindedomäne die Aktivierung durch das UASp1 von *PHO5* und durch das UAS-Element des *HIS4*- wie auch des *HO*-Promotors fast vollständig, während ein *ADE1-lacZ*-Reporter jedoch 30-40 % der Aktivität beibehält.

### 3.3.9 Duale Rolle von Pho2 bei der Aktivierung des *PHO5*-Promotors

Es ist offensichtlich, daß Pho2 ein Ausnahmeprotein ist, da seine Aufgabe, die unterschiedlichsten Faktoren an jedem Promotor funktional zu vervollständigen, für diverse Bestandteile des zellulären Metabolismus gilt. Kooperative Bindung mit einem spezifischen Faktor scheint der primäre Mechanismus zu sein. Aber sogar mit dem gleichen Partner kann die Notwendigkeit kooperativer Bindung bei unterschiedlichen Promotoren verschieden sein (*PHO5* gegenüber *PHO8*, wo Pho4-Bindung größtenteils Pho2-unabhängig ist [Abbildung 37; bzw. (Barbaric et al., 1992); (Barbaric et al., 1998)]). Noch erwähnenswerter wären die Unterschiede an verschiedenen Stellen des gleichen Promotors, wie hier für *PHO5*-UASp1 und *PHO5*-UASp2 gezeigt. Die zusätzliche Rolle von Pho2 in der Exponierung der Aktivierungsdomäne des primären Aktivators kann nur in dem Fall effektiv sein, wenn die Bindung der Aktivatorproteine letztendlich zu einem gewissen Teil Pho2-unabhängig ist, wie es beim UASp2 am *PHO5*-Promotor der Fall ist.

### 3.4 Transkriptionelle Regulation des *PHO8*-Promotors im Vergleich zu dem koregulierten *PHO5*-Promotor

Trotz der koordinativen Regulation der *PHO5* und *PHO8*-Gene wird der *PHO8*-Promotor beinahe 10fach schwächer aktiviert als der *PHO5*-Promotor. Während der Induktion durchlaufen beide Promotoren eine signifikante Umordnung ihrer Chromatinstruktur, obgleich die Umordnung am *PHO8* nur partiell ist ((Barbaric et al., 1992)). Diese Arbeit stellt eine detaillierte Studie der *cis*- und *trans*agierenden Faktornotwendigkeiten für die Chromatin-Umordnung und Aktivierung des *PHO8*-Promotors dar. Sie hat das letztendliche Ziel, die Grundlagen für den großen Unterschied der Induzierbarkeit zwischen den zwei Promotoren aufzudecken und neue Einsichten in das Zusammenspiel zwischen Transkriptionsfaktoren und Nukleosomen bei der Regulation der Promotoraktivität aufzuzeigen.

#### 3.4.1 Eine einzelne Pho4-Bindestelle ist für die Aktivierung des *PHO8*-Promotors verantwortlich

Zwei Pho4-Bindestellen, eine niedrigaffine Stelle (UASp1) und eine hochaffine Stelle (UASp2), wurden *in vitro* am *PHO8*-Promotor gefunden ((Barbaric et al., 1992)). *In vivo*-Mutationsanalysen zeigten, daß die Promotoraktivität nicht durch die Eliminierung von UASp1 betroffen ist, während die Mutation von UASp2 den Promotor komplett inaktiviert (Abbildung 34). Ebenfalls im Gegensatz zu UASp2 war UASp1 nicht in der Lage, einen heterologen Promotoren zu aktivieren (siehe Tabelle 10). Dies unterstützt die Schlußfolgerung, daß dieses Element *in vivo* nicht von funktioneller Relevanz ist.

Die Aktivierung des *PHO8*-Promotors ist mit einer Chromatin-Umordnung am Promotor verbunden und scheint eine Voraussetzung für die Aktivierung zu sein ((Barbaric et al., 1992)). Wie von den Aktivitätsdaten erwartet, war die Mutation von UASp1 ohne Effekt auf das Ausmaß der Chromatinöffnung, während die Mutation von UASp2 die Chromatin-Umordnung dieses Promotors vollständig verhinderte (nicht gezeigt).

Diese Eigenschaften machen den *PHO8*-Promotor deutlich unterscheidbar vom *PHO5*-Promotor, wo beide Pho4-Bindestellen für die Chromatin-Umordnung ((Svaren and Hörz, 1997)) und Promotoraktivität ((Barbaric et al., 1998)) kooperieren müssen.

### 3.4.2 Die Stärke des *PHO8*-Promotors ist durch ein Gleichgewicht von Transkriptionsfaktor-UAS-Interaktionen und dem Ausmaß der Repression durch Chromatin bestimmt

Das niedrige Ausmaß der Aktivierung am *PHO8*-Promotor könnte darin begründet sein, daß die Pho4-Bindung an nur einer einzelnen Stelle nicht ausreicht, um die Chromatinstrukturen völlig öffnen zu können. Am *PHO5*-Promotor wurde gezeigt, daß die Bindung von Pho4 an beide Stellen für die Chromatin-Umordnung nötig ist und letztendlich zu einer 10fach höheren Promotoraktivität im Vergleich zur Abwesenheit einer der zwei Stellen führt (Tabelle 6, bzw. (Barbaric et al., 1998)). Dies bedeutet, daß die Kooperativität zwischen den beiden Stellen primär auf das Ausmaß der Chromatin-Umordnung wirkt ((Svaren and Hörz, 1997)). Deshalb war es interessant zu sehen, ob das Einführen einer zusätzlichen Pho4-Bindestelle in den *PHO8*-Promotor substantiell die Chromatin-Umordnung und Promotoraktivität erhöhen würde. Die *PHO8*-Promotorvariante, in der das inaktive UASp1-Element des *PHO8*-Promotors durch das UASp1-Element von *PHO5* ersetzt wurde, zeigte ein ausgedehnteres Chromatinremodulieren im Bereich der den Nukleosomen -3 und -2 zugehörigen Region (Abbildung 38, Spuren 9-11; (Munsterkötter et al., 2000)). Sie ergab jedoch nicht die komplett geöffnete Chromatinstruktur, wie sie für den *PHO5*-Promotor typisch ist ((Almer et al., 1986)). Ebenfalls war diese Promotorvariante im Hinblick auf die Aktivität weitaus schwächer als der Wildtyp-*PHO5*-Promotor und profitierte nur zweifach vom zusätzlichen UAS-Element. Ein zweifacher Anstieg der Wildtyp-*PHO8*-Promotoraktivität wurde ebenfalls beobachtet, wenn die DNA-Region, die normalerweise von den Nukleosomen -3 und -2 besetzt ist, deletiert wurde, was konsistent mit der repressiven Rolle dieser Nukleosomen ist. Deshalb wurde erwartet, daß die Promotorvariante mit dem UASp1 von *PHO5*, welche ein geringeres Ausmaß der Chromatinrepression zeigte, weniger von der Deletion der zwei repressiven Nukleosomen profitieren würde. In der Tat stieg die Aktivität durch ihren Wegfall nur um 25 %. Dieses Ergebnis steht deshalb mit der Beobachtung im Einklang, daß die Aktivität des *PHO8*-Promotors bestimmt wird durch ein Wechselspiel zwischen Chromatinrepression auf der einen und der Intensität der Faktorbindung an den Promotor auf der anderen Seite.

Überraschenderweise inaktivierte das Ersetzen des *PHO8*-UASp2-Elements durch das korrespondierende Element von *PHO5* den Promotor fast vollständig. Ich fand, daß das *PHO5*-UASp2-Element signifikant schwächer als das *PHO8*-UASp2-Element war, wenn die Elemente unabhängig voneinander vor einem *CYCI*-Minimalpromotor getestet wurden. Dies

kann jedoch die sehr geringe Aktivität dieses in den *PHO8*-Kontext gebrachten Elementes nicht erklären. Das geringe Aktivierungspotential des *PHO8*-Promotors mit dem *PHO5*-UASp2-Element läßt sich weiter nicht auf eine ineffiziente Pho4-Bindung zurückführen. *In vivo*-Footprintexperimente zeigten eindeutig, daß die Bindung von Pho4 an das in den *PHO8*-Promotor gebrachte *PHO5*-UASp2-Element ununterscheidbar ist von der Bindung zu demselben Element im natürlichen Kontext. Chromatinanalysen zeigten, daß Pho4 hier nicht in der Lage war, eine Chromatin-Umordnung mit sich zu bringen (Abbildung 38, Spuren 13-15). Dies ist sehr bemerkenswert, da zum ersten Mal demonstriert werden konnte, daß die Bindung eines nativen Pho4-Moleküls an ein UAS-Element nicht zu einer Disruption der benachbarten Nukleosomen führt.

In unserem Labor wurde früher bereits für den *PHO5*-Promotor gezeigt, daß die Fähigkeit von Pho4, Chromatin zu remodulieren, eine Eigenschaft seiner Aktivierungsdomäne ist ((McAndrew et al., 1998)). Deshalb scheint die sehr geringe Aktivität der *PHO8*-Promotorvarianten mit dem *PHO5*-UASp2 Element erklärbar zu sein durch das Unvermögen von Pho4, in diesem Kontext seine Aktivierungsdomäne richtig entfalten zu können (d. h. in der Art, die nötig ist, Chromatin-Umordnung an diesem Promotor hervorzurufen). In diesem Zusammenhang ist es interessant, unsere Befunde zu erwähnen, daß die Aktivierung des *PHO8*-Promotors den SWI/SNF- und den SAGA-Komplex benötigt (Tabelle 13, (Gregory et al., 1999)). Es existieren Ergebnisse, welche diese zwei Proteinkomplexe in die Chromatin-Umordnung involviert sehen ((Gregory et al., 1998); (Hirschhorn et al., 1992); (Pollard and Peterson, 1998); (Wu and Winston, 1997)). In Abwesenheit von Snf2, einer essentiellen Komponente des SWI/SNF Komplexes, ist die Chromatin-Umordnung am *PHO8*-Promotor in der Tat völlig verhindert, und es findet nur eine sehr geringe Remodulierung in Abwesenheit der SAGA-Komponente Gcn5 statt ((Gregory et al., 1999)). Darüber hinaus wird eine effiziente Bindung von Pho4 an UASp2 in beiden Mutationsstämmen beobachtet. Dies zeigt, daß die Faktoren Snf2 und Gcn5 erst für einen der Pho4-Bindung nachfolgenden Schritt nötig sind, um das Chromatin umzuordnen (siehe Abbildung 43 und (Gregory et al., 1999)).

Im Gegensatz dazu ist bei der Remodulierung am *PHO5*-Promotor unter voll induzierenden Bedingungen weder Snf2 ((Gaudreau et al., 1997)) noch Gcn5 ((Gregory et al., 1998)) nötig. Das Unvermögen des im *PHO8*-Promotorkontext an das *PHO5*-UASp2-Element gebundenen Pho4-Proteins, Chromatin zu remodulieren, scheint deshalb in seinem Unvermögen begründet zu sein, in produktiver Weise mit Komponenten des SWI/SNF- und/oder SAGA-Komplexes zu interagieren.

### 3.4.3 Am *PHO8*-Promotor ist Pho2 für die Pho4-Bindung und Chromatin-Umordnung nicht absolut nötig

Eine andere Eigenschaft, die den *PHO8*-Promotor unterscheidbar vom *PHO5*-Promotor macht, ist seine signifikante Aktivität in Abwesenheit von Pho2. Es konnte gezeigt werden, daß der *PHO5*-Promotor absolut Pho2-abhängig ist und daß das Pho2 eine duale Rolle im Aktivierungsprozeß spielt. Es ist absolut für die Bindung von Pho4 an UASp1 nötig, während an UASp2, wo die Bindung von Pho4 nicht absolut Pho2-abhängig ist, Pho2 hauptsächlich für die Fähigkeit von Pho4, zu transaktivieren, benötigt wird ((Barbaric et al., 1998)). Es konnte im weiteren gezeigt werden, daß Pho4 effizient in einer Pho2-unabhängigen Weise an *PHO8*-UASp2 binden kann, daß aber die Anwesenheit von Pho2 signifikant die *PHO8*-Aktivität erhöht (Tabelle 10). Deshalb ist der *PHO8*-Promotor partiell Pho2-abhängig, eine Schlußfolgerung, die auch durch Aktivitätsmessungen mit Pho4 $\Delta$ int, einem Pho4-Derivat mit fehlender Pho2-Interaktionsdomäne, bestätigt wird.

Pho4 $\Delta$ int bindet und aktiviert den *PHO8*-Promotor in einer Pho2-unabhängigen Weise in gleichem Ausmaß wie das Pho4wt (Abbildung 35B; (Munsterkötter et al., 2000)). Ich habe früher gezeigt, daß die Aktivierung für *PHO5*-UASp2 in Abwesenheit von Pho2 durch Pho4 $\Delta$ int höher als durch Pho4wt ist. Dieses Phänomen wurde durch die Annahme der Existenz einer repressiven Domäne in Pho4 erklärt, welche durch Interaktion mit Pho2 unter physiologischen Bedingungen neutralisiert ist, dagegen im Pho4 $\Delta$ int herausgeschnitten war ((Barbaric et al., 1998)). Der *PHO8*-Promotor ist ideal dazu geeignet, diese Hypothese zu testen; und in der Tat ist der Grad der Aktivierung durch Pho4 $\Delta$ int in vollständiger Übereinstimmung mit diesem Konzept.

Es ist wichtig zu bemerken, daß im Gegensatz zum *PHO5*-Promotor der *PHO8*-Promotor Pho2 nicht für die Chromatin-Umordnung benötigt ((Barbaric et al., 1992)). Dies ist konsistent mit der Fähigkeit von Pho4, in Abwesenheit von Pho2 an den *PHO8*-Promotor, aber nicht an den *PHO5*-Promotor zu binden. In einem *pho2*-Stamm resultiert die Überexpression von Pho4 in dem Wegfall der Pho2-Notwendigkeit der Pho4-Bindung an seiner Stelle; dies macht somit den *PHO5*-Promotor dem *PHO8*-Promotor recht ähnlich. Das Resultat ist weiter ein völlig offener (nukleosomenfreier) Promotor mit jedoch nur 20-25 % Aktivität ((Fascher et al., 1990)). Auch dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem Konzept, daß, wenn einmal Pho4 an einen Promotor gebunden ist, Pho2 sein

Aktivierungspotential weiter erhöht und nicht mehr nötig ist, um die Chromatin-Umordnung des Promotors zu instruieren.

#### **3.4.4 Die unterschiedlich starke Pho2-Notwendigkeit könnte eine Rolle in der Feinabstimmung der *PHO5*- und *PHO8*-Expression unter reprimierenden Bedingungen spielen**

Die Tatsache, daß sich *PHO5* und *PHO8* im Ausmaß der Pho2-Notwendigkeit unterscheiden, wirft die Frage der physiologischen Bedeutung dieses Unterschieds auf. Es wurde vermutet, daß die transkriptionelle Regulation des *PHO5*-Gens in Antwort auf Veränderungen der  $P_i$ -Konzentration durch die Regulation der Kernlokalisierung von Pho4 aufgrund seines Phosphorylierungsstatus reguliert wird ((Kaffman et al., 1998a)). Auf der anderen Seite ist nichts Vergleichbares bekannt, was die Aktivität von Pho2 modulieren könnte. Pho2 ist ein pleiotroper Faktor, der involviert ist in die Regulation sehr diverser Sätze von Genen, wie *HIS4* ((Arndt et al., 1987)), *TRP4* ((Braus et al., 1989)), *ADE5,7* ((Rolfes et al., 1997); (Zhang et al., 1997)) und *HO* ((Brazas et al., 1995); (McBride et al., 1997)); deshalb ist es nicht wahrscheinlich, daß seine Aktivität reguliert wird. Die kürzlich veröffentlichte Arbeit über die Rolle von einzelnen Serinresten in der Regulation der Pho4-Aktivität zeigte, daß die Phosphorylierung von Pho4 nicht nur die Kontrolle seiner nukleären Lokalisation regulierte, sondern – durch einen zweiten Regulationsmechanismus – auch die Interaktion zwischen Pho4 und Pho2. Phosphorylierung von Serin 114 und Serin 128 ist nötig und ausreichend für den nukleären Export von Pho4, während die Phosphorylierung von Serin 223 seine Fähigkeit, mit Pho2 zu interagieren, negativ reguliert ((Komeili and O'Shea, 1999)). Es wurde vorgeschlagen, daß die zwei Mechanismen zusammenwirken, um die *PHO5*-Expression vollständig zu reprimieren, während einer für sich alleine eine partielle Repression mit sich bringt. Der Befund, daß die Aktivierung des *PHO8*-Promotors nur teilweise Pho2-abhängig ist, würde deshalb zu der Vorhersage führen, daß die Pho4-Phosphorylierung nicht in einer völligen Repression von *PHO8* resultiert. Ein niedrigeres, aber signifikantes Ausmaß der *PHO8*-Expression wurde in der Tat auch unter repressiven Bedingungen, im Gegensatz zur Abwesenheit irgendeiner messbaren Aktivität des *PHO5*-Promotors, beobachtet (Tabelle 9 und (Barbaric et al., 1998)). Die Inhibierung der Pho2-Pho4-Interaktion unter repressiven Bedingungen wäre deshalb ein Mechanismus für eine unterschiedliche Feineinstellung der *PHO5*- und *PHO8*-Expression unter physiologischen Bedingungen.



### 3.4.5 Einfluß basaler Promotoren auf die Aktivität von Genen

Durch Ersetzen des basalen Promotors von *PHO8* gegen den basalen *PHO5*-Promotor erhält man beim *PHO8*-Hybridpromotoren eine um den Faktor 2 gegenüber beiden – dem Wildtyp-Promotor als auch der Variante mit den zwei *PHO5*-UAS-Elementen – erhöhte Aktivität. Der Grund für die erhöhte Aktivität, die mit dem basalen *PHO5*-Promotor erhalten wird, ist nicht ganz klar. Mutationsanalysen und Randomselektionen für funktionale TATA-Elemente definierten TATAAA als die Konsensus-TATA-Sequenz in Hefe ((Chen and Struhl, 1988); (Wobbe and Struhl, 1990); (Singer et al., 1990)); viele Derivate dieser Konsensussequenz erfüllen TATA-Funktion, aber mit verminderter Aktivität. Eine TATA-ähnliche Stelle ist im *PHO8*-Promotor von -124 bis -117 (TATATAAA perfekter Konsensus) und von -94 bis -88 (TATATA ein Fehler) gleich zweimal zu finden, während sie im *PHO5*-Promotor von -101 bis -95 (TATATAA ein Fehler) nur einmal auftritt. Es scheint möglich, daß spezifische Interaktionen zwischen TATA-Elementen und TBP dadurch gestört werden und damit der limitierende Schritt (Zusammenbaus des Transkriptions-Präinitiationskomplexes) für eine effiziente Initiation der Transkription *in vivo* betroffen ist ((Klein and Struhl, 1994)). Experimente, welche die Zusammenhänge zwischen TATA und Inr bestimmten, zeigten, daß das TATA-Element das Fenster definiert, in dem die Initiation stattfinden kann. Welche der spezifischen Sequenzen in diesem Fenster verwendet wird, hängt jedoch von anderen Faktoren ab. Die Qualität der spezifischen Startstellen und die Art ihrer Auswahl könnte daher entscheidend für die höhere Aktivität mit dem basalen *PHO5*-Promotor sein. Die Aktivität der stärksten Promotorvarianten, dem *PHO5*-UASp1, zusammen mit dem nativen *PHO8*-UASp2 ist nur um zusätzliche 20-30 % erhöht. Dies zeigt, daß der basale *PHO5*-Promotor nicht grundsätzlich einen 2fachen Anstieg aufweist, sondern bei Annäherung an den Platoowert geringer ausfällt. Im Gegensatz dazu ist die schwache Promotorvariante mit dem *PHO5*-UASp2 nicht im geringsten durch den heterologen basalen Promotor betroffen. Dies bestätigt, daß Pho4 – gebunden an dieses Element – transkriptionell inaktiv ist und daß die Transkriptionsinitiation am basalen Promotor abhängig zu sein scheint von einer effektiven Wechselwirkung zwischen Transkriptionsaktivator und Transkriptionsmaschinerie.

### 3.4.6 Rolle von Pho4

Die Bindung eines Transaktivatorproteins an seine Bindungsstelle in der Promotor-DNA mag direkt durch die Anwesenheit einer repressiven Chromatinstruktur inhibiert werden ((Landsberger and Wolffe, 1997)); der Vorgang der Bindung ist jedoch nicht

notwendigerweise ausreichend, um Remodulierung zu induzieren. Die Bindung einer Pho4-DNA-bindenden Domäne allein ist nicht hinreichend, um die Öffnung des Chromatins am *PHO5*-Promotor zu induzieren ((Svaren and Hörz, 1997)). Beobachtet werden kann ein ähnlicher Effekt auch mit Derivaten des *GAL* Promotors, wo sich der spezifische Transaktivator, Gal4, außerhalb des Zusammenhangs eines *bona fide*-Promotors befindet. Nachfolgend der Transkriptionsfaktorbindung trägt hier die Aktivierungsdomäne in ähnlicher Weise substantiell zur Auflösung der Ordnung der Chromatinstruktur bei ((Stafford and Morse, 1997)). Die Aktivierungsdomäne scheint eine zentrale Rolle in dem Chromatindisruptionsprozeß zu spielen. Experimente unseres eigenen Labors mit dem *PHO5*-Gen haben gezeigt, daß ein direktes Rekrutieren der basalen Transkriptionsmaschinerie die Notwendigkeit einer klassischen sauren Aktivierungsdomäne umgehen kann ((Gaudreau et al., 1997)). Die Frage blieb, was hierbei die Chromatin-Umordnung mit sich gebracht hat. Die Transkription allein scheint nicht notwendig für dieses Auflösen der Ordnung zu sein, da die Umordnung ebenfalls in TATA-losten Promotorkonstrukten beobachtet wurde. Andere Faktoren, wie TAF (TATA-box binding protein associated factor), Swi/Snf-like-chromatinremodulierende Maschinen ((Li et al., 1997)) und verschiedene Aktivatoren interagieren mit Komponenten von SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase, einem HAT-Komplex [(Sterner et al., 1999)]). Zudem zeigten Transkriptionsaktivatoren Interaktionen mit generellen Repressoren, wie Tup1-Ssn6. Vom Gal4-VP16-Hybridprotein wurden Interaktionen mit Med2, Pgd1 und Sin4, den Untereinheiten des SRB- bzw. Mediator-Komplexes ((Myers et al., 1999)) oder auch direkt zum PIC nachgewiesen ((Ranish et al., 1999)).

Eine andere attraktive Erklärungsmöglichkeit ist, daß eine spezifische Domäne, welche trennbar von der Aktivierungsdomäne ist, die Chromatindisruption initiiert. Eine Trennung beider Domänen wurde für viele Transaktivatorproteine versucht, für Pho4 war es jedoch unmöglich, diese zwei Funktionen auf molekularem Niveau zu trennen ((McAndrew et al., 1998)). Eine Deletion einer Domänen des muskelspezifischen transkriptionellen Aktivators MyoD, welche verschieden von der klassischen Aktivierungsdomäne ist, ermöglicht es dem Faktor zwar, an seine Stellen in reprimiertem Chromatin zu binden, dies jedoch ohne dabei aktivieren zu können ((Gerber et al., 1997)). Darüber hinaus hatten Untersuchungen des TR (thyroid hormone receptor) und des RXR (retinoid acid receptor) eine Region identifiziert, die spezifisch für die hormoninduzierte Chromatin-Umordnung benötigt wird ((Wong et al., 1997)). Allerdings sind die Bindung des TR-Proteins an DNA, die Remodulierung von Chromatin

und die Aktivierung der Transkription trennbare Schritte in der Regulation der Transkription durch TR ((Wong et al., 1997)).

### **3.4.7 Reprimierender Effekt der nukleosomalen Region (N-2 / N-3) am *PHO8*-Promotor**

Die Chromatinstrukturanalysen und Aktivitätsmessungen deuten einen repressiven Effekt der Nukleosomen -3 und -2 an. Sie durchlaufen während der Induktion im Gegensatz zum Nukleosom -4 nur eine partielle Remodulierung. Eine Deletion dieser Promotorregion resultiert in einem fast 2fachen Anstieg der Promotoraktivität. Die Aktivität der stärkeren Promotorvarianten mit dem *PHO5*-UASp1 ist in einem weit geringeren Umfang (~ 25 %) betroffen. Dies ist gut nachvollziehbar, wenn man betrachtet, daß *PHO5*-UASp1 im *PHO8*-Promotor bereits ein höheres Ausmaß der Remodulierung im Bereich der Nukleosomen -3 und -2 als der Wildtyp-Promotor zeigt. Dagegen ist die Aktivität der schwachen Promotorvarianten mit dem *PHO5*-UASp2, welches allein im *PHO8*-Promotor fast keine Chromatin-Umordnung zeigt, durch diese Deletion mehr als 3fach erhöht. Die direkte reziproke Korrelation zwischen dem Grad der Chromatinöffnung und dem Ausmaß der Aktivierung durch das Entfernen der Nukleosomen -3 und -2 macht klar, daß einer der entscheidenden vorausgehenden Schritte in der Aktivierung der Chromatinöffnung liegt. Neben einer Menge von *in vitro*-Rekonstitutionsexperimenten wurde die überzeugendste Demonstration der Repression der Transkription durch Chromatin vor rund 10 Jahren vom Grunstein-Labor erbracht. Sie zeigten, daß das Verhindern der Anordnung von intakten Nukleosomen in Hefe durch Absenken der Menge von Histon H4 die Promotoren von *CUP1*, *HIS3* und *PHO5* unter sonst nicht induzierenden Bedingungen aktiviert ((Han et al., 1988); (Durrin et al., 1992)). Viele Untersuchungen hatten sich auf die Regulation von induzierbaren Genen fokussiert, welche als Modellsystem für die Aufspaltung der Prozesse der Chromatinöffnung dienten. Für die Chromatinöffnung des *PHO8*-Promotors ist die Bindung des Transkriptionsfaktors Pho4 nötig. Jedoch scheinen quantitativ kaum unterscheidbare Bindungen – wie von *PHO8*-UASp2 und von *PHO5*-UASp2 – qualitativ unterschiedlich zu sein. Dieser Unterschied scheint vorrangig die Fähigkeit zu betreffen, mit repressiven Chromatinstrukturen zu interagieren. Wie sich eine effektive von einer ineffektiven Bindung molekular unterscheidet, ist bisher noch nicht geklärt. Zum anderen scheinen auch kooperative Wechselwirkungen zwischen dem Transkriptionsfaktor Pho4, gebunden an die zwei Elemente *PHO5*-UASp1 und *PHO8*-UASp2, einen deutlichen Beitrag vor allem zur Chromatin-Umordnung und weniger zur Aktivierung zu leisten. Dies ist konsistent mit der Ansicht, daß der Effekt der DNA-Deletion

einer sonst nukleosomenbesetzten Region in der Tat mehr eine Konsequenz der Verminderung der Chromatinrepression als nur ein Abstandseffekt ist.

### 3.4.8 Proteinkomplexe, die an der Chromatin-Umordnung beteiligt sind

Es konnte gezeigt werden, daß der SAGA-Komplex einen entscheidenden Beitrag bei der Aktivierung am *PHO8*-Promotor leistet und die Chromatin-Umordnung des *PHO8*-Promotors in einem *gcn5*-Stamm signifikant betroffen ist ((Gregory et al., 1999)). Da Gcn5 bereits eine Rolle bei der submaximalen Aktivierung des *PHO5*-Promotors spielt, lag es nahe, daß dies beim *PHO8*-Promotor auch der Fall wäre, da dieser schwache Promotor mit nur einem funktionalen UAS-Element und repressiver Chromatinstruktur dem Abhängigkeitskriterium für Gcn5 bzw. Snf2 bestens entsprach. In der Tat bestand eine Abhängigkeit des Promotors vom HAT-Aktivität beinhaltenden SAGA-Komplex und vom Swi/Snf-Komplex, der mittels ATPase-Aktivität wirkt. Beide Komplexe scheinen am *PHO8*-Promotor sogar kooperativ zu wirken. Weiter konnte durch *in vivo*-DMS-Footprintexperimente gezeigt werden, daß der Schritt der Transkriptionsfaktorbindung, welcher der Aktivierung vorausgeht, durch die Nichtacetylierung der Histone nicht betroffen ist. Die Nichtacetylierung der Histone hat somit keinen Einfluß auf die Fähigkeit des Pho4-Proteins, an das UASp2-Element des *PHO8*-Promotors, welches sich in einer hypersensitiven Region befindet, zu binden.

Es ist damit deutlich gezeigt, daß SAGA und SWI/SNF auch entscheidend sind, wenn UASp-Elemente in hypersensitiven Regionen bereits von Transkriptionsfaktoren gebunden sind, und daß sie nicht nur dann nötig sind, wenn ein Promotor-Element in einem positionierten Nukleosom liegt, wie es bei *SUC2* der Fall ist ((Hirschhorn et al., 1992)). Die Aktivierung des *PHO5*-Promotors, die zur Umstrukturierung von vier Nukleosomen führt, ist SWI/SNF-unabhängig und zeigt nur unter submaximalen Bedingungen eine gewisse Gcn5-Abhängigkeit. Die Frage stellt sich somit, ob die hier beschriebenen Unterschiede der *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren bezüglich Anzahl und Stärke der UASp-Elemente oder ob eher die Position von nukleosomalen Regionen die Abhängigkeit von diesen chromatinmodifizierenden Komplexen bestimmt. So ist Gcn5 nur bei schwachen Gcn4-Stellen ((Georgakopoulos and Thireos, 1992)) und Swi2/Snf nur bei schwachen Gal4-Stellen ((Burns and Peterson, 1997)) von Bedeutung. Noch zu klären ist, welchen Beitrag andere HAT-Aktivitäten leisten, wie z. B. TAFII130 ((Mizzen et al., 1996)), Sas2, Esa1, Pat1 oder Elp3, und ob es neben der Histonmodifizierung auch zur Modifizierung anderer Faktoren wie Sin1p (HMG-artig) kommt ((Pollard and Peterson, 1997)), die an der Regulation teilnehmen. Die Schwierigkeit

liegt bei einigen dieser HAT in ihrer Essentialität; so ist TAFII130 zwar nicht für eine aktivierte Transkription nötig, jedoch für den TFIID-Komplex und spielt eine entscheidende Rolle bei der Expression einiger Zellzykluskontrollgene ((Moqtaderi et al., 1996); (Walker et al., 1997)).

### **3.4.9 Die Genregulation ist durch eine Vielzahl kleiner Beiträge geprägt**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Mechanismen zur transkriptionellen Regulation befassen sich vorrangig mit Chromatin, der dynamischen Matrix von Histonen und Nichthistonproteinen, mit der die DNA-Grundlage assoziiert ist. Diese regulatorischen Prozesse werden von Transkriptionsfaktoren initiiert, die an spezifische DNA-Elemente (UASp) binden, wobei häufig kooperative Wechselwirkungen mit weiteren Elementen und mit anderen Transkriptionsfaktoren stattfinden. Eine effiziente Bindung des Transkriptionsfaktors führt aber nicht bereits immer zur Chromatin-Umordnung und Promotoraktivierung. Entscheidend sind der Kontext der Bindestelle und/oder das Vorhandensein weiterer modifizierender Faktoren wie HATs. Transkriptionsfaktoren gehen Verknüpfungen ein mit anderen Proteinen, die an der Chromatinmodifizierung beteiligt sind, oder direkt mit Proteinen des Transkriptionsapparates (Holoenzym). Die Gesamtaktivität beruht nicht nur auf einer Vielzahl kleiner Beiträge von DNA-Elementen, an die Transkriptionsfaktoren binden können, sondern vor allem auf der kooperativen Weise, in der dies geschieht, und stellt somit eine sehr effiziente Möglichkeit der Feinjustierung jedes Promotors dar. Die Dramatik eines „Alles oder Nichts“ scheint eher wenigen essentiellen Faktoren vorbehalten zu sein, da bei regulierenden Aktivitäten wie HAT, HDA oder ATPase immer wieder eine Redundanz unterschiedlicher Komplexe zu beobachten ist.

Im Phosphatasesystem sind die iniziiierenden Schritte der Transkription das kooperative Binden der Transkriptionsfaktoren Pho4 und Pho2; dies führt letztendlich zur Chromatinöffnung und Aktivierung. Noch offen ist, wie nach der Bindung die Signale weitergegeben werden, ob direkt über die saure Aktivierungsdomäne auf Bestandteile des Präinitiationskomplexes und/oder über weitere Kofaktoren, welche mittels modifizierender Komponenten die Chromatinstruktur verändern. Aufgrund seiner guten Vergleichbarkeit, aber auch unterschiedlichen Regulation ist das Phosphatasesystem ein guter Ansatzpunkt für weitere gezielte Studien.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	United States Biochemical Cleveland, Ohio, USA
Bal3I-Nuklease	Boehringer, Mannheim
DNaseI	Boehringer, Mannheim
Klenow-Enzym (Klenow-Fragment der DNA-Pol I)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsnukleasen	Boehringer, Mannheim New England Biolabs, Inc., USA, Promega
RNase A	Boehringer, Mannheim
Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit	United States Biochemical Cleveland, Ohio, USA
Taq-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA Ligase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
Zymolase 100T	ICN Immuno Biolog. Costa Mesa, CA, USA

#### 4.1.2 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose (SeaKem)	FMC Bio Products Rockland, ME, USA
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxidisulfat	E. Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar, -Trypton, -Pepton, -Yeast Extrakt	Difco Laboratoritis,

---

	Detroit, Michigan, USA
Bromphenolblau	E. Merck, Darmstadt
5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen
Carbenicillin	Sigma, Deisenhofen
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	BDH Chemicals Ltd., Pool, England
Dimethylsulfat	E. Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
DNA aus Heringssperma	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	E. Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Dinatriumsalz	E. Merck, Darmstadt
Ficoll 4000	Sigma, Deisenhofen
5-Fluororotsäure (5-FOA)	Sigma, Deisenhofen
Glucose	E. Merck, Darmstadt
Guanidiniumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Harnstoff	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	E. Merck, Darmstadt
Imidazol	E. Merck, Darmstadt
Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Lachs-Sperma-DNA	Serva, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	E. Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylenbisacrylamid	Biomol, Ilvesheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	E. Merck, Darmstadt
3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
o-Nitro-Phenylphosphat (ONPP)	Boehringer, Mannheim
o-Nitro-Phenyl-Galactopyranosid (ONPG)	Boehringer, Mannheim
Polyethylenglycol	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
Random-Primer p(dN) <sub>6</sub>	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen



SDS PAGE Molekulargewichtsmarker	USB USA
Sequagel-(XR)-Fertiglösung 6 %, 8 %	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA
Spermin	Sigma, Deisenhofen
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglycol)	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	E. Merck, Darmstadt
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Difco Laborities Detroit, Michigan, USA

#### 4.1.3 Radioaktive Substanzen

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ , $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ , $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$	Du Pont de Nemours, NEN, Division, Dreieich
---	--

#### 4.1.4 Sonstiges

$\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose	Qiagen,
Nitrocellulosemembran	Pall Filtrationstechnik, Dreieich
Nylonmembranen	Pall Filtrationstechnik, Dreieich
Qiagensäulen zur DNA-Reinigung	Diagen, Düsseldorf
Röntgenfilme Fuji RX	Fuji Photo Co., Tokyo, Japan
Sephadex G-50	Pharmacia LKB, Freiburg
Verstärkerschirme Curix MR 600	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Whatman,3MM-Papier	Whatman Limited, Springfield Mill Maidstone Kentucky USA

#### 4.1.5 Medien

##### 4.1.5.1 Medien für Escherichia coli

###### LB<sub>0</sub>-Medium:

10 g/l Trypton, 05 g/l Hefeextrakt, 05 g/l NaCl

Platten: 20 g Agar/l Medium

Antibiotika nach Bedarf:

225 mg/l Ampicillin, 500 mg/l Carbenicillin, 340 mg/l Chloramphenicol

#### 4.1.5.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

##### YPDA-Vollmedium:

1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glucose, 100 mg/l Adenin

Platten: 20 g Agar/l Medium

##### YNB-phosphathaltiges Minimalmedium:

6,7 g/l Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 100mg Adenin, 2 % (w/v) Glucose, 1,6 g/l Aminosäuren dropout

Platten: 20 g Agar/l Medium

##### Phosphatfreies Minimalmedium:

2 g/l L-Asparagin, 500 mg/l  $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l NaCl, 100 mg/l  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 100mg Adenin, 500  $\mu\text{g/l}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 40  $\mu\text{g/l}$   $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{g/l}$  KJ, 200  $\mu\text{g/l}$   $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 400  $\mu\text{g/l}$   $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 200 $\mu\text{g/l}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27} \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{g/l}$   $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{g/l}$ , 2 mg/l Inositol, 200 $\mu\text{g/l}$  Riboflavin, 200  $\mu\text{g/l}$  p-Aminobezoesäure, 2  $\mu\text{g/l}$  Biotin, 2  $\mu\text{g/l}$  Folsäure, 400  $\mu\text{g/l}$  Nicotinsäureamid, 400  $\mu\text{g/l}$  Pyridoxin-HCl, 400  $\mu\text{g/l}$  Thiaminchlorid, 13,4 mM KCl, 20 mM Natriumcitrat pH = 5,0, 2 % (w/v) Glucose, 1,6 g/l Aminosäure drop out siehe auch ((Svaren et al., 1995))

##### Aminosäure drop out:

2 g Adenin, 2 g Alanin, 2 g Arginin, 2 g Asparagin, 2 g Aspartat, 2 g Cystein, 2 g Glutamin, 2 g Glutamat, 2 g Glycin, 2 g meso-Inosit, 2 g Isoleucin, 2 g Lysin, 2 g Methionin (6 g bei *cpfl*), 0,2 g p-Aminobenzoesäure, 2 g Phenylalanin, 2 g Prolin, 2 g Serin, 2 g Threonin, 2 g Tryptophan, 2 g Tyrosin, 2 g Valin.

Histidin (2 g), Uracil (2 g) und Leucin (4 g) wurden nach Bedarf zugesetzt.

#### 4.1.6 Oligonukleotidsequenzen

##### 4.1.6.1 Oligonukleotide zur Amplifikation von *PHO5*-Promotorfragmenten

###### 4.1.6.1.1 *PHO5*-UASp1

*PHO5*-UASp1-up (*PHO5* Sequenz -405 bis -390): 5'-GCGCTTTTTCTTTGTC-3'

*PHO5*-UASp1-do (*PHO5* Sequenz -325 bis -340 revers): 5'-TTTTGGCATTGTGCAG-3'

#### 4.1.6.1.2 *PHO5*-UASp2

*PHO5*-UASp2-up(*Nco*I) (*PHO5*-Sequenz -345 bis -329): 5'-CGCAACTGCACAATGCC-3'

*PHO5*-UASp2-up(*Tru*I) (*PHO5*-Sequenz -316 bis -300): 5'-AGTGATTAAAAGAGTTA-3'

*PHO5*-UASp2-do (*PHO5*-Sequenz -208 bis -224 revers): 5'-AAACAGGGACCAGAATC-3'

#### 4.1.6.1.3 *PHO5*-UASp3

*PHO5*-UASp3-up (*PHO5*-Sequenz -221 bis -205): 5'-TCTGGTCCCTGTTTTTCG-3'

*PHO5*-UASp3-do (*PHO5*-Sequenz -158 bis -174 revers): 5'-TGCCAAGTAAGGTGACC-3'

#### 4.1.6.1.4 *PHO5*-lacZ

pPZ-up(*Apa*I- statt *Nhe*I-Stelle in pBR): 5'-TGGGGCCCCCTAGCGCTATATGCG-3'

pPZ-do(*lacZ*-Sequenz +16 bis -2 revers): 5'-CGGGATCCCCAAACATTG-3'

*lacZ*-down (*lacZ*-Sequenz +44 bis +24 revers): 5'-GGGTTTTCCAGTCACGACG-3'

#### 4.1.6.1.5 Oligonukleotide zur Amplifikation DMS behandelter DNA im *PHO5*-Promotor

(*PHO5*-UASp2-up(D) (*PHO5*-Sequenz -325 bis -288):

5'-AAAAGTAAAAGTGATTAAAAGAGTTAATTGAATAGGC-3')

*PHO5*-UASp2-do(Z) (*PHO5*-Sequenz -185 bis -207 revers):

5'-TTTGGCATGTGCGATCTCTTCGA-3'

Uli primer 1 (*PHO5*-Sequenz -158 bis -174 revers): 5'-GCCAAGTAAGGTGACC-3' für

UASp2 ((Venter et al., 1994)) primer B in ihrer Doktorarbeit genannt

#### 4.1.6.2 Oligonukleotide zur Modifikation des *PHO8*-Promotors

##### 4.1.6.2.1 Oligonukleotide für *PHO8*-upstream-Sonde

*PHO8*upSoup (*PHO8*-Sequenz -1224 bis -1201):

5'-GGTTGTTTTAGTGTCGATCGGGGC-3'

*PHO8*upSodo (*PHO8*-Sequenz -908 bis -931 revers):

5'-TGGCCCTCTTCTCAGTAAGAGAC-3'

##### 4.1.6.2.2 Oligonukleotide für Austausch der *PHO5*- gegen die *PHO8*-UASp-Elemente

*PHO8* UASp1(*PHO5*)-do (*PHO8*-Sequenz -700 bis -718 revers, *PHO5*-Sequenz -350 bis -387

revers, *PHO8*-Sequenz -758 bis -776 revers): 5'-ACTTGATTCTTCCTTGCCATGCGAA-

AACGTGCTAATTTAATATATATTTCTTTGTGACGCCTTCTTCTAGTAGG-3'

*PHO8*-UASp2<sub>(PHO5)</sub>-do (*PHO8*-Sequenz -501 bis -519 revers, *PHO5*-Sequenz -238 bis -262 revers, *PHO8*-Sequenz -545 bis -562 revers): 5'-CGCCTATTGTTGCTAGCAAGTGC-TAGTCCCACGTGTGAGTGCCAAGATGACCCTTTTGCCGA-3'

#### 4.1.6.2.3 Oligonukleotide für D296-Disruption im *PHO8*-Promotor

*PHO8*-Δ296 (*PHO8*-Sequenz -463 bis -445, *PHO8*-Sequenz -158 bis -144): 5'-CAAAATGCGATCAAAAAGGTTTCGCGCGTAGAGG-3'

(5'-CAAAATGCGATCAAAAAG(G/C)TTCGCGCGTAGAGG-3')

#### 4.1.6.2.4 Oligonukleotide für *PHO8*-Disruption mit *URA3*

*PHO8*-*URA3*int-up (*PHO8*-Sequenz -803 bis -761, *URA3*-Sequenz +848 bis +829 revers): 5'-GTTTCTTCACCAAATTTCTTTTTTTTTCTACTAGAAGAAGG  
GTGAGTTTAGTATACATGCA-3'

*PHO8*-*URA3*int-do (*PHO8*-Sequenz -472 bis -513 revers, *URA3*-Sequenz -227(-221) bis -208): 5'-GCCGCTGCTGTTGACTACCCTGTGGTCTGCGCCTATTGTTGC  
GATCTGGCTTTTCAATTCAA-3'

*PHO8*Δ296-*URA3*int-do (*PHO8*-Sequenz -118 bis -158 revers, *URA3*-Sequenz -227(-221) bis -208): 5'-CTTTATATACTAAAATCCCTTACTTTTCTCTACGCGCGAA  
GATCTGGCTTTTCAATTCAA-3'

#### 4.1.6.2.5 Oligonukleotide zur Amplifikation DMS behandelter DNA im *PHO8*-Promotor

*PHO8*-UASp2-up(B) (*PHO8*-Sequenz -599 bis -576):

5'-CCGTCCAGTCATGTCGTACAACGG-3'

(*PHO8*-UASp2-up(A) (*PHO8*-Sequenz -607 bis -584):

5'-CTGCATCACCGTCCAGTCATGTCG-3')

*PHO8*-UASp2<sub>(PHO5)</sub>-do(Z) (*PHO8*-Sequenz -467 bis -489 revers):

5'-TTGTTGCCGCTGCTGTTGACTAC-3'

#### 4.1.6.2.6 Oligonukleotide für *PHO8*-Promotor Amplifikation

*PHO8*-933up (*PHO8*-Sequenz -933 bis -910): 5'-CAGTCTTACTGAGAAAGAGGGC-3'

*PHO8*+35do (*PHO8*-Sequenz +35 bis +12 revers):

5'-CGTGTCTGTTTCGCTTGGTAATGTG-3'

*PHO8*+62do (*PHO8*-Sequenz +62 bis +39 revers):

5'-GAGCTGGAGTCAGATCCAGGAACA-3'

#### 4.1.6.2.7 Oligonukleotide für die Erzeugung von *PHO8*-Promotorfragmenten

*PHO8*-UASp1-up (*PHO8*-Sequenz -775 bis -758): 5'-CCTACTAGAAGAAGGCGT-3'

*PHO8*-UASp1-do (*PHO8*-Sequenz -691 bis -708 revers): 5'-TAAGGTCTTACTTGATTC-3'

*PHO8*-UASp2-up (*PHO8*-Sequenz -582 bis -566): 5'-ACAACGGAATAGGGCTC-3'

*PHO8*-UASp2-do (*PHO8*-Sequenz -484 bis -500 revers): 5'-GACTACCCTGTGGTCTG-3'

#### 4.1.6.2.8 Oligonukleotide zum Einführen einer *SpeI*-Stelle in den core *PHO5*- bzw.

##### *PHO8*-Promotor

*PHO5*-*SpeI* (*PHO5*-Sequenz -183 bis -166, *SpeI* -165 bis -160, *PHO5*-Sequenz -159 bis -140): 5'-TATCAAATTGGTCACCTTACTAGTCAAGGCATATAACCCATTTGG-3'

*PHO8*-*SpeI*-141 (*PHO8*-Sequenz -157 bis -145, *SpeI*:-144 bis -139, *PHO8*-Sequenz -138 bis -117): 5'-TCGCGCGTAGAGGACTAGTAAAGGGATTTTAGTATATAAAG-3'

*PHO8*-*SpeI*-206 (*PHO8*-Sequenz -231 bis -213, *SpeI*:-212 bis -207, *PHO8*-Sequenz -206 bis -190): 5'-ACACCCCTCGTAAGGCGCGACTAGTGGAAGAGCAGCATCGAC-3'

#### 4.1.6.3 DNA-Fragmente

##### 4.1.6.3.1 DNA-Fragmente für Rekonstitution

$\alpha$ -Satelliten-DNA (234 Bp) *Bam*HI-*Eco*RI-Fragment (nach Markierung mit *Cla*I nachgespalten) aus pBR153 (Linxweiler Dissertation).

Ein 183 Bp-Fragment des *PHO5*-Promotors (-340 bis -174) wurde mit *Nco*I und *Acc*65I (nach Markierung mit *Apa*I nachgespalten) Enden aus einen pUCBM20-Vektor herausgespalten, in welchen zuvor zwischen der *Sal*I- und *Nco*I-Stelle das *Xho*I-*Nco*I-*PHO5*-Promotorfragment aus pDO21(Labor) kloniert wurde (5'-CATGGCTGC.....ATTGCTCGACGGGCCCG-3').

#### 4.1.7 Reporter- und Expressionsplasmide

##### 4.1.7.1 *lacZ*-Reporterplasmide

Plasmid:	Bezugsquelle:
pPZ ( <i>PHO5-lacZ</i> )	Labor (Straka)
$\alpha$ 2- <i>PHO5-lacZ</i>	Arbeit
3 $\alpha$ 2- <i>PHO5-lacZ</i>	Arbeit
3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 46 <i>PHO5-lacZ</i>	Arbeit
3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 66 <i>PHO5-lacZ</i>	Arbeit

---

<i>3α2-Δ101PHO5-lacZ</i>	Arbeit
<i>PHO5-α2<sub>(-311 bis -280)</sub>-lacZ</i>	Arbeit
<i>Reb1-PHO5-lacZ</i>	Arbeit
<i>Reb1-Δ46PHO5-lacZ</i>	Arbeit
<i>Reb1-Δ66PHO5-lacZ</i>	Arbeit
<i>UASp1-mut-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>UASp2-mut-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>Pho4-Stelle3-mut-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1-mut + UASp2-mut-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1-mut + Pho4-Stelle3-mut-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>2xUASp2-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>M1-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>M2-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>M4+M5-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>M1+M4+M5-PHO5-lacZ</i>	Labor
<i>CYC1-lacZ (CYC1 Minimal-Promotor vor lacZ)</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO5)</sub>-CYC1-lacZ</i>	Labor
<i>UASp2<sub>(PHO5)</sub>-CYC1-lacZ</i>	Labor
<i>pPHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1-mut-PHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp2-mut-PHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1-mut + UASp2-mut-PHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO8)</sub>-CYC1-lacZ</i>	Labor
<i>UASp2<sub>(PHO8)</sub>-CYC1-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO5)</sub>-PHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO5)</sub>-UASp2-mut-PHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp2<sub>(PHO5)</sub>-PHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO5)</sub>-UASp2<sub>(PHO5)</sub>-PHO8-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO5)</sub>-PHO8-proxPHO5-lacZ</i>	Labor
<i>UASp2<sub>(PHO5)</sub>-PHO8-proxPHO5-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO5)</sub>-UASp2<sub>(PHO5)</sub>-PHO8-proxPHO5-lacZ</i>	Labor
<i>PHO8Δ296-lacZ</i>	Labor
<i>UASp1<sub>(PHO5)</sub>-PHO8Δ296-lacZ</i>	Labor
<i>UASp2<sub>(PHO5)</sub>-PHO8Δ296-lacZ</i>	Labor

UASp1<sub>(PHO5)</sub>-UASp2<sub>(PHO5)</sub>-PHO8Δ296-lacZ Labor

#### 4.1.7.2 Expressionsplasmide

##### 4.1.7.2.1 Plasmide für Proteinexpression in Hefe

Plasmid:	Bezugsquelle:
YCpP4(Pho4wt 1-3 Kopien pro Zelle)	Labor
YCpP2(Pho2wt 1-3 Kopien pro Zelle)	Stillman Labor
YCpP4Δint (Pho4Δint 1-3 Kopien pro Zelle)	Labor
YEpP4(Pho4wt 50-70 Kopien pro Zelle)	Labor (A. Hinnen)

##### 4.1.7.2.2 Plasmide für Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

pET-21d( <i>E. coli</i> Expressionsvektor mit hexa HIS tag)	Novagen
pET-Pho2-HIS	Stillman Labor
pET-Pho4-HIS	Arbeit
pET -Pho4Δint-HIS	Arbeit
pLysS(Lysozym Expressionsplasmid)	Novagen

##### 4.1.7.3 Vektoren zur Subklonierung und Sequenzierung

Plasmid:	Bezugsquelle:
pBR322	Boehringer, Mannheim
pUC19	Boehringer, Mannheim
pUC19-URA3	G. Mannhaupt
pUC20BM	Boehringer, Mannheim
Bluescript SK <sup>-</sup>	Stratagene, Heidelberg
SK <sup>-</sup> -PHO5-lacZ	Labor
SK <sup>-</sup> -PHO8-UAS2.5-lacZ	Labor

#### 4.1.8 Organismen

##### 4.1.8.1 Bakterienstämme

Stamm:	Genotyp:	Bezugsquelle:
<i>E. coli</i> 490A	r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> , met <sup>-</sup> , thr <sup>-</sup> , leu <sup>-</sup> , rec <sup>-</sup>	G. Hobom, Gießen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS		Novagen

## 4.1.8.2 Hefestämme

Stamm:	Genotyp:	Bezugsquelle:
YS18 $\alpha$	( <i>MATa</i> ; <i>his3-11</i> , <i>his3-15</i> ; <i>leu2-3</i> , <i>leu2-112</i> , <i>can<sup>R</sup></i> , <i>ura3<sup>D5</sup></i> )	A. Hinnen
YS18a	( <i>MATa</i> ; <i>his3-11</i> , <i>his3-15</i> ; <i>leu2-3</i> , <i>leu2-112</i> , <i>can<sup>R</sup></i> , <i>ura3<sup>D5</sup></i> )	A. Hinnen
YS19	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho2</i> )	Labor
YS22	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho4</i> )	Labor
YS27	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho2</i> , <i>pho4</i> )	Labor
YS31	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho80::HIS3</i> )	Labor
YS32	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho2</i> , <i>pho80::HIS3</i> )	Labor
YS42	(wie YS18 $\alpha$ , <i>cpf1::LEU2</i> , <i>pho2</i> )	Labor
YS45	(wie YS18 $\alpha$ , <i>cpf1::LEU2</i> )	Labor
YS46	(wie YS18 $\alpha$ , <i>cpf1::LEU2</i> , <i>pho4</i> )	Labor
YS78	(wie YS18 $\alpha$ , <i>cpf1::LEU2</i> , <i>pho2</i> , <i>pho4</i> )	Labor
YS84	(wie YS18 $\alpha$ , <i>sin4</i> )	Labor
YS201	(wie YS45 $\alpha$ , <i>pho4::URA3</i> )	Arbeit
YS202	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho8::URA3</i> )	Arbeit
YS203	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho8::ura3</i> )	Arbeit
YS204	(wie YS18 $\alpha$ , <i>pho8<sup>DUASp1</sup></i> , <i>UASp2::URA3</i> )	Arbeit
YS205	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8re</i> )	Arbeit
YS206	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8re</i> , <i>cpf1::URA3</i> )	Arbeit
YS207	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8re</i> , <i>pho2::URA3</i> )	Arbeit
YS208	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8re</i> , <i>pho4::URA3</i> )	Arbeit
YS209	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8<sup>D296</sup></i> )	Arbeit
YS210	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8<sup>D296</sup></i> , <i>cpf1::URA3</i> )	Arbeit
YS211	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8<sup>D296</sup></i> , <i>pho2::URA3</i> )	Arbeit
YS212	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8<sup>D296</sup></i> , <i>pho4::URA3</i> )	Arbeit
YS213	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8-UASp1<sub>(PHO5)</sub></i> )	Arbeit
YS214	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8-UASp2<sub>(PHO5)</sub></i> )	Arbeit
YS215	(wie YS18 $\alpha$ , <i>PHO8-UASp1<sub>(PHO5)</sub></i> , <i>UASp2<sub>(PHO5)</sub></i> )	Arbeit
YS216	(wie YS45 $\alpha$ , <i>PHO8-UASp2<sub>(PHO5)</sub></i> )	Arbeit
YS218	(wie YS45 $\alpha$ , <i>gcn5</i> )	Labor
YS518	(wie YS18 $\alpha$ , <i>gcn5</i> )	Labor



## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Klonierungstechniken in *E. coli*

Sämtliche Standardtechniken wurden nach Maniatis durchgeführt:

- Restriktionsspaltungen
- Ligierungen
- Entfernen von 5'-Phosphatresten der DNA mit alkalischer Phosphatase (Shrimp), mit anschließender Hitzeinaktivierung bei 75°C
- Entfernen von 3'-Überhängen und Auffüllen von 5'-Überhängen mit T4-DNA-Polymerase
- Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:
  - a) Zentrifugieren eines aus TAE- oder TEB-Agarosegelen ausgeschnittenen DNA-Fragmentes durch ein Filterpapierstückchen (Schleicher und Schuell, Dassel)
  - b) Qiaex-Gelextraktionskits (Diagen, Düsseldorf)
  - c) Elektroelution aus TEB-Agarosegelstückchen in Dialysemembran

### 4.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode {Barbaric, Münsterkötter, et al. 1996 1721 /id}(Dagert and Ehrlich, 1979) wurden 100 ml einer logarithmisch gewachsenen Bakterienkultur bei einer O.D.<sub>600</sub> von 0,1 bis zu 0,5 abzentrifugiert und in 30 ml TFBI-Puffer (30 mM KOAc, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 15 % [w/V] Glycerin, pH = 5,8) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (2500 rpm; 5°C, 5 min) wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem TFBII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15 % (w/V) Glycerin, pH = 7,0) resuspendiert und aliquotiert. Tiefgefroren bei -80°C sind diese Bakterien bis zu einem Jahr hochkompetent.

### 4.2.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

20 µl eines Ligierungsansatzes wurden mit 30 µl TMC-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) auf 100 µl kompetenten *E. coli* pipettiert und eine Stunde in Eis inkubiert. Die Bakterien wurden einem Hitzeschock bei 42°C und anschließend einer einstündigen Inkubation in LB-Medium unterzogen, abzentrifugiert, auf ampicillinhaltigen Agarplatten (225 mg Ampicillin/l Medium) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 4.2.4 DNA-Fragmente und Klonierungen

### 4.2.4.1 DNA Fragmente

*PHO5*-DNA-Restriktionsfragmente, welche für DNaseI-Footprints und Gelretardationsanalysen gebraucht wurden, entstammen den *PHO5-lacZ*-Fusionplasmiden ((Straka and Hörz, 1991)). Sie enthalten den *PHO5*-Wildtyp-Promotor oder subklonierte Derivate mit Restriktionsspaltstellen, welche nicht im Wildtyp-Promotor zu finden sind.

### 4.2.4.2 Hefereporterplasmide

Das *PHO5-lacZ*-Reporterplasmid ist bei Straka et al. ((Straka and Hörz, 1991)) beschrieben. In dem *PHO5-lacZ*-Reporter mit 2xUASp2 wurde das UASp1 durch UASp2, wie für YS70 beschrieben, ersetzt ((Venter et al., 1994)). Die *PHO5-UAS-CYC-lacZ*-Reporter wurden – wie bereits bei Sengstag beschrieben ((Sengstag and Hinnen, 1988)) – aus einem Multikopienhefeplasmid konstruiert, welcher eine *CYC1-lacZ*-Genfusion enthält ((Guarente and Ptashne, 1981)). Ein 31 Bp-*PHO5*-Promotorfragment von -381 bis -351 wurde als UASp1-Fragment genutzt (Sengstag et al., 1988), und als UASp2-Element wurde in – Übereinstimmung mit dem Pho4-Footprint ((Vogel et al., 1989)) – ein 24 Bp-Oligonukleotid von Position -262 bis -239 genutzt.

Das *PHO8-lacZ*-Reporterplasmid wurde aus dem beschriebenen *PHO5-lacZ*-Reporterplasmid ((Straka and Hörz, 1991)) konstruiert, und zwar durch Austausch des *Bam*HI-*Bam*HI-*PHO5*-Promotorfragments gegen ein PCR-regeneriertes *PHO8*-Promotorfragment, welches 902 Bp flüßauf liegend des Startkodons begann. Alle Varianten des *PHO8*-Promotors wurden von diesem *PHO8-lacZ*-Reporterplasmid durch die PCR-Megaprimertechnik konstruiert ((Sarkar and Sommer, 1990)). Beschreibung der Konstruktionsplanung siehe Abschnitt 2.4.1. Abbildung 33A. Für die UASp-Mutationen wurde die zentrale hexanukleotide Konsensussequenz in eine *Hind*III-Stelle (5'-AAGCTT-3') verwandelt. Für den UASp1-Austausch wurde anstatt der *PHO8*-Sequenz von -757 bis -718 (beginnend mit ACGA und endend mit GTAA) die *PHO5*-Sequenz von -388 bis -355 (CACA ... GCAT) verwendet. Für den UASp2-Austausch wurde die *PHO8*-Sequenz -543 bis -522 (beginnend mit ACGT und endend mit CGAT) durch die *PHO5*-Sequenz von -262 bis -241 (TGGC ... CTAG) ersetzt und zusätzlich die anschließende *Nhe*I-Stelle (GCTAGC) zu einer *Sph*I-Stelle (GCTAGC) mutiert.

Der Austausch des proximalen Promotors geschah durch Benutzung der *Spe*I-Stelle als Punkt der Transition von *PHO8* nach *PHO5*. Hierfür wurde zuvor jeweils eine *Spe*I-Stelle

(ACTAGT) eingeführt, und zwar bei Position -144 bis -139 in den *PHO8*-Promotor und bei Position -165 bis -160 in den *PHO5*-Promotor.

Für die Deletion von Nukleosom -2 und -3 wurde ein 296 Bp-Fragment zwischen Position -443 und -158 (startend mit CCAG und endend mit AAGC) aus dem *PHO8*-Promotor entfernt.

Die *PHO8-UAS-CYCI-lacZ* Reporter wurden ebenfalls, wie bei Sengstag beschrieben, ((Sengstag and Hinnen, 1988)) aus einem Multikopienhefeplasmid konstruiert, welcher eine *CYCI-lacZ*-Genfusion enthält ((Guarente and Ptashne, 1981)). Ein 30 Bp-Promotorfragment von -747 bis -718 wurde als UASp1-Element und ein 25 Bp-Promotorfragment von -543 bis -519 als UASp2-Element verwendet. In beiden Fällen enthielten die Reporterplasmide zwei aufeinanderfolgende Kopien des UAS-Oligonukleotids, jedoch in einer zum natürlichen Promotor entgegengesetzten Orientierung, um die Aktivität zu erhöhen.

#### **4.2.4.3 Klonierung von Expressionsplasmiden zur Herstellung von rekombinanten Hefeproteinen in *E. coli***

Das *PHO2-HIS*-Expressionsplasmid ((Brazas and Stillman, 1993)) stellte uns freundlicherweise D. J. Stillman zur Verfügung. Das *PHO4-HIS*-Expressionsplasmid ((Barbaric et al., 1996)) wurde aus einem Plasmid erzeugt, in welches eine *NcoI*-Stelle am *PHO4*-Startkodon inseriert wurde (von A. Hinnen). Ein *NcoI-BbrPI*-Fragment dieses Plasmids wurde in den *NcoI*- und *EagI*-gespaltenen pET-21d-Vektor (Novagen) kloniert. Dies fügt zusätzlich 10 Aminosäuren an das Carboxyende von Pho4 an, die letzten sechs von ihnen sind Histidine. Das *PHO4<sup>Dint</sup>-HIS*-Expressionsplasmid wurde durch Subklonieren eines internen *PHO4<sup>Dint</sup>*-Fragments in *PHO4-HIS* erzeugt.

#### **4.2.4.4 Klonierung der Hefeexpressionsplasmide**

YEp-Pho4 und YEp-Pho4 $\Delta$ 2 sind bei Svaren et al. ((Svaren et al., 1994)) beschrieben und Pho2-VP16 und PHO4 $\Delta$ int von Hirst et al. ((Hirst et al., 1994)). YCpP4 ist bei Svaren et al. (1994) beschrieben und YCpP4 $\Delta$ int bei Barbaric et al. (1998).

#### **4.2.4.5 Integration der modifizierten *PHO8*-Promotoren**

Die modifizierten *PHO8*-Promotorvarianten wurden in einem Zwei-Schritt-Verfahren in den chromosomalen Locus integriert. Zunächst wurde der Wildtyp-*PHO8*-Promotor durch das

*URA3*-Gen ersetzt. Im zweiten Schritt wurde das *URA3*-Gen durch ein *Bam*HI-Fragment der *PHO8*-Promotorvarianten wieder ersetzt, dabei zeigte eine FOA-Selektion den erfolgreichen Austausch. Mittels chromosomaler PCR ließ sich die erfolgte Integration der Promotorvarianten nachweisen. Beschreibung der Integration und Nachweis siehe Abschnitt 2.4.2. Abbildung 33B.

#### 4.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Für analytische Untersuchungen wurde Plasmid-DNA nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) aus *E. coli* isoliert. Präparative Isolierungen erfolgten unter Verwendung von Qiagen-Silicagel-Anionenaustauschersäulen (Diagen, Düsseldorf).

#### 4.2.6 DNA-Sequenzierung

Sequenziert wurde Plasmid-DNA nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) bzw. nach der PCR basierenden Cycle-Sequencing-Methode. Dabei wurde der „Sequenase DNA Sequencing Kit“ bzw. der „Cycle Sequencing Kit“ der Firma USB verwendet. Nach fünf Minuten Denaturierung bei 95°C wurden die mit <sup>35</sup>S markierten Fragmente in 6%igen PAA-Gelen (20 x 40 cm) mit 7 M Harnstoff aufgetrennt. Als Laufpuffer diente Tris/Boratpuffer (100 mM Tris, 83 mM Borsäure, 1 mM EDTA pH 8,8).

#### 4.2.7 Hefetransformation

Die Transformation von Plasmid-DNA in logarithmisch wachsende Hefezellen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Ito et al., 1983). Logarithmisch gewachsene Zellen wurden zentrifugiert (4000 rpm; 5 min; 5°C), mit sterilem TE-Puffer, pH = 7,4 gewaschen und eine Zellsuspension von 30 O.D.<sub>600</sub> in sterilem TE-Puffer; pH = 7,4 hergestellt. Zu dieser wurde 0,2 M Lithiumacetat zugesetzt, bis die Endkonzentration an Lithiumacetat 0,1 M betrug. Transformiert wurden jeweils 100 µl Zellsuspension mit 1-5 µg DNA, wobei 30 Minuten bei 30°C inkubiert wurde, danach pro Ansatz das gleiche Volumen an 60%igem, sterilen PEG zupipettiert wurde und nach 60-minütiger Inkubation bei 30°C die Zellen einem Hitzeschock von 5 Minuten bei 42°C unterzogen wurden. Nach dem Waschen in sterilem Wasser wurden die Zellen auf selektionierenden YNB-Platten ausplattiert und 2-5 Tage bei 30°C inkubiert.

#### 4.2.8 Isolierung von chromosomaler Hefe-DNA

Über Nacht gewachsene Hefekulturen in 2,5 ml Vollmedium oder 10 ml Minimalmedium wurden mit 4000 rpm abzentrifugiert und in 250 µl Sorbit/β-Mercaptoethanol-Lösung (0,9 mM Sorbit; 140 mM Mercaptoethanol in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH = 7,4) mit 400 µg/ml Zymolase 100T 40 Minuten bei 37°C lysiert. Nach 30 Minuten Proteinase-K-Inkubation (EDTA (Endkonzentration 30 mM), SDS (Endkonzentration 2 %) und 2 mg/ml Proteinase K) wurde die wäßrige DNA-enhaltende Phase jeweils einmal mit 1:1 Phenol/Chloroform (1:24 Isoamylalkohol : Chloroform) und Chloroform ausgeschüttelt. Nach einer Ethanol-fällung erfolgte der RNA-Abbau in einer 8%igen Rnase-A-Lösung; die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und in TE pH = 8,0 resuspendiert.

#### 4.2.9 Messung der β-Galaktosidase-Aktivität

Aus über Nacht gewachsenen stationären YNB-Kulturen wurden logarithmisch wachsende YNB-Kulturen angeimpft. Zur β-Galaktosidase-Aktivitätsmessung wurden diese abzentrifugiert und in 1 ml Z-Puffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Die O.D.<sub>600</sub> wurde von 200 µl Zellsuspension bestimmt, und die restlichen 800 µl wurden mit 50 µl 0,1 % SDS und 20 µl Chloroform gevortext und 5 Minuten bei 30°C geschüttelt. Als Substrat wurden jeweils 200 µl ONPG (ortho-Nitro-Phenyl-β-D-Galaktopyranosid) in wäßrige Lösung (4 mg/ml) zugesetzt und die Reaktion nach Gelbfärbung mit 0,5 ml 1 M Natriumcarbonat beendet. Die Absorption A der zentrifugierten zellfreien Reaktionslösung wurde bei 420 nm bestimmt ((Guarente, 1983); siehe auch (Straka and Hörz, 1991)).

β-Galaktosidase-Aktivität (U) =

$$\frac{10000 * A_{420}}{O.D._{600} / ml * 0.8ml * t(\text{min})}$$

#### 4.2.10 Messung der sauren Phosphataseaktivität

Logarithmisch gewachsene Hefekulturen bei einer O.D.<sub>600</sub> von 1-2 wurden nach dem Abzentrifugieren in 2 ml 0,1 M Natriumacetat pH = 3,6 aufgenommen. 1 ml der Zellsuspension wurde zur O.D.<sub>600</sub>-Bestimmung verwendet und 1 ml mit 1 ml 20 mM o-Nitro-Phenylphosphat in 0,1 M Natriumacetat, pH = 3,6 bei 30°C 10 min inkubiert. Beendet wurde die Reaktion

durch Zusetzen von 0,5 ml 1 M NaOH. Die Absorption der zellfreien Reaktionslösung wurde bei 410 nm gemessen.

saure-Phosphataseaktivität (U) =

$$\frac{1000 * A_{410}}{O.D._{600} / ml * 1ml * 10(\text{min})}$$

#### 4.2.11 Messung der alkalischen Phosphataseaktivität

Logarithmisch gewachsene Hefekulturen bei einer O.D.<sub>600</sub> von 1-2 wurden nach dem Abzentrifugieren in 1 ml Puffer (5 mM Magnesiumsulfat/50 mM Tris-HCl pH = 8,8) aufgenommen. 200 µl der Zellsuspension wurde zur O.D.<sub>600</sub>-Bestimmung verwendet, und 800 µl wurden mit 50 µl 0,1 % SDS und 20 µl Chloroform gevortext und 5 Minuten bei 30°C geschüttelt, danach mit 200 µl 100 mM o-Nitro-Phenylphosphat in 5 mM Magnesiumsulfat/50 mM Tris-HCl pH = 8,8 bei 30°C inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Zusetzen von 0,5 ml 1 M NaOH. Die Absorption der zellfreien Reaktionslösung wurde bei 410 nm gemessen.

alkalische Phosphataseaktivität (U) =

$$\frac{10000 * A_{410}}{O.D._{600} / ml * 0.8ml * t(\text{min})}$$

#### 4.2.12 Isolierung von Hefezellkernen

Anzucht von Hefezellen in glucosehaltigen Medien: Zum Animpfen von +P<sub>i</sub>- und P<sub>i</sub>-Kulturen dienten logarithmisch wachsende +P<sub>i</sub>-Vorkulturen im Bereich einer O.D.<sub>600</sub> von 0,5-1,5. Aus diesen Vorkulturen wurden jeweils 500 ml +P<sub>i</sub>-Kulturen mit einer O.D.<sub>600</sub> von 0,003 angeimpft. Für -P<sub>i</sub>-Kulturen wurde das Phosphat der vorkultivierten Hefezellen zweimal mit bidestilliertem, sterilem Wasser ausgewaschen und jeweils 500 ml -P<sub>i</sub>-Medium mit einer

O.D.<sub>600</sub> von 0,35-0,5 angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C erfolgte die Zellkernisolierung, wenn die Zellen eine O.D.<sub>600</sub> von 1-4 erreicht hatten (Almer and Hörz, 1986).

#### **4.2.13 Auftrennung von DNA in Agarosegelen; Southern Transfer auf geladene Nylonmembranen und Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA**

Analytische Gele enthielten 0,6-2,0 % w/v Agarose in 1xTEB-Puffer (90 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA (Na)<sub>2</sub>, 90 mM Borsäure, pH 8,3). Die Gele wurden horizontal bei einer Spannung von 100-200 V elektrophoresiert.

Präparative Gele enthielten 0,6-1,5 % w/v-Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA(Na)<sub>2</sub>, pH 7,4). Die Gele wurden horizontal bei einer Spannung von 100 V elektrophoresiert.

Für einen späteren Southern Transfer wurde die DNA auf präparative Gele aufgetragen, diese wurden jedoch vertikal bei einer Spannung von 100 V elektrophoresiert. Nach der Gelelektrophorese wurden die präparativen TAE-Agarosegele 15 Minuten in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,1 M NaOH) unter vorsichtigem Schütteln behandelt. Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht auf die zunächst in Wasser und dann in 20 x SSC äquilibrierte Nylonmembran (Pall) in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat). Anschließend wurde die Membran prähybridisiert, und zwar in 500 ml 3 x SSC/1xDenhardt 2 Stunden bei 68°C, weitere 2 Stunden in einem rotierenden Zylinder in 25 ml 3 x SSC/1xDenhardt (0,5 % SDS, 1 mM EDTA (Na)<sub>2</sub>, 0,02 % Rinderserumalbumin, 0,02 % Ficoll, 0,02 % Polyvinylpyrrolidon) und 50 µg/ml gescherter Lachsspermien-DNA.

Hybridisiert wurde sie danach mit radioaktiv markierter Sonde 16 Stunden im rotierenden Zylinder in 4 ml 3 x SSC, 1 x Denhardt mit 50 µg/ml gescherter Lachsspermien-DNA hybridisiert. Die Membranen wurden je einmal in 500 ml 2 x SSC, 1 x Denhardt und 500 ml 2 x SSC, 0,5 % SDS bei 68°C abgewaschen und in 2 x SSC gespült. In Haushaltsfolie verpackt, wurden die Membranen mit einem Röntgenfilm und einem Verstärkerschirm Curix MR600 eine Stunde bis mehrere Tage bei -70°C exponiert.

#### **4.2.14 Analyse von *in vivo*-Proteinbindung mit Dimethylsulfat (DMS)**

Für die *in vivo*-Behandlung (Svaren et al., 1995) von wachsenden Hefezellen mit DMS wurden 500 ml über Nacht angezogene Hefezellkulturen bei einer O.D.<sub>600</sub> von 1-2, 10 Minuten bei 10-20°C mit 3000 rpm zentrifugiert und in 1,5 ml Medium pro 1er O.D.<sub>600</sub> (entspricht 1 x 10<sup>7</sup>) Zellen resuspendiert. Die Ansätze von je 1,5 ml wurden bei Raumtemperatur 9 (+P<sub>i</sub>)

und 20 (-P<sub>i</sub>) Minuten mit 2 µl DMS inkubiert und zur Beendigung der Methylierungsreaktion mit 40 ml eiskaltem TEN-Puffer versetzt (10 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 1 mM EDTA; 40 mM NaCl). Nach einer Zentrifugation bei 5°C bei 3000 rpm wurden die Zellen in 0,8-0,9 ml SCED-Puffer (1 M Sorbitol; 0,1 M Natrium-Citrat, pH 5,8; 10 mM EDTA; 2 mM Dithiothreitol) resuspendiert, so daß ein Gesamtvolumen von 1 ml erreicht wurde. Anschließend wurden pro Ansatz 100 µl einer wäßrigen Zymolase 100T-Suspension (10 mg/ml) zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,8-0,9 ml lysiert, und zwar in einer Lösung von 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 durch Zusatz von 50 µl 20%iges SDS bei 65°C auf einem Heizschüttler 30-45 Minuten (Gesamtvolumen mit den Zellen sollte wieder 1 ml ergeben). Die Reaktion war beendet, wenn die vorher trübe Suspension durchsichtig erschien. Durch Schwenken mit 400 µl 5 M KOAc pH = 8,0 und anschließender 1stündiger Inkubation auf Eis ließen sich nach 10minütiger Zentrifugation bei 5°C die Proteine und das SDS abtrennen. Die DNA in den Überständen wurde mit 0,65 ml Isopropanol vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, mit 70%igen eiskaltem Ethanol gewaschen, 2-3 Minuten lyophilisiert und in 594 µl TE mit 8 µl RNase A (0,5 µg/µl) eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Gefällt und abzentrifugiert wurde die DNA bei Raumtemperatur mit 2 ml 5 M NaCl und 0,4 ml Isopropanol, anschließend wurde die DNA mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und jeder Ansatz in einem Spaltpuffer von 540 µl H<sub>2</sub>O, 60 µl Boehringer B-Spaltpuffer und 7,5 µl *EcoRV* bzw. *BamHI* (40 U/µl) bei 37°C auf dem Heizschüttler eine Stunde gespalten, um die Viskosität der DNA zu verringern. Nachspalten ließe sich mit jedem Restriktionsenzym, welches nicht zwischen dem Anfangspunkt der zum Primer komplementären Sequenz und dem zu untersuchenden DNA-Bereich schneidet. Gefällt wurde dann bei -80°C in einem Ethanol/Trockeneis-Gemisch mit 8 µl 5 M NaCl und 1 ml Ethanol. Nach dem Abzentrifugieren bei 5°C und 10000 rpm, Waschen mit 70%igem eiskaltem Ethanol und kurzem Trocknen in einer Lyophilise wurde die mit DMS behandelte DNA in TE pH 8,0 resuspendiert. Pro 1 ml Kultur mit einer O.D.<sub>600</sub> von 1 wurden 100 µl TE als DNA-Solvens verwendet.

Eine zusätzliche chemische Spaltung der methylierten Guanosinen mit Piperidin war nicht notwendig, sogar eher von Nachteil, da Piperidinspuren die PCR-Reaktionen inhibieren können (Brewer et al., 1990).



#### 4.2.15 „*In vitro*“-DMS-Behandlung von freier Plasmid-DNA

Als Referenz zur *in vivo*-DMS-behandelten DNA diente aus *E. coli* isoliertes Plasmid. Freie Plasmide werden an jedem Guanosin methyliert, weil keine schützenden Nihthistonproteine an der DNA gebunden sind. Zu 1 µg freier Plasmid-DNA und 50 µg ultra-beschallter Lachs-DNA wurden bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 100 µl wäßriger Lösung 2 µl DMS (99 %, E. Merck, Darmstadt) zugegeben. Nach 5 Minuten wurde die Methylierung mit 4 µl 5 M NaCl und 90 µl Isopropanol beendet, bei Raumtemperatur abzentrifugiert, mit 80%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, 3 Minuten lyophilisiert und in 100 µl eine Stunde mit *EcoRV* bzw. *BamHI* nachgespalten. Aufgenommen wurde die DNA nach einer weiteren Isopropanolfällung in 100 µl TE pH 8,0.

#### 4.2.16 Oligonukleotid-Verlängerungsreaktionen

##### 4.2.16.1 Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden

Verwendet wurden HPLC-gereinigte Oligonukleotide (MWG Biotech) einer Länge von 18 bis 24 Nukleotiden. Die Markierung am 5'-Ende des Primers erfolgte pro Ansatz mit 5 pmol Primer, 10 pmol  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP und 1,5 µl T4-Polynukleotid-Kinase, gepuffert mit T4-Polynukleotid-Kinase-Fertigpuffer (Boehringer), in 15 µl Gesamtvolumen bei 37°C für 30 Minuten. Über Sephadex-G50-Säulen wurden nicht eingebaute Nukleotide von dem markierten Primer getrennt (Maxam and Gilbert, 1980).

##### 4.2.16.2 Primerextensionsreaktion mit Hilfe von Taq-Polymerase

Die Amplifikation der durch DNaseI oder DMS-Behandlung entstandenen DNA-Fragmente erfolgte in einem Volumen von 100 µl. Ungefähr 10 µg der *in vivo* oder 6 ng der *in vitro* behandelten DNA wurden in Taq-Polymerase-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH = 8,3; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM KCl; 0,1 mg/ml Gelatine) mit ca. 400.000 cpm endmarkierten Oligonukleotiden versetzt, je 0,25 mM dATP, dGTP, dCTP sowie dTTP und 5 U Taq-Polymerase. Die Mischung wurde für 30 Zyklen (1 min 95°C, 2 min 45°C, 3 min 70°C) in einer PCR-Maschine inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 13,2 ml einer frisch hergestellten Proteinase-K-Lösung (100 mM EDTA, 1%iges SDS 1 mg/ml Proteinase K) beendet (30 min 45°C). Nach der Ethanol-fällung in Gegenwart von 0,2 M NaCl wurde die DNA in Sequenzgel-Auftragspuffer aufgenommen (80 % Formamid, 50mM Tris-Borat pH = 8,3, 1 mM EDTA

und 0,1 % Bromphenolblau und 0,1 % Xylenyanol). Nach dreiminütiger Inkubation bei 98°C konnte die DNA auf ein Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

#### 4.2.17 Expression und Reinigung von Pho4-HIS und Pho2-HIS-Fusionsproteinen

Mittels des pET21d-Vektorsystems (Qiagen, siehe 4.2.) wurden im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS die Fusionsproteine Pho4-HIS bzw. Pho2-HIS überexprimiert. Die Expression des Zielgens wird durch Zugabe von IPTG zur wachsenden Kultur induziert. Die pET21d-Konstrukte mit T7 lac Promotor erhalten 1 mM IPTG zur Induktion der Proteinexpression. Angeimpft wurde eine Einzellkolonie oder einige µl einer Glycerinkultur in 2 ml Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin und 34 µg Chloramphenicol/ml bei pLysS. Bei 37°C wurde die Kultur unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 1,0 inkubiert und ÜN bei 4°C gehalten. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 30 sec in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert, in 2 ml frisches Medium resuspendiert und damit 50 ml Medium angeimpft. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 1,0 (etwa 3 Stunden wachsen lassen) wurden Aliquots entnommen und IPTG von einer 100 mM-IPTG-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Nach 2-3 Stunden weiterer Inkubation wurde die Kultur für 5 min auf Eis gebracht, für 5 min bei 4 °C mit 5000 g zentrifugiert, in 12 ml kalter Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0, mit 2 mM EDTA) resuspendiert, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment bei -70°C aufbewahrt. Aufgrund des enthaltenen pLysS-Vektors werden die Zellen während des Auftauens bereits lysiert. Die Reinigung des Pho2-HIS-Fusionsproteins wurde bereits früher beschrieben ((Brazas and Stillman, 1993)). Pho2-HIS wurde auf ähnliche Weise über eine Qiagen-Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule gereinigt; die Säule wurde jedoch vor der Elution mit 1 M Imidazol enthaltenen Puffer nur mit 60 mM Imidazol enthaltenen Puffer gewaschen. Die Hauptfraktionen mit Pho4-HIS oder Pho2-HIS wurden gepoolt und gegen 20 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,5 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 1 mM Benzamidin dialysiert. Wie durch SDS-Gelelektrophorese gezeigt, waren beide Proteine hoch gereinigt. Der monoklonale Antikörper gegen den Histidin-tag wurde von Dianova, Hamburg, Deutschland bezogen.

#### 4.2.18 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

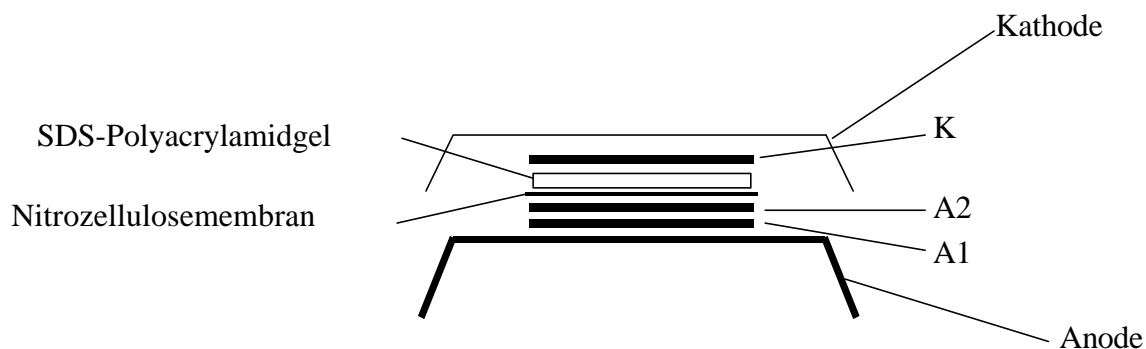
Die Auftrennung von Proteinen geschah nach ihrer Größe (Mobilität) durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS (Laemmli, 1970). Das Sammelgel bestand aus 5,1 % Acrylamid-Bisacrylamid 30 : 0,8-Lösung in 120 mM Tris/HCl pH = 6,8,

0,1 % SDS, welche durch Zugabe von 0,1 % APS und 0,02 % TEMED polymerisiert wurde. Das Trenngel bestand aus 8 %, 10 % oder 15 % Acrylamid-Bisacrylamid 30 : 0,8-Lösung in 375 mM Tris/HCl pH = 6,8, 0,1 % SDS, welche durch Zugabe von 0,10 % APS und 0,01 % TEMED polymerisiert wurde. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei abgedichteten Glasplatten (16 cm x 18 cm, 1 mm Abstand) gegossen. Nach dessen Polymerisation wurde der Kamm im Sammelgel einpolymerisiert. Die vertikale Gelelektrophorese erfolgte im Tris-Glycin-Puffer (0,33 mM Tris [4,00 g Tris, 14,25 g Glycin, 0,1 % SDS pro Liter]) bei 20-25 mA für 3-4 Stunden. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Viertel-Volumen SDS-Auftragspuffer (5x) versetzt (Endkonzentration von 1 % SDS, 10 % Glycerin, 40 mM Tris /HCl pH = 6,8, 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,005 % Bromphenolblau) und ca. 2 Minuten auf 95°C erhitzt (gilt nicht für Proteine, die noch Imidazol im Puffer enthalten). Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt im Sammelgel und 200 Volt im Trenngel durchgeführt. Die Proteinfärbung (Coomasie) fand in einer wässrigen Lösung aus 0,25 % Coomassieblau in 10 % Eisessig und 40 % Methanol (Ethanol) für mindestens 1 h statt. Entfärbt wurde durch mehrmaliges Waschen in einer bis auf das Coomassieblau gleichen Lösung (10 % Eisessig, 40 % Methanol [Ethanol]).

#### 4.2.19 Spezifischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose

##### 4.2.19.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen – „Western- Blotting“

Immunologisch nachzuweisende Proteine wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Ein nahezu quantitativer Transfer von Proteinen aus dem SDS-Polyacrylamidgel erfolgte mittels der Semi-dry-blotting-Methode:



Folgendes wurde nacheinander auf das Anodengitter gelegt: ein Whatmanpapier mit 0,3 M Tris, 20 % Methanol (A1), ein Whatmanpapier mit 0,025 M Tris, 20 % Methanol (A2), die Nitrozellulosemembran, das SDS-Polyacrylamidgel, ein Whatmanpapier mit 0,040 m 6-Aminohexansäure 0,01 % SDS, 20 % Methanol (K), und schließlich das Kathodengitter. Der elektro-phoretische Transfer wurde bei 105 mA ( $130 \text{ cm}^2 = 0,8 \text{ mA/cm}^2$ ) für 30 min bei RT durchgeführt. Nach Beendigung des Transfers wurden die auf der Nitrozellulose immobilisierten Proteine, also auch Molekulargewichtsstandards, durch 3minütige Färbung mit Ponceau-Lösung (0,2 % Ponceau-S, 3 % TCA) sichtbar gemacht.

#### **4.2.19.2 Immunodetektion von Proteinen und Nachweis mit Meerrettich-Peroxidase**

Vor der Immunodetektion der auf Nitrozellulose transferierten Proteine wurden unspezifische Bindestellen durch einstündige Inkubation der Membran mit 4 % Magermilchpulver in TBS (0,9 % NaCl, 10 mM Tris/HCl pH = 7,4) abgesättigt. Die Membran wurde in eine 0,2-0,5%ige Antikörperlösung in 4 % Magermilchpulver/TBS überführt, dort ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur leicht geschüttelt und anschließend je 15 min in TBS, TBS/0,05 % Triton X100 und wieder TBS gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper auf der Nitrozellulose erfolgte mit einem gegen diesen Antikörper gerichteten zweiten Antikörper, an dem kovalent Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Inkubation mit diesem Antikörperkonjugat und der nachfolgende Waschschritt wurden in gleicher Weise wie für den ersten Antikörper beschrieben durchgeführt. Die Visualisierung der gebundenen Antikörper-Peroxidase-Konjugate erfolgte in 20 ml DAB-Puffer (25 mM Tris/HCl, 125 mM NaCl, 2 mM  $\text{NiCl}_2$  pH = 7,6) nach Zugabe von 0,5 ml 40x 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (10 mg/ml in Wasser) wurde die Reaktion mit 10  $\mu\text{l}$  3%iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung gestartet. Es bildete sich ein dunkles rot-schwarzes Präzipitat, welches metallisches Nickel beinhaltet. Die Reaktion wurde nach ca. 10 min durch 1minütiges Spülen unter fließendem Wasser gestoppt. Waschen mit 25 mM Kaliumhydrogenphthalat/HCl pH = 2,2 reduziert eine unspezifische Hintergrundbindung.

#### **4.2.20 „In vitro“-DnaseI-Footprints**

Gereinigtes Pho2-HIS und/oder Pho4-HIS wurde mit markierten DNA-Fragmenten (~1500 cpm) für 30 min bei Raumtemperatur in 25  $\mu\text{l}$  eines 10 mM Tris-HCl pH = 7,4, 50 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT und 10  $\mu\text{g/ml}$  poly(dI-dC) enthaltenden Puffers vorinkubiert. Danach wurden 25  $\mu\text{l}$  des gleichen Reaktionspuffers, jedoch mit 1 U/ml DNaseI und 1 mM

CaCl<sub>2</sub> zugefügt und für 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (0,4 mM NaCl, 0,4 % SDS und 25 mg/ml Lachssperma DNA). Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und auf einem 6- oder 8 %-Polyacrylamidgel, welches 8 M Harnstoff enthielt, analysiert.

#### 4.2.21 Gelretardationsexperimente

DNA-Fragmente wurden mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (6000 Ci/mmol) mittels Polynukleotidkinase markiert. Jeweils ~5000 cpm der DNA wurden pro Bindereaktion eingesetzt. Protein-DNA-Bindereaktionen (10µl) wurden durchgeführt in 15 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 75 mM NaCl, 7,55 Glyzerin, 12,5 mM DTT, 0,375 mM EDTA, 750 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin) und 25µg/ml poly (dI-dC). Die Menge an Protein, welches in jeder Bindereaktion eingesetzt wurde, ist in imaginären Einheiten in den Abbildungslegenden angegeben. Eine Einheit Pho4 und Pho2 entspricht ~5 und 6 ng Protein (durch SDS-Gelelektrophorese abgeschätzt). Reaktionen wurden bei Raumtemperatur für 30-45 min inkubiert, bevor sie auf ein 5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen werden, das mit TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1,25 mM EDTA, pH = 8,3) hergestellt wurde. Die Elektrophorese wurde im gleichen Puffer für 1,5 Stunden bei 250 V gefahren, dann wurde das Gel getrocknet und mit einem Verstärkerschirm autoradiographiert.

#### 4.2.22 Isolierung von Mononukleosomen

Um Mononukleosomen (Histonoktamer [(H2A+H2B)(H3+H4)<sub>2</sub>(H2A+H2B)] mit DNA, HistonH1 und H5 frei) für Rekonstitutionsexperimente zu erhalten, wurden Hühnererythrozyten verwendet. Dabei wurden 20 ml Hühnerblut in 150 ml 1xSSC getropft, 10 min bei 4°C und 2000 upm abzentrifugiert, der Überstand und die obere weiße Schicht verworfen und das Pellet mehrmals in 200 ml 1xSSC gewaschen und 10 min bei 4°C und 2000 upm abzentrifugiert. Zum Schluß wurde es in 100 ml 150 mM NaCl aufgenommen, auf 20 x 5 ml Zentrifugenröhrchen verteilt (etwa 500 OD/ml), 10 min bei 4°C und 1500 upm abzentrifugiert, im Trockeneisbad eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Zur Gewinnung von Mononukleosomen wurde das Sediment dreimal mit einem Puffer A aus 15 mM Tris-HCl pH = 7,4, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,15 mM Spermin und 0,5 mM Spermidin gewaschen und in dem gleichen Puffer aufgenommen, ergänzt um 0,34 mM Succhrose, 1 mM EDTA und 0,25 mM EGTA.

Anschließend wurde mit 150-300 Mikrokokkus-Nuklease für 10 min bei 37°C im Puffer A gespalten, ergänzt um 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 1,4 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM PMSF. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zusatz von EDTA auf eine Endkonzentration von 4 mM und 10 min bei 4°C und 5000 upm abzentrifugiert. Danach wurde mit 10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 0,2 mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 0,4 M NaCl extrahiert und mittels Sucrose-gradientenzentrifugation (0,34-2,1 M Suchrose, 2 mM EDTA, 0,15 mM EGTA, 15 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF und 0,4 M NaCl) für 15 h bei 4°C und 40000 upm aufgetrennt. Danach wurde auf 25 Fraktionen zu je 8 Tropfen (~440µl) verteilt (1. Fraktion weist höchste Dichte auf, da von unten abgenommen), und Aliquots (je 5µl) wurden auf einem Agarosegel im Vergleich zu einer Nukleosomenleiter aufgetrennt.

#### 4.2.23 Rekonstitutionsexperimente mit radioaktiv markierter DNA

Mononukleosomen (0,5-1 mg/ml) wurden als Histonquelle verwendet. Gemischt mit radioaktiv markierter DNA in 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 1 mM EDTA, 1,4 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml BSA und 0,1 mM PMSF, wurden sie überführt in einen Dialyseschlauch (1-8 X 100 FT, Union Carbide Corp., Chicago, USA) (20-50 µl mit einer Mononukleosomenkonzentration von 0,1-0,2 mg/ml). Durchgeführt wurde die Dialyse in einer Apparatur zur Erzeugung eines linearen Salzgradienten für die kontinuierliche Rekonstitution von Nukleosomen, ähnlich wie in der Dissertation von W. Linxweiler (1984) beschrieben. Während der Dialyse wurde die NaCl-Konzentration kontinuierlich über 14 bis 16 h von 2 M auf etwa 5-10 mM in 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 1 mM EDTA 1,4 mM β-Mercaptoethanol verringert.

#### 4.2.24 Nukleoproteingelelektrophorese

Die Elektrophorese von rekonstituiertem Material erfolgte mit einem PAA-Gel (4 % Acrylamid, 0,1 % Bisacrylamid) mit 6,4 mM Tris 3,2 mM Na-Acetat pH = 8,0 mit Essigsäure, 0,32 mM EDTA, 20 % Glycerin bzw. in 0,5x TBE. Der Elektrophoresepuffer entspricht jeweils dem Gelpuffer ohne Glycerin. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V und 4°C für 4-6 Stunden. Danach wurde ein Autoradiogramm bei 4°C angefertigt (5 min).

#### 4.2.25 Isolierung rekonstituierter Partikel aus dem Nukleoproteingel

Nach Auftrennung des rekonstituierte Materials auf einem Nukleoproteingel wird das Gel mit radioaktiver Tinte markiert, ein Autoradiogramm bei 4°C angefertigt (5 min), und die Banden

des rekonstituierten Materials auf Grundlage des Autoradiogramms werden ausgeschnitten. Die Gelstücke werden durch Zentrifugation durch ein Nylonnetz mit der Maschenweite 80 µm (NY 80 HD, Scyrel der Firma ZBF Rüslikon, Schweiz) zerkleinert und diese Gelmasse in 2-3 Volumen 10 mM Tris-HCl, pH = 7,6, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF 0,1 mg/ml BSA suspendiert; durch Diffusion über Nacht bei 4°C extrahiert man die Partikel. Nach Zentrifugation und zwei weiteren Extraktionsschritten mit dem gleichen Puffer 5 min bei 4°C können 60-90 % des Materials gewonnen werden.

#### **4.2.26 Nukleaseabbau von rekonstituierten Nukleosomen**

Der Abbau mit Exonuklease III aus *E. coli* wurde bei 37°C in 10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM β-Mercaptoethanol und einer DNA-Konzentration von 25 µg/ml gescherter Lachs-DNA (200-400 Bp) durchgeführt. Der Abbau mit DNaseI wurde bei 20°C für 10 min durchgeführt. Anschließend wurden die DNA mittels 0,1 mg/ml Proteinase K für 30 min bei 37°C in 0,2 % SDS, 10 mM Tris-HCl pH = 8,0 und 1 mM EDTA von den Proteinen befreit.





## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen Transkriptionsfaktoren und Elementen der Chromatinstruktur bei der Regulation zweier Promotoren des Phosphatase-systems der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Als Modellsystem wurden die Promotoren der Gene *PHO5* und *PHO8* gewählt, die für eine saure bzw. eine alkalische Phosphatase kodieren und durch Phosphatmangel induziert werden. Während der Induktion findet eine charakteristische Chromatin-Umordnung am Promotor statt, die sich bei *PHO5* über einen Bereich von vier Nukleosomen ausdehnt, bei *PHO8* jedoch signifikant geringer ist. Für die transkriptionelle Aktivierung sind insbesondere zwei Transkriptionsfaktoren nötig: das bHLH-Protein Pho4 und das Homöodomänenprotein Pho2. Der *PHO5*-Promotor besitzt zwei Pho4-Bindestellen, die den regulatorischen Elementen UASp1 und UASp2 entsprechen. Während UASp1 in einem hypersensitiven Bereich zwischen den Nukleosomen liegt, ist UASp2 intranukleosomal lokalisiert. Mutagenese einer der beiden Bindestellen führte zu einer zehnfachen Abnahme der Promotoraktivität, während Mutagenese beider Stellen die Induzierbarkeit des Promotors völlig aufhob.

Um die Bedeutung der Lokalisation der UAS-Elemente im Chromatin zu analysieren, wurde ein Operator für den  $\alpha 2$ -Repressorkomplex oberhalb des *PHO5*-Promotors eingebaut. Dieser Repressorkomplex bildet im Kontext bestimmter Promotoren eine zum  $\alpha 2$ -Operator benachbarte repressive Chromatinstruktur mit basenpaargenauer Nukleosomenposition aus. Im *PHO5*-Promotor führte der Einbau dieses Operators zur Repression der Promotoraktivität und einer leicht verminderten Chromatinzugänglichkeit. Demnach kann der  $\alpha 2$ -Operator transkriptionshemmende Strukturen initiieren, wobei die Repression durch verstärkte Chromatinkondensation und möglicherweise durch die Rekrutierung von reprimierenden Mediatorproteinen des RNA-PolymeraseII-Holoenzym vermittelt wird. Durch Deletionen von Bereichen zwischen dem  $\alpha 2$ -Operator und den UAS-Elementen konnten Nukleosomen wie das Nukleosom-2 zwar stabilisiert, aber nicht gezielt verschoben werden. Rekonstitutionsexperimente mit einem 180 Bp-DNA-Fragment, das den Bereich des Nukleosoms -2 enthielt, zeigten zwar einen gewissen Beitrag der Sequenz zur Histon-DNA-Bindung, dieser allein kann jedoch keinesfalls die Positionierung erklären, vielmehr scheinen Wechselwirkungen der Histone mit anderen Chromatinkomponenten entscheidenden Anteil zu haben.

Der Mechanismus der Chromatin-Umordnung am *PHO5*-Promotor durch die Transkriptionsfaktoren Pho4 und Pho2 wurde zunächst durch *in vitro* Experimente unter Verwendung von rekombinantem Pho2-Protein analysiert. Es konnten mehrere Pho2-Bindestellen verschiedener Affinität im *PHO5*-Promotor gefunden werden. Eine der hochaffinen Pho2-Bindestellen überlappt größtenteils mit der Pho4-Bindestelle UASp1. Die kooperative DNA-Bindung der beiden Proteine an ihre überlappenden Bindestellen resultierte in einem hochaffinen ternären Komplex. Auch am UASp2-Element, bei dem zwei Pho2-Bindestellen eine Pho4-Bindestelle flankieren, findet eine kooperative Bindung von Pho2 und Pho4 an die DNA statt. Durch Mutation der mittels *in vitro*-Footprints entdeckten Pho2-Bindestellen konnte gezeigt werden, daß diese zur Promotoraktivität beitragen. Sie sind nicht nur wichtig, um Pho2 an den Promotor zu rekrutieren, sondern ermöglichen auch die kooperative DNA-Bindung mit Pho4 über direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Pho2 und Pho4. Eine Pho2-Interaktionsdomäne von Pho4 ist essentiell für die Aktivierung des *PHO5*-Promotors, wie durch Deletionsanalyse demonstriert wurde. Die kooperative DNA-Bindung dieser Faktoren scheint demnach sehr wichtig für die Transkriptionsregulation des *PHO5*-Gens zu sein. Getrennte Untersuchungen von UASp1 und UASp2 in einem *CYC1*-Promotor-Kontext zeigen einen eindrucksvollen Unterschied zwischen den zwei UAS-Elementen und verdeutlichen die duale Rolle von Pho2 in der Aktivierung des *PHO5*-Promotors. Es ist in entscheidender Weise für die Rekrutierung von Pho4 zur UASp1-Stelle nötig und verstärkt darüber hinaus das Pho4-Aktivierungspotential, während es an der UASp2-Stelle eher nur das Pho4-Aktivierungspotential erhöht.

Trotz der koordinierten Regulation beider Promotoren ist der *PHO8*- fast 10mal schwächer als der *PHO5*-Promotor. Von den beiden Pho4-Bindestellen am *PHO8*-Promotor, welche früher *in vitro* bestimmt worden waren, ist nur eine *in vivo* funktional. Der Austausch des inaktiven *PHO8*-UASp1-Elements durch das UASp1-Element des *PHO5*-Promotors erhöht das Ausmaß der Chromatinöffnung im Bereich der Nukleosomen -3 und -2 und ergibt einen zweifachen Anstieg der Promotoraktivität. Im Gegensatz dazu verhindert der Austausch der hochaffinen UASp2-Stelle durch die entsprechende UASp2-Stelle von *PHO5* die Chromatinumordnung und Promotoraktivierung, obwohl eine effiziente Bindung von Pho4 an dieser Stelle besteht. Diese Daten zeigen, daß eine quantitative Bindung von Pho4 an ein UAS-Element ohne irgendeine Chromatin-Umordnung und Promotoraktivierung möglich ist.

Die Deletion der Promotorregion, die normalerweise von den Nukleosomen -3 und -2 bedeckt wird, ergibt einen zweifachen Anstieg der Promotoraktivität, was die repressive Rolle dieser

Nukleosomen anzeigt. Die gute Korrelation zwischen Promotoraktivität und Ausmaß der Chromatin-Umordnung impliziert, daß für das Ausmaß der *PHO8*-Induktion im Vergleich zu *PHO5* die Qualität der Histon-DNA-Wechselwirkung eine Rolle spielt, da auch bei Einführung des *PHO5*-UASp1-Elements in den *PHO8*-Promotor keine vollständige Chromatinöffnung beobachtet wird. Obwohl Pho4 in Pho2-unabhängiger Weise am *PHO8*-Promotor bindet und Chromatin remoduliert, ist Pho2 dennoch an der Promotoraktivität durch Erhöhen des Aktivierungspotentials von Pho4 beteiligt, ähnlich wie am UASp2-Element des *PHO5*-Promotors.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben die Rolle des Homöoproteins Pho2 bei der Induktion des *PHO5*- und *PHO8*-Promotors aufgeklärt und unterstreichen die enorme Bedeutung des kooperativen Bindens der Transkriptionsfaktoren Pho4 und Pho2. Zum anderen haben sie das Wechselspiel zwischen Transkriptionsfaktoren und der Chromatinstruktur am Beispiel dieser Promotoren besser definiert.



## 6 Literaturverzeichnis

- Aihara, T., Miyoshi, Y., Koyama, K., Suzuki, M., Takahashi, E., Monden, M., and Nakamura, Y. (1998). Cloning and mapping of SMARCA5 encoding hSNF2H, a novel human homologue of Drosophila ISWI. *Cytogenetics And Cell Genetics* 81, 191-193.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Potes, J., Chin, L., Schreiberagus, N., and Depinho, R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3 mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49-55.
- Almer, A., and Hörz, W. (1986). Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the *PHO5/PHO3* locus in yeast. *EMBO J.* 5, 2681-2687.
- Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A., and Hörz, W. (1986). Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* 5, 2689-2696.
- Archer, T. K., Lefebvre, P., Wolford, R. G., and Hager, G. L. (1992). Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation. *Science* 255, 1573-1576.
- Arndt, K. T., Styles, C., and Fink, G. R. (1987). Multiple global regulators control *HIS4* transcription in yeast. *Science* 237, 874-880.
- Banerji, J., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27, 299-308.
- Barbaric, S., Fascher, K. D., and Hörz, W. (1992). Activation of the weakly regulated *PHO8* promoter in *S. cerevisiae*: Chromatin transition and binding sites for the positive regulator protein Pho4. *Nucl. Acids Res.* 20, 1031-1038.
- Barbaric, S., Münsterkötter, M., Goding, C., and Hörz, W. (1998). Cooperative Pho2-Pho4 interactions at the *PHO5* promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho4 at UASp2. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2629-2639.
- Barbaric, S., Münsterkötter, M., Svaren, J., and Hörz, W. (1996). The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter. *Nucl. Acids Res.* 24, 4479-4486.
- Beachy, P. A., Varkey, J., Young, K. E., von Kessler, D. P., Sun, B. I., and Ekker, S. C. (1993). Cooperative binding of an Ultrabithorax homeodomain protein to nearby and distant DNA sites. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6941-6956.
- Becker, P. B., Rabindran, S. K., and Wu, C. (1991). Heat shock-regulated transcription in vitro from a reconstituted chromatin template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4109-4113.
- Benoist, C. and Chambon, P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* 290, 304-310.
- Berben, G., Legrain, M., Gilliquet, V., and Hilger, F. (1990). The yeast regulatory gene *PHO4* encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast* 6, 451-454.
- Berben, G., Legrain, M., and Hilger, F. (1988). Studies on the structure, expression and function of the yeast regulatory gene *PHO2*. *Gene* 66, 307-312.
- Berger, S. L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G. A., Agapite, 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.
- Braus, G., Mösch, H. U., Vogel, K., Hinnen, A., and Hütter, R. (1989). Interpathway regulation of the *TRP4* gene of yeast. *EMBO J.* 8, 939-945.

- Brazas, R. M., Bhoite, L. T., Murphy, M. D., Yu, Y. X., Chen, Y. Y., Neklason, D. W., and Stillman, D. J. (1995). Determining the requirements for cooperative DNA binding by Swi5p and Pho2p (Grf10p/Bas2p) at the *HO* promoter. *J. Biol. Chem.* *270*, 29151-29161.
- Brazas, R. M. and Stillman, D. J. (1993). The Swi5 zinc-finger and Grf10 homeodomain proteins bind DNA cooperatively at the yeast *HO* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11237-11241.
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *50*, 349-383.
- Bresnick, E. H., Bustin, M., Marsaud, V., Richard Foy, H., and Hager, G. L. (1992). The transcriptionally-active MMTV promoter is depleted of histone H1. *Nucl. Acids Res.* *20*, 273-278.
- Brownell, J. E., Zhou, J. X., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase a: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* *84*, 843-851.
- Bun Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S., and Oshima, Y. (1991). The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 3229-3238.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* *56*, 549-561.
- Burns, L. G. and Peterson, C. L. (1997). The yeast SWI-SNF complex facilitates binding of a transcriptional activator to nucleosomal sites *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4811-4819.
- Bürglin, T. R. (1988). The yeast regulatory gene *PHO2* encodes a homeo box. *Cell* *53*, 339-340.
- Cairns, B. R., Erdjument, B. H., Tempst, P., Winston, F., and Kornberg, R. D. (1998). Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol. Cell* *2*, 639-651.
- Cairns, B. R., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1996b). TFG3/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 3308-3316.
- Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M. C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., and Kornberg, R. D. (1996a). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* *87*, 1249-1260.
- Cairns, B. R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R. D., and Winston, F. (1999). Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol. Cell* *4*, 715-723.
- Candau, R., Zhou, J. X., Allis, C. D., and Berger, S. L. (1997). Histone acetyltransferase activity and interaction with Ada2 are critical for Gcn5 function *in vivo*. *EMBO J.* *16*, 555-565.
- Carey, M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* *92*, 5-8.
- Chao, D. M., Gadbois, E. L., Murray, P. J., Anderson, S. F., Sonu, M. S., Parvin, J. D., and Young, R. A. (1996). A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* *380*, 82-85.
- Chasman, D. I., Lue, N. F., Buchman, A. R., LaPointe, J. W., Lorch, Y., and Kornberg, R. D. (1990). A yeast protein that influences the chromatin structure of UAS<sub>G</sub> and functions as a powerful auxiliary gene activator. *Genes Dev.* *4*, 503-514.
- Chen, S., West, R. W. J., Johnson, S. L., Gans, H., Kruger, B., and Ma, J. (1993). Tsf3, a global regulatory protein that silences transcription of yeast *GAL* genes, also mediates repression by alpha 2 repressor and is identical to Sin4. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 831-840.
- Chen, W. and Struhl, K. (1988). Saturation mutagenesis of a yeast *his3* „TATA element“: genetic evidence for a specific TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 2691-2695.

- Cooper, K. F., Mallory, M. J., Smith, J. B., and Strich, R. (1997). Stress and developmental regulation of the yeast C-type cyclin Ume3p (Srb11p/Ssn8p). *EMBO J.* *16*, 4665-4675.
- Corton, J. C. and Johnston, S. A. (1989). Altering DNA-binding specificity of Gal4 requires sequences adjacent to the zinc finger. *Nature* *340*, 724-727.
- Daignan-Fornier, B., and Fink, G. R. (1992). Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators Bas1 and Bas2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6746-6750.
- Dasso, M., Dimitrov, S., and Wolffe, A. P. (1994). Nuclear assembly is independent of linker histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12477-12481.
- Denis, V., Boucherie, H., Monribot, C., and Daignan-Fornier, B. (1998). Role of the myb-like protein Bas1p in *Saccharomyces cerevisiae*: a proteome analysis. *Mol. Microbiol.* *30*, 557-566.
- Denis, V., and Daignan-Fornier, B. (1998). Synthesis of glutamine, glycine and 10-formyl tetrahydrofolate is coregulated with purine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *259*, 246-255.
- Desplan, C., Theis, J., and O'Farrell, P. H. (1988). The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* *54*, 1081-1090.
- Driever, W., and Nusslein Volhard, C. (1989). The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* *337*, 138-143.
- Durrin, L. K., Mann, R. K., and Grunstein, M. (1992). Nucleosome loss activates *CUP1* and *HIS3* promoters to fully induced levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 1621-1629.
- Durrin, L. K., Mann, R. K., Kayne, P. S., and Grunstein, M. (1991). Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation *in vivo*. *Cell* *65*, 1023-1031.
- Dynlacht, B. D., Hoey, T., and Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* *66*, 563-576.
- Edmondson, D. G., and Roth, S. Y. (1996). Chromatin and transcription. *FASEB J.* *10*, 1173-1182.
- Eisenberg, S. P., Coen, D. M., and McKnight, S. L. (1985). Promoter domains required for expression of plasmid-borne copies of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in virus-infected mouse fibroblasts and microinjected frog oocytes. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 1940-1947.
- Elgin, S. C. R. (1988). The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.* *263*, 19259-19262.
- Elgin, S. C. R. (1990). Chromatin structure and gene activity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *2*, 437-445.
- Escher, D., and Schaffner, W. (1997). Gene activation at a distance and telomeric silencing are not affected by yeast histone H1. *Mol. Gen. Genet.* *256*, 456-461.
- 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.
- Fascher, K. D., Schmitz, J., and Hörz, W. (1993). Structural and functional requirements for the chromatin transition at the *PHO5* promoter in *Saccharomyces cerevisiae* upon *PHO5* activation. *J. Mol. Biol.* *231*, 658-667.
- Fassler, J. S., Gray, W., Lee, J. P., Yu, G. Y., and Gingerich, G. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *SPT14* gene is essential for normal expression of the yeast transposon, Ty, as well as for expression of the *HIS4* gene and several genes in the mating pathway. *Mol. Gen. Genet.* *230*, 310-320.
- Faye, G., Leung, D. W., Tatchell, K., Hall, B. D., and Smith, M. (1981). Deletion mapping of sequences essential for *in vivo* transcription of the iso-1-cytochrome c gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 2258-2262.

- Fedor, M. J., Lue, N. F., and Kornberg, R. D. (1988). Statistical positioning of nucleosomes by specific protein-binding to an upstream activating sequence in yeast. *J. Mol. Biol.* *204*, 109-127.
- Felsenfeld, G. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* *355*, 219-224.
- Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., Clark, D., and Studitsky, V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 9384-9388.
- Fields, S., and Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* *10*, 286-292.
- Fisher, F., Jayaraman, P. S., and Goding, C. R. (1991). C-myc and the yeast transcription factor Pho4 share a common CACGTG-binding motif. *Oncogene* *6*, 1099-1104.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., and Ausio, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* *270*, 17923-17928.
- Gaudreau, L., Schmid, A., Blaschke, D., Ptashne, M., and Hörz, W. (1997). RNA polymerase II holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast *PHO5* promoter. *Cell* *89*, 55-62.
- Gavin, I. M., and Simpson, R. T. (1997). Interplay of yeast global transcriptional regulators Ssn6p-Tup1p and Swi-Snf and their effect on chromatin structure. *EMBO J.* *16*, 6263-6271.
- Gehring, W. J. (1992). The homeobox in perspective. *Trends Biochem. Sci.* *17*, 277-280.
- 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.
- Gerber, A. N., Klesert, T. R., Bergstrom, D. A., and Tapscott, S. J. (1997). Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev.* *11*, 436-450.
- Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., and Workman, J. L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: Characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt-Ada) complex. *Genes Dev.* *11*, 1640-1650.
- Gregory, P. D., and Hörz, W. (1998). Chromatin and transcription: How transcription factors battle with a repressive chromatin environment. *European Journal of Biochemistry* *251*, 9-18.
- Gregory, P. D., Schmid, A., Zavari, M., Lui, L., Berger, S. L., and Hörz, W. (1998). Absence of Gcn5 HAT activity defines a novel state in the opening of chromatin at the *PHO5* promoter in yeast. *Mol. Cell* *1*, 495-505.
- Gregory, P. D., Schmid, A., Zavari, M., Münsterkötter, M., and Hörz, W. (1999). Chromatin remodelling at the *PHO8* promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* *18*, 6407-6414.
- Gross, D. S., and Garrard, W. T. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* *57*, 159-197.
- Grunstein, M. (1992). Histones as regulators of genes. *Sci. Am.* *267*, 68-74B.
- Guarente, L. (1983). Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* *101*, 181-191.
- Guarente, L. (1987). Regulatory proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* *21*, 425-452.
- Guarente, L. (1988). UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* *52*, 303-305.



- Guarente, L., and Ptashne, M. (1981). Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the cytochrome *c* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 2199-2203.
- Gustafsson, C. M., Myers, L. C., Li, Y., Redd, M. J., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (1997). Identification of Rox3 as a component of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.* *272*, 48-50.
- Hager, G. L., Smith, C. L., Svaren, J., and Hörz, W. (1995). Initiation of expression: Remodelling genes. In *Chromatin Structure & Gene Expression: Frontiers in Molecular Biology*, S. C. R. Elgin, ed. (Oxford: Oxford University Press), 89-103.
- Han, M., Kim, U. J., Kayne, P., and Grunstein, M. (1988). Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the *PHO5* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *7*, 2221-2228.
- Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L., and Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3a. *Cell* *89*, 341-347.
- Hayashi, N., and Oshima, Y. (1991). Specific cis-acting sequence for *PHO8* expression interacts with Pho4 protein, a positive regulatory factor, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 785-794.
- Hayashi, S., and Scott, M. P. (1990). What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins? [published erratum appears in *Cell* 1991 Mar 8;64(5): following 1046]. *Cell* *63*, 883-894.
- Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* *13*, 1823-1830.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* *387*, 43-48.
- Hengartner, C. J., Thompson, C. M., Zhang, J. H., Chao, D. M., Liao, S. M., Koleske, A. J., Okamura, S., and Young, R. A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* *9*, 897-910.
- Herschbach, B. M., Arnaud, M. B., and Johnson, A. D. (1994). Transcriptional repression directed by the yeast alpha 2 protein *in vitro*. *Nature* *370*, 309-311.
- Hirschhorn, J. N., Bortvin, A. L., Ricupero-Hovasse, S. L., and Winston, F. (1995). A new class of histone H2A mutations in *Saccharomyces cerevisiae* causes specific transcriptional defects *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1999-2009.
- Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D., and Winston, F. (1992). Evidence that Snf2/Swi2 and Snf5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.* *6*, 2288-2298.
- Hirst, K., Fisher, F., McAndrew, P. C., and Goding, C. R. (1994). The transcription factor, the cdk, its cyclin and their regulator: directing the transcriptional response to a nutritional signal. *EMBO J.* *13*, 5410-5420.
- Hoey, T. and Levine, M. (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* *332*, 858-861.
- Huang, L., Zhang, W. Z., and Roth, S. Y. (1997). Amino termini of histones H3 and H4 are required for alpha 2 repression in yeast. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6555-6562.
- Imbalzano, A. N., Kwon, H., Green, M. R., and Kingston, R. E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* *370*, 481-485.
- Jeppesen, P. and Turner, B. M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* *74*, 281-289.

- Jiang, Y. W., Dohrmann, P. R., and Stillman, D. J. (1995). Genetic and physical interactions between yeast Rgr1 and Sin4 in chromatin organization and transcriptional regulation. *Genetics* *140*, 47-54.
- Jiang, Y. W., and Stillman, D. J. (1992). Involvement of the Sin4 global transcriptional regulator in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4503-4514.
- Justice, M. C., Hogan, B. P., and Vershon, A. K. (1997). Homeodomain-DNA interactions of the Pho2 protein are promoter-dependent. *Nucl. Acids Res.* *25*, 4730-4739.
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* *89*, 365-371.
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1998). Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5121-5127.
- Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R., and O'Shea, E. K. (1994). Phosphorylation of the transcription factor Pho4 by a cyclin-CDK complex, Pho80-Pho85. *Science* *263*, 1153-1156.
- Kaffman, A., Rank, N. M., O'Neill, E. M., Huang, L. S., and O'Shea, E. K. (1998b). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* *396*, 482-486.
- Kaffman, A., Rank, N. M., and O'Shea, E. K. (1998a). Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* *12*, 2673-2683.
- Kaneko, Y., Tamai, Y., Toh-e, A., and Oshima, Y. (1985). Transcriptional and post-transcriptional control of *PHO8* expression by *PHO* regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 248-252.
- Kaufmann, J., Verrijzer, C. P., Shao, J., and Smale, S. T. (1996). Cif, an essential cofactor for TFIID-dependent initiator function. *Genes Dev.* *10*, 873-886.
- Kayne, P. S., Kim, U. J., Han, M., Mullen, J. R., Yoshizaki, F., and Grunstein, M. (1988). Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* *55*, 27-39.
- Keleher, C. A., Goutte, C., and Johnson, A. D. (1988). The yeast cell-type-specific repressor alpha 2 acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. *Cell* *53*, 927-936.
- Keleher, C. A., Redd, M. J., Schultz, J., Carlson, M., and Johnson, A. D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* *68*, 709-719.
- Kim, U. J., Han, M., Kayne, P., and Grunstein, M. (1988). Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *7*, 2211-2219.
- Kim, Y. J., Bjorklund, 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.
- Kingston, R. E. (1999). A shared but complex bridge [news; comment]. *Nature* *399*, 199-200.
- Kissinger, C. R., Liu, B. S., Martin Blanco, E., Kornberg, T. B., and Pabo, C. O. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* *63*, 579-590.
- 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.
- Knezetic, J. A., Jacob, G. A., and Luse, D. S. (1988). Assembly of RNA polymerase II preinitiation complexes before assembly of nucleosomes allows efficient initiation of transcription on nucleosomal templates. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 3114-3121.

- Knezetic, J. A., and Luse, D. S. (1986). The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45, 95-104.
- Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators [see comments]. *Nature* 368, 466-469.
- Komeili, A., and O'Shea, E. K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* 284, 977-980.
- Koren, R., LeVitre, J., and Bostian, K. A. (1986). Isolation of the positive-acting regulatory gene *PHO4* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 41, 271-280.
- Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1991). Irresistible force meets immovable object-transcription and the nucleosome. *Cell* 67, 833-836.
- Kuchin, S., Yeghiayan, P., and Carlson, M. (1995). Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs Ssn3 and Ssn8 contribute to transcriptional control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4006-4010.
- Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269-272.
- Kuo, M. H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E. A., and Allis, C. D. (1998). The histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes *in vivo*. *Genes Dev.* in press.
- Kuras, L., and Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399, 609-613.
- Kuwahara, J., and Coleman, J. E. (1990). Role of the zinc(II) ions in the structure of the three-finger DNA binding domain of the Sp1 transcription factor. *Biochemistry* 29, 8627-8631.
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.
- Landsberger, N., and Wolffe, A. P. (1997). Remodeling of regulatory nucleoprotein complexes of the *Xenopus* hsp70 promoter during meiotic maturation of the *Xenopus* oocyte. *EMBO J.* 16, 4361-4373.
- Laughon, A. (1991). DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* 30, 11357-11367.
- Laybourn, P. J., and Kadonaga, J. T. (1991). Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science* 254, 238-245.
- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
- Legrain, M., De Wilde, M., and Hilger, F. (1986). Isolation, physical characterization and expression analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* positive regulatory gene *PHO4*. *Nucl. Acids Res.* 14, 3059-3073.
- Lenburg, M. E., and O'shea, E. K. (1996). Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* 21, 383-387.
- Lesage, P., Yang, X. L., and Carlson, M. (1996). Yeast Snf1 protein kinase interacts with Sip4, a C-6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for Snf1 in the glucose response. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1921-1928.
- Levine, M., and Hoey, T. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55, 537-540.
- Lewin, B. (1990). Commitment and activation at pol II promoters: a tail of protein- protein interactions. *Cell* 61, 1161-1164.
- Li, Q., Wrangé, O., and Eriksson, P. (1997). The role of chromatin in transcriptional regulation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29, 731-742.

- Li, X. Y., Virbasius, A., Zhu, X., and Green, M. R. (1999). Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* 399, 605-609.
- Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y. W., Kim, Y. J., Lane, W. S., Stillman, D. J., and Kornberg, R. D. (1995). Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10864-10868.
- Linxweiler, W., and Hörz, W. (1985). Reconstitution experiments show that sequence-specific histone-DNA interactions are the basis for nucleosome phasing on mouse satellite DNA. *Cell* 42, 281-290.
- Lorch, Y., LaPointe, J. W., and Kornberg, R. D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203-210.
- Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Waye, M.-M. Y., and Richmond, T. J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *Journal of Molecular Biology* 272, 301-311.
- Magbanua, J. P., Fujisawa, K., Ogawa, N., and Oshima, Y. (1997). The homeodomain protein Pho2p binds at an A/T-rich segment flanking the binding site of the basic-helix-loop-helix protein Pho4p in the yeast *PHO* promoters. *Yeast* 13, 1299-1308.
- 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.
- McAndrew, P. C., Svaren, J., Martin, S. R., Horz, W., and Goding, C. R. (1998). Requirements for chromatin modulation and transcription activation by the Pho4 acidic activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5818-5827.
- McBride, H. J., Brazas, R. M., Yu, Y., Nasmyth, K., and Stillman, D. J. (1997). Long-range interactions at the *HO* promoter. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2669-2678.
- Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., and Allis, C. D. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.
- Moqtaderi, Z., Bai, Y., Poon, D., Weil, P. A., and Struhl, K. (1996). TBP-associated factors are not generally required for transcriptional activation in yeast. *Nature* 383, 188-191.
- Münsterkötter, M., Barbaric, S., and Hörz, W. (2000). Transcriptional regulation of the yeast *PHO8* promoter in comparison to the coregulated *PHO5* promoter. *J. Biol. Chem.* 275, 22678-22685.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., and et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Münsterkötter, M. (1992). Die Rolle des positiven Regulators Pho81 bei der Expression des Gens der sauren Phosphatase *PHO5* aus *Saccharomyces cerevisiae*. (Universität München: Diplomarbeit).
- Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Bushnell, D. A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (1998). The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 12, 45-54.
- Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Hayashibara, K. C., Brown, P. O., and Kornberg, R. D. (1999). Mediator protein mutations that selectively abolish activated transcription [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 67-72.
- Nehlin, J. O., Carlberg, M., and Ronne, H. (1991). Control of yeast *GAL* genes by Mig1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* 10, 3373-3377.
- Norris, D. and Osley, M. A. (1987). The two gene pairs encoding H2A and H2B play different roles in the *Saccharomyces cerevisiae* life cycle. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3473-3481.

Ogawa, N., Hayashi, N., Saito, H., Noguchi, K., Yamashita, Y., and Oshima, Y. (1994). Regulatory Circuits for Phosphatase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Specific cis-Acting Sites in *PHO* Promoters for Binding the Positive Regulator Pho4p. In Phosphate in Microorganisms, A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver, eds. (Washington: ASM), 56-62.

Ogawa, N., Noguchi, K., Yamashita, Y., Yasuhara, T., Hayashi, N., Yoshida, K., and Oshima, Y. (1993). Promoter analysis of the *PHO81* gene encoding a 134-kda protein bearing ankyrin repeats in the phosphatase regulon of *saccharomyces-cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 238, 444-454.

Ogawa, N., and Oshima, Y. (1990). Functional domains of a positive regulatory protein, Pho4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2224-2236.

Ogawa, N., Saitoh, H., Miura, K., Magbanua, J. P. V., Bunya, M., Harashima, S., and Oshima, Y. (1995). Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of *PHO84* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 406-416.

Oshima, Y. (1982). Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and phosphate. In The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolism and gene expression, J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach, eds. (Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 159-180.

Oshima, Y. (1997). The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* 72, 323-334.

Paranjape, S. M., Kamakaka, R. T., and Kadonaga, J. T. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 265-297.

Parent, S. A., Justice, M. C., Yuan, L., Hopper, J. E., and Bostian, K. A. (1994). Protein-DNA and Protein-Protein Interactions Regulating the Phosphatase Multigene Family of *Saccharomyces cerevisiae*. In Phosphate in Microorganisms, A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver, eds. (Washington: ASM), pp. 63-69.

Pazin, M. J., and Kadonaga, J. T. (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89, 325-328.

Pederson, D. S., Thoma, F., and Simpson, R. T. (1986). Core particle, fiber, and transcriptionally active chromatin structure. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 117-147.

Peterson, C. L. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Science* 272, 1749-1749.

Peterson, C. L., and Tamkun, J. W. (1995). The Swi-Snf complex: a chromatin remodeling machine. *Trends Biochem. Sci.* 20, 143-146.

Pollard, K. J., and Peterson, C. L. (1997). Role for *ADA/GCN5* products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6212-6222.

Pollard, K. J., and Peterson, C. L. (1998). Chromatin remodeling: a marriage between two families? *Bioessays* 20, 771-780.

Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1993). Histone-DNA contacts in a nucleosome core containing a xenopus 5s rRNA gene. *Biochemistry* 32, 6810-6814.

Ptashne, M., and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569-577.

Ptashne, M., and Gann, A. A. (1990). Activators and targets. *Nature* 346, 329-331.

Ranish, J. A., Yudkovsky, N., and Hahn, S. (1999). Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev.* 13, 49-63.

Redd, M. J., Arnaud, M. B., and Johnson, A. D. (1997). A complex composed of Tup1 and Ssn6 represses transcription *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 272, 11193-11197.

- Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 327-335.
- Rolfes, R. J., Zhang, F., and Hinnebusch, A. G. (1997). The transcriptional activators Bas1, Bas2, and Abf1 bind positive regulatory sites as the critical elements for adenine regulation of *ADE5,7*. *J. Biol. Chem.* *272*, 13343-13354.
- Rosenblum-Vos, L. S., Rhodes, L., Evangelista, C. C., Jr., Boayke, K. A., and Zitomer, R. S. (1991). The *ROX3* gene encodes an essential nuclear protein involved in *CYC7* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 5639-5647.
- Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? *Cell* *87*, 5-8.
- Roth, S. Y., Dean, A., and Simpson, R. T. (1990). Yeast alpha 2 repressor positions nucleosomes in *TRP1/ARS1* chromatin. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 2247-2260.
- Rudolph, H., and Hinnen, A. (1987). The yeast *PHO5* promoter: phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 1340-1344.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Suka, N., Turner, B. M., and Grunstein, M. (1998). Transcriptional repression by Ume6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by Rpd3. *Nature* *392*, 831-835.
- Sakurai, H., Ohishi, T., and Fukasawa, T. (1994). Two alternative pathways of transcription initiation in the yeast negative regulatory gene *GAL80*. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6819-6828.
- Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., McMahon, S. B., Litchfield, D. W., Yates, J. R., LeesMiller, S. P., Cole, M. D., and Brandl, C. J. (1998). Tra1p is a component of the yeast Ada center dot Spt transcriptional regulatory complexes. *J. Biol. Chem.* *273*, 26559-26565.
- Sarkar, G., and Sommer, S. S. (1990). The „megaprimer“ method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* *8*, 404-407.
- Schmid, A., Fascher, K. D., and Hörz, W. (1992). Nucleosome disruption at the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction occurs in the absence of DNA replication. *Cell* *71*, 853-864.
- Seipel, K., Georgiev, O., and Schaffner, W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote (enhancer) and proximal (promoter) positions. *EMBO J.* *11*, 4961-4968.
- Sengstag, C., and Hinnen, A. (1988). A 28-bp segment of the *Saccharomyces cerevisiae PHO5* upstream activator sequence confers phosphate control to the *CYCI-lacZ* gene fusion. *Gene* *67*, 223-228.
- Sera, T., and Wolffe, A. P. (1998). Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3668-3680.
- Shao, D., Creasy, C. L., and Bergman, L. W. (1996). Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Pho2 with Pho4 increases the accessibility of the activation domain of Pho4. *Mol. Gen. Genet.* *251*, 358-364.
- Shen, X., and Gorovsky, M. A. (1996). Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo. *Cell* *86*, 475-483.
- Shen, X. T., Yu, L. L., Weir, J. W., and Gorovsky, M. A. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell* *82*, 47-56.
- Shimizu, M., Roth, S. Y., Szent Gyorgyi, C., and Simpson, R. T. (1991). Nucleosomes are positioned with base pair precision adjacent to the alpha 2 operator in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *10*, 3033-3041.
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Oshima, Y., and Hakoshima, T. (1997). Crystal structure of Pho4 bHLH domain-DNA complex: Flanking base recognition. *EMBO J.* *16*, 4689-4697.

- 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.
- Smith, D. L. and Johnson, A. D. (1992). A molecular mechanism for combinatorial control in yeast: Mcm1 protein sets the spacing and orientation of the homeodomains of an alpha 2 dimer. *Cell* *68*, 133-142.
- Song, W. J., Treich, I., Qian, N. F., Kuchin, S., and Carlson, M. (1996). *SSN* genes that affect transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* encode *SIN4*, *ROX3*, and *SRB* proteins associated with RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 115-120.
- Stafford, G. A., and Morse, R. H. (1997). Chromatin remodeling by transcriptional activation domains in a yeast episome. *J. Biol. Chem.* *272*, 11526-11534.
- Stargell, L. A., and Struhl, K. (1996). Mechanisms of transcriptional activation in vivo: two steps forward. *Trends Genet.* *12*, 311-315.
- Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., Duggan, L. J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L. A., Winston, F., Workman, J. L., and Berger, S. L. (1999). Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol* *19*, 86-98.
- Straka, C., and Hörz, W. (1991). A functional role for nucleosomes in the repression of a yeast promoter. *EMBO J.* *10*, 361-368.
- Struhl, K. (1987). Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* *49*, 295-297.
- Struhl, K. (1996). Transcriptional enhancement by acidic activators. *Biochimica et Biophysica Acta* *1288*, O15-O17.
- Surosky, R. T., Strich, R., and Esposito, R. E. (1994). The yeast *UME5* gene regulates the stability of meiotic mRNAs in response to glucose. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 3446-3458.
- Svaren, J., and Hörz, W. (1993). Histones, nucleosomes and transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *3*, 219-225.
- Svaren, J., and Hörz, W. (1995). Interplay between nucleosomes and transcription factors at the yeast *PHO5* promoter. *Semin. Cell Biol.* *6*, 177-183.
- Svaren, J., and Hörz, W. (1996). Regulation of gene expression by nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 164-170.
- Svaren, J., and Hörz, W. (1997). Transcription factors vs nucleosomes: Regulation of the *PHO5* promoter in yeast. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 93-97.
- 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.
- Svaren, J., Venter, U., and Hörz, W. (1995). *In vivo* analysis of nucleosome structure and transcription factor binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Gene Techniques* *6*, 153-167.
- Thali, M., Muller, M. M., DeLorenzi, M., Matthias, P., and Bienz, M. (1988). *Drosophila* homoeotic genes encode transcriptional activators similar to mammalian OTF-2 [published erratum appears in *Nature* 1989 Jan 19;337(6204):290]. *Nature* *336*, 598-601.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., and Hansen, J. C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 4629-4638.
- Ushinsky, S. C., Bussey, H., Ahmed, A. A., Wang, Y., Friesen, J., Williams, B. A., and Storms, R. K. (1997). Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 151-161.

- Utle, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Cote, J., Steger, D. J., Eberharter, A., John, S., and Workman, J. L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394, 498-502.
- Vallier, L. G., and Carlson, M. (1994). Synergistic release from glucose repression by *mig1* and *ssn* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 49-54.
- Venter, U. (1993). Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren und Histonen mit Promotorelementen einer Phosphatasegenfamilie in der Hefe *S. cerevisiae*. Ph.D. thesis, Universität München).
- 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.
- Vettese-Dadey, M., Grant, P. A., Hebbes, T. R., Crane-Robinson, C., Allis, C. D., and Workman, J. L. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J.* 15, 2508-2518.
- Vogel, K., and Hinnen, A. (1990). The yeast phosphatase system. *Mol. Microbiol.* 4, 2013-2017.
- Vogel, K., Hörz, W., and Hinnen, A. (1989). The two positively acting regulatory proteins Pho2 and Pho4 physically interact with *PHO5* upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2050-2057.
- Wade, P. A., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem. Sci.* 22, 128-132.
- Wahi, M., and Johnson, A. D. (1995). Identification of genes required for alpha 2 repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 140, 79-90.
- Walker, S. S., Shen, W. C., Reese, J. C., Apone, L. M., and Green, M. R. (1997). Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state. *Cell* 90, 607-614.
- Wang, L., Liu, L., and Berger, S. L. (1998). Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function *in vivo*. *Genes Dev.* 12, 640-653.
- Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., and Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains Swi/Snf regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.
- Winslow, G. M., Hayashi, S., Krasnow, M., Hogness, D. S., and Scott, M. P. (1989). Transcriptional activation by the Antennapedia and fushi tarazu proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* 57, 1017-1030.
- Winston, F., and Carlson, M. (1992). Yeast Snf/Swi transcriptional activators and the Spt/Sin chromatin connection. *Trends Genet.* 8, 387-391.
- 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.
- Wolffe, A. P. (1997). Transcriptional control: sinful repression. *Nature* 387, 16-17.
- Wolffe, A. P., Khochbin, S., and Dimitrov, S. (1997). What do linker histones do in chromatin. *Bioessays* 19, 249-255.
- Wolffe, A. P., and Pruss, D. (1996). Chromatin: hanging on to histones. *Curr. Biol.* 6, 234-234.
- Wong, J., Shi, Y. B., and Wolffe, A. P. (1997). Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor: hormone-regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation. *EMBO J.* 16, 3158-3171.
- Workman, J. L., and Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual Review Of Biochemistry* 67, 545-579.
- Workman, J. L., and Roeder, R. G. (1987). Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* 51, 613-622.



Workman, J. L., Taylor, I. C., Kingston, R. E., and Roeder, R. G. (1991). Control of class II gene transcription during in vitro nucleosome assembly. *Methods Cell Biol.* 35, 419-447.

Wu, L., and Winston, F. (1997). Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 25, 4230-4234.

Yaniv, M., and Cereghini, S. (1986). Structure of transcriptionally active chromatin. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 21, 1-26.

Zhang, F., Kirouac, M., Zhu, N. N., Hinnebusch, A. G., and Rolfes, R. J. (1997). Evidence that complex formation by Bas1p and Bas2p (Pho2p) unmasks the activation function of Bas1p in an adenine repressible step of ADE gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3272-3283.

Zhou, Z., and Elledge, S. J. (1992). Isolation of crt mutants constitutive for transcription of the DNA damage inducible gene *RNR3* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 131, 851-866.

Zitomer, R. S., and Lowry, C. V. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 56, 1-11.



## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Modell zur Chromatin-Verpackung.** Diese schematische Zeichnung zeigt einige der zahlreichen Ordnungsprinzipien der Chromatin-Verpackung, um ein hochgradig kondensiertes mitotisches Chromosom entstehen zu lassen. ....3
- Abbildung 2: Das Phosphataseregulon der Hefezelle.** Die Zeichnung zeigt in vereinfachter Weise das Phosphataseregulon der Hefezelle. Dargestellt sind die Phosphatetransporter, welche Phosphat in die Zelle bringen, die positiv regulatorischen Faktoren Pho2, Pho4 und Pho81 und die negativ regulatorischen Faktoren Pho80 und Pho85, welche die Expression der Phosphatstrukturgene kontrollieren. Aufgeführt sind zudem die stark regulierten Phosphatasestrukturgene *PHO5* und *PHO8* mit schematischer Darstellung der Promotorstruktur bzgl. der Lage der Nukleosomen und Aktivatorbindestellen (Näheres siehe Text). ....8
- Abbildung 3: Konstruktion von *lacZ*-Reporterplasmiden mit Bindestellen für Chromatin-modulierende Faktoren.** Diese schematische Zeichnung zeigt einen Überblick aller erzeugten Hybride des *PHO5*-Promotors mit Bindestellen für Chromatin-modulierende Faktoren. Oben ist zur Orientierung der Wildtyp-*PHO5*-Promotor abgebildet. Die Lage der Transkriptionsfaktorbindestellen sind für das Pho4-Protein durch schwarze Rechtecke und für das Pho2-Protein durch hellgraue Rechtecke markiert. Die Bindestellen für die modulierenden Faktoren  $\alpha 2$ -Repressor bzw. Reb1 sind durch graue Rechtecke markiert. Senkrechte Hilfslinien dienen zur besseren Orientierung und lassen das Ausmaß der 5'-Verkürzung am *PHO5*-Promotoren leichter erkennen. Die Kreise zeigen jeweils die vermutliche Lage der Nukleosomen in der Promotorregion an. ....15
- Abbildung 4A: Einfluß des  $\alpha 2$ -Operators auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors.** (A) Einfluß des eingefügten  $\alpha 2$ -Operators auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors. Verwendet wurden Hefezellkerne eines YS18 $\alpha$ -Stamms mit episomalem  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphathaltigen (Spuren 1-3) bzw. einem phosphatfreien Medium (Spuren 7-9) gewachsen waren, und zur Kontrolle Zellkerne eines YS18a-Stamms mit episomalem  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphatfreien Medium gewachsen war (Spuren 13-15). Die Zellkerne wurden jeweils 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 oder 2 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußauf liegenden pBR-Sequenz enthaltenden Sonde hybridisiert. Zur Positionskartierung wurden die Zellkerne anstatt mit DNaseI mit einer weiteren Restriktionsnuklease gespalten (siehe Beschriftung über den Spuren). Am linken Rand findet sich zur besseren Orientierung eine Schemazeichnung des inaktiven  $\alpha 2$ -*PHO5*-Promotors. Die Kreise sollen die Nukleosomenpositionen repräsentieren; die Position des  $\alpha 2$ -Operator ist durch ein Rechteck, die Positionen der UAS-Elemente sind durch kleinere ausgefüllte Kreise wiedergegeben. ....17
- Abbildung 4B: Einfluß der drei eingefügten  $\alpha 2$ -Operatoren auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors:** (B) Einfluß der drei eingefügten  $\alpha 2$ -Operatoren auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors. Verwendet wurden Hefezellkerne eines YS18 $\alpha$ -Stamms mit episomalem  $3\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphathaltigen (Spuren 6-7) bzw. einem phosphatfreien Medium (Spuren 14-16) gewachsen waren, und zur Kontrolle Zellkerne eines YS18a-Stamms mit episomalem  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*-Plasmid, die in einem phosphathaltigen Medium (Spuren 1-2) und einem phosphatfreien Medium gewachsen war (Spuren 8-10). Details bezüglich Behandlung der Zellkerne, Positionskartierung und Schema siehe Abbildung 4A. ....17
- Abbildung 4C: Einfluß des eingefügten  $\alpha 2$ -Operators auf die *ClaI*-Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** Die nukleosomale Struktur des *PHO5*-Promotors wurde in phosphathaltigem (+P<sub>i</sub>) und phosphatfreiem (-P<sub>i</sub>) Medium untersucht. Zellkerne des YS18 $\alpha$ -Hefestammes ( $\alpha$ ) bzw. des YS18a-Kontrollstammes (a) wurden mit je zwei Konzentrationen 40 U/ml und 160 U/ml des *ClaI*-Restriktionsenzym gespalten. Auf Plasmidebene wurde die Promotorsituation charakterisiert durch eine *HindIII/PvuII*-Nachspaltung und Hybridisierung mit einer Sonde aus dem pBR322-Bereich des pPZ-Plasmides von *HindIII* bis *BamHI* (Fascher et al, 1993). Aufgetragen sind jeweils zwei Ansätze der in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) und einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsenen Zellen des  $\alpha$ - bzw. a-Stammes mit den Plasmid *PHO5-lacZ*: Spuren 1-8,  $\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*: Spuren 9-16 und  $3\alpha 2$ -*PHO5-lacZ*: Spuren 17-24. Unten ist jeweils die relative *ClaI*-Zugänglichkeit angegeben. ....18

- Abbildung 5A: Einfluß der eingefügten Deletionen zwischen 3 $\alpha$ 2 und den Pho4-Bindestellen auf die *ClaI*-Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** Hergestellt wurden alle Hefezellkerne von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 46*PHO5-lacZ*-, 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 66*PHO5-lacZ*- oder 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 101*PHO5-lacZ*-Konstrukt, welche in einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 30 min bei 37°C mit 40 bzw. 160 U/ml *ClaI* gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* und *PvuII* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden pBR-Sonde hybridisiert. Aufgetragen wurden Zellkerne mit episomalem 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 46*PHO5-lacZ* unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 1-2) oder a-Stamm (3-4), Zellkerne mit episomalem 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 66*PHO5-lacZ* unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 5-6) oder a-Stamm (7-8), Zellkerne mit episomalem 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 101*PHO5-lacZ* unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 9-10) oder a-Stamm (11-12). Unter den Spuren ist jeweils die relative *ClaI*-Zugänglichkeit angegeben. ....24
- Abbildung 5B: Einfluß der eingefügten Deletionen zwischen den 3 $\alpha$ 2-Operator- und den Pho4-Bindestellen auf die Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** Einfluß der flußauf verkürzten Konstrukte des *PHO5*-Promotoren auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors. Hergestellt wurden alle Hefezellkerne von Zellen des YS18 $\alpha$ -Stammes mit episomalem 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 46*PHO5-lacZ*- (Spuren 2-5) oder 3 $\alpha$ 2- $\Delta$ 66*PHO5-lacZ*-Konstrukt (Spuren 7-10), welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 und 2 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden, eine pBR-Sequenz enthaltenden Sonde hybridisiert. Die Spuren (1, 6, 9) repräsentieren eine Mischung von Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *HindIII* und *NcoI*, *XhoI*, und *ClaI*. ....25
- Abbildung 6A: Einfluß des eingefügten  $\alpha$ 2-Operators zwischen den Pho4-Bindestellen auf die Chromatinzugänglichkeit des *PHO5*-Promotors.** Alle Hefezellkerne wurden von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem *PHO5- $\alpha$ 2* (<sub>-311 bis -280</sub>)-*lacZ*-Konstrukt hergestellt, welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) oder einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 30 min bei 37°C mit 40 und 160 U/ml *ClaI* gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* und *PvuII* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden pBR-Sonde hybridisiert. Gewonnen wurden Zellkerne mit episomalem *PHO5- $\alpha$ 2* (<sub>-311 bis -280</sub>)-*lacZ* unter Hochphosphatbedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 1-2) und a-Stamm (3-4) sowie unter phosphatfreien Bedingungen in einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm (Spuren 5-6) und a-Stamm (7-8). Unten ist jeweils die relative *ClaI*-Zugänglichkeit angegeben. ....26
- Abbildung 6B: Einfluß des zwischen den Pho4-Bindestellen eingefügten  $\alpha$ 2-Operators auf die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors.** Alle Hefezellkerne wurden von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem *PHO5- $\alpha$ 2* (<sub>-311 bis -280</sub>)-*lacZ*-Konstrukt hergestellt, welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) oder einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 und 2 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden pBR-Sonde hybridisiert. Die Spuren (3 und 9) repräsentieren einen Mix von Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *HindIII* und *BamHI*, *SalI*, *ClaI*, und *BstEII*. Aufgetragen wurden Zellkerne von einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 4-5) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 10-11) sowie als Kontrolle Zellkerne von einem a-Stamm unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 1-2) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 6-8). Links befindet sich zur Orientierung das Schema des reprimierten Promotors mit  $\alpha$ 2-Operator. ....27
- Abbildung 7: Chromatinanalyse von *PHO5*-Promotorvarianten mit flußauf liegender Reb1-Bindestelle.** Alle Hefezellkerne wurden von Zellen des YS18 $\alpha$ - oder YS18a-Stammes mit episomalem Reb1-*PHO5-lacZ*- oder Reb1-*PHO5-lacZ*-Konstrukt gewonnen, welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) oder einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,5, 1 und 2 U/ml DNaseI gespalten, die DNA wurde isoliert, mit *HindIII* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen flußab liegenden, pBR-Sequenz enthaltenden Sonde hybridisiert. Die Spuren (4, 5, 12, 13) repräsentieren einen Mix von Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *HindIII* und *NcoI* oder *ClaI*. Verwendet wurden Zellkerne von einem Wildtyp- $\alpha$ -Stamm unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 1-3) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 6-8) mit episomalem Reb1-*PHO5-lacZ*,

- sowie unter Hochphosphatbedingungen (Spuren 9-11) und phosphatfreien Bedingungen (Spuren 14-16) mit episomalem *Reb1-ΔPHO5-lacZ*.....29
- Abbildung 8: Histonzusammensetzung der Mono- und Dinukleosomen aus Hühnererythrozyten.** Nach Auftrennung der Hühnererythrozyten in einem Dichtegradienten und Analyse der Fraktionen auf einem Agarosegel wurden die Dinukleosomen (Spuren 2 und 3) und Mononukleosomen (Spuren 4 und 5) auf einem 18%igen SDS-Polyacrylamidgel in ihre Komponenten aufgetrennt. Als Vergleich diente ein 1:1:1:1-Gemisch der von Boehringer erworbenen Histone H3 (15,3 kDa), H2A (14,8 kDa), H2B (14,3 kDa) und H4 (11,5 kDa) aus Kalbsthymus (siehe Spuren 6 und 7) sowie ein Molekulargewichtstandard (Spuren 1 und 8). .....31
- Abbildung 9: Analyse der Nukleosomenrekonstitution auf der  $\alpha$ -Satelliten-DNA und der *PHO5*-Promotor-DNA.** Rekonstituiertes Material wurde auf einen 4%igen PAG aufgetrennt. Die linken Spuren zeigen mit der  $\alpha$ -Satelliten-DNA rekonstituiertes Material, rechts befindet sich das mit der *PHO5*-Promotor-DNA rekonstituierte Material. Die freie DNA erscheint jeweils im unteren Teil des Gels. Mit M1 ist die Bande bezeichnet, die das Nukleosom endständig trägt; bei M2 handelt es sich um interne Nukleosomenpositionen. ....32
- Abbildung 10: Stabilität der isolierten Nukleosomenpartikel mit *PHO5*-Promotor-DNA und  $\alpha$ -Satelliten-DNA.** Die aus dem Nukleoproteingel durch Diffusion isolierten Nukleosomen wurden wiederum auf ein Nukleoproteingel aufgetrennt. Auf den ersten beiden Spuren wurden die Partikel M2 (Spur 1) und M3 (Spur 2) von der *PHO5*-Promotor-DNA aufgetragen, danach wurde M1 (Spur 3), M2 (Spur 4) und M3 (Spur 5) von der  $\alpha$ -Satelliten-DNA aufgetragen. Die freie DNA erscheint jeweils unten im Gel. Mit M1 ist die Bande bezeichnet, die das Nukleosom endständig trägt, bei M2 handelt es sich um interne Position, und M3 weist völlige Besetzung der DNA mit Histonproteinen auf. ....34
- Abbildung 11: Analyse des M2-Partikels von der *PHO5*-Promotor-DNA mit DNaseI.** Am linken Rand (Spur 1) befindet sich ein zur Größenorientierung mit *HpaII* gespaltener pUC20BM-Vektor. Auf Spur 2 ist die *PHO5*-Promotor-DNA aufgetragen. Auf den folgenden Spuren ist nukleosomal rekonstituiertes Material der *PHO5*-Promotor-DNA nach Spaltung mit steigenden Konzentrationen an DNaseI auf einem Nukleoproteingel aufgetrennt und nach der Isolierung des M2-Partikels auf dieses Sequenzgel aufgetragen worden. ....35
- Abbildung 12: SDS-PAGE-Analyse der rekombinanten HIS-Proteine.** Analyse auf Reinheit der Hexa-HIS-Proteine Pho2 ~57kD (Spur 2), Pho4 ~35kD (Spur 3) und Pho4 $\Delta$ int ~31kD (Spur 4) auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mittels Anfärbens mit Coomassie Blue sichtbar gemacht. Zum Größen- und Mengenvergleich befindet sich auf den Spuren 1 und 5 je ein  $\mu$ g der Proteine Rinderserumalbumin (66,2 kD), Ovalalbumin (42,7 kD), Carboanhydrase (31,0 kD), Sojabohnentrypsininhibitor (22,5 kD) und  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kD) (SDS-PAGE-Molekulargewichtsmarker von USB). Bei den mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Banden handelt es sich um das proteolytische Abbauprodukt des Pho4-Proteins, wie durch Westernblot bestätigt (nicht gezeigt bzw. siehe Abbildung 16). ....37
- Abbildung 13: DNaseI-Footprintanalyse des *PHO5*-Promotors mit Pho2.** Die DNaseI-Footprints wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der obere Strang eines *SfuI*(-206)-*BamHI*(-542)-Fragments wurde an der *SfuI*-Stelle markiert (A), der untere Strang eines *BsaHI*(-444)-*BamHI*(+9)Fragments an der *BsaHI*-Stelle (B), der obere Strang eines *BamHI*(-542)-*EcoRI*(-324)-Fragments an der *BamHI*-Stelle (C) und der untere Strang eines *HindIII*(-287)-*BamHI*(+9)-Fragments an der *HindIII*-Stelle. Alle Fragmente stammen von *PHO5-lacZ*-Derivaten ab (siehe Material und Methoden). Die Fragmente sind schematisch relativ zum gesamten Promotor jeweils unten eingezeichnet. Die durch Pho2 geschützten Regionen sind am rechten Rand markiert. In (C) ist eine zusätzliche Verstärkung bzw. ein zusätzlicher Schutz durch DNaseI-Spaltstellen nicht in die Abbildung eingezeichnet. Die -291- bis -320- und die -358- bis -385-Regionen scheinen konsistent mit zwei benachbarten oder teilweise überlappenden Pho2-Bindestellen zu sein. Ein partielles Purinspezifisches Abbaumuster auf der linken Seite dient in (D) zur besseren Orientierung. ....40
- Abbildung 14: Pho2 und Pho4 können gleichzeitig an überlappenden Stellen am UASp1 binden.** DNaseI-Footprints wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der untere Strang eines *BsaHI*(-444)-*BamHI*(+9)-Fragments wurde an der *BsaHI*-Stelle markiert. Pho4 und Pho2 wurden, wie oben angezeigt, einzeln oder zusammen zugefügt. Ein partielles Purinspezifisches Abbaumuster auf der linken Seite dient zur besseren Orientierung. Die geschützten Regionen sind am rechten Rand eingetragen. ....41

- Abbildung 15: Kooperative DNA-Bindung von Pho2 und Pho4 am UASp1.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Verwendet wurde – wie schematisch oben gezeigt – ein markiertes 81 Bp-PCR-erzeugtes Fragment (-324 bis -405), das UASp1 und die überlappende Pho2-Bindestelle(n) beinhaltend. Pho4 und Pho2 wurden, wie oben angezeigt, einzeln oder zusammen zugefügt. Die Menge des zugefügten Proteins zu einem Reaktionsansatz ist in imaginären Einheiten angegeben (siehe Material und Methoden). Der höher mobile Protein-DNA-Komplex, den man beobachtet, wenn Pho4 allein zugegeben wird, repräsentiert an DNA gebundenes, proteolytisch abgebautes Pho4-Protein (durch einen Pfeil markiert). Durch Sternchen gekennzeichnet ist die Position der ternären Komplexe, bestehend aus entweder vollständigen oder degradierten Produkten des Pho4-Proteins. ....42
- Abbildung 16: Supershift mit HIS-tag-Antikörpern.** Die experimentellen Bedingungen entsprechen denen von Abbildung 14. Ein 81 Bp-PCR-erzeugtes Fragment (-324 bis -405 Bp) mit UASp1 und der überlappenden Pho2-Bindestelle(n) wurde für die Bindereaktion benutzt. Die HIS-tag-Antikörper wurden zusammen mit den Pho4/Pho2-Proteinen 5 min bei RT im Bindepuffer vorinkubiert. Das 81 Bp-endmarkierte DNA-Fragment wurde zusammen mit unspezifischer Kompetitor-DNA (poly dI-dC) zu dem Reaktionsansatz gegeben und weitere 10 min bei RT inkubiert und einer PAGE-Analyse unterzogen. Das Muster, das mit Pho4 und DNA in Abwesenheit von HIS-tag-Antikörpern beobachtet wird, entspricht dem von Spur 1. Bei Pho4\* handelt es sich um das proteolytische Abbauprodukt von Pho4, wie bereits in Abbildung 15 beschrieben. ....43
- Abbildung 17: Pho2-DNA-Bindestellen sind eng benachbart zu der am UASp2 lokalisierten Pho4-Bindestelle.** DNaseI-Footprints wurden durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben. Der untere Strang eines *NcoI*(-345)-*BstEII*(-174)-Fragments wurde an der *NcoI*-Stelle markiert. Ein partielles Purin-spezifisches Abbaumuster auf der linken Seite dient zur Orientierung. Die geschützten Regionen sind an den Seiten eingetragen. ....44
- Abbildung 18: Pho2 und Pho4 binden kooperative an DNA-Sequenzen an UASp2.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Benutzt wurden drei verschiedene Promotorfragmente, wie schematisch unten gezeigt: (A) *XhoI*(-288)-*AvaII*(-218)-Fragment mit UASp2 und Pho2-Bindestellen flußauf und flußab liegend von der Pho4-Bindestelle lokalisiert; (B) *XhoI*(-288)-*ApoI*(-232)-Fragment, mit UASp2 und der flußauf liegenden Pho2-Bindestelle; (C) *ClaI*(-273)-*AvaII*(-218)-Fragment mit UASp2 und der flußab liegenden Pho2-Bindestelle. ....46
- Abbildung 19: Effekt von Pho2 beim Binden von Pho4 zu einem Fragment mit UASp2 ohne benachbarte Pho2-Bindestellen.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Gezeigt wird die stattfindende Bindung von Pho4 in Abwesenheit und Anwesenheit von Pho2 an ein *ClaI*(-273)-*ApoI*(-232)-Promotorfragment (schematisch unten gezeigt) mit UASp2, aber ohne Pho2-Bindestellen. ....47
- Abbildung 20: Eine dritte Pho4-Bindestelle wurde flußab liegend von UASp2 gefunden.** Der untere Strang eines *HindIII*(-292)-*BamHI*(+9)-Fragments (Abbildung 13D) wurde an der *HindIII*-Stelle markiert und für DNaseI Footprint-Experimente in Anwesenheit von Pho4 und/oder Pho2, wie oben angezeigt, verwendet. Geschützte Regionen sind seitlich angezeigt. ....48
- Abbildung 21: Kooperative Bindung zwischen Pho2 und Pho4 wird ebenfalls beobachtet an der neu erkannten Pho4-Bindestelle.** Bindung von Pho4 und Pho2 an ein *AvaII*(-218)-*Acc65*(-162)-Fragment mit der in Abbildung 20 gezeigten Pho4-Bindestelle und der benachbarten Pho2-Bindestelle wurde mittels Gelretardationsexperimenten wie in Material und Methoden beschrieben untersucht. ....49
- Abbildung 22: Karte von Pho4- und Pho2-Bindestellen am PHO5-Promotor.** Die Lokalisation der Bindestellen, wie sie in diesen Studien entdeckt wurden, sind im Schema angezeigt. Die Höhe der Balken beschreibt die relative Affinität der Bindestellen, wie sie durch Gelretardationsexperimente ermittelt wurde. ....50
- Abbildung 23: Mutationen von Pho2- und Pho4-Bindestellen am PHO5-Promotor.** Die Lokalisation der Pho4- und Pho2-Bindestellen, wie durch *in vitro*-Footprints bestimmt ((Barbaric et al., 1996)), sind durch gefüllte und offene Balken angezeigt, wobei die Höhe der Balken mit der relativen Affinität des Faktors für diese Stelle korrespondiert. Mutierte Regionen in den Pho2-Bindestellen sind in den Rahmen (M1 bis M5) und die ausgetauschten Nukleotide über der Wildtyp-Sequenz dargestellt. Mutationen in der Pho4-Konsensussequenz sind unter der Wildtyp-Sequenz angezeigt und referenziert als UASp1-mut, UASp2-mut, und Pho4-Stelle3-mut. ....51
- Abbildung 24: Effekt der Mutationen M1 und M2 auf Pho2- und Pho4-Bindung *in vitro*.** DNaseI-Footprints wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der obere Strang eines

*SfuI*(-206)-*BamHI*(-542)-Fragments – vom Wildtyp-Promotor oder mutierten Promotor – wurde an der *SfuI*-Stelle markiert. Wie oben gezeigt, wurde Pho4 oder Pho2 zugefügt. Die Regionen, die im Wildtyp-Promotor geschützt sind, sind seitlich angezeigt. Der Ort der M1- und M2-Mutationen (Abbildung 23) in den Pho2-Bindestellen ist schematisch unten gezeigt. ....53

**Abbildung 25: Pho2-Bindung ist nötig für Kooperativität zwischen Pho2 und Pho4 an UASp1.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Ein markiertes 81 Bp-PCR-Promotorfragment (-324 bis -405) wurde mit Wildtyp-Promotorsequenzen entweder der M1- oder der M2-Mutation benutzt (siehe Abbildung 23); dies ist unten schematisch gezeigt. Die Menge des zugefügten Proteins zu einem Reaktionsansatz ist in imaginären Einheiten angegeben. Eine Einheit von Pho4 und Pho2 entspricht ungefähr 5 und 6 ng Protein, so genau, wie durch Natriumdodecylsulfatgelelektrophorese bestimmt werden konnte. Den höher mobilen Protein-DNA-Komplex, den man beobachtet, wenn Pho4 allein zugegeben wird, repräsentiert proteolytisch abgebautes Pho4-Protein an DNA gebunden (durch einen Pfeil markiert). Durch Sternchen gekennzeichnet ist die Position des ternären Komplexes, bestehend aus entweder vollständigen oder degradierten Produkten des Pho4-Proteins. Ein niedriger mobiler Komplex mit nur Pho2 (Spur 5) wandert etwa an der gleichen Stelle wie der ternäre Komplex. Die Anwesenheit eines ternären Komplexes mit dem proteolysierten Pho4-Protein (niedrigere Bande mit Stern) macht es möglich, eindeutig den ternären Komplex zu identifizieren. ....54

**Abbildung 26: Mutationen in den Pho2-Bindestellen betreffen die PHO5-Promotoraktivität unterschiedlich.** Die Aktivität des Wildtyp-*PHO5*-Promotors fusioniert an das *lacZ*-Gen ((Straka and Hörz, 1991)), und Promotorvarianten mit Mutationen in den Pho2-Bindestellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben gemessen. Die Aktivitäten der mutierten Promotorvarianten sind relativ zum Wildtyp-Promotor (920 U) angegeben. Die Mutationen sind schematisch unten angezeigt. ....55

**Abbildung 27: Pho2-DNA-Bindung ist nötig für Kooperativität zwischen Pho2 und Pho4 auch am UASp2.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Benutzt wurde ein markiertes 109 Bp-PCR-erzeugtes Promotorfragment (-316 bis -208) mit UASp2 und entweder Wildtyp(wt)-Sequenz oder kombinierter M4+M5-Mutation, wie schematisch unten gezeigt. Die Menge hinzugefügten Proteins zum Reaktionsansatz ist in imaginären Einheiten oben angezeigt. Weitere Details – wie die Bedeutung der Pfeile und Sterne – sind in der Legende zu Abbildung 25 erläutert. ....57

**Abbildung 28: Chromatinöffnung am PHO5-Promotor hängt von den Pho2-cis-Elementen benachbart zu UASp1, aber nicht zu UASp2 ab.** Hefestämme mit entweder dem Wildtyp(wt)- oder dem *PHO5-lacZ*-Plasmid oder Plasmiden mit Promotorvarianten wurden im Medium mit  $P_i$  (+ $P_i$ ) oder ohne  $P_i$  (- $P_i$ ) wie gezeigt kultiviert und ihre Zellkerne isoliert. Diese wurden für 60 min bei 37°C in 200µl Puffer mit 100 U *Clal* oder 200 U *HindIII* und *XhoI* gespalten (die M4-Mutationen fügten eine *HindIII*- und *XhoI*-Stelle ein, wobei die *Clal*-Stelle zerstört wurde). Um eine Spaltung durch die Restriktionsnuklease nachzuweisen – angezeigt in dem oberen Schema –, wurde die DNA isoliert, mit *RsaI* nachgespalten, in einem 1%igen Agarosegel analysiert, transferiert und hybridisiert mit einem *RsaI-BamHI*-Fragment, welches zu der Region direkt flussab liegend der *BamHI*-Stelle hybridisiert. Ein 1,46 kbp-*RsaI*-Fragment wurde erzeugt, wenn vor der Restriktionsnuklease geschützt wird. Ein Fragment von halber Länge entsteht, wenn die Stelle zugänglich ist. Die Analyse des Wildtyp-Promotors und des M1-Promotors ist oben gezeigt. Zugänglichkeitswerte des Wildtyp-Reporters und des M1-, wie auch des M4+M5- und des M1+M4+M5-Promotors sind in dem Diagramm daneben gezeigt. Die Messungen für M4+M5 und M1+M4+M5 wurden aus *XhoI*- und *HindIII*-Spaltungen erhalten, die Werte ergaben, welche sich um weniger als 5 % unterschieden. ....59

**Abbildung 29: Pho2-cis-Elemente sind nötig für die Aktivierung des PHO5-Promotors durch Pho2-VP16 und ein transkriptionell inaktives Pho4-Derivat.** (A) Die Aktivierung des Wildtyp-*PHO5*-Promotors oder einer Promotorvarianten mit einer mutierten Pho4-Bindestelle bei UASp2 (UASp2-M) durch Pho4Δ2 und Pho2-VP16, wie sie in den Stämmen YS22 (*pho4*) oder YS27 (*pho4, pho2*) gemessen wurde. (B) Die Aktivierung der *PHO5*-Promotorvarianten mit mutierten Pho2-Bindestellen, schematisch unten gezeigt, durch Pho4Δ2 und Pho2-VP16, welche zusammen in YS27 (*pho4, pho2*) exprimiert wurden. ....60

**Abbildung 30: Überexpression von Pho4 kompensiert die Notwendigkeit für Pho2-cis-agierende Elemente.** Die Aktivierung von *PHO5*-Promotorvarianten mit mutierten Pho2-cis-Elementen, schematisch unten angezeigt, wurde gemessen in dem Wildtyp(wt)-Stamm YS18 und im gleichen

- Stamm, der zusätzlich Pho4 von einem Multikopienplasmid (2 $\mu$ ) exprimiert. Die Aktivierung des Wildtyp-Reporters in einem *pho2*-Stamm (YS19) ist rechts gezeigt. ....62
- Abbildung 31: Die kooperative DNA-Bindung mit Pho2 ist fast vollständig abwesend bei einer Pho4-Varianten ohne Pho2-Interaktionsdomäne.** Die Bindereaktionen und Gelretardationsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Proteine wurden einzeln oder in Kombination in unten angezeigter Menge (imaginäre Einheiten, wie in Abbildung 15; mit 1 U von Pho4 $\Delta$ int entspricht etwa 5 ng Protein) zu einem radioaktiv markierten Fragment zugefügt. Verwendet wurde hierfür zum einen das 81 Bp-PCR-erzeugte Promotorfragment (-324 bis -405), welches das UASp1 und die überlappende Pho2-Bindestelle (A) enthält, und zum anderen das 109 Bp-PCR-erzeugte Fragment (-316 bis -208), welches das UASp2 und die benachbarten Pho2-Bindestellen enthält (B) (siehe Schemata unten). Der Pfeil markiert binäre Komplexe, die von proteolytisch abgebautem Pho4 (volle Pfeile) und Pho4 $\Delta$ int (unterbrochene Pfeile) stammen. Ternäre Komplexe mit vollständigem Pho4 und seinem Degradationsprodukt sind durch Sterne markiert, die für Pho4 $\Delta$ int in analoger Weise durch einen Punkt. ....63
- Abbildung 32: DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an UASp2.** Untersucht worden ist die Bindung des Pho4wt und von Pho4 $\Delta$ int an das flüßauf liegende UASp2-Element (siehe Schema) im YS22 (*pho4*) oder YS27 (*pho2*, *pho4*), und zwar in der *PHO5*-Promotorvarianten, in der UASp1 durch UASp2 ersetzt wurde. ....66
- Abbildung 33: Graphische Darstellung der Konstruktion von episomalen Reporterplasmiden mit veränderten *PHO8*-Promotor und Integration der veränderten Promotoren in den chromosomalen *PHO8*-Lokus.** (A) Graphische Darstellung der Konstruktion von episomalen Reporterplasmiden mit Veränderungen des *PHO8*-Promotors. Die Ersellung des veränderten Promotorfragments mittels zweier PCR Reaktionen mit anschließender Nachspaltung findet sich oben. Restriktionsspaltstellen sind zur besseren Orientierung eingezeichnet. Die jeweils zur Klonierung verwendeten Fragmente der Plasmide sind durch gestrichelte Bögen angezeigt. (B) Zweischnittintegration von veränderten *PHO8*-Promotoren in den chromosomalen *PHO8*-Lokus. Die Orte der Rekombination sind durch Kreuze gekennzeichnet. Zum *PHO8*-spezifischen Nachweis dienten die Oligonukleotide *PHO8*upSoup und *PHO8*-UASp2-do(Z), es entstanden Fragmente von 757 bp bei *PHO8* und *PHO8*mut und von 1574 bp bei *pho8::URA3*. Die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide finden sich bei Material und Methoden 4.1.6. ....69
- Abbildung 34: Die Mutationen in den Pho4-Bindestellen UASp1 und UASp2 treffen den *PHO8*-Promotor in sehr unterschiedlicher Weise.** Gemessen wurde die Aktivität der Wildtyp- und der mutierten *PHO8*-Promotorvarianten, jeweils fusioniert an das *lacZ*-Gen. Die Positionen von UASp1 und UASp2 als auch die Nukleosomenstruktur für den reprimierten Promotor sind unten schematisch gezeigt. Die Schattierung der Nukleosomen reflektiert den Grad des DNA-Schutzes gegen Restriktionsnukleasespaltung: schwarz = 95 %, grau = 80 %, weiß = 50 % geschützt ((Barbaric et al., 1992)). ....71
- Abbildung 35: Pho4 bindet an das *PHO8*-UASp2-Element in Pho2-unabhängiger Weise.** Pho4-Bindung unter reprimierenden (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen (A) oder Pho4 $\Delta$ int Bindung unter induzierenden Bedingungen (B) an UASp2 in einem Wildtyp- und einem *pho2*-Stamm mittels DMS-Footprinttechnik analysiert. Die benutzten Hefestämme waren YS45 (wt), YS46 (*pho4*), YS42 (*pho2*) und YS78 (*pho2*, *pho4*). Alle Stämme tragen eine *CPF1*-Deletion, um eine mögliche Cpf1-Bindung an diese Stelle zu verhindern. Die Stämme exprimieren Pho4wt oder Pho4 $\Delta$ int von Centromer-Expressionsplasmiden. Die durch DNaseI-Footprints bestimmte Sequenz der Pho4-Bindestelle ((Barbaric et al., 1992)) ist im Kästchen auf der Seite gezeigt. Guanine sind durch Punkte und Pfeile markiert; mittlere Pfeile kennzeichnen Guanine, deren Reaktivität sich durch DMS nicht veränderte; die kleinen Pfeile beschreiben Guanine, die durch Pho4 geschützt sind. Die großen Pfeile kennzeichnen Guanine, welche hypersensitiv gegenüber DMS werden. Oben angezeigt ist die Defizienz benutzter Stämme und zusätzlich die Proteinexpression für jede Spur. Die *lacZ*-Aktivität des *PHO8*-Promotors in den unterschiedlichen Stämmen ist unter dem Gel gezeigt (B). ....74
- Abbildung 36: Aktivitäten der *PHO8*-Promotorvarianten mit UAS-Elementen des *PHO5*-Promotors.** Der Wildtyp-Promotor und Promotorvarianten mit UAS-Elementen vom *PHO5*-Promotor sind schematisch unten gezeigt. Die offenen und gefüllten Rechtecke repräsentieren jeweils *PHO8*-UASp1 und -UASp2 und die Kreise die zugehörigen Elemente von *PHO5*. ....76
- Abbildung 37: Pho4 bindet auch im Kontext des *PHO8*-Promotors effizient an *PHO5*-UASp2.** Die DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an das in den *PHO8*-Promotor gebrachten *PHO5*-UASp2



- (A), oder an das gleiche Element in seiner natürlichen Lokalisation im *PHO5*-Promotor (B). Für Details siehe Abbildung 35. ....78
- Abbildung 38: Chromatin-Umordnungen bei der Induktion des Wildtyp-*PHO8*-Promotors oder von Promotorvarianten mit *PHO5*-UAS-Elementen.** Alle Hefezellkerne wurden von Stämmen gewonnen, welche in einem phosphatfreien Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit ansteigenden DNaseI-Konzentrationen (0,25, 0,5 und 1 U/ml in jeden Fall) gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *Bgl*III gespalten, in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt, transferiert und mit dem *Pvu*II/*Xho*I-Fragment hybridisiert. Die Markerbanden enthalten Doppelspaltungen gereinigter genomischer DNA mit *Bgl*III und entweder *Eco*RV (1), *Hpa*I (2), *Pml*I (3), *Nhe*I (4), *Rsa*I (5), *Hind*III (6) oder *Xho*I (7). Die nukleosomale Struktur des Promotors unter repressiven Bedingungen ist unten gezeigt; sie enthält zusätzlich die Positionen der Restriktionsstellen, die gebraucht wurden, um Markerfragmente zu generieren. Während der Induktion durchlaufen Nukleosom -5 (schwarzer Kreis) keine, Nukleosomen -1, -2 und -3 (graue Kreise) teilweise und Nukleosom -4 (weißer Kreis) eine komplette Chromatin-Umordnung ((Barbaric et al., 1992)). ....79
- Abbildung 39: Das Ersetzen des basalen *PHO8* durch den basalen *PHO5*-Promotor erhöht die Promotoraktivität.** Der proximale Promotor (Position -142 bis -1) des *PHO8*-Promotors und Varianten daraus wurde durch ein 159 Bp-proximales Promotorfragment von *PHO5* ersetzt, und die Aktivitäten dieser Konstrukte wurden gemessen. ....81
- Abbildung 40: Deletion der *PHO8*-Promotorregion besetzt durch die Nukleosomen -3 und -2 erhöht die Promotoraktivität.** Verglichen wurden die Aktivitäten des Wildtyp-Promotors und Varianten mit ausgetauschten UAS-Elementen mit den korrespondierenden Promotorkonstrukten mit Deletion der Region, die normal durch die Nukleosomen -3 und -2 bedeckt ist, *PHO8*Δ296 (siehe Schema unten). ....82
- Abbildung 41: Lokale Chromatin-Umordnung unter Hochphosphatbedingungen am Wildtyp-*PHO8*-Promotor und der Promotorvarianten mit der Deletion des Bereichs von Nukleosom -3 und -2.** Chromatinanalysen unter Hochphosphatbedingungen am Wildtyp-*PHO8*-Promotor (A) und der Promotorvarianten mit der Deletion des Bereichs von Nukleosom -3 und -2 (B). Alle Hefezellkerne wurden von Stämmen gespalten, die in Anwesenheit von Phosphat gewachsen sind, und zwar 20 min bei 37°C mit ansteigenden DnaseI-Konzentrationen (0,25, 0,5 und 1 U/ml in jeden Fall). Die DNA wurde isoliert, mit *Bgl*III gespalten, in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt, transferiert und hybridisiert mit dem *Pvu*II/*Xho*I-Fragment. Die Markerbanden enthalten Doppelspaltungen gereinigter genomischer DNA mit *Bgl*III und entweder *Eco*RV (1), *Hpa*I (2), *Pml*I (3), *Nhe*I (4), oder *Hind*III (5). Unten gezeigt ist die nukleosomale Struktur des Promotors unter repressiven Bedingungen mit den Positionen der Restriktionsstellen, die gebraucht wurden, um Markerfragmente zu generieren. Während der Induktion durchlaufen Nukleosom -5 (schwarzer Kreis) keine, Nukleosomen -1, -2 und -3 (graue Kreise) teilweise, und Nukleosom -4 (weißer Kreis) eine komplette Chromatin-Umordnung ((Barbaric et al., 1992)). ....84
- Abbildung 42: Pho4-Überexpression erhöht die Bindung an das UASp2 des *PHO8*-Promotors in Wildtyp- und *pho2*-Stämmen.** Die DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an das *PHO8*-UASp2 in Wildtyp-Stämmen und *pho2*-Stämmen. Für Details siehe Abbildung 35. ....86
- Abbildung 43: *In vivo*-DMS-Footprintanalyse der Pho4-Bindung an das UASp2 des *PHO8*-Promotors im *gcn5*-Stamm.** Bestimmt wurde das DMS-Modifizierungsmuster der Pho4-Bindung an das UASp2-Element im *PHO8*-Promotor unter nichtinduzierenden (+P<sub>i</sub>) (Spur 2 und 3) und induzierenden Bedingungen (-P<sub>i</sub>) (Spur 4 und 5) in einem YS18(Wildtyp)- und einem *gcn5*-Stamm. Der Pho4-defiziente YS22(*pho4*)-Stamm wurde als Kontrolle für fehlende Bindung verwendet. Die Punkte markieren die DMS-modifizierten Guanin-Stellen. Die kurzen Pfeile induzieren Guanine, welche durch Pho4 geschützt sind, die mittleren Pfeile zeigen Guanine, deren Reaktivität durch DMS nicht verändert wurde, und der breite Pfeil kennzeichnet ein Guanin, welches hypersensitiv zu DMS während der Pho4-Bindung wird. Der Kasten zeigt den DNaseI-Footprint der Pho4-Bindung an das UASp2-Element unter phosphatfreien Bedingungen. Alle Stämme sind zusätzlich CpfI-defizient. Für Einzelheiten der DMS-Footprintmethode und der benutzten Oligonukleotide siehe das untere Schema und Material und Methoden. ....88
- Abbildung 44: Chromatinöffnung des *PHO84*-Promotors während der Aktivierung.** Alle Hefezellkerne stammen von Zellen des IH2-Wildtyp-Stamms, welche in einem phosphathaltigen (+P<sub>i</sub>) oder in einem phosphatfreien (-P<sub>i</sub>) Medium gewachsen sind. Aliquots wurden 20 min bei 37°C mit 0,25, 0,5, 1, 2 und 4 U/ml DNaseI gespalten. Die DNA wurde isoliert, mit *Nco*I gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen *PHO84*-FluöBab-Sonde (*Clal*/*Nco*I-Restriktionsfragment) hybridisiert. Die Spuren (6-8) zeigen zur

Orientierung Restriktionsnuklease-Doppelspaltungen mit *NcoI* und *ClaI*, *DraI*, oder *PmlI*. Aufgetragen wurden Zellkerne eines unter Phosphatanwesenheit gewachsenen Stammes (+P<sub>i</sub>) (Spuren 1-5) sowie Zellkerne eines unter Phosphatabwesenheit gewachsenen Stammes (-P<sub>i</sub>) (Spuren 9-13). Die unteren gezeigten Schemata zeigen den *PHO84*-Promotor unter inaktiven und aktiven Bedingungen und verdeutlichen die Disruption der Nukleosomen vom *PHO84*-Promotor unter Phosphatmangelbedingungen. Als Sonde für die indirekte Endmarkierung wurde ein flußab liegendes-Fragment aus der kodierenden Region von *PHO84* verwendet. ....90

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Repression des <i>PHO5</i>-Promotors durch den <math>\alpha 2</math>-Repressor.</b> Bestimmt wurde die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von <i>PHO5-lacZ</i> -Reporterplasmiden und Varianten mit ein bzw. drei $\alpha 2$ -Operatoren unter nichtinduzierenden (+P <sub>i</sub> ) und induzierenden (-P <sub>i</sub> ) Bedingungen im $\alpha$ -Stamm. Es wurden jeweils Messungen dreier unabhängiger Klone durchgeführt; das Ergebnis wurde gemittelt (siehe Material und Methoden). Die Aktivität wurde in Einheiten U ausgedrückt (siehe Material und Methoden). Der $\alpha$ -Stamm, der kein $\alpha 2$ -Protein produziert, diente jeweils zur Kontrolle. ....	16
<b>Tabelle 2: Die volle Repression über den <math>\alpha 2</math>-Operator benötigt <i>Sin4</i>.</b> Bestimmt wurde die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von <i>PHO5-lacZ</i> Reporterplasmiden und dem Konstrukt mit einem $\alpha 2$ -Operator unter nichtinduzierenden (+P <sub>i</sub> ) und induzierenden (-P <sub>i</sub> ) Bedingungen in einem Wildtyp- und einem <i>sin4</i> -Stamm. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden. ....	21
<b>Tabelle 3: Pho4-Überexpression hebt die <math>\alpha 2</math>-Repression auf.</b> Bestimmt wurde die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von <i>PHO5-lacZ</i> -Reporterplasmiden und einer Varianten mit einem $\alpha 2$ -Operator unter nichtinduzierenden (+P <sub>i</sub> ) und induzierenden (-P <sub>i</sub> ) Bedingungen im Wildtyp-YS18a-Stamm und einem $\alpha$ -Stamm, der den Transkriptionsaktivator Pho4 überexprimiert. Als Kontrolle diente der YS18a-Stamm, der keinen $\alpha 2$ -Faktor produziert. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden. ....	22
<b>Tabelle 4: Verschiebung des <math>\alpha 2</math>-Operators zur kodierenden Sequenz hin erhöht die Repression.</b> Bestimmt wurde die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von <i>PHO5-lacZ</i> -Reporterplasmiden mit drei $\alpha 2$ -Operatoren und Varianten mit verkürztem <i>PHO5</i> -Promotor unter nichtinduzierenden (+P <sub>i</sub> ) und induzierenden (-P <sub>i</sub> ) Bedingungen im Wildtyp-Stamm. Als Kontrolle diente der YS18a-Stamm, der keinen $\alpha 2$ -Faktor produziert. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden. ....	23
<b>Tabelle 5: Reb1-Bindestellen führen zu keiner Veränderung der <i>PHO5</i>-Promotoraktivität.</b> Bestimmt wurde die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von <i>PHO5-lacZ</i> Reporterplasmiden und Varianten mit Reb1-Bindestelle vor dem nativen bzw. verkürztem <i>PHO5</i> -Promotor unter nichtinduzierenden (+P <sub>i</sub> ) und induzierenden (-P <sub>i</sub> ) Bedingungen im Wildtyp-Stamm. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden. ....	28
<b>Tabelle 6: Beitrag der einzelnen Pho4-Bindestellen zur <i>PHO5</i>-Promotoraktivität.</b> ( <sup>a</sup> Pho4-Bindestellen am <i>PHO5</i> -Promotor wurden wie in Abildung 23 gezeigt mutiert. <sup>b</sup> Aktivitäten der mutierten Promotoren relativ zur Aktivität des Wildtyp-Promotors.) ....	51
<b>Tabelle 7: Ein mutiertes Pho4-Protein ohne die Pho2-Interaktionsdomäne (Pho4<math>\Delta</math>int) kann UASp2 aktivieren, aber nicht UASp1.</b> <sup>a</sup> Die Aktivität des <i>PHO5</i> -Promotors und die Aktivität von heterogenen Promotorkonstrukten mit einzelnen <i>PHO5</i> -UAS-Elementen wurde in einem Stamm gemessen, der entweder Pho4wt oder Pho4 $\Delta$ int exprimiert. Die Aktivitätswerte mit reinen <i>CYC1-lacZ</i> -Plasmid betragen < 5 U. ....	64
<b>Tabelle 8: Aktivierung einer <i>PHO5</i>-Promotorvarianten mit 2 x UASp2.</b> <sup>a</sup> Die Aktivität der Promotorvarianten mit 2 x UASp2 (siehe Material und Methoden) wurde mit Pho4wt oder Pho4 $\Delta$ int in einem YS22( <i>pho4</i> )- und einem YS27( <i>pho2, pho4</i> )-Stamm gemessen. ....	65
<b>Tabelle 9: Die Induktion des <i>PHO8</i>-Promotors ist vollkommen Pho4-abhängig.</b> Bestimmt wurde die Aktivität des <i>PHO8</i> -Promotors in einem Wildtyp(wt)- und einem <i>pho4</i> -Stamm unter repressiven (+P <sub>i</sub> ) und induzierenden (-P <sub>i</sub> ) Bedingungen durch Messung der endogenen alkalischen Phosphataseaktivität oder durch Gebrauch eines <i>PHO8</i> -Promotor- <i>lacZ</i> -Konstruktes. ....	70
<b>Tabelle 10: <i>PHO8</i>-UASp1 ist allein nicht aktiv, wenn es mit einem <i>CYC1</i>-minimal-Promotor getestet wird.</b> Die Fähigkeit von <i>PHO8</i> -UAS-Elementen, die Transkription zu aktivieren, wurde	

durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in heterologen Konstrukten mit einem *lacZ*-Gen bestimmt, das durch einen *CYC1*-minimal-Promotor getrieben ist. ....72

**Tabelle 11: Volle Aktivierung des *PHO8*-Promotors benötigt Pho2.** Um den Effekt von Pho2 auf die *PHO8*-Promotoraktivierung zu bestimmen, wurde die Aktivität des *PHO8-lacZ*-Konstruktes in Stämmen mit einem disrupierten *PHO2*-Gen (YS19 und YS32) und in den zugehörigen Wildtyp-Stämmen (YS18 und YS31) gemessen. ....73

**Tabelle 12: Auswirkung einer Pho4-Überproduktion auf die *PHO8*-Promotoraktivität.** Bestimmt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von *PHO8-lacZ* Reporterplasmiden unter nichtinduzierenden (+P<sub>i</sub>) und induzierenden (-P<sub>i</sub>) Bedingungen im Wildtyp-Stamm und einem *pho2*-Stamm, welche zusätzlich ein Pho4-Expressionsplasmid enthielten, das auf cen- bzw. 2 $\mu$ -Level exprimierte, im Vergleich zur chromosomalen Pho4-Expression. Näheres siehe Tabelle 1 und Material und Methoden. ....84

**Tabelle 13: Aktivitäten des *PHO8*-Promotors in einem *gcn5* Stamm.** Um den Effekt von Gcn5 auf die *PHO8*-Promotoraktivierung zu bestimmen, wurde die Aktivität des *PHO8-lacZ*-Konstruktes in Stämmen mit einem disrupierten *GCN5*-Gen (YS518 $\alpha$ ) und in dem zugehörigen Wildtyp-Stamm (YS18 $\alpha$ ) gemessen. ....87

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

ADA	Activator dependent adaptor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bHLH	basisch-Helix-Loop-Helix
Bp	Basenpaare
CDC	Cell division cycle
Ci	Curie (1 Ci, 3,7x10 Becquerel)
CTD	C-terminale Domäne (RNA-PolIII)
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	DesoxyribonukleaseI
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FOA	Fluorotsäure
GTF	generelle Transkriptionsfaktoren
kBp	Kilo-Basenpaare
kD	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani (Medium)

---

min	Minuten
O. D.	Optische Dichte
ONPG	ortho-Nitro-Phenyl-Galactopyranosid
ONPP	ortho-Nitro-Phenyl-Phosphat
PCR	Polymerase chain reaction
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PIC	Preinitiationcomplex
RAP	Repressor activator protein
RPB	RNA-Polymerase B
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (20°C)
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRB	Suppressor of RNA Pol.B
TAFs	TBP assoziierte Faktoren
TBP	TATA bindendes Protein
TDH	Triosephosphat-Dehydrogenase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UAS	upstream activating sequence
URS	upstream repressing sequence

# LEBENS LAUF

Martin Münsterkötter

- Geburtsdatum: 12. August 1963 in Stadtlohn
- Ausbildung: 05.06.1984  
Erwerb der „Allgemeinen Hochschulreife“  
am Alexander-Hegius Gymnasium, Ahaus
- 10.84 – 12.85  
Wehrdienst
- 15.10.85 – 13.07.88  
Diplom Chemie  
Westfälische-Wilhelms-Universität Münster  
Diplom-Chemiker-Vorprüfung
- 10.88 – 05.91  
Diplom Chemie  
Ludwig-Maximilian-Universität München  
Diplom
- 01.07.91 – 01.06.92  
Diplomarbeit am Adolf-Butenandt-Institut der Universität München  
Betreuer: Prof. W.Hörz  
Thema: Die Rolle des positiven Regulators Pho81 bei der Expression  
des Gens der sauren Phosphatase *PHO5* aus *Saccharomyces cerevisiae*
- 01.07.92 – 14.06.99  
Promotion am Adolf-Butenandt-Institut der Universität München  
Betreuer: Prof. W.Hörz  
Thema: Kooperative Wechselwirkungen von Transkriptionsfaktoren  
und Histonen mit Promotorelementen der Phosphatasegene *PHO5* und  
*PHO8* in *Saccharomyces cerevisiae*
- 15.06.99 bis dato  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Münchener Institut für Protein  
Sequenzen (bis 14.03.01 Max-Planck-Institut für Biochemie seit  
15.03.01 GSF Neuherberg)  
Lehrstuhl: Prof. W.Mewes Institut für Bioinformatik
- 01.11.96 – 31.07.99  
4 Semesterwochenstunden Lehrtätigkeit Biochemie 2 für Mediziner