

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut für Molekularbiologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Peter Becker

**Chromatinstruktur und Regulation
der Genexpression
des Phosphatasegens *PHO3*
in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lydia Kriegl
aus
Freising

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. B. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Imhof

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 2005

Meinen Eltern

1 Einleitung	1
2 Ergebnisse	9
2.1 Vektorklonierung zur Aktivitätsmessung des PHO3 – Promotors	9
□ BamH	
I	11
2.2 Fragmentklonierung für PHO6 Disruption in Escherichia coli	17
2.3 Fragmentklonierung für DNase I Analyse in Escherichia coli	22
9 A 23	
9 C 23	
9 B 23	
2 Ergebnisse	24
2.5 Messergebnisse	27
2.6 Chromatinanalyse	34
3 Diskussion	38
3.1 Klonierungen	38
3.2 Messergebnisse	39
3.3 Chromatinstruktur	42
3.4 Weitere Aussichten zu der Erforschung des PHO3 Promotors	46
4 Materialien und Methoden	47
4.1 Chemikalien und Enzyme	47
4.2 Medien	48
4.3 Hefe-, Bakterienstämme, Vektoren und DNA	48
4.4 Arbeitsmethoden	49
5 Zusammenfassung	59
6 Literaturverzeichnis	62

7 Abkürzungsverzeichnis	73
8 Danksagung	74
9 Lebenslauf	75

1 Einleitung

1962 erhielten James D. Watson und Francis Crick den Nobelpreis für Medizin. 9 Jahre zuvor war es ihnen gelungen, ein Modell über die Molekularstruktur der Nukleinsäuren zu erstellen und damit den Grundstein der Molekularbiologie zu legen. Aus damals bereits gewonnenen Erkenntnissen über die genetische Information der Zellen folgerten sie, dass sich die Träger der Erbinformation in Form einer Doppelhelix anordnen (Watson und Crick, 1953). Bis dahin war zwar bekannt gewesen, dass die Erbinformation als Basensequenz auf DNA-Makromolekülen niedergelegt ist und ein Jahr zuvor war Alfred Hershey und Martha Chase sogar der Beweis gelungen, dass die DNA Träger der genetischen Information ist (Hershey und Chase, 1952) aber erst mit dem räumlichen Aufbau des Erbmoleküls konnten viele der tiefsten Probleme der Biologie ans Licht gebracht werden. Denn mit der Entschlüsselung der dreidimensionalen Anordnung der DNA gelang es Watson und Crick, gleichzeitig den chemischen Mechanismus zu erklären, mit dem die Zellen ihre biologische Eigenschaft bei der Zellteilung exakt weitergeben können. Diesen auch als semikonservative Replikation bezeichneten Vorgang konnten Mathew Meselson und Frank W. Stahl 1958 experimentell bestätigen (Meselson und Stahl, 1958).

Der nächste Meilenstein in der Geschichte der DNA war die Entdeckung von DNA spaltenden Enzymen. Den Anfang machten Ende der 60-er Jahre Linn und Arber mit einer Restriktionsnuclease, die die DNA unspezifisch spaltet (Linn und Arber, 1968). Das erste Restriktionsenzym mit spezifischer Erkennungssequenz, von denen mittlerweile über 150 verschiedene entdeckt wurden, wurde durch Hamilton Smith Anfang der 70-er Jahre aus dem Bakterium *Haemophilus influenzae* extrahiert (Smith und Wilcox, 1970). Mit Hilfe dieser gentechnischen Werkzeuge gelang es 1972 dem Chemiker Paul Berg, das erste Mal sogenannte rekombinante DNA zu erzeugen. Für seine Experimente verwendete er dabei Plasmide. Das sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sowohl in Bakterien als auch in Zellkernen von Hefe und einigen höheren eukaryotischen Zellen vorkommen können. In diese baute er die DNA des SV40 Virus ein und beobachtete, dass das veränderte Plasmid nach Einschleusung in Bakterien in identischer Form an die Tochtergenerationen weitervererbt wurde (Jackson et al., 1972). Für diese grundlegenden molekularbiologischen Studien erhielt er 1980 den Nobelpreis.

Aber nicht nur im Bereich der Arbeitsmethoden wurden Fortschritte erzielt, sondern es gelang auch, weitere Einblicke in den komplexen Aufbau der DNA zu erlangen. Die Existenz von basischen Histonproteinen als universale Komponente des eukaryoten Chromatins war

schon im vorletzten Jahrhundert beobachtet worden war (Kossel, 1884), aber ihre Funktion war lange Zeit unklar. Es gab sogar Theorien, nach denen die Histone selbst das genetische Material seien. Nachdem man erkannt hatte, dass es genau fünf Histonproteine gibt (Phillips und Johns, 1965), schlug Roger Kornberg 1974 ein Modell vor, in dem ein Oktamer aus je zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3, H4 einen Kern bilden, um deren Oberfläche sich 147 Basenpaare der DNA zweimal winden. Aus dem Kern ragen dabei die aminoterminalen Domänen der Histone als lysinreiche Schwänze heraus. Diese Einheit der Chromatinstruktur wird als Nukleosom bezeichnet. Weitere Forschungen zeigten, dass sich die sich wiederholenden Nukleosomenpartikel spulenförmig aufwickeln, so dass ein Faden von etwa 30 nm Stärke entsteht. Dieser wird als Solenoid bezeichnet und durch das Histonprotein H1 stabilisiert (zur Wiederholung siehe Horn und Peterson, 2002).

Insgesamt führen die Leistungen der Forscher der letzten zwei Jahrhunderte zu unserem heutigen umfassenden Bild von Aufbau und Funktion der DNA. Die DNA-Doppelhelix von Watson und Crick besteht aus zwei Polynukleotidketten, die über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind und sich dreidimensional in Form einer Doppelschraube anordnen. Jeder Einzelstrang ist dabei aus einer Sequenz von Untereinheiten aufgebaut, den Nukleotiden. Diese bestehen aus einer stickstoffhaltigen Base, einer Pentose und einer Phosphatgruppe. Bei den Basen handelt es sich um heterozyklische Ringmoleküle aus Kohlenstoff- und Stickstoffatomen, von denen es zweierlei Arten gibt, die Pyrimidine und die Purine. Pyrimidine wie das Cytosin und Thymin haben einen sechsgliedrigen Ring, Purine wie das Adenin und Guanin einen fünf- und einen sechsgliedrigen Ring. Sie liegen auf der Innenseite des Doppelstranges und bilden zu den Basen der gegenüberliegenden Kette Wasserstoffbrücken aus. Diese Basenpaarung ist spezifisch, d.h. Adenin kann sich nur mit Thymin und Guanin nur mit Cytosin paaren. Die Zucker und Phosphatgruppen der Nukleotide liegen an der Außenseite der Doppelhelix und bilden ihr Rückgrat.

Für die Verdopplung der DNA trennen sich die beiden Stränge und dienen als Matrize für den Aufbau zweier identischer Tochterstränge. Um diesen Vorgang der Replikation primär zu ermöglichen, muss sich die Doppelhelix entwinden. Dies übernimmt die sogenannte Helikase. Anschließend wird über eine RNA-Polymerase, die Primase, ein kurzes RNA Stück synthetisiert. An diesem kann die DNA-Polymerase, das Hauptenzym der Replikation, ansetzen und die restliche Kette bilden. Da jeder einzelne Tochterstrang nur in 5`-3` Richtung verlängert wird, läuft am anderen Strang die Synthese diskontinuierlich ab. Dieser Vorgang erfordert sowohl eine weitere DNA-Polymerase, welche die Lücken füllt, als auch

das Enzym DNA-Ligase, welches das Rückgrat der DNA verbindet. Abschließend lagern sich die Töchterstränge über Wasserstoffbrücken aneinander an.

Wird nicht die gesamte DNA umgeschrieben, sondern nur eine Kopie eines Gens in Form eines einzelsträngigen RNA-Moleküls hergestellt, so bezeichnet man diesen Vorgang als Transkription. Um eine Anlagerung der für die Transkription verantwortlichen Enzyme, nämlich der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen zu ermöglichen, wird der DNA-Doppelstrang zuerst an der gewünschten Stelle entspiralisiert. Im nächsten Schritt steht das korrekte Auffinden der Startstelle im Vordergrund, so dass nur der für die Funktion des betreffenden Gens benötigte DNA-Abschnitt transkribiert wird. Hierfür verfügen pro- und eukaryote Gene über sog. Promotoren oder Promotorregionen. Diese sind die Träger von Strukturelementen, die die Bindung der RNA-Polymerasen an den Transkriptionsstartpunkt ermöglichen und Informationen darüber geben können, mit welcher Effizienz ein Gen transkribiert wird, bzw. wie seine Transkription reguliert ist. Im nächsten Schritt werden die entsprechenden Nukleosidtriphosphate zum fertigen RNA-Strang zusammengesetzt, bis spezifische Signale diesen Vorgang beenden.

Aber nicht nur Promotoren können die Transkription verschiedener Gene steuern. In allen regulierbaren eukaryoten Genen kommen sogenannte Enhancer- (=engl. Verstärker-) Sequenzen vor (Serfling et al. 1985), die auch als cis-aktivierende Elemente bezeichnet werden. Durch Bindung induzierbarer Proteine an diese Kontrollelemente, kann die Transkriptionsgeschwindigkeit der entsprechenden Gene um ein vielfaches gesteigert werden. Diese Form der Genregulation wird als Trans-Aktivierung bezeichnet. Die Position des Enhancers relativ zum Promotor kann dabei beträchtlich variieren. Meist liegt das Kontrollelement einige hundert Basenpaare oberhalb der Promotorregion, kann jedoch in Einzelfällen auch unterhalb oder innerhalb des Gens lokalisiert sein. Auch bei Entfernungen von einigen tausend Basenpaaren oder bei Einbau mit entgegengesetzter Polarität können sie noch voll aktiv sein. In Hefe findet man Sequenzabschnitte, die den Enhancern analog sind. Sie werden als UAS-Sequenzen (upstream activator sequences) bezeichnet (Guarente, 1984) und können ebenfalls in beiden Orientierungen und in variablen Abständen stromaufwärts vom Promotor wirken, jedoch nicht aus einer Position stromabwärts arbeiten.

Ein interessanter positiver Regulationsfaktor im Rahmen der Transkription ist das Gcr1 Protein (Holland et al., 1983). Gcr1 steht dabei für „glucose regulation 1“ und wird für die maximale Expression vieler glykolytischer Gene in Hefe benötigt (Clifton und Fraenkel, 1981). Dabei bindet das Protein spezifisch an ein CTTCC Sequenzmotiv (Baker, 1991; Huie et al., 1992), welches auch als CT-Box bezeichnet wird und das in der UAS-Region von

glykolytischen Enzymgenen liegt. Es kann die Transkription der Zielgene entweder allein (Huie et al., 1992) aktivieren oder als Teil eines Komplexes mit Gcr2 (glucose regulation 2). In diesem Gcr1-Gcr2-Komplex enthält Gcr1 die Bindungsdomäne und Gcr2 die Aktivierungsdomäne (Uemura und Jigami, 1992). In einem anderen Modell kooperieren Gcr1 und das UAS_{RPG} (upstream activating sequenz in ribosomal protein genes) Bindungsprotein Rap1 (repressor/activator protein) bei der Aktivierung der Genexpression. Zusammen bilden sie einen heterotrimeren Komplex, in dem Gcr1 die Aktivierungsdomäne und Rap1 die Bindungsdomäne zur Verfügung stellt (Tornow et al., 1993).

Seit einigen Jahren wird immer deutlicher, dass nicht nur die Zusammenarbeit einzelner Faktoren die Transkription steuert. Auch die kompakte Struktur des Chromatins dient nicht ausschließlich dazu, die über einen Meter lange DNA (im Falle des menschlichen Genoms) in den Zellkern zu verpacken, sondern spielt ebenso eine dynamische Rolle in der Regulation der Transkription (Felsenfeld, 1996; Peterson, 1996; Wolffe, 1997; Gregory und Hörz, 1998). Das Ausmaß ihrer Faltung beeinflusst direkt die Aktivität von Transkription und Replikation, indem sie den Zugang zu DNA-Bindungsstellen begrenzt und damit die Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte Elemente der Promotoren blockiert (Almer et al., 1986; Axelrod et al., 1993; Wolffe, 1994). Ein Beginn der Transkription wird durch Faktoren, die die Öffnung des Chromatins herbeiführen und damit die Funktion von Transaktivatoren und/oder der gesamten Transkriptionsmaschine unterstützen, ermöglicht. Zwei Mechanismen, die diese Veränderung des Chromatins bewirken können, stehen zur Zeit im Vordergrund des Forschungsinteresses, zum einen die Acetylierung der Histone und zum anderen die Umformung des Chromatins (chromatin remodelling) über einen ATP-abhängigen Vorgang.

Die Grundlage für den ersten Mechanismus legte in den 60-iger Jahren die Entdeckung Allfreys, dass Histone an ihren N-terminalen Schwänzen acetyliert werden können und dass diese Acetylierung stark mit DNA Regionen korreliert ist, die aktiv transkribiert werden (Allfrey et al., 1964). Bei weiteren Untersuchungen erkannte man, dass die Acetylierung die Affinität zwischen DNA und Histonen (Wade et al., 1997; Tse et al., 1998) und zwischen Nukleosomen (Luger et al., 1997) reduziert, was ein zugänglicheres Substrat für Transaktivatoren (Lee et al., 1993; Vettese-Dadey et al., 1996) und für die Transkriptionsmaschinerie generell (Ura et al., 1997) schafft. Außerdem stellte man bei bereits beschriebenen Transkriptionsfaktoren fest, dass sie fähig sind, Histone in Nukleosomen zu acetylieren und damit eine Histonacetyltransferase(=HAT)Aktivität besitzen (Kuo et al., 1996; Mizzen et al., 1996; Candau et al., 1997; Pennisi, 1997).

Einer dieser Faktoren ist Gcn5. Bei diesem ursprünglich als Transkriptionsaktivator identifizierten Enzym (Berger et al., 1992; Georgakopoulos and Thireos, 1992; Marcus et al., 1994) stellte Brownell 1996 HAT-Aktivität fest und sorgte so erstmals für eine direkte Verbindung zwischen der Aktivierung der Transkription und der Acetylierung von Histonen (Brownell et al., 1996). Man zählt Gcn5 zu den Typ A Histonacetyltransferasen. Diese haben ihren Wirkort im Kern und sind an chromosomalen Histonen aktiv. Im Gegensatz dazu kommen die Typ B HATs im Zytoplasma der Zelle vor und sorgen hauptsächlich für die Acetylierung von neusynthetisierten Histonen, bevor diese mit neu replizierter DNA in Chromatin zusammengebaut werden. Rekombinantes Gcn5 acetyliert *in vitro* Lysine in den Histonen H3 (Lysin 14) und H4 (Lysin 8 und 16), und es wurde gezeigt, dass diese HAT Aktivität benötigt wird für die Stimulation der Transkription durch Gcn5 (Kuo et al., 1998).

Nachdem man festgestellt hatte, dass rekombinantes Gcn5 zwar freie Histone, aber nicht Histone im Zusammenhang mit Nukleosomen acetylieren kann, folgerte man daraus, dass zusätzlich andere Faktoren für die Acetylierung durch Gcn5 benötigt werden (Kuo et al., 1996; Yang et al., 1996). Untersuchungen der natürlichen Form von Gcn5 führten zu der Erkenntnis, dass Gcn5 in mindestens 2 großen Proteinkomplexen, nämlich Ada und SAGA vorkommt (Grant et al., 1997; Pollard und Peterson 1997; Saleh et al., 1998). Bei Ada handelt es sich um den sogenannten Adapter Komplex, in dem Gcn5 zusammen mit den Faktoren Ada2 und Ada3 die Aktivierung durch bestimmte Transkriptionsaktivatoren vermittelt (Berger et al., 1992; Marcus et al., 1994). Und auch für den SAGA Komplex, so genannt wegen seiner Bestandteile Spt und Ada Proteinen, Gcn5 und Acetyltransferase-Aktivität (Grant et al., 1997), konnte gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle bei der Initiation der Transkription spielt.

Der zweite Mechanismus, der den Zugang von Transkriptionsaktivatoren an die DNA ermöglicht, ist die Umformung des Chromatins (chromatin remodelling) über einen ATP-abhängigen Vorgang. Dabei verschieben sich Proteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten entlang der DNA und destabilisieren unter Energiegewinnung aus der Hydrolyse von ATP die Interaktion zwischen Histonen und DNA. Wie man aus konservierten NTP-bindenden Motiven dieser Faktoren schließen kann, entspricht die Bewegung dieser Proteine wahrscheinlich der ATP-abhängigen Translokation von Helikasen (Pazin und Kadonaga, 1997). Die dabei stattfindende Disruption der Nukleosomen verändert den Weg und die Länge der DNA, die sich um das Histonoktamer windet (Côté et al., 1998; Bazett-Jones et al., 1999). Man konnte zeigen, dass dabei eine Bewegung von Histonen entlang der DNA *in cis* (Whitehouse et al., 1999) und *in trans* (Owen-Hughes et al., 1996; Lorch et al., 1999;

Phelan et al., 2000) katalysiert wird. Die dadurch geschaffenen nukleosomfreien Regionen zeigen eine gesteigerte Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und Restriktionsenzyme (Côté et al., 1994; Kwon et al., 1994; Logie und Peterson, 1997; Logie et al., 1999).

Einer dieser Chromatinremodellingkomplexe ist Swi-Snf in Hefe, ein 2 MDa großer, stark konservierter Komplex aus 11 Untereinheiten, der die Konformation von Nukleosomen und deren Position ändert (Armstrong et al., 1998; Workman und Kingston, 1998; Kingston und Narlikar, 1999; Muchardt und Yaniv, 1999; Peterson und Workman, 2000; Vignali et al., 2000). *SWI* steht für das englische switching und bezieht sich auf den Wechsel des Paarungstyps (mating-type switching). *SNF* ist eine Abkürzung für das englische sucose non fermenting. Ursprünglich wurde der Komplex auf der Suche nach Genen, die für die Expression von *HO* (Stern et al., 1984) und von *SUC2* (Neigeborn und Carlson, 1984) benötigt werden, in Hefe identifiziert. Bei näherer Untersuchung fand man heraus, dass eines der *SWI* Gene, das *SWI2*, identisch mit einem der *SNF* Gene ist, dem *SNF2*, und seitdem bezieht man sich bei diesem Gen auf *SWI2/SNF2*. Dieses kodiert die Swi2/Snf2 Untereinheit des Proteinkomplexes und stellt eine hochkonservierte DNA abhängige ATPase dar (Laurent et al., 1993).

Um Veränderungen der Konformation der DNA, die sich durch die beschriebenen Mechanismen hervorrufen lässt, sichtbar zu machen, kann man DNase I Spaltungen intakter Hefekerne durchführen und anschließend die Lokalisation der Nukleasespaltungen durch indirekte Endmarkierung darstellen. DNase I ist ein Enzym, das die DNA bevorzugt in Chromatinbereichen schneidet, in denen diese besonders exponiert ist. Vor allem Regionen, die nicht durch Nukleosomen bedeckt werden, sind für das Enzym gut zugänglich und werden daher auch als „nuclease-hypersensitive“ Stellen bezeichnet (Elgin 1981, 1984). Verändert sich durch Disruption der Nukleosomen die Zugänglichkeit der DNA für das Spaltungsenzym, so ändert sich auch das Muster der DNase I Spaltung (Côté et al., 1994; Logie und Peterson, 1997; Utley et al., 1997, Logie et al., 1999). Bei der indirekten Endmarkierung wird ein Ende des Fragments durch Spaltung der hypersensitiven Stelle mit DNase I erzeugt und das andere Ende durch Spaltung mit einem Restriktionsenzym. Anschließend kann über gelelektrophoretische Auftrennung, Übertragung auf eine Nylonmembran und radioaktive Markierung der DNA die Lage der hypersensitiven Regionen dargestellt werden.

Almer und Hörz konnten 1986 durch Anwendung dieser Methode am *PHO5* Genort in *Saccharomyces cerevisiae* unterschiedliche Muster in der Anordnung der Nukleosomen zeigen, je nachdem ob das Gen induziert oder reprimiert ist (Almer et al., 1986; Almer und

Hörz, 1986). Unter reprimierten Bedingungen ist der *PHO5* Promotor in einer lokalisierten Ordnung von Nukleosomen verpackt. Nur eine kurze Strecke von 80 Basenpaaren, etwa 370 bp stromaufwärts des ATG Initiationskodons, ist nukleosomenfrei. Diese ungeschützte Region stellt eine hypersensitive Stelle für Nukleasen dar. Durch eine Induktion der Transkription von *PHO5* durch einen Mangel an Phosphat kann man beobachten, dass vier Nukleosomen am *PHO5* Promotor entfernt werden und eine 600 bp lange nukleosomenfreie Region hinterlassen.

Auch die Abhängigkeit von den zuvor beschriebenen Mechanismen bei der Initiation der Transkription wurde am *PHO5* Genort untersucht. Es zeigte sich *in vivo*, dass bei Abwesenheit der Gcn5 HAT Aktivität das gesamte Remodelling des Chromatins am *PHO5* Promotor in Hefe unter maximal induzierten Bedingungen verlangsamt wird (Gregory et al., 1998b; Barbaric et al., 2001). Ebenso hat eine Deletion des *SNF2* Gens, die die Funktion von Swi/Snf ausschaltet, einen kinetschen Effekt auf die Aktivierung von *PHO5* und auf die Chromatindisruption am *PHO5* Promotor (Neef und Klädde, 2003). Die Transkription des *PHO5* Gens zeigt demnach eine deutliche Abhängigkeit von Gcn5 und Swi-Snf.

Das *PHO5* Gen ist ein Teil der Phosphatasegenfamilie, die ein ideales Modell für die Untersuchung der Genexpression in Hefe darstellt. Basierend auf den Pionierstudien von Oshima und Kollegen (Oshima, 1982), sorgte das PHO System für zahlreiche Erkenntnisse bei der Untersuchung der Signaltransduktion, Regulation der Transkription und der Funktion der Chromatinstruktur. Ein Mangel an Phosphat in der Hefe *S.cerevisiae* führt zu einer mindestens 50fach erhöhten Produktion von sezernierter saurer Phosphatase, die aus drei Isoenzymen besteht, die von den *PHO5*, *PHO10* und *PHO11* Genen produziert werden. Mehr als 90% der sauren Phosphataseaktivität wird durch das *PHO5* Genprodukt zur Verfügung gestellt, weshalb sich Experimente auf seine Regulation konzentriert haben. Es ist das am besten untersuchte strukturelle Gen im Phosphatase System.

Das *PHO3* Gen, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt, ist der chromosomale Nachbar von *PHO5*. Beide wurden geklont und sequenziert und zeigen große Homologien sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene (Bajwa et al., 1984). Das *PHO3* Gen kodiert für eine saure Phosphatase mit einem Molekulargewicht von 140 000 (Iwashima et al., 1979). Dieses ist ein kleines, extrazellulär im periplasmatischen Raum lokalisiertes Glykoprotein (Iwashima und Nishimura, 1979). Es besitzt Thiaminbindungs- und Hydrolaseaktivität (Iwashima et al., 1979) und seine Funktion besteht in der Hydrolyse von Thiaminphosphat zu Thiamin bevor dieses in die Zellen aufgenommen wird (Nosaka et al., 1989). Die Expression

des *PHO3* Gens kann sowohl durch einen Thiaminmangel (Schweingruber et al., 1986, Iwashima und Nose, 1976) als auch durch die regulatorischen Gene *PHO6* (THI2) und *PHO7* (THI3) (Toh-e et al, 1975; Nishimura et al., 1992) induziert werden. Reprimiert wird es durch Thiamin, Hda1, Rpd3 (Rundlett et al., 1998) und Methylmethansulfonat (Jelinsky und Samson, 1999).

.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit folgenden Fragen:

- A) Hängt die Regulation der Transkription des *PHO3* Gens durch dessen Promotor von den Transkriptionsfaktoren Gcr1, Pho6, Gcn5 und Swi-Snf ab?
- B) Inwieweit verändert sich die Chromatinstruktur des *PHO3*-Promotors im aktivierten und reprimierten Zustand?

2 Ergebnisse

2.1 Vektorklonierung zur Aktivitätsmessung des *PHO3* – Promotors

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, einen Vektor zu klonieren, mit dem die Aktivität des *PHO3* Promotors in Hefe bestimmt werden konnte. Dieser Vektor sollte nach seiner Fertigstellung in verschiedene Hefestämme transformiert werden und anschließend sollten unter wechselnden Bedingungen Aktivitätsmessungen durchgeführt werden. Aus diesen Ergebnissen sollten sich dann Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der Funktion des Promotors von bestimmten Faktoren ziehen lassen. Der Vektor musste also so konstruiert werden, dass er sowohl die *PHO3*-Promotor Region als auch ein Reporterogen zur Aktivitätsbestimmung enthielt.

Generell versteht man unter Vektoren Trägermoleküle für DNA-Sequenzen. Man verwendet in der Molekularbiologie neben viralen Genomen häufig Plasmide. Dabei handelt es sich um doppelsträngige, ringförmige DNA-Moleküle, die in einer Größe zwischen einigen tausend bis etwa hunderttausend Basenpaaren vorkommen. Sie sind fakultativ sowohl in Bakterien als auch einigen niederen Eukaryoten wie Hefen vorhanden. Dort liegen sie außerhalb des bakteriellen Hauptchromosoms vor und können sich autonom, d.h. unabhängig von der Wirtszelle vermehren. Für ihre Vervielfältigung besitzen sie einen Replikationsstartpunkt, also eine spezifische DNA – Sequenz aus 50 – 100 Basenpaaren, an welche die Enzyme der Zelle binden und mit der Synthese des komplementären Stranges beginnen können. So werden Kopien der DNA-Moleküle gebildet, die an die Tochterzellen weitergegeben werden und dafür sorgen, dass alle Nachkommen dieses Plasmid besitzen.

Um nach der Vermehrung der Wirtszellen sicherzustellen, dass diese das gewünschte Plasmid auch wirklich besitzen, benötigt der Vektor weitere Eigenschaften, die eine Selektion des gesuchten Klons ermöglichen. Plasmide können generell Gene für den Abbau bestimmter Substrate, für Resistenzen gegenüber Antibiotika oder Schwermetallionen oder für die Produktion von Toxinen enthalten. Speziell die Resistenzgene verleihen den Bakterien die Fähigkeit, in normalerweise tödlichen Konzentrationen von Antibiotika wie Chloramphenicol oder Ampicillin zu überleben. Im Labor nutzt man diesen Wachstumsvorteil als Marker für die gesuchten Klone. Beispielsweise kann man so durch Anzucht von gentechnisch veränderten Organismen auf ampicillinhaltigen Nährboden sichergehen, dass

nur diejenigen Bakterienkulturen dort wachsen, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen haben.

Zusätzlich zu diesen grundlegenden Eigenschaften benötigt der Vektor zusätzlich ein Reportergen zur Aktivitätsbestimmung des Promotors. Diese Gene werden mit stromaufwärts gelegenen Regulationssequenzen des klonierten Gens verknüpft und entsprechen diesem in ihrem Expressionsmuster. Meist exprimieren sie Enzyme, deren Substratumsatz leicht bestimmbar ist und ersetzen damit eine quantitative mRNA – Messung. Häufig verwendete Beispiele sind das CAT-Gen, das das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert oder das auch hier eingesetzte LacZ-Gen. Dessen Genprodukt ist das zuckerspaltende Enzym β -Galaktosidase, das u.a. o-Nitrophenylgalactosid hydrolysiert. Das dabei entstehende Produkt kann durch photometrische Messung quantitativ bestimmt werden. Da dieses Enzym in *Saccharomyces cerevisiae*, wie in den meisten Eukaryoten nicht vorkommt, ist der so gemessene Substratumsatz nicht von endogener Expression überlagert.

Ein Beispiel für einen häufig verwendeten Vektor ist pUC19. Er hat eine Größe von 2686 bp und ist damit für Klonierungen gut zu handhaben. Als Selektionsmarker trägt er das Ampicillinogen, als Reportergen das LacZ-Gen und um den Einbau fremder DNA möglichst einfach zu machen besitzt er wie viele Vektoren eine sogenannte Polyklonierungsstelle oder Multiple Cloning Site (MCS). Diese besteht aus einer Basensequenz, in der hintereinander die Schnittstellen häufig verwendeter Restriktionsendonucleasen eingefügt sind. Somit bestehen zahlreiche Möglichkeiten den Vektor aufzuschneiden und in diese Stellen mittels Insertion und Ligierung DNA-Stücke mit denselben Spaltstellen einzufügen.

Zur Herstellung des geplanten Konstrukts wurde im ersten Schritt das Plasmid pDo3 verwendet. Dieser 5,7 kbp große Vektor war durch Einbau eines XbaI/SacI Fragmentes aus dem Plasmid pP8Z + Trp 8692 in pUC19 unter Umänderung der NheI Spaltstelle an Position 226 in eine ApaI Spaltstelle hergestellt worden. Es erfolgte eine Spaltung von pDo3 mit dem Restriktionsenzym BamHI (siehe Abbildung 1). Dabei entstanden zwei lineare DNA-Fragmente. Das kleinere Fragment war ein 550 bp langes herausgelöstes Teilstück, das nicht weiter benötigt wurde. Das größere Fragment mit einer Länge von 5,2 kb wurde nach entsprechender Präparation und Reinigung in den folgenden Klonierungsschritten als Vektor verwendet.

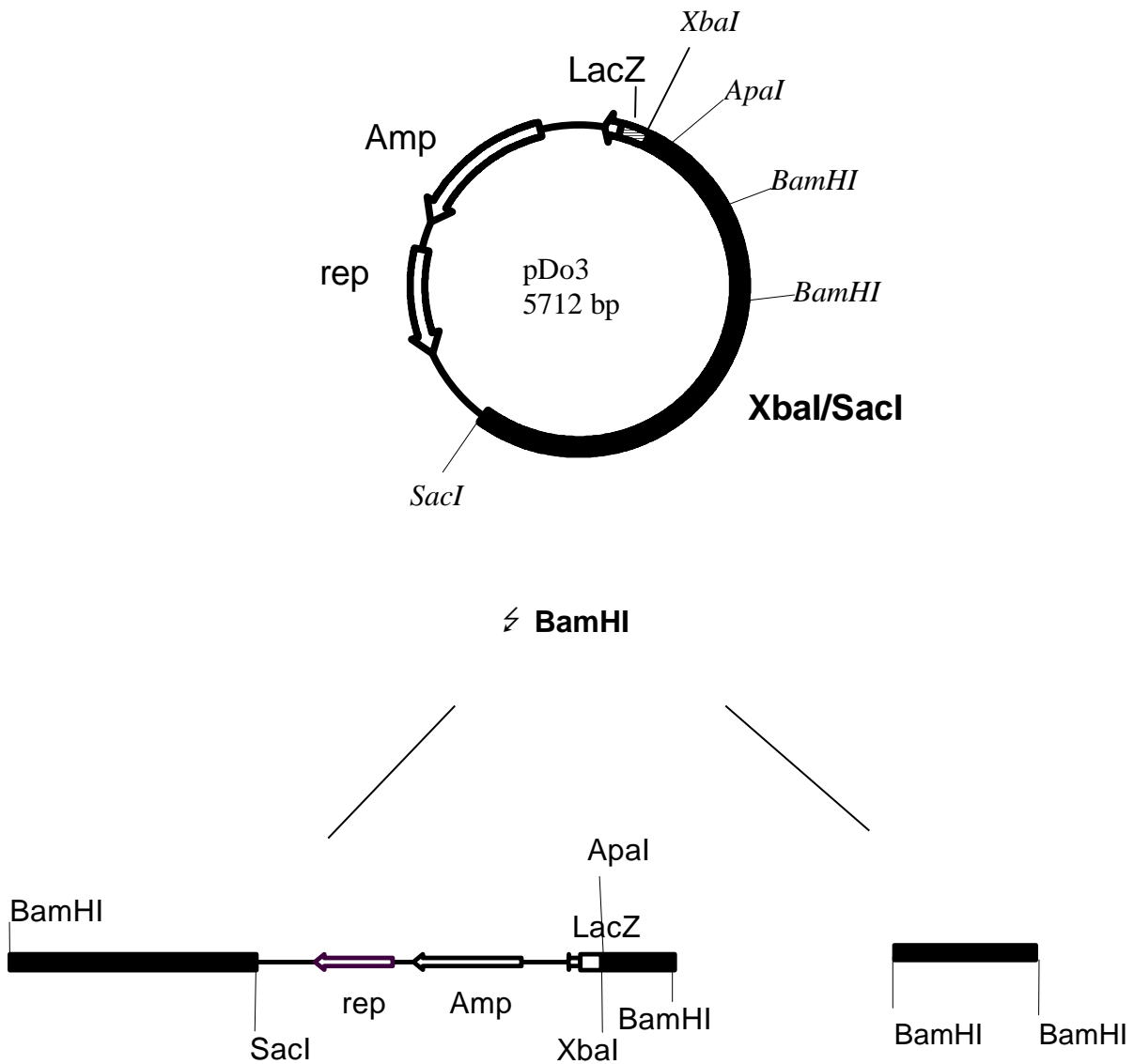


Abbildung 1: Plasmid pDo3 vor und nach Spaltung mit BamHI

Das Plasmid pDo3 besteht aus pUC19 mit einem XbaI/SacI Fragment aus pP8Z + Trp und einer eingebauten ApaI-Spaltstelle an Position 226. Es hat eine Größe von 5712 bp und enthält einen Replikationsursprung (rep), das Ampicillinen (Amp) und als Reportergen LacZ.

Nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym BamHI entstanden 2 Fragmente. Das eine hat eine Größe von 5162 bp und wurde für die folgenden Schritte weiterverwendet, das andere ist ein herausgelöstes 550 bp großes BamHI-Fragment.

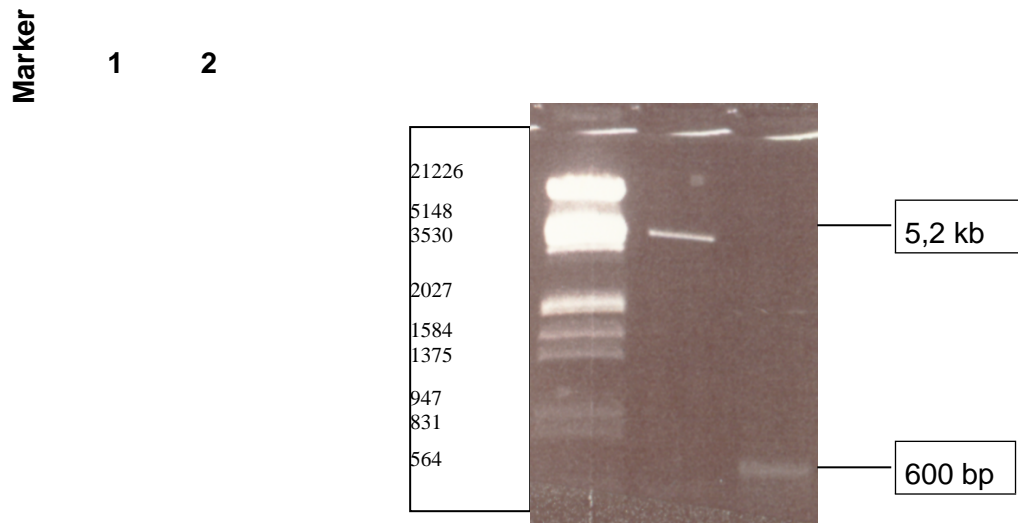


Abbildung 2: Probegel des Vektors und des *PHO3* Promotor
BamHI Spaltung

Auf dem Probegel sieht man in Bahn eins das 5162 bp la
Spaltung von pDo3 mit BamHI entstanden war und
Klonierungsschritten als Vektor verwendet wurde.

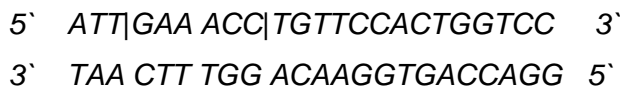
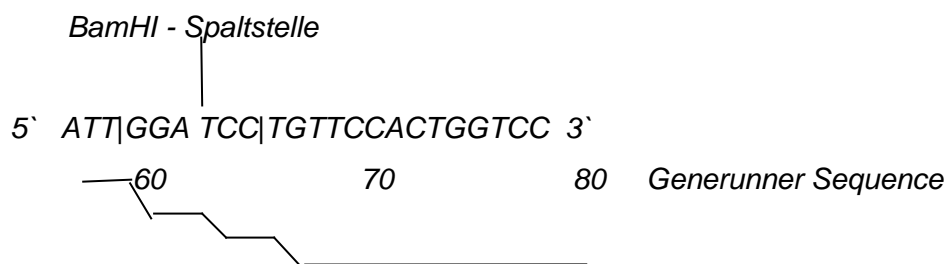
In Bahn zwei sieht man das 600 bp große PCR Produkt nach
Als Größenstandard diente λ -DNA, die mit HindIII und EcoRV

Nach der enzymatischen Spaltung mit BamHI wurde der Spaltansatz mit Alkohol gefällt und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, dass an den Enden der DNA die Phosphatgruppen entfernt und damit eine spontane Religierung der beiden BamHI Enden des Vektors verhindert. Anschließend wurde der lineare Vektor auf ein präparatives Gel aufgetragen, die gewünschten Banden ausgeschnitten und aus dem Gel isoliert. Damit erhielt man einen gereinigten Vektor, der sich für die Weiterverwendung eignete.

In diesen Vektor sollte nun der *PHO3* Promotor integriert werden. Zu diesem Zweck musste dieser mittels PCR vervielfältigt werden. PCR steht für Polymerase-Ketten-Reaktion und ist eine Methode zur Vermehrung spezifischer DNA Sequenzen. Dabei wird zunächst die doppelsträngige Ausgangs-DNA durch Erhitzen in zwei Einzelstränge denaturiert. An diese

können nun sogenannte Primer binden. Dabei handelt es sich um komplementäre Oligonukleotide mit einer Länge von 15 – 25 bp. Nach Bindung der Primer verlängert die Taq – Polymerase, ein hitzeresistentes Enzym, unter Verwendung von überschüssigen Nucleosidtriphosphaten die DNA-Sequenz. Nach Beendigung der Synthese beginnt durch erneutes Erhitzen ein weiterer Zyklus. Durch eine genügend hohe Anzahl an Wiederholungen wird dadurch exponentiell die gesuchte DNA vervielfältigt (Saiki et al., 1988).

PHO3 Promotor Forward Primer:



PHO3 Promotor Reverse Primer:

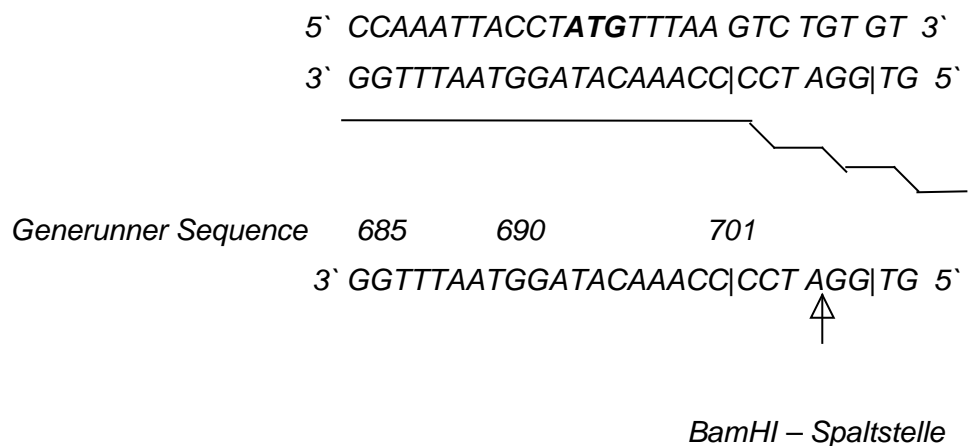


Abbildung 3: Primer für die Synthese des *PHO3* Promotors

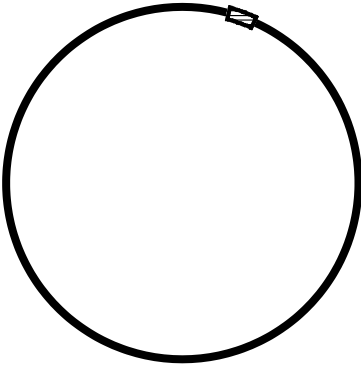
Der *PHO3* Promotor Forward Primer besteht aus 24 Nucleotiden. Er enthält eine konstruierte BamHI Spaltstelle, die einen späteren Einbau in den verwendeten Vektor ermöglichen sollte.

Der *PHO3* Promotor Reverse Primer besteht aus 27 Nucleotiden. Auch dieser Primer enthält eine BamHI Spaltstelle, um eine spätere Ligierung mit dem konstruierten Vektor möglich zu machen. Das fett hervorgehobene ATG Initiationskodon entspricht dem Beginn der *PHO3* Gens

Die beiden Primer wurden so konstruiert, dass sie jeweils eine BamHI – Spaltstelle enthielten (siehe Abbildung 3) und daher so mit dem Vektor ligiert werden konnten. Bei der Synthese der DNA-Sequenz mittels PCR entstand ein 600 bp langes Fragment. Dieses wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und mittels Alkoholfällung gereinigt. Zur Überprüfung des Ergebnisses und zur Abschätzung der erhaltenen DNA-Menge wurde ein Ethidiumbromidprobegal des PCR Produkts und des Vektors angefertigt (siehe Abbildung 2). Anschließend wurde das *PHO3* Promotor Fragment mit dem Vektor mittels einer DNA-Ligase zusammengefügt. Die verwendete T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen an dsDNA-Fragmenten. Die Enden der Teilstücke müssen jeweils komplementär zusammenpassen. Dabei können diese entweder glatt oder wie in unserem Fall mit Basenüberhang durchtrennt sein.

Im nächsten Schritt wurde der Ligierungsansatz in *Escherichia coli* transformiert. Dieses Bakterium wird bereits seit den 40-iger Jahren des letzten Jahrhunderts bei genetischen Experimenten verwendet. Da es sich leicht kultivieren lässt und sich mit einer Zellteilung pro 20 Minuten rasch vermehrt, ist es für Laborzwecke gut geeignet. Damit die Plasmide von *E.coli* erfolgreich aufgenommen werden konnten, mussten die Zellwände permeabel gemacht werden. Dies geschieht durch CaCl_2 und führt zu sogenannten kompetenten Zellen. Dabei beeinflusst die Behandlung durch CaCl_2 die Bindung der DNA an die Zellwand und eine nachfolgende kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42°C führt zur Aufnahme des Vektors. Anschließend wurden die Bakterien auf ampicillinhaltigen Platten angezogen, wodurch eine Selektion der plasmidhaltigen Klone erreicht wird (s.o.). Bei der Transformation ergibt 1 ng DNA eines ringförmigen Plasmids ca. 10^3 - 10^4 Kolonien (Guarente, 1983). Da bei der Ligierung von DNA-Fragmenten etwa 1% ringförmige DNA entsteht, führt eine Ligierung mit 1 ng DNA zu ca. 10 Bakterienkolonien. Eine Kolonie bezeichnet dabei genetisch identische Zellen, die durch Zellteilung aus einer einzigen Ursprungszelle hervorgegangen sind.

Bei der Ligierung des 5.2 kb großen Vektors und des 600 bp großen *PHO3* Promotor Fragments mit nachfolgender Transformation und Ampicillinselektion wuchsen 220 Einzelkolonien. Davon wurden 10 steril von der Transformationsplatte gepickt, in Flüssigmedium angezogen und die inkorporierten Plasmide durch eine DNA-Minipräparation nach Birnboim und Doly (1979) aus den Bakterien isoliert. Mit der gereinigten DNA erfolgten



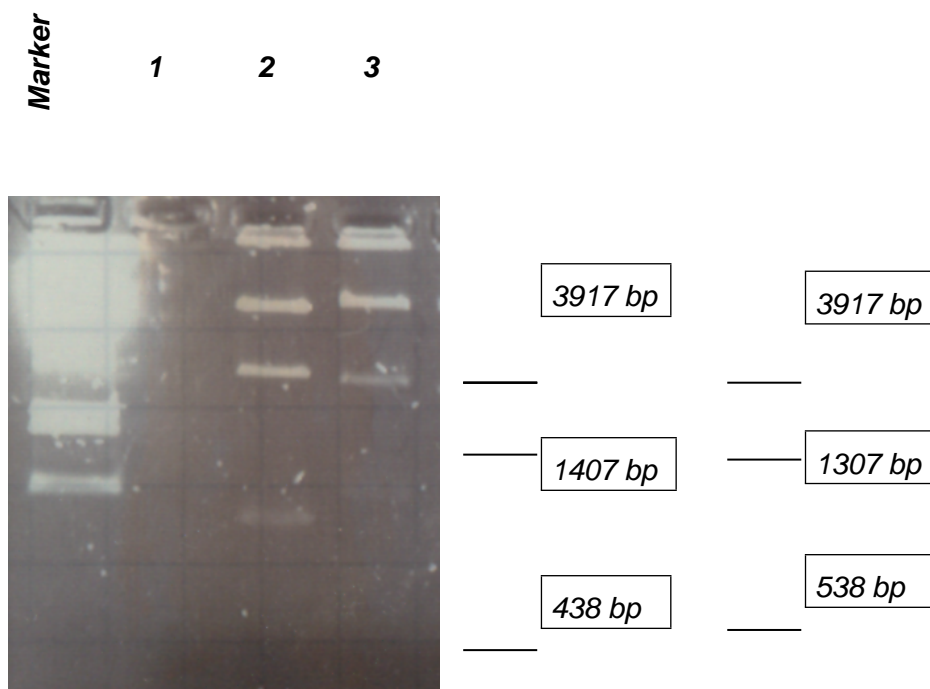


Abbildung 5: Vektor pDo3 mit BamHI Insert nach Spaltung mit EcoRV

Durch die Spaltung des Vektors mit EcoRV sieht man auf Bahn 2 drei Teilstücke mit einer Größe von 3917 bp, 1407 bp und 438 bp und auf Bahn drei drei Teilstücke mit einer Länge von 3917 bp, 1307 bp und 538 bp. Damit ist auf Bahn 2 der Vektor, der das inserierte Fragment in der richtigen Orientierung enthält.

Im nächsten Schritt wurden sowohl das gefundene Plasmid, als auch der Vektor pP8Z.LEU mit den Restriktionsenzymen Apal und SacI gespalten und die entstehenden Fragmente ligiert. Bei pP8Z.LEU handelt es sich um einen etwa 10 kb großen Hefevektor. Als Reporter gen trägt er das LacZ-Gen, dessen Aktivität sich nach Ligierung unter der Kontrolle des *PHO3* Promotors befand. Als Selektionsmarker enthält pP8Z.LEU das LEU2 Gen, welches das Wachstum der Zellen in Selektionsmedium ermöglicht, dem die Aminosäure Leucin fehlt. Bei der Ligierung wuchsen 120 Kolonien, von denen wurden 6 angeimpft. Anschließend wurde die DNA isoliert und durch Probespaltungen mit Apal und SacI bzw. Apal, SacI und BamHI überprüft. Diese ergaben, dass alle sechs Kolonien den gewünschten Vektor enthielten. Dieser wird im folgenden als pP3Z.Leu bezeichnet.

2.2 Fragmentklonierung für *PHO6* Disruption in *Escherichia coli*

Nachdem der Vektor fertiggestellt worden war, standen die verschiedenen Hefehintergründe im Vordergrund, in denen die Aktivitätsmessungen stattfinden sollten. Einige der benötigten Stämme waren bereits am Institut erstellt oder von Kollegen freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden (siehe Kapitel Materialien und Methoden). Der *pho6*-Disruptionsstamm sollte über den sogenannten „Ein-Schritt“ – Genaustausch im Hefegenom synthetisiert werden. Bei dieser Methode wird ein lineares DNA-Fragment kloniert, das an beiden Enden von Sequenzen flankiert wird, die der genomischen DNA im Bereich der Zielregion entsprechen. An diesen Enden kann dann, nachdem das Fragment in den Wildtyp Hefestamm eingebracht worden ist, eine homologe Paarung der chromosomalen Zielsequenz und der eingebrachten linearen DNA stattfinden. Es folgt ein doppeltes Rekombinationsereignis mit Austausch der Sequenzen. Diese Veränderung wird im Anschluss stabil bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen weitervererbt.

Ein Ziel war also die Disruption bzw. Inaktivierung des *PHO6* Gens. In der Literatur war bereits beschrieben worden, dass die Transkription des *PHO3* Gens abhängig von der Anwesenheit des *PHO6* Genprodukts ist (Toh-e et al., 1975; Nishimura et al., 1992). Dies sollte nochmals verifiziert werden. Zu diesem Zweck sollte ein Fragment kloniert werden, das zum einen die ursprüngliche Sequenz des *PHO6* Gens und zum anderen das *URA3*-Gen enthielt (Abbildung 6). Dabei sollte das *URA3*-Gen so in die *PHO6* Sequenz eingebaut werden, dass die *PHO6* Enden ausreichend lange Flanken für die Rekombination darstellen, während das *URA3*-Gen sowohl für die Ausschaltung der Funktionsfähigkeit des *PHO6* Gens sorgt, als auch die Selektion der gesuchten Kolonien sicherstellt.

Das *URA3*-Gen kodiert die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, ein Enzym, das einen Schritt im Biosyntheseweg der Pyrimidinnucleotide katalysiert. Der haploide Stamm (YS18), der als Mutterstamm für den „Ein-Schritt“ – Genaustausch diente, ist durch eine Deletion in der *URA3*-Region (*ura3Δ5*) für Uracil auxotroph, d.h. er kann nur in Gegenwart von Uracil im Wachstumsmedium überleben. Der Einbau des *URA3*-Gens durch doppelte Rekombination macht den Tochterstamm für Uracil prototroph und so positiv selektierbar.

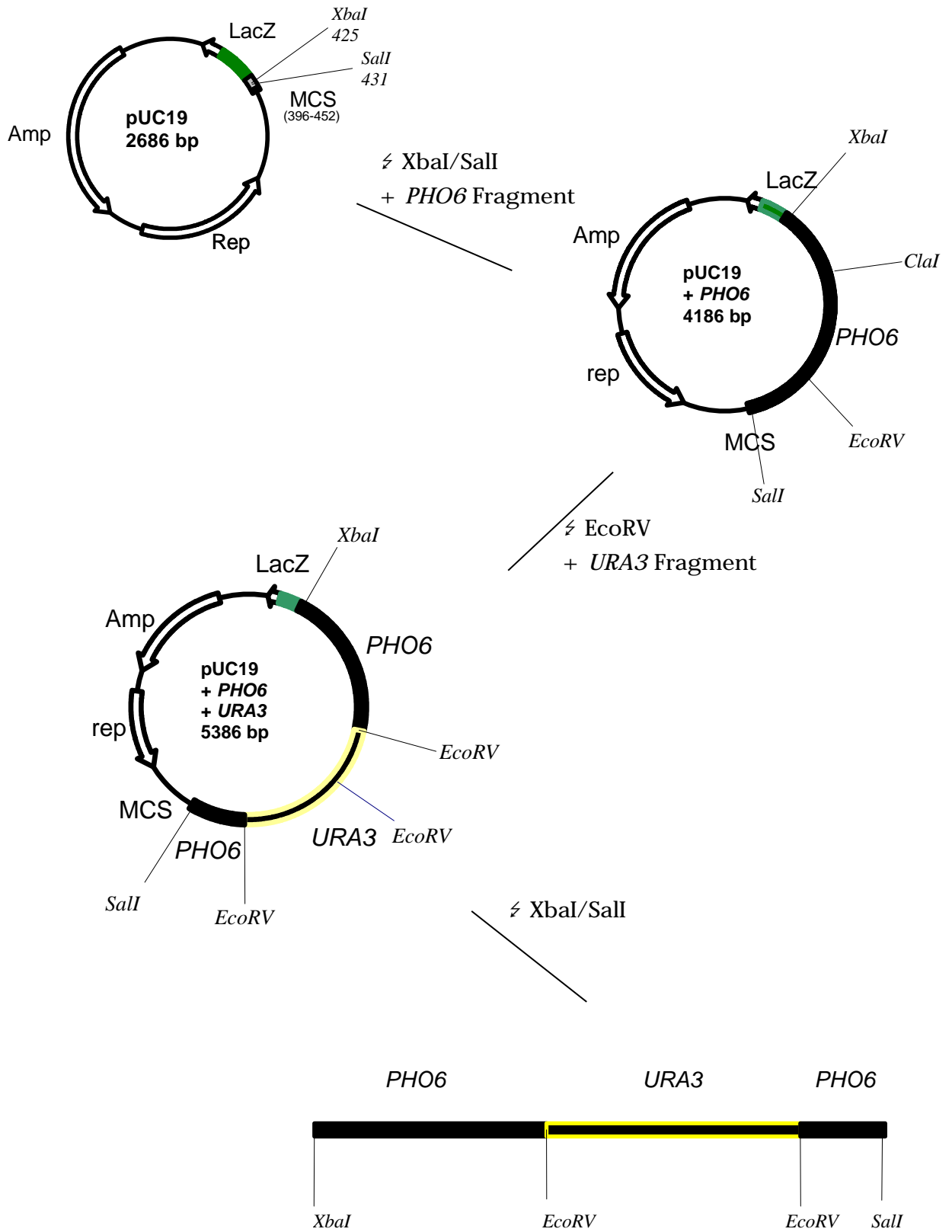
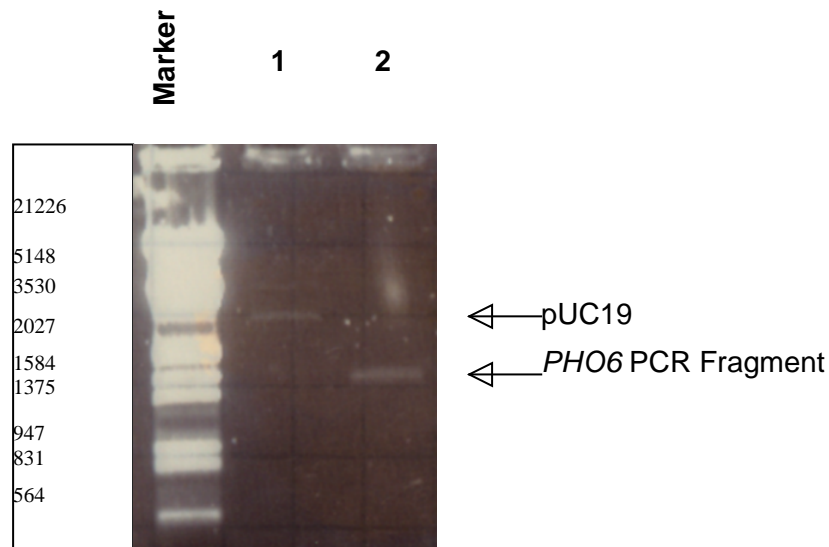


Abbildung 6: Klonierungsschritte für das *PHO6* Disruptionsfragment

Der 2,7 kb große Klonierungsvektor pUC19 wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und Sall gespalten. Anschließend wurde ein durch PCR synthetisiertes *PHO6*-Fragment mit dem Vektor ligiert und das entstandene Plasmid mit dem Restriktionsenzym EcoRV gespalten. An diese Stelle wurde das *URA3*-Gen integriert. Um das 2,7 kb lange Fragment für den „Ein-Schritt-Genaustausch“ zu erhalten, wurde abschließend eine Spaltung mit XbaI und Sall durchgeführt.

Wie bereits bei der vorherigen Klonierung wurde auch hier als Vektor das 2,7 kb lange Plasmid pUC19 verwendet. Der erste Schritt bestand in der Spaltung von pUC19 mit den Restriktionsenzymen XbaI und Sall. Da die beiden Spaltstellen sich innerhalb der Polyklonierungsstelle befinden und nur wenige Basenpaare voneinander entfernt liegen, entstand ein linearer Vektor aus dem nur ein kleines Fragment herausgetrennt worden war. Zur Reinigung wurde ein präparatives Gel angefertigt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert.

Abbildung 7: Vektor pUC19 und *PHO6* PCR Fragment

Bahn 1 zeigt den Vektor pUC19, der nach einer Spaltung mit XbaI und Sall und anschließender Reinigung auf einer Höhe von 2,7 kb lief. Auf Bahn 2 lief das 1,5 kb große *PHO6* PCR Fragment nach Spaltung mit XbaI und Sall und anschließender Reinigung. Als Längenstandard wurde λ -DNA, die mit HindIII und EcoRV gespalten worden war, verwendet.

Der nächste Schritt bestand aus Synthese der Sequenz des *PHO6* Gens mittels PCR. Dazu wurden zuerst die Primer hergestellt, von denen der eine eine XbaI- und der andere eine Sall- Spaltstelle besaß. Es entstand ein 1,5 kb langes PCR Produkt. Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und Sall gespalten und auf ein Präparationsgel gegeben. Die gesuchte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde ein Probegel des *PHO6* Gens und des Vektors angefertigt, um die Menge der für die Ligierung benötigten DNA abschätzen zu können (siehe Abbildung 7).

Bei der Ligierung wuchsen auf den ampicillinhaltigen Platten 100 Kolonien. Von diesen wurden 10 angeimpft und die DNA durch eine DNA Minipräparation isoliert. Danach wurde eine Probespaltung mit den Restriktionsenzymen XbaI und Sall durchgeführt, um herauszufinden, in welchen Vektor das *PHO6* Fragment eingebaut worden war. Dabei erwies sich unter anderem Kolonie 10 als richtig. Diese wurde dann auch weiterverwendet.

Ursprünglich sollte der Vektor im Bereich des *PHO6* Gens nun mit dem Enzym ClaI gespalten werden und an diese Stelle das *URA3*-Gen eingefügt werden. Wie sich aber zeigte, ließ sich die DNA trotz einer theoretisch vorhandenen Spaltstelle nicht schneiden. Nachdem ausgeschlossen worden war, dass das Enzym funktionsunfähig war, stellte sich heraus, dass diese ClaI-Spaltstelle methyliert war und damit nicht spaltbar. Daraufhin wurde eine weitere geeignete Spaltstelle gesucht, die in der *PHO6* Sequenz nur einmal und im restlichen Vektor überhaupt nicht vorkommen sollte. Es zeigte sich eine Spaltstelle für EcoRV, die das *PHO6* Gen in zwei 400 bzw. 1100 bp lange Sequenzen unterteilt. Diese beiden Abschnitte waren auch als Flanken für die doppelte Rekombination geeignet. Um die Richtigkeit des Vektors und der gefundenen EcoRV Spaltstelle nochmals zu überprüfen, wurden mit der DNA nochmals verschiedene Probespaltungen angefertigt (siehe Abbildung 8).

Anschließend wurde der Vektor mit EcoRV gespalten. Die dabei entstandenen überhängenden Enden wurden durch einen Bestandteil der Polymerase I, dem Klenow-Fragment, durch zugegebene Nukleotide aufgefüllt. Die DNA Polymerase I ist ein DNA-abhängiges Enzym aus *E.coli*, dessen größtes Fragment nach einem limitierten Proteaseverdau das Klenowenzym darstellt. Das Klenowenzym, das keine 5'-3' Exonukleaseaktivität mehr aufweist, knüpft an das 3'-Ende Mononukleotide an, die zum überhängenden 5'-Ende komplementär sind. Dadurch entsteht ein glattes Ende, welches mit einem anderen glatten Ende ligiert werden kann. Der Vektor wurde anschließend gereinigt

und mit alkalischer Phosphatase behandelt und war damit bereit für die Ligierung mit dem *URA3*-Gen.

Marker	EcoRV 4,1kb	ClaI 4,1 kb	Sall/XbaI 2,7/1,5kb	ClaI/XbaI 4,1 kb	EcoRV/XbaI 1,1/ 3,0 kb	4 ungespalten
--------	----------------	----------------	------------------------	---------------------	---------------------------	------------------

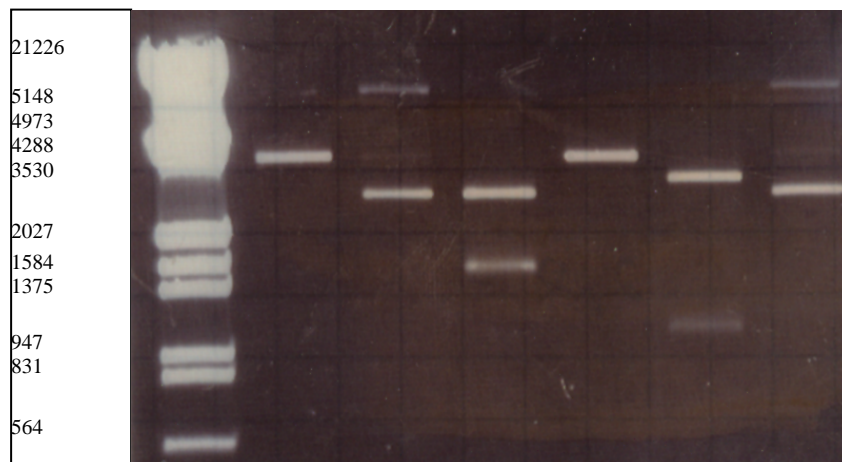


Abbildung 8: Verschiedene Spaltungen des Plasmids „Nr.10“ (pUC19 + *PHO6*)

Die Spaltung mit EcoRV in Bahn 1 ergab ein 4,1 kb großes DNA – Fragment. In Bahn 2 und 6 lief das Plasmid ungespalten, da das in 2 zugegebene ClaI durch eine methylierte Spaltstelle nicht funktionierte. In Bahn 3 führte eine Spaltung mit XbaI und Sall zu zwei Fragmenten mit einer Größe von 2,7 kb und 1,5 kb. In Bahn 4 lief ein 4,1 kb großer Vektor nach Spaltung mit XbaI und dem nicht funktionierendem ClaI. In Bahn 5 sieht man zwei Banden in Höhe von 1,1 kb und 3 kb nach Spaltung mit XbaI und EcoRV. Als Längenstandard wurde mit HindIII und EcoRV gesplante λ -DNA verwendet.

Um das *URA3*-Gen in die *PHO6* Sequenz zu integrieren, musste es entsprechend präpariert werden. Eine *URA3* Kasette wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten. Anschließend wurden die überhängenden Enden ebenfalls mit dem Klenowenzym aufgefüllt, so dass nun sowohl der Vektor als auch das zu integrierende Fragment glatte Enden besaßen. In der nachfolgenden Ligierung wuchsen 320 Kolonien, von denen 6 Stück angeimpft wurden. Probespaltungen der gereinigten DNA mit XbaI und Sall, mit ApaI und mit EcoRV und HindIII ergaben, dass die Kolonien 1, 4 und 5 richtig waren. Kolonie 1 wurde mit XbaI und Sall gespalten, wodurch ein 2,7 kb großes lineares Fragment entstand (siehe

Abbildung 6), welches zur doppelten Rekombination in den Hefestamm YS18 transformiert werden konnte (siehe Kapitel 2.4).

2.3 Fragmentklonierung für DNase I Analyse in *Escherichia coli*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Chromatinstruktur des *PHO3* Promotors im induzierten und reprimierten Zustand zu beurteilen. Dazu sollte eine DNase I Spaltung und indirekte Endmarkierung von präparierten Hefekernen durchgeführt werden. Diese Methode war bereits erfolgreich am *PHO5* Promotor angewandt worden (Almer et al., 1986). Da sich für die Anlagerung einer Sonde im passenden Abstand vom *PHO3* Promotor stromauf- und stromabwärts homologe Regionen des *PHO5* und des *PHO3* Gens befinden, musste ein Stamm mit eindeutig definierter Bindungsregion geschaffen werden. Dazu sollte die Disruption des *PHO5* Gens erfolgen und eine Sonde zur Hybridisierung verwendet werden, die sich stromaufwärts des *PHO5* Promotors an die Sequenz zwischen den Spaltstellen für die Restriktionsenzyme *Apal* und *BamHI* anlagert (siehe Abbildung 9).

Zu diesem Zweck sollte in den folgenden Klonierungen ein lineares Fragment konstruiert werden, das als Chimäre für den „Ein-Schritt“-Genaustausch verwendet werden konnte. Die Flanken für die homologe Rekombination waren folgendermaßen geplant: das 3`Ende sollte aus dem 550 bp langen *PHO3* Promotor bestehen und das 5`Ende aus einer 250 bp langen Sequenz, die sich 1600 bp stromaufwärts des *PHO5* Promotors zwischen den Spaltstellen *Stul* und *Clal* befindet. Zusätzlich war vorgesehen, in das Fragment ein *URA3*-Gen zur Selektion zu integrieren. Durch Rekombination sollte dann das *PHO5* Gen aus der chromosomalen Sequenz entfernt werden und das *PHO3* Gen bzw. sein Promotor in die Nähe des *Apal/BamHI* Abschnittes gebracht werden (siehe Abbildung 9 C).

Abbildung 9: „Ein-Schritt“-Genaustausch für DNase I Analyse

Abbildung 9 A: Die chromosomale *PHO5/3* Genregion

Die Abbildung zeigt rechts das *PHO3* Gen, stromaufwärts davon den *PHO3* Promotor und anschließend daran das *PHO5* Gen. Davor liegt ein Abschnitt der von den Spaltstellen *Stul* und *BamHI* begrenzt ist und daher als *Stul/BamHI* – Region bezeichnet wurde. In dieser Region befinden sich eine *Apal* und eine *Clal* Spaltstelle. Zwischen der *Apal* und der *BamHI* Spaltstelle lagert sich die Sonde an, die bei der indirekten Endmarkierung verwendet wurde.

Abbildung 9 B: *XhoI/XbaI* Fragment zum „Ein-Schritt“-Genaustausch

Das klonierte Fragment enthielt die *PHO3* Promotorregion, die als 550 bp lange Flanke am 3`Ende für die homologe Paarung verwendet wurde. Am 5`Ende diente die 250 bp lange Sequenz zwischen der *Stul* und *Clal* Spaltstelle als Flanke zur Rekombination. Dazwischen befand sich das *URA3*-Gen, dass zur Selektion der Klone im Bereich der *Clal* Spaltstelle in das Fragment integriert wurde. Da die gesamte Sequenz mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *XbaI* aus dem Vektor ausgeschnitten worden war, wurde es als *XhoI/XbaI* Fragment bezeichnet.

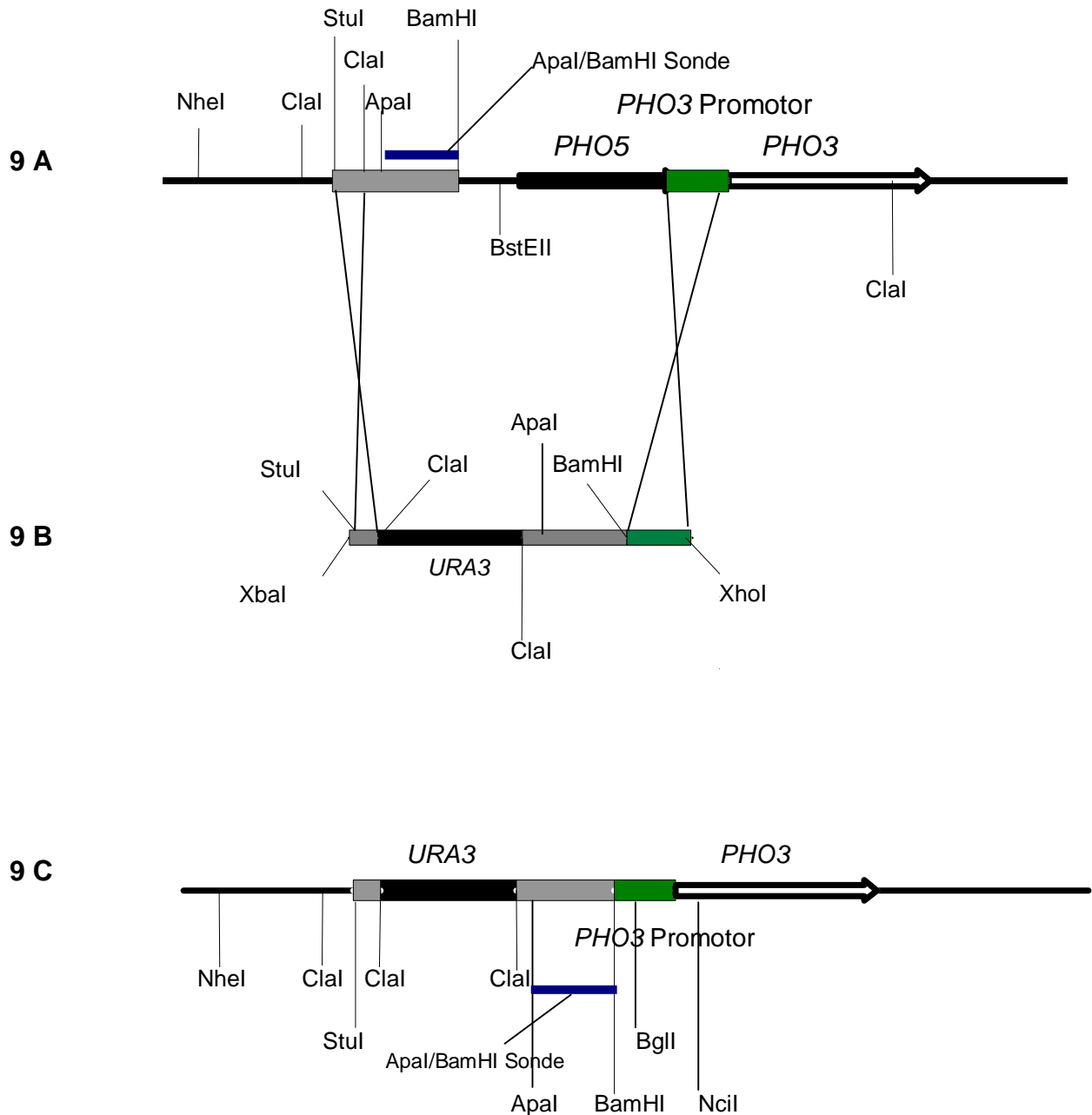


Abbildung 9 C: chromosomaler *PHO3* Genabschnitt nach Disruption

Nach dem „Ein-Schritt“-Genaustausch schloss sich an die *PHO3* Promotorregion die *Stul*/*BamHI* Region mit integriertem *URA3*-Gen an. Da sich die Sonde an den Bereich zwischen der *Apal* und *BamHI* Spaltstelle anlagerte, eignete sie sich gut zur Darstellung der *PHO3* Promotorregion

Die gekreuzten Linien zwischen den Bildern zeigen die Stellen der homologen Paarung, also die *PHO3* Promotorregion und die Sequenz zwischen den Spaltstellen *Stul* und *Clal*.

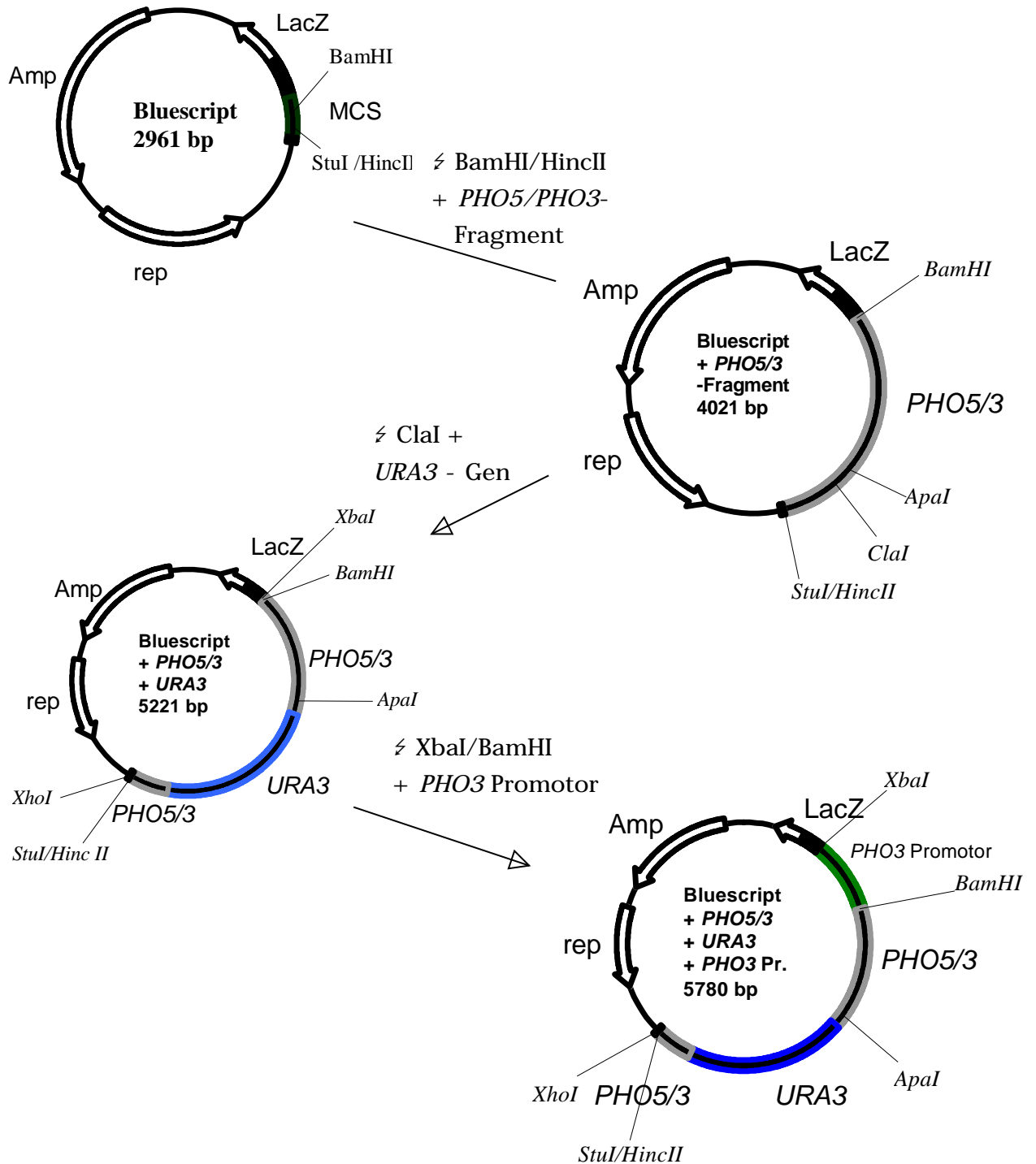


Abbildung 10: Syntheseschritte des XhoI/XbaI Fragments

Der Vektor Bluescript wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HincII gespalten und mit dem *PHO5/3*-Fragment ligiert. Es erfolgte eine Spaltung des gewonnenen Vektors mit dem Restriktionsenzym ClaI und eine Ligation mit dem *URA3*-Gen. Anschließend wurde das Produkt mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI durchtrennt und die durch PCR gewonnenen *PHO3* Promotor Sequenz integriert. Der entstandene Vektor wurde mit XhoI und XbaI gespalten, so dass das XhoI/XbaI Fragment für den „Ein-Schritt“-Genaustausch entstand (siehe auch Abbildung 9 B).

Im Labor war bereits ein Vektor mit einem sogenannten *PHO5/3* Abschnitt vorhanden, der die Sequenz zwischen der Spaltstelle für das Enzym *StuI* und dem *PHO3* Gen enthält. Um das 5`Ende des linearen Fragments zu konstruieren, wurde im ersten Schritt durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *BamHI* ein 1105 bp großes Teilstück aus der *PHO5/3* Region isoliert. Als Träger für die Klonierungen wurde der Vektor pBSK- bzw. Bluescript verwendet. Dieses 2961 bp große Plasmid enthält einen Replikationsursprung (rep), ein LacZ-Gen, eine Multiple Cloning Site (MCS) und zur Selektion das Ampicillin (siehe Abbildung 10). Neben pUC19 gehört es dank seiner Größe und seines Aufbaus zu den Standardvektoren in *E.coli*.

pBSK- wurde mit den Restriktionsnukleasen *BamHI* und *HincII* gespalten, wobei *HincII* genauso wie *StuI* glatte Enden erzeugt. Danach liefen der Vektor und das *StuI/BamHI*-Fragment auf einem präparatives Gel, die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und die DNA gereinigt. Auf einem Probegel wurde eine kleine Menge des Vektors und des *StuI/BamHI* – Fragments sichtbar gemacht, um zum einen das Ergebnis der Reinigung zu beurteilen und um zum anderen die benötigte Menge für die nachfolgende Ligierung abschätzen zu können (siehe Abbildung 11). Diese ergab 280 Kolonien von denen 8 angeimpft wurden.

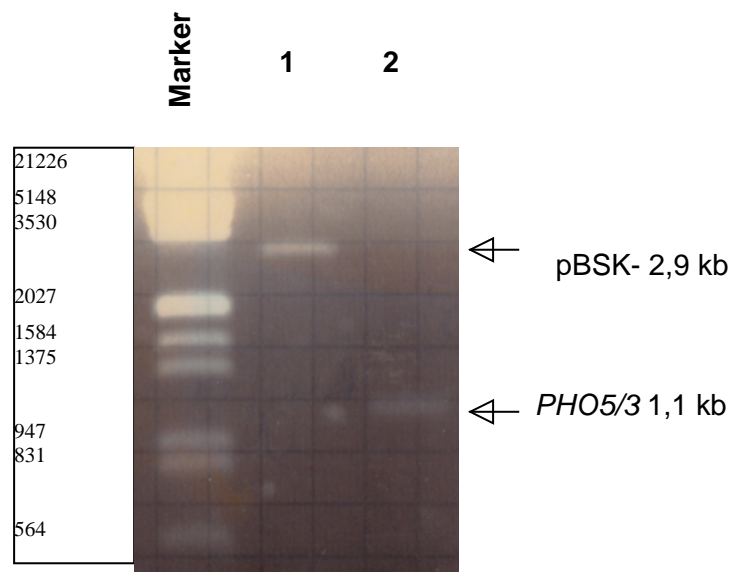


Abbildung 11: Probegel des Vektors pBSK- und *PHO5/3* Fragment

Auf Bahn 1 läuft das 1,1 kb große *StuI/BamHI* – Fragment aus *PHO5/3*.
In Bahn 2 sieht man den 2,9 kb großen Vektor Bluescript, der mit *StuI/HincII* gespalten worden war.

Als Längenstandard diente mit *HincII* und *EcoRV* gesplattene λ -DNA.

Nun wurde das Plasmid „Nummer 6“ mit dem Restriktionsenzym ClaI gespalten und die beiden überhängenden Enden durch das Klenowenzym aufgefüllt. Zusammen mit dem *URA3*-Gen, das bereits für die vorhergehenden Klonierungen fertiggestellt worden war (siehe auch Kapitel 2.2), wurde ein präparatives Gel des Plasmids angefertigt. Die gesuchten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA gereinigt. Es folgte eine Ligierung der beiden DNA Stücke, bei der 50 Kolonien wuchsen. Von diesen wurden zehn angeimpft. Probespaltungen mit XhoI und XbaI, mit ApaI und mit BamHI ergaben, dass sich in allen Kolonien das gesuchte Plasmid befand. Die Plasmid-DNA aus Kolonie Nummer 4 wurde in den weiteren Schritten verwendet.

In den Vektor sollte als nächstes die *PHO3* Promotor A Sequenz eingebaut werden. Dazu musste diese aus chromosomaler DNA mittels PCR synthetisiert werden. Der erste Schritt bestand in der Konstruktion der Primer. Der eine Primer, den wir als *PHO3* Promotor Forward Primer A bezeichneten, war 21 Nukleotide lang und enthielt am 5' Ende eine BamHI-Spaltstelle. Der andere Primer mit der Bezeichnung *PHO3* Promotor Reverse Primer A war 25 Nukleotide lang und enthielt an seinem 3' Ende eine XbaI-Spaltstelle. Die nachfolgende PCR erbrachte ein 572 bp langes Fragment des *PHO3* Promotors.

Das PCR-Fragment des *PHO3* Promotors und der Vektor „Nummer 4“ (pBSK- mit integriertem StuI/BamHI – Fragment und *URA3*-Gen) wurden mit XbaI und BamHI gespalten. Danach erfolgte die Präparation mit Auftrennung der DNA auf einem präparativem Gel, die Isolierung der Banden aus dem Gel und nachfolgende Reinigung der DNA. Bei der anschließenden Ligierung wuchsen 80 Kolonien, von denen acht angeimpft wurden. Die Probespaltungen XbaI und BamHI bzw. XhoI und XbaI ergaben, dass alle acht Kolonien das richtige Plasmid enthielten. Dieses wurde nun mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI gespalten. Dadurch entstand ein lineares Fragment, das für den „Ein-Schritt“-Genaustausch verwendet werden konnten.

2.4 Hefetransformation

Nach Fertigstellung der Klonierungen konnten die linearen Fragmente zur doppelten Rekombination in verschiedene Hefestämme eingebracht werden. Als Mutterstamm für den „Ein-Schritt“- Genaustausch wurde sowohl für die *PHO6* als auch für die *PHO5* Disruption

YS18 verwendet. Die linearen Fragmente wurden nach der Lithiumacetatmethode nach Ito et al. (1983) in die Hefezellen transformiert und auf uracilfreien Selektionsmedien ausplattiert. Die beiden Stämme werden im folgenden als *pho6*⁻ und *pho5*⁻-Disruptionsstamm bezeichnet. Zusätzlich wurde die *PHO5* Disruption in den Stämmen YS5189, CY337 und CY407 (s.u.) durchgeführt. Diese werden nachfolgend YS5189 bzw. CY337 bzw. CY407 *pho5*-Disruptionsstamm genannt.

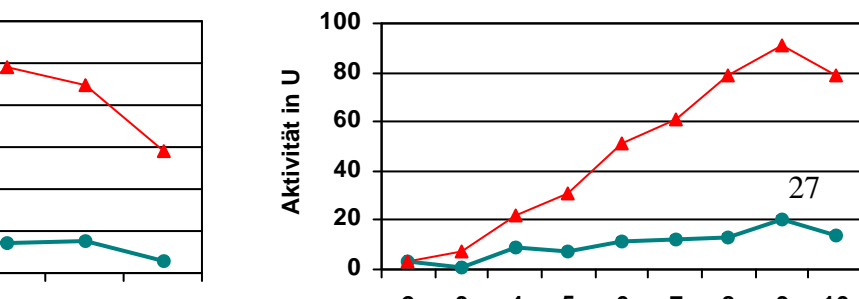
Nach derselben Methode erfolgte die Transformation des Hefepasmids pP3Z.*LEU* (siehe Kapitel 2.1) in folgende Hefestämme: YS18, YS5189, CY337, CY407, S173-6B, *gcr1*⁻, *pho6*⁻-Disruptionsstamm, YS5189 *pho5*⁻-Disruptionsstamm, CY337 *pho5*-Disruptionsstamm und CY407 *pho5*-Disruptionsstamm. Dabei handelt es sich bei YS18 um den Wildtypstamm, durch den die Thiaminreprimierbarkeit des *PHO3* Promotors quantifiziert werden sollte. YS5189 leitet sich von YS18 ab. Diesem Stamm wurde durch Disruption das Gen für die Histonacetyltransferase Gcn5 entfernt. CY337 ist der Ausgangstamm für CY407, dem das Gen für die Snf2-ATPase Untereinheit des Swi/Snf – Komplexes fehlt. Der *gcr1*⁻-Stamm leitet sich von S173-6B ab und ist durch ein Fehlen des Transkriptionsfaktors Gcr1 gekennzeichnet. Insgesamt waren nun die Stämme sowohl für die LacZ- und Phosphatasemessungen als auch für DNase I Spaltung bereit.

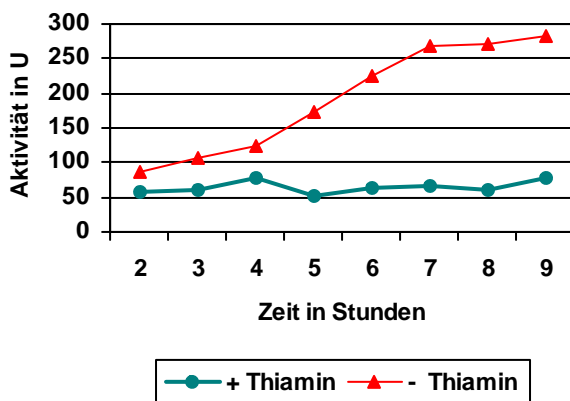
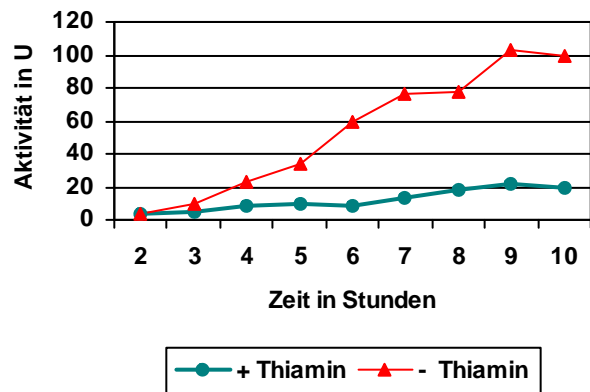
2.5 Messergebnisse

Nach Transformation des Vektors in die verschiedenen Hefestämme konnten mittels LacZ-Galactosidase und Phosphatasemessungen Aktivitätsbestimmungen des *PHO3* Promotors durchgeführt werden. Dadurch sollten sich Rückschlüsse auf die Abhängigkeit des *PHO3* Promotors von den einzelnen Faktoren ziehen lassen. Um gut wachsende Zellen zu erhalten wurden die Stämme jeweils über Nacht in thiaminreichem Medium angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in thiaminhaltigen Medium als auch in Medium ohne Thiamin angeimpft. Danach wurden im Laufe des Tages stündlich aus beiden Kulturen Proben entnommen und mit diesen sowohl Phosphatase- als auch LacZ-Messungen durchgeführt.

A) YS18 LacZ-Messung

B) YS18 Phosphatase-Messung



C) YS18 *pho5*-Disruption LacZ-MessungD) YS18 *pho5*-Disruption Phosphatase-MessungAbbildung 12 A - D: Induktion der Aktivität des *PHO3* Promotors im YS18 Stamm und YS18 *pho5*⁻ - Disruptionsstamm unter Thiaminmangelbedingungen

Der YS18 Wildtypstamm zeigte in thiaminarmem Medium einen Anstieg der Messwerte in der LacZ-Messung von ca. 150 Units nach 2 Stunden auf etwa 450 Units nach 5 Stunden. In der Phosphatase-Messung stiegen die Werte von 3 Units auf 90 Units nach 9 Stunden. Man konnte eine Aktivitätssteigerung auf das drei- bzw. das 30fache beobachten. In thiaminreichem Medium schwankten die Werte konstant um 50 Units in der LacZ-Messung und um 15 Units in der Phosphatase-Messung.

Der YS18 *pho5*-Disruptionsstamm zeigte nach 9 Stunden einen Anstieg der Werte von ca. 90 Units auf ca. 280 Units in der LacZ-Messung und von 4 Units auf 103 Units in der Phosphatase Messung. Sie erreichten damit das drei- bzw. 25-fache ihrer Ausgangswerte. Im reprimierten Zustand blieb die Aktivität in der Phosphatase Messung relativ konstant bei ca. 15 Units.

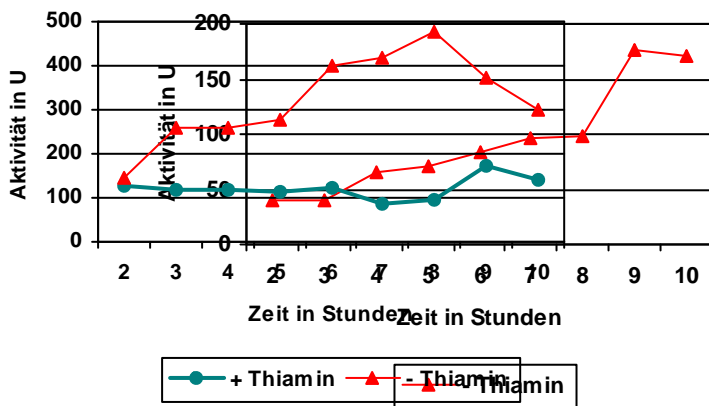
Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Datensatz von 4 (A und B), 3 (C) bzw. 2 (D) wiederholten Messungen.

Die ersten Messungen erfolgten im YS 18 Stamm. Bei Betrachtung der Ergebnisse (siehe Abbildung 12) kann man feststellen, dass die Aktivität des *PHO3* Promotors nach animpfen in thiaminarmem Medium im Zeitverlauf anstieg. Die Werte erreichten in der LacZ – Messung nach fünf Stunden ein Maximum mit dem etwa dreifachen des Ausgangswertes und in der

Phosphatase – Messung nach neun Stunden sogar das 30-fache des Anfangswertes. In thiaminreichem Medium blieben die Messwerte jeweils konstant. Der Anstieg der Werte bestätigt eine Aktivierung der Genexpression der *PHO3* Gens unter Thiaminmangel wie sie bereits von Schweingruber et al. (1986) bzw. Iwashima und Nose (1976) beschrieben worden ist. Um festzustellen, ob sich durch die Disruption des *PHO5* Gens Änderungen des Induktionsverhaltens ergeben, wurden dieselben Messungen im YS18 *pho5*–Disruptionsstamm durchgeführt. Man konnte nach neun Stunden in der LacZ-Messung das dreifache und in der Phosphatase-Messung das 25-fache des Ausgangswertes beobachten. Damit zeigte der *pho5*⁻ - Disruptionsstamm ein ähnliches Verhalten wie der Wildtypstamm und war für die anschließende Chromatinanalyse geeignet.

A) YS5189 LacZ-Messung

B) YS5189 Phosphatase-Messung



C) YS5189 *pho5* Disruption LacZ-Messung

D) YS5189 *pho5* Disruption Phosphatase-Messung

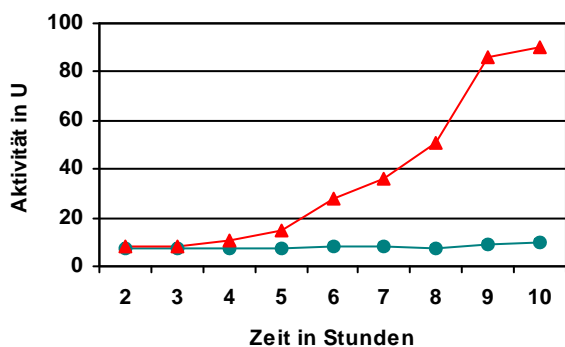
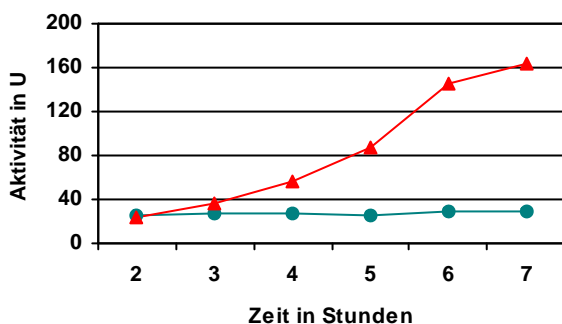


Abbildung 13 A - D: Induktion der Aktivität des *PHO3* Promotors im YS5189 Stamm und YS5189 *pho5* Disruptionsstamm unter Thiaminmangelbedingungen

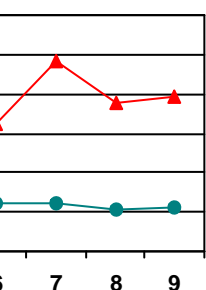
Im YS5189 Stamm stiegen die Messwerte in der LacZ-Messung nach 8 Stunden von 150 Units auf ca. 460 Units an. In der Phosphatase Messung ergaben sich Werte von etwa 40 Units nach 2 Stunden bis etwa 180 Units nach 9 Stunden. Die Aktivität stieg folglich auf das drei- bzw. vierfache an. In thiaminreichem Wachstumsmedium schwankten die Werte in der LacZ-Messung um 120 Units.

Im YS5189 *pho5*-Disruptionsstamm sah man einen Anstieg der Messwerte von ca. 25 Units auf 160 Units nach 7 Stunden in der LacZ-Messung und von etwa 8 Units auf etwa 90 Units nach 10 Stunden in der Phosphatase Messung. Man konnte also eine Aktivitätsteigerung auf das sechs- bzw. 11-fache feststellen. Unter reprimierenden Bedingungen blieben die Werte

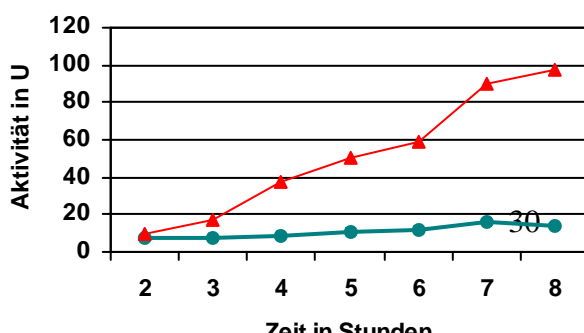
Im YS5189 Stamm (siehe Abbildung 13), dem die Histonacetyltransferase Gcn5 fehlt, zeigte der *PHO3* Promotor in der LacZ-Messung nach acht Stunden Wachstumszeit einen Anstieg der Werte auf das etwa dreifache und in der Phosphatase-Messung nach neun Stunden einen Anstieg der Werte auf das vierfache der Ausgangswerte. Im YS5189 *pho5* Disruptionsstamm zeigte sich nach sieben Stunden Wachstumszeit ein Anstieg der LacZ-Aktivität auf das etwa sechsfache und in der Phosphatase-Messung nach zehn Stunden auf etwa das 11-fache. Im reprimierten Zustand blieben die Werte jeweils konstant. Damit zeigte sich unter induzierenden Bedingungen ein ähnlicher Aktivitätsanstieg wie für YS18 beschrieben. Dies lässt darauf schließen, dass keine Abhängigkeit des *PHO3* Promotors von Gcn5 besteht.

Der CY337 Stamm, der den Ausgangsstamm für die Disruption der ATPase Untereinheit des Swi-Snf Komplexes darstellt, zeigte in der LacZ-Messung nach sieben Stunden einen dreifachen und in der Phosphatase Messung nach acht Stunden fast einen zehnfachen Anstieg der Aktivität. Der CY337 *pho5*-Disruptionsstamm erhöhte seine Aktivität in der LacZ-Messung nach sechs Stunden auf das dreifache und in der Phosphatase Messung nach etwa acht Stunden auf das etwa achtfache des Ausgangswertes. In thiaminreichem Medium blieben die Werte jeweils auf niedrigem Level konstant. Damit liess sich eine Induzierbarkeit des *PHO3* Promotors unter Thiaminmangel beobachten. Die Werte dienen als Vergleich für die Messergebnisse des CY407 Stammes.

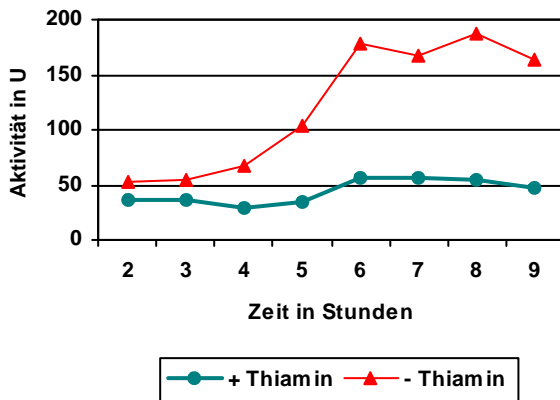
A) CY337 LacZ-Messung



B) CY337 Phosphatase-Messung



C) CY337 *pho5* Disruption LacZ-Messung



D) CY337 *pho5* Disruption Phosphatase-Messung

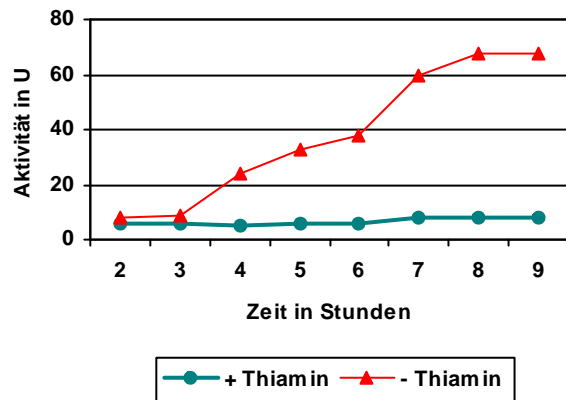


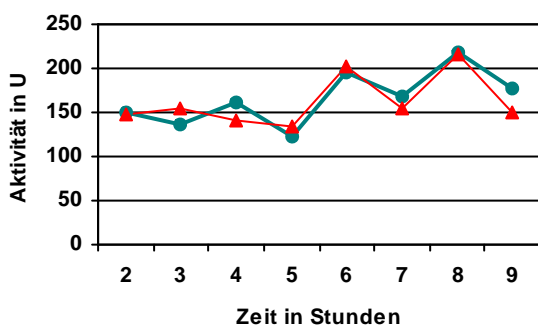
Abbildung 14 A - D: Induktion der Aktivität des *PHO3* Promotors im des CY337 Stamm und im CY337 *pho5*-Disruptionsstamm unter Thiaminmangelbedingungen

Die Messwerte des CY337 Stammes stiegen nach 7 Stunden in der LacZ-Messung von 80 Units auf 240 Units und erreichten damit das dreifache des Ausgangswertes. In der Phosphatase-Messung zeigte sich ein Anstieg von 10 Units auf 98 Units nach 8 Stunden, also auf das knapp zehnfache. Im reprimierten Zustand blieben die Werte relativ konstant bei 50 Units in der LacZ-Messung bzw. ca. 11 Units in der Phosphatase-Messung.

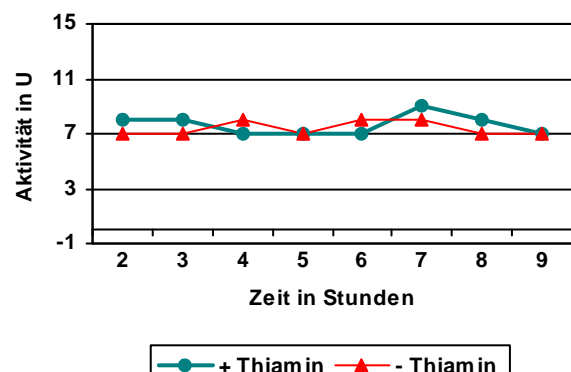
Der CY337 *pho5*-Disruptionsstamm zeigte nach 8 Stunden einen Anstieg der Messwerte in der LacZ-Messung von 50 Units auf 180 Units und in der Phosphatase-Messung von 8 Units auf 68 Units. Man sah folglich einen Anstieg auf das drei- bzw. achtfache. In thiaminreichen Medium blieben die Werte bei etwa 40 Units in der LacZ-Messung und bei etwa 7 Units in der Phosphatase-Messung.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Datensatz von 3 (A) bzw. von 2 (C) wiederholten Messungen. Die Phosphatase Messungen wurden jeweils nur einfach durchgeführt (B und D).

A) CY407 LacZ-Messung



B) CY407 Phosphatase-Messung



C) CY407 *pho5* Disruption LacZ-

D) CY407 *pho5* Disruption Phosphatase-

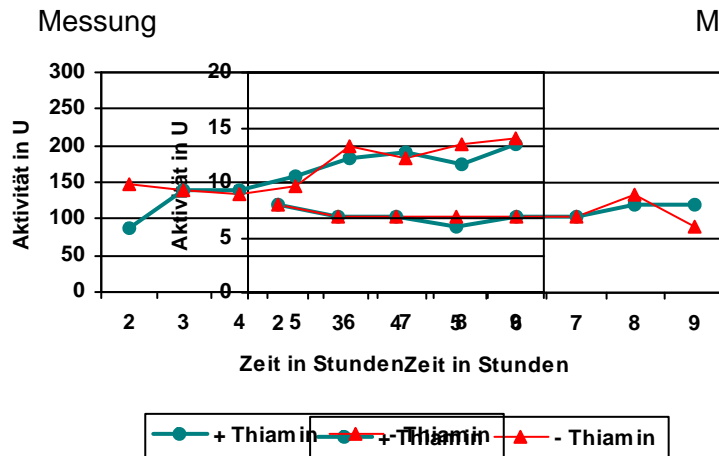


Abbildung 15 A - D: Induktion der Aktivität des *PHO3* Promotors im CY407 Stamm und im CY407 *pho5* Disruptionsstamm unter Thiaminmangelbedingungen

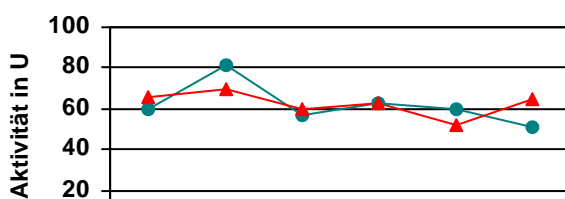
Der CY407 Stamm zeigte in der LacZ und in der Phosphatase Messung relativ konstante Werte die sowohl unter induzierenden als auch reprimierenden Bedingungen um ca. 150 bzw. 8 Units schwanken.

Der CY407 *pho5*-Disruptionsstamm verhielt sich ähnlich mit konstanten Werten um 160 Units in der LacZ-Messung und 7 Units in der Phosphatase Messung, die sowohl in thiaminreichem als auch thiaminarmen Medium beobachtet werden konnten.

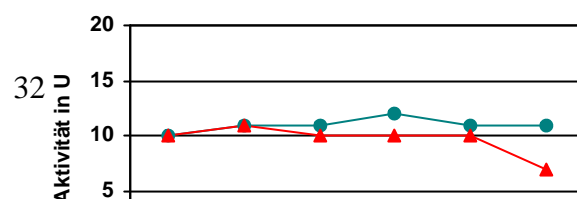
Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Datensatz von 3 (A) bzw. von 2 (C) wiederholten Messungen. Die Phosphatase Messungen wurden jeweils nur einfach durchgeführt (B und D).

Der CY407 Stamm, dem die ATPase Untereinheit des Swi-Snf Komplexes fehlt, zeigte weder selbst noch als durch *pho5* Disruption veränderter Stamm einen signifikanten Anstieg der Aktivität. Man konnte sowohl in der LacZ- als auch in Phosphatase Messung beobachten, dass die Messwerte im Zeitverlauf sowohl unter reprimierten als auch unter induzierten Bedingungen auf dem gleichen Level konstant blieben. Im Vergleich mit CY337, der unter aktivierenden Verhältnissen einen Anstieg der Aktivität zeigte, konnte der Schluss gezogen werden, dass der Swi-Snf Komplex eine Funktion im Rahmen der Induktion des *PHO3* Gens übernimmt.

A) *pho6*⁻ LacZ-Messung



B) *pho6*⁻ Phosphatase-Messung



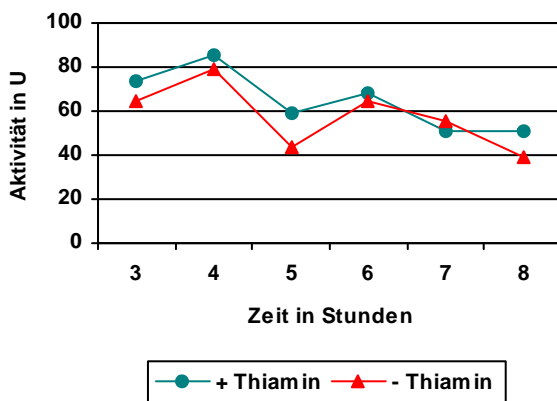
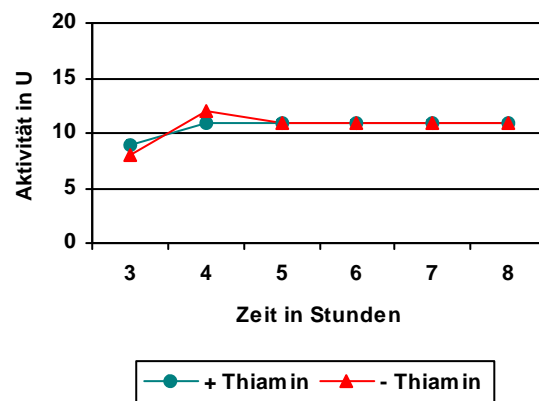
C) *gcr1*⁻ LacZ-MessungD) *GCR1*⁻ Phosphatase-Messung

Abbildung 16 A – D: Induktion der Aktivität des *PHO3* Promotors im *pho6*⁻ - und im *gcr1*⁻ - Stamm unter Thiaminmangelbedingungen

Der *pho6*⁻-Stamm zeigte sowohl unter reprimierenden als auch unter induzierenden Bedingungen konstante Werte um die 60 Units in der LacZ Messung und 10 Units in der Phosphatase-Messung.

Der *gcr1*⁻-Stamm zeigte sowohl in thiaminarmen als auch thiaminreichem Medium gleichbleibende Werte um die 65 Units in der LacZ-Messung und 11 Units in der Phosphatase Messung.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Datensatz von 3 (A und C) bzw. von 2 (B und D) wiederholten Messungen.

Der *pho6*⁻-Stamm zeigte ebenso wie der *gcr1*⁻-Stamm sowohl unter reprimierenden als auch induzierenden Bedingungen eine gleichbleibende Aktivität in der LacZ-Messung und in der Phosphatase-Messung. Die Werte der LacZ-Messung des *pho6*⁻-Stammes schwankten um die 60 Units, die Werte der Phosphatase Messung um die 10 Units. In der LacZ-Messung des *gcr1*⁻-Stammes lagen die Werte bei etwa 65 Units, in der Phosphatase Messung bei 11 Units. Diese Ergebnisse ließen eine Abhängigkeit der Aktivierung des *PHO3* Promotors von Pho6 und Gcr1 erkennen.

2.6 Chromatinanalyse

Nachdem der *PHO5* Disruptionsstamm für die DNase I Analyse fertig gestellt worden war, sollte ein Chromatinblot zu Untersuchung der Chromatinstruktur angefertigt werden. Bei dieser Methode wird im ersten Schritt das Chromatin des Zellkerns so präpariert, dass seine Struktur erhalten bleibt. Anschließend wird es mit DNase I behandelt, einem Enzym, das das Chromatin bevorzugt dort schneidet, wo es gut zugänglich ist, also vor allem im Bereich von Linker-Regionen, die zwischen den Nukleosomen liegen. Eine zusätzliche Restriktionsspaltung nach Aufreinigen der DNA sorgt für die Festlegung eines definierten Endes. Für die anschließende indirekte Endmarkierung (Nedospasov und Georgiev, 1980; Wu, 1980), die als Nachweismethode für die entstandenen DNA-Fragmente dient, wird die DNA auf ein Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt. In einem Kapillarblotverfahren nach Southern (1979) erfolgt die Übertragung der DNA auf eine Filtermembran. Diese kann dann mit radioaktiv markierten DNA-Sequenzen, die sich als Sonden an komplementäre Strukturen anlagern, hybridisiert werden. Durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm wird das Ergebnis sichtbar gemacht.

Um die Veränderung der Chromatinstruktur am *PHO3* Promotor zu untersuchen, wurde der *pho5* Disruptionsstamm sowohl in thiaminarmen als auch thiaminreichen Medium angezogen, bis die Zellen die exponentielle Phase des Wachstums erreicht hatten. Aus einer kleinen Menge von Zellen wurden LacZ – und Phosphatase Messungen durchgeführt. Diese ergaben in der LacZ-Messung im reprimierten Zustand 64 Units und unter induzierten Bedingungen 446 Units und in der Phosphatase-Messung 18 Units im inaktiven Zustand und 156 Units im aktiven Zustand. Die Zellen zeigten demnach einen Anstieg der Aktivität des *PHO3* Promotors auf das sieben- bis achtfache. Anschließend wurden in mehreren Präparationsschritten die Zellkerne gewonnen und die nukleosomal organisierte DNA mit zunehmenden DNase I Konzentrationen gespalten. Dieses Vorgehen ermöglicht eine optimale Analyse der Nukleosomenanordnung (Gregory et al., 1998b).

Nachdem die mit DNase I – behandelte DNA von allen Proteinen befreit worden war, erfolgte eine zusätzliche Spaltung mit dem Restriktionsenzym Apal, dessen Spaltstelle direkt am Beginn der verwendeten Sonde lag. Als Marker wurde freie DNA verwendet, die mit Apal auf der einen Seite und jeweils mit den Restriktionsenzymen BamHI, BglII und NciI auf der anderen Seite gespalten worden war. Damit ergaben sich drei Banden mit einer Länge von

770 bp, 1040 bp und 1450 bp (siehe Abbildung 16, Bahn 4), die in etwa auf Höhe des *PHO3* Promotors liegen. Wie oben beschrieben wurde anschließend ein Gel angefertigt und die

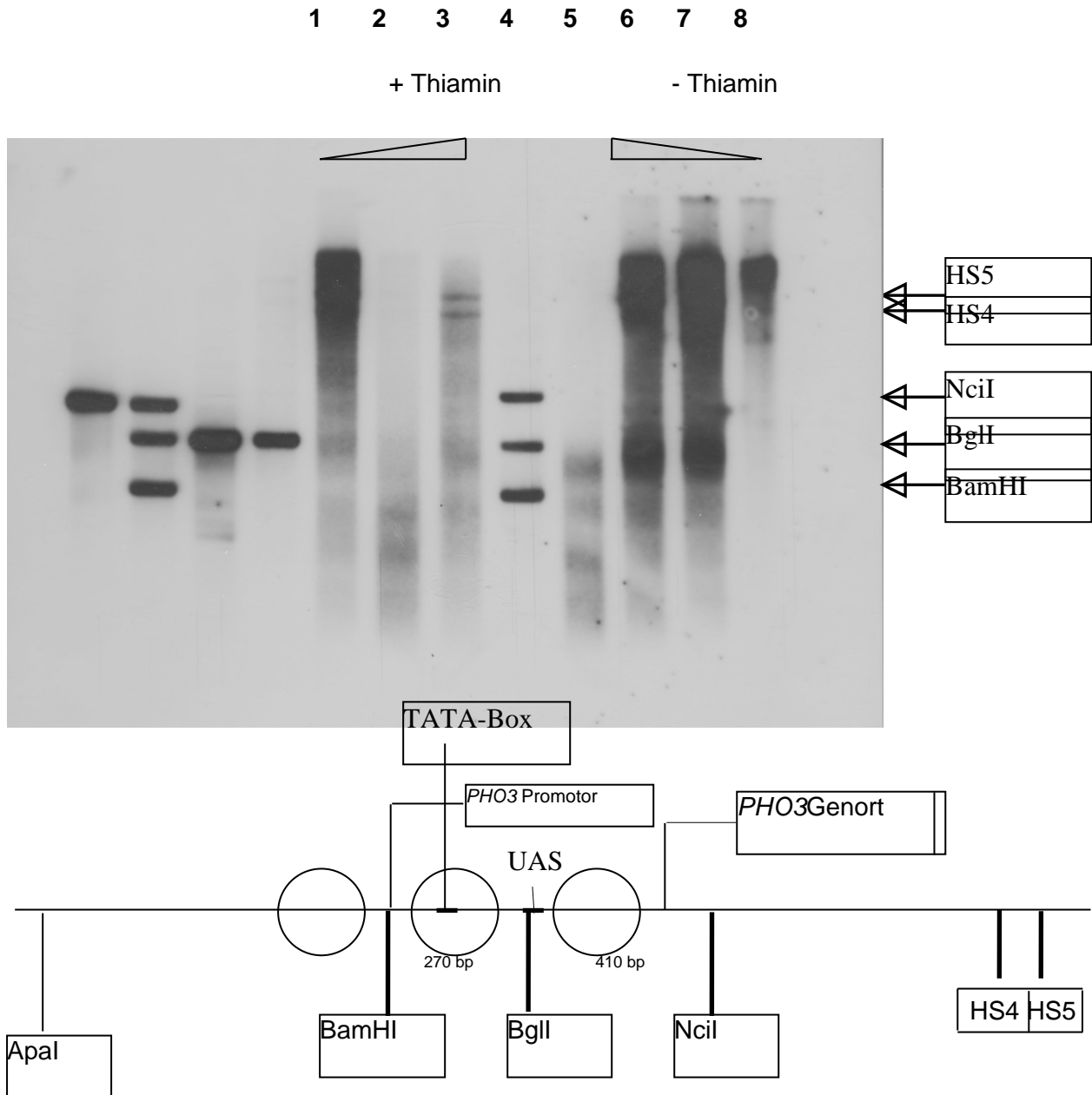


Abbildung 17: DNase I Analyse des Chromatinzustandes des Hefe *PHO3* Promotors

Kerne des *pho5*-Disruptionsstammes im reprimierten (Bahnen 1-3) oder aktivierten (Bahnen 5-8) Zustand wurden mit ansteigenden (Bahnen 1-3, Dreieck über den Spuren) bzw. absteigenden Konzentrationen (Bahnen 4-7) DNase I behandelt. Die Bahnen 2 und 3 sind vertauscht hinsichtlich der ansteigenden DNase I Konzentration. Die DNA wurde isoliert, mit Apal gespalten und auf einem 1,5%-igem Agarosegel analysiert, geblottet und mit der Apal/BamHI Sonde hybridisiert. Genomische DNA wurde mit Apal und BamHI, BglI bzw. NciI gespalten und diente als Marker (Bahn 4). Die Banden liefen auf einer Höhe von 768, 1038 bzw. 1447 bp (markiert). Die beiden oberen Pfeile zeigen die hypersensitiven Regionen HS4 und HS5 (Almer und Hörz, 1986) an.

Das Schema darunter zeigt den *PHO3* Promotor und den *PHO3* Genort mit drei positionierten Nucleosomen, dem UAS Element und der TATA-Box sowie die Hypersensitiven Stellen HS4 und HS5. Zusätzlich die Spaltstellen der Restriktionsenzyme BamHI, BglI und NciI, die bei der Herstellung des Markers verwendet wurden.

DNA auf eine Filtermembran übertragen. Zur nachfolgenden Hybridisierung wurde eine Sonde verwendet, die sich dank ihrer komplementären Basenpaarabfolge an die Sequenz zwischen den Spaltstellen *Apal* und *BamHI* anlagert und eine Länge von 768 bp aufweist (siehe Abbildung 9 C).

Bei Betrachtung des Spaltmusters des Chromatins des *PHO3* Promotors fielen sowohl im reprimierten Zustand (Bahnen 1-3, Abbildung 17) als auch im induzierten Zustand (Bahnen 5-8, Abbildung 17) fünf deutliche Banden auf. Diese spiegelten die Anwesenheit von hypersensitiven Stellen im Chromatin wider. Bei Kartierung der Banden bezüglich ihrer Lokalisation des *PHO3* Gens bzw. dessen Promotor ergab sich das folgende Bild: eine Bande lag etwa auf Höhe der *BamHI* Spaltstelle, die in dem hier verwendeten *pho5*-Disruptionsstamm in etwa den Beginn des *PHO3* Promotors darstellte. Bei der zweiten Bande handelte es sich um die bereits bei Almer und Hörz (1986) beschriebene hypersensitive Region HS3, die sich im normalen chromosomalen Umfeld zwischen dem *PHO3* und dem *PHO5* Gen befindet und die 220 bp vom 5`Ende des Endpunktes der Transkription von *PHO5* entfernt ist. Das Strukturgen *PHO3* beginnt 230 bp weiter stromaufwärts von HS3. Die dritte Bande lief etwas unterhalb der *NciI* Spaltstelle und befand sich damit im Bereich des Beginns des *PHO3* Genortes. Eine genaue Lokalisation der vierten sowie der fünften Bande war durch die große Entfernung von den Markerbanden problematisch. Es dürfte sich aber hierbei um die bei Almer und Hörz (1986) beschriebenen hypersensitiven Regionen HS4 und HS5 gehandelt haben. Dabei befand sich HS4 in dem Bereich, an dem die Transkription von *PHO3* beendet wird und HS5 etwa 700 bp weiter stromabwärts.

Dieses Bandenmuster legte den Aufbau des *PHO3* Promotors aus positionierten Nukleosomen nahe. Dabei war es denkbar, dass zwischen dem Beginn des *PHO3* Promotors und der *BglI* Spaltstelle ein Nukleosom lokalisiert war und zwischen der *BglI* Spaltstelle und dem Beginn des *PHO3* Genortes ein weiteres (siehe Abbildung 17, unteres Schema). Da das beschriebene Nukleasespaltmuster keine wesentliche Veränderung im Rahmen der Induktion erfuhr, konnte daraus geschlossen werden, dass unter induzierenden Bedingungen die Chromatinstruktur erhalten blieb. Eventuell nahm die Intensität der HS3 zu.

Die stärkere Bande von HS3 in den Spuren 5-8 im Vergleich zu den Spuren 1-3 (Abbildung 17) rührte aber eher von einer höheren Gesamtmenge an aufgetragener DNA her. Außerdem zeigte ein Vergleich der Chromatinstruktur unter Induktionsbedingungen dieses Stammes mit der der entsprechenden *pho6⁻* Mutante als Negativkontrolle ebenfalls keine deutliche Veränderung (Dorothea Blaschke, persönliche Mitteilung). Beide Ergebnisse zusammen sprachen gegen eine mit dieser Methode deutlich zu beobachtende Chromatinveränderung am induzierten *PHO3* Promoter.

3 Diskussion

3.1 Klonierungen

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der Transkription des *PHO3* Gens von den Faktoren Gcn5, Swi-Snf, Pho6 und Gcr1 abhängt und ob sich Veränderungen in der Chromatinstruktur des *PHO3* Promotors beim Übergang vom inaktiven in den aktiven Zustand zeigen. Dafür waren im Vorfeld einige Klonierungen notwendig. Zum einen wurde ein Hefepiasmid synthetisiert, das eine Fusion des *PHO3* Promotors aus *S. cerevisiae* und dem *Escherichia coli* LacZ- Gen enthielt. Bei der Konstruktion war darauf zu achten, dass die *PHO3* Promotor Sequenz in der korrekten Orientierung vor das LacZ Gen integriert wurde. Dies wurde durch Probespaltungen sichergestellt (siehe Kapitel 2.1). Außerdem sollten Plasmideffekte vermieden werden, die durch Vektoren mit einer hohen Kopienzahl verursacht werden können und die die Regulation des Gens beeinträchtigen (Rupp, 2001). Daher wurde der Hefevektor pP8Z.LEU verwendet, der sich schon bei früheren Messungen bewährt hatte. Das fertige Plasmid wurde in die Hefestämme YS18, YS5189, CY337, CY407, S173-6B, *gcr1*⁻, *pho6*⁻ und die *pho5*-Disruptionsstämme YS5189, CY337 und CY407 transformiert (siehe Kapitel 2.4). Durch Aktivitätsmessungen der β -Galaktosidase, einem Enzym das durch das LacZ Gen kodiert wird und das keine endogene Aktivität in *S. cerevisiae* zeigt, konnte die Expression des Plasmidgens überwacht und Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der Regulation des *PHO3* Gens von verschiedenen Hefehintergründen bzw. den oben genannten Faktoren gezogen werden.

Weitere Klonierungen betrafen die Herstellung eines Hefestammes, bei dem eine Disruption des *PHO6* Gens, das einen positiven Regulationsfaktor für die Transkription von *PHO3* kodiert, durchgeführt werden sollte. Dazu wurde ein lineares Fragment konstruiert, das aus der Sequenz des *PHO6* Gens bestand und in das das *URA3*-Gen integriert wurde (siehe Abbildung 6 in Kapitel 2.2). Diese DNA wurde für den „Ein-Schritt“-Genaustausch verwendet, wobei die *PHO6* Sequenz an beiden Enden mit 1100 bp bzw. 400 bp ausreichend lange Flanken für das doppelte Rekombinationsereignis bereitstellte. Als Mutterstamm wurde YS18 verwendet. In diesen wurde die DNA transformiert und durch Ausstreichen der Zellen auf uracilfreien Platten konnten die gesuchten *pho6*- Disruptionsstämme selektiert werden.

Eine weitere Disruption betraf das *PHO5* Gen. Dieses liegt im Hefechromosom vor dem *PHO3* Gen und war bereits mit DNase I Spaltungen und indirekter Endmarkierung auf Veränderungen seiner Struktur bei der Aktivierung der Transkription hin erforscht worden

(Almer et al., 1986). Mit demselben Ziel und denselben Methoden sollte nun der *PHO3* Promotor untersucht werden. Da sich in einem geeigneten Abstand vom *PHO3* Promotor für die Anlagerung einer Sonde homologe Regionen befinden, musste ein Stamm mit einer eindeutig definierten Bindungsregion geschaffen werden. Dazu sollte das *PHO5* Gen aus der Sequenz entfernt werden, so dass sich stromaufwärts des *PHO3* Promotors eine Bindungsregion für eine bereits bei der Untersuchung des *PHO5* Promotors verwendete Sonde befand. Dies wurde im „Ein-Schritt“ Genaustausch mit einem Fragment erreicht, das als Flanken für die Rekombination zum einen den etwa 550 bp langen *PHO3* Promotor und zum anderen eine 250 bp lange Sequenz enthielt, die sich 1600 bp stromabwärts des *PHO5* Promotors zwischen den Spaltstellen *StuI* und *Clal* anlagerte. Zur Selektion wurde in das Fragment das *URA3*-Gen integriert (siehe auch Abbildung 9 B in Kapitel 2.3). Als Mutterstämme wurden die Hefestämme YS18, YS5189, CY337 und CY407 verwendet.

3.2 Messergebnisse

Nach Transformation des klonierten Hefevektors wurden sowohl LacZ- als auch Phosphatase Messungen der verschiedenen Hefestämme durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen des YS18 Stammes zeigten bei Thiaminmangel einen deutlichen Anstieg der Aktivität des *PHO3* Promotors. In der LacZ-Messung wurde nach etwa 5 Stunden das 3-fache und in der Phosphatase Messung sogar das 25-fache des Ausgangswertes erreicht. Diese Beobachtung stimmte mit der in der Literatur beschriebenen Induzierbarkeit der Aktivität von *PHO3* unter Thiaminmangel überein (Schweingruber et al., 1986, Iwashima und Nose, 1976). Eine gleichartige Veränderung der Aktivität im *pho5* Disruptionsstamm wie im Wildtypstamm war zu erwarten gewesen. *PHO5* ist nicht durch die Abwesenheit von Thiamin sondern nur durch einen Mangel an Phosphat induzierbar. Da das verwendete Wachstumsmedium phosphatreich war, sollte das *PHO5*-Gen bei allen Messungen reprimiert sein und damit keinen Einfluss auf die Messwerte ausüben. Diese Vermutung wurde in der Übereinstimmung der Ergebnisse des Wildtyp- und des Disruptionsstammes bestätigt. Dadurch eignete sich der *pho5* Disruptionsstamm auch für die anschließende Untersuchung der Chromatinstruktur durch DNase I Spaltung und indirekte Endmarkierung.

Ein Fehlen der Histonacetyltransferase Gcn5 im YS5189 Stamm zeigte keinen Einfluß auf die Transkription des *PHO3* Gens. Der Verlauf der Messwerte ähnelte sowohl in der LacZ-Messung als auch in der Phosphatase Messung demjenigen des YS18 Stammes. Da die Regulation der Genexpression am *PHO3* Promotor u.a. durch Rpd3 kontrolliert wird

(Rundlett et al., 1998) und dieser Faktor eine Histondeacetylase in *S.cerevisiae* darstellt, die eine Suppression der Transkription bewirkt, wäre eine Kontrolle der Aktivierung durch einen gegenteiligen Mechanismus durchaus naheliegend gewesen. Allerdings schließt ein Unabhängigkeit des *PHO3* Promotors von Gcn5 eine Beeinflussung durch andere Histonacetyltransferasen wie z.B. der NuA4 Histonacetylase nicht aus.

Diese Ergebnisse standen auch im Gegensatz zu der Beobachtung, dass viele der Gene, die eine Abhängigkeit von Swi-Snf zeigen (s.u.), ebenso eine Abhängigkeit von Gcn5 aufweisen (Pollard und Peterson, 1997). Das Rekrutment des Chromatinremodelling Komplexes Swi-Snf ist teilweise abhängig von der Histonacetylierung. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Acetylierung von H4 K8 für ein Heranziehen von Swi-Snf sorgt (Agalioti et al., 2002; Hassan et al., 2002) und dass durch eine Histonacetylierung die Bindung des Swi-Snf Komplexes an die Nukleosomen des Promotors stabilisiert bzw. verstärkt wird (Hassan et al., 2002; Huang et al., 2003). Auch ermöglicht eine Histonacetylierung durch HAT Komplexe Swi-Snf am Promotor zu bleiben, wenn der Aktivator dissoziiert ist (Hassan et al., 2001). Folglich wären weitere Untersuchungen hinsichtlich einer Abhängigkeit des *PHO3* Promotor von anderen Histonacetyltrasen interessant und wegweisend.

Der CY337 Stamm, der als Wildtyp für die Disruption der Snf2 Untereinheit des Swi/Snf-Komplexes verwendet wurde, zeigte einen Anstieg der Messwerte unter Thiaminmangelbedingungen in der LacZ-Messung auf das dreifache und in der Phosphatase Messung auf etwa das neunfache, wobei ein Maximum nach 7-8 Stunden erreicht wurde. Damit ähnelten die Werte im Verlauf dem YS18 Wildtypstamm und dem YS5189 Stamm. Auch der S173-6B Stamm, der als Ausgangsstamm für die Gcr1 Disruption diente, zeigte einen ähnlichen Anstieg. Die Werte wurden als Vergleich für die Messergebnisse des CY407 bzw. des *gcr1*⁻ Stammes herangezogen.

Der CY407 Stamm, dem die Snf2 ATPase-Untereinheit des Swi/Snf-Komplexes fehlt, zeigte sowohl in der LacZ- als auch in der Phosphatase-Messung einen gleichbleibenden Verlauf der Werte. Die Abwesenheit von Snf2 behindert demnach eine Aktivierung des *PHO3* Gens. Damit gehört *PHO3* zu den ca. 2% der Hefegene, deren Expression durch eine *snf2/swi2* Mutation vermindert wird (Holstege et al., 1998). Zu diesen Genen gehören unter anderem auch *HO*, *SUC2*, *ADH1-2*, *INO1* und *PHO8*. Der Swi-Snf Komplex spielt durch eine Veränderung der Chromatinstruktur eine wichtige Rolle bei der Initiation der Transkription. Durch Veränderung der Konformation der Nukleosomen und/oder deren Position wird Transkriptionsfaktoren ein verstärkter Zugang zur nukleosomalen DNA ermöglicht (Côté et

al., 1998) und die chromatinvermittelte Unterdrückung der Transkription vermindert (Kingston und Narlikar, 1999; Peterson und Workman, 2000; Vignali et al., 2000; Workman und Kingston, 1998). Dementsprechend wäre es auch am *PHO3* Promotor vorstellbar, dass Swi-Snf, von dem bekannt ist, dass es ohne Sequenzspezifität aber mit einer hohen Affinität an Nukleosomen und DNA binden kann (Quinn et al., 1996; Côté et al., 1998), primär an die DNA andockt und über eine Veränderung der Chromatinstruktur Bindungsstellen für Faktoren wie Gcr1 (s.u.) oder dem positiven Regulationsfaktor Pho6 zugänglicher macht. Allerdings macht das gleichbleibende Bandenmuster des Chromatinblotes unter induzierenden und reprimierenden Bedingungen (siehe Kapitel 2.6) diese Wirkungsweise am *PHO3* Promotor unwahrscheinlich.

Die Aufgabe von Swi-Snf ist nicht nur auf die Initiation der Genexpression begrenzt (Biggar und Crabtree, 1999). Am *HO* Endonuklease Genpromotor beispielsweise geht der Bindung des Swi-Snf Komplexes die Interaktionen des Transkriptionsaktivator Swi5 mit seiner DNA-Bindungsstelle voraus (Cosma et al., 1999; Krebs et al., 1999). Auch an einigen anderen Promotoren wie zum Beispiel dem *PHO8* Promotor spielt der Komplex erst nach Bindung des Aktivators eine Rolle (Gregory et al., 1999; Ryan et al., 1998). Am *PHO3* Promotor wäre es folglich möglich, dass zuerst Gcr1 oder Pho6 an die DNA binden, im nächsten Schritt Swi-Snf rekrutieren und Swi-Snf erst anschließend eine oder mehrere Aufgaben übernimmt. Diese Funktionen könnten die Rekrutierung anderer Proteine, wie des SAGA Komplexes beinhalten oder die Unterstützung der Bindung verschiedener Faktoren wie u.a. des TATA-bindenden Proteins (TBP) bedeuten, wie dies für die Aktivierung der *HO* Expression diskutiert wurde (Cosma et al., 1999; Yu et al., 2000).

Auch die Messungen des *pho6*-Disruptionsstammes und des *gcr1*⁻-Stammes sind eindeutig. Der gleichbleibende Verlauf der Werte beider Stämme sowohl unter induzierenden als auch unter reprimierenden Bedingungen zeigten eine Abhängigkeit der Transkription des *PHO3* Promotors von den genannten Faktoren. Bei dem positiven Regulationsfaktor Pho6 war dieses Ergebnis zu erwarten gewesen, da in der Literatur bereits seine Funktion bei der Expression des *PHO3* Gens beschrieben worden war (Toh-e et al., 1975; Nishimura et al., 1992). Bei dem Transkriptionsfaktor Gcr1 war der Nachweis überraschender. Durch seine spezifische Bindung an ein CTTCC-Sequenzmotif (Baker, 1991; Huie et al., 1992) wurde über Computeranalysen festgestellt, dass Gcr1 eine potentielle Bindungsstelle am *PHO3* Promotor besitzt. Diese theoretischen Erkenntnisse sollten in der Praxis experimentell bestätigt werden. Da es insgesamt über 800 CT Boxen im Hefegenom gibt und Gcr1-abhängige Gene dazu tendieren mehr als eine CTTCC-Sequenz in ihrer Promotorregion zu

besitzen (Lopez und Baker, 2000), war eine Beteiligung bei der Aktivierung des *PHO3* Gens eher unwahrscheinlich. Trotzdem zeigten die Messungen ein eindeutiges Ergebnis. Durch das Fehlen eines Anstieges der Messwerte, was sowohl in der LacZ- als auch in der Phosphatase-Messung beobachtet werden konnte, kann auf eine klare Abhängigkeit der Aktivität des *PHO3* Promotors von Gcr1 geschlossen werden. Damit gehört *PHO3* neben *ENO1*, *ENO2*, *TDH3* (Holland et al., 1987), *ADH1* (Santangelo und Tornow, 1990) und *TPI* (Scott et al., 1990) zu den Gcr1-abhängigen Genen. Besondere Erwähnung soll in diesem Zusammenhang das *ADH1* Gen finden, dass die glykolytische Form der Aldehyddehydrogenase in *S. cerevisiae* kodiert. Die Regulation der Transkription unterliegt bei diesem Gen sowohl, wie bereits oben beschrieben, der Kontrolle von Swi-Snf, als auch dem globalen Regulator Gcr1. Da demnach beide Faktoren sowohl bei *PHO3* und als auch bei *ADH1* eine Rolle bei der Genexpression spielen, wäre es denkbar, dass sie auch über ähnliche Mechanismen wirken. Tornow und Santangelo (1990) schlugen vor, dass ein heterotrimerer Komplex aus Gcr1 und dem multifunktionellen Protein Rap1 durch die DNA Bindungsdomäne von Rap1 mit der UAS Region des *ADH1* Promotors interagiert und durch die Gcr1 Aktivierungsdomäne die Transkriptionsmaschinerie kontaktiert. Eine zusätzliche Bindung von Gcr1 an die CT Box könnte dabei entweder eine Stabilisation der Interaktion zwischen dem Gcr1-Rap1 Komplex und der Promotor DNA hervorrufen oder die Aktivierungsdomäne von Gcr1 freilegen, was beides zu einer effizienteren Transkriptionsaktivierung beitragen würde. Demnach wären weitere Untersuchungen des *PHO3* Promotors hinsichtlich einer Beteiligung von Rap1 bei der Transkriptionskontrolle interessant, da sich damit Hinweise ergeben würden, ob sich dieses Modell auch auf den *PHO3* Promotor übertragen lässt. Zusätzlich könnte die Rolle von Swi-Snf innerhalb dieses Modells erforscht werden, die beispielsweise darin bestehen könnte die Bindung von Gcr1 an die CT Box zu erleichtern.

3.3 Chromatinstruktur

Bereits 1986 wurde die globale Chromatinstruktur des *PHO5/PHO3* Genortes durch die Spaltung von Hefekernen mit verschiedenen Nukleasen und der nachfolgenden Kartierung der Nukleasespaltungen durch indirekte Endmarkierung analysiert (Almer und Hörz, 1986). Dabei stellte sich unter anderem heraus, dass sich zwischen den beiden Genen die hypersensitive Stelle HS3 befindet, die im Bereich von Position -230 stromabwärts des Initiationskodons von *PHO3* gelegen ist. Bei detaillierter Betrachtung des 550 bp langen *PHO3* Promotor im reprimierten Zustand durch DNase I Spaltung erkannte man drei starke

Banden (Abbildung 17 in Kapitel 2.6). Die mittlere Bande entsprach der bereits beschriebenen hypersensitiven Stelle HS3. Die weiter stromaufwärts gelegene Bande lag auf Höhe der BamHI Spaltstelle und markierte den Beginn des *PHO3* Promotors, während die stromabwärts gelegene Bande sich etwas unterhalb der NciI Spaltstelle befand und damit im Bereich des Beginns des *PHO3* Genortes lag. Diese Anordnung legte den Aufbau des Promotors aus positionierten Nukleosomen nahe. Dabei war es denkbar, dass zwischen dem Beginn des *PHO3* Promotors und der BglI Spaltstelle ein Nukleosom lokalisiert war und zwischen der BglI Spaltstelle und dem Beginn des *PHO3* Genortes ein weiteres. Bereits 1981 schlug Kornberg vor, dass hypersensitive Stellen eine geordnete nukleosomale Anordnung erzeugen und dieser Effekt mit wachsender Entfernung von den hypersensitiven Stellen abnimmt. Diesen Mechanismus bezeichnete er als Grenzeffekt. Dies unterstützt die These des Aufbaus des *PHO3* Promotors aus lokalisierten Nukleosomen, aber um eine genauere Positionierung der Nukleosomen zu erhalten, müssten weitere Spaltungen mit Restriktionsnukleasen erfolgen. Die Spaltung von Kernen mit Restriktionsnukleasen stellt einen alternativen Ansatz zur Kartierung von zugänglichen und geschützten Regionen im Chromatin dar. Restriktionsstellen, die mit positionierten Nukleosomen zusammenfallen, sollten gegenüber der Spaltung resistent sein, wenn sie innerhalb des Kernpartikels liegen und zugänglich, wenn sie in der Linker-Region oder in hypersensitiven Stellen liegen (Linxweiler und Hörz, 1984; Almer et al., 1986). Am *PHO5* Promotor wurde dies unter anderem anhand einer ClaI Spaltstelle bestätigt. Diese wurde innerhalb eines positionierten Nukleosoms, das auf der Basis von Daten durch Micrococcusnuklease kartiert worden war, in weniger als 5% der Kerne gespalten. Eine andere ClaI Stelle, die innerhalb einer mutmaßlich nukleosomenfreien hypersensitiven Region kartiert worden war, wurde in 95 % der Kerne gespalten (Almer et al., 1986). Mit Hilfe dieser Methoden ließe sich am *PHO3* Promotor eine exaktere Positionierung von Nukleosomen vornehmen und die Anzahl der stromaufwärts der hypersensitiven Region HS3 gelegenen Nukleosomen klären.

Da das oben beschriebene Bandenmuster sowohl unter induzierenden als auch unter reprimierenden Bedingungen zu beobachten war (siehe Kapitel 2.6), konnte daraus geschlossen werden, dass die lokalisierte Nukleosomenanordnung im Rahmen der Genaktivierung weitgehend erhalten blieb. Dies steht im Gegensatz zu den Veränderungen die am chromosomalen Nachbarn des *PHO3* Promotors, nämlich dem *PHO5* Promotor im Rahmen der Geninduktion beobachtet werden. Hier ist ein reguläres Muster um die hypersensitive Stelle HS2, das hier aufgrund von vier positionierten Nukleosomen entsteht, die charakteristisch für den inaktiven Zustand des Gens sind, unter aktivierenden Bedingungen nicht länger zu finden. Stattdessen wird eine 600 bp lange Region um HS2

bevorzugt von DNase I gespalten (Almer et al., 1986). Die Aktivierung des Promotors wird durch die kooperative Interaktion zweier positiver Transaktivatoren vermittelt, dem basischen Helix-Loop-Helix Protein Pho4 (Svaren und Hörz, 1997) und dem Homöobox-Protein Pho2 (Sengstag und Hinnen, 1987; Barbaric et al., 1996, Barbaric et al., 1998). Dabei bindet Pho4 an zwei UAS Elemente, von denen UASp1 zwischen zwei Nukleosomen innerhalb der DNaseI-hypersensitiven Stelle HS2 liegt (Almer et al., 1986), und UASp2 innerhalb des positionierten Nukleosoms -2 (Svaren und Hörz, 1995). Pho2 erleichtert die Bindung des Transaktivators an beide UAS Elemente (Svaren, 1997; Barbaric et al., 1998).

Am *PHO3* Promotor liegt insofern eine ähnliche Situation vor, als dass die Region HS3 zwischen -234 bis -215 ebenfalls eine UAS Sequenz enthält, die für die Aktivierung und Sensitivität für Thiamin benötigt wird (Nosaka et al., 1992). Folglich liegt dieses regulative DNA-Element auch innerhalb des *PHO3* Promotors in einem nukleosomenfreien, gut zugänglichen DNA Abschnitt, wie dies schon für mehrere Gene gezeigt wurde (McGhee et al., 1981; Emerson and Felsenfeld 1984; Lohr, 1984; Fritton et al., 1984; Emerson et al., 1985; Costlow et al., 1985; Proffitt, 1985). Dementsprechend wäre es vorstellbar, dass am *PHO3* Promotor ein positiver Regulationsfaktor wie z.B. Pho6 allein oder auch zusammen mit anderen Proteinen (z. B. Gcr1) an die UAS Sequenz bindet und die Aktivierung der Transkription einleitet, ohne dass ein extensives Remodelling der Chromatinstruktur nötig ist.

Das unterschiedliche Verhalten des *PHO3* und *PHO5* Promotors im Rahmen der Genaktivierung könnte in Zusammenhang mit der Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren stehen. Während bei *PHO5* die Histonacetylierung durch Gcn5, ebenso wie das Remodelling durch Swi-Snf eine wichtige Rolle spielt, aber letztlich nicht essentiell ist (Gregory et al., 1998b; Neef und Klädde, 2003), findet eine Aktivierung des *PHO3* Gens ohne Swi-Snf nicht statt (siehe Kapitel 3.2.). Es bleibt ungeklärt, warum die Induktion von *PHO3* eine stärkere Abhängigkeit von Swi-Snf zeigt als die Induktion von *PHO5*, obwohl letztere mit einer weitaus deutlicheren Chromatinveränderung in der Promoterregion einhergeht. Eventuell wirkt Swi-Snf nicht auf der Ebene der Öffnung des Promoterchromatins, sondern auf der Ebene der Transkription oder mRNA-Prozessierung. Es ist aber auch möglich, dass subtile Veränderungen der Chromatinstruktur mit den durchgeführten Versuchen nicht klar erkennbar waren.

Auch die Induktion von *PHO8* ist strikt abhängig von Swi-Snf (Gregory et al., 1999). Allerdings findet auch an diesem Promoter ein deutlicheres Chromatinremodelling statt. Der *PHO8* Promotor zeigt unter repressiven Bedingungen eine höhere Chromatinorganisation mit drei hypersensitiven Regionen, von denen zwei den Bindungsstellen für das Pho4 Protein entsprechen. An diese kann Pho4 unabhängig von Swi-Snf oder SAGA binden (Gregory et

al., 1999). Während der Aktivierung des *PHO8* Promotors wird ein labiles Nukleosom, das zwischen den beiden hypersensitiven Regionen mit der Pho4 Bindungsstelle liegt, disrupiert und es entsteht eine 300 bp hypersensitive Region. Die Region stromabwärts von UASp2 nimmt nur eine mittlere Zugänglichkeit für Nukleasen an, was am Besten mit einem instabilen oder nur teilweise offen liegendem Nukleosom übereinstimmt (Barbaric et al., 1992). Außerdem konnte am *PHO8* Promotor gezeigt werden, dass es nach Bindung des Aktivators zu einer Hyperacetylierung derjenigen Nukleosomen kommt, die während der Aktivierung ihre Struktur ändern (Reinke et al., 2001). Dementsprechend könnte am *PHO3* Promotor, wie bereits oben erwähnt, Pho6 im Bereich der UAS Sequenz an die DNA binden und für das Heranholen anderer Faktoren wie Gcr1 und Swi-Snf sorgen. Diese könnten über eine Markierung der entsprechenden Nukleosomen durch Hyperacetylierung eine Aktivierung der Transkription durch weitere Faktoren einleiten.

Die TATA Box liegt im *PHO3* Promotor in einer Entfernung von etwa 120 bp stromaufwärts des UAS Elementes. Diese Region übernimmt bei der Initiation der Transkription eine zentrale Rolle, indem es die Genauigkeit der Positionierung der RNA Polymerase bestimmt (Breathnach und Chambon, 1981). Innerhalb des *PHO3* Promotors liegt sie in einer für Nukleasen nicht zugänglichen Region. Es stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit eines Nukleosoms auf der TATA Box für die Geninduktion benötigt wird. Dies könnte über eine nukleosomenvermittelte Kooperation mehrerer Proteine geregelt werden. Am steroidinduzierten *Mouse Mammary Tumour Virus* (MMTV) Promotor wurde beispielsweise gezeigt, dass zwei Faktoren, nämlich der Glukokortikoidrezeptor und der Kernfaktor I gleichzeitig ihre jeweiligen Bindungsstellen an einem Nukleosom einnehmen und die Aktivierung der Transkription synergistisch stimulieren (Beato et al., 1995). Bei Fehlen der Nukleosomenvorlage entfällt dieser Synergismus (Chavez et al., 1997). Demnach verhindern Nukleosomen eine unpassende Aktivierung reprimierter Gene, sie könnten aber auch eine Notwendigkeit für eine angemessene Genexpression sein. (Gregory und Hörz, 1998). Da es auch am MMTV Promotor im Rahmen der Geninduktion nicht zu einem ersichtlichen Nukleosomenverlust kommt (Truss et al., 1995), könnten am *PHO3* Promotor ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen. Beispielsweise wäre es möglich, dass Gcr1 und Pho6 nur synergistisch binden können und die Transkription im Folgenden unter Heranholen weiterer Faktoren aktivieren.

Der Promotor des *TDH3* Gens, eines stark transkribierten Gens für die Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (*GAPDH*), unterliegt wie auch der *PHO3* Promotor

der Kontrolle von Gcr1. Der *TDH3* Promotor enthält eine hypersensitive Domäne im Bereich von – 370 bis – 560, die sich im aktivierten Zustand des Gens ausdehnt bis zu Position –40. Hier scheint das Gcr1 Protein durch Entfernung zweier Nukleosomen verantwortlich für die Öffnung dieses stromabwärts gelegen Teil des Promotors einschließlich der TATA Box zu sein (Pavlovic und Hörz, 1988). Da sich am *PHO3* Promotor keine wesentliche Veränderung der Chromatinstruktur zeigt, scheint hier Gcr1 eine andere Funktion im Rahmen der Genaktivierung zu übernehmen.

3.4 Weitere Aussichten zu der Erforschung des *PHO3* Promotors

Untersuchungen, die Regulationsmechanismen und Veränderungen der Chromatinstruktur im Rahmen der Geninduktion erforschen, benötigen experimentelle Modellsysteme um klare Aussagen über einzelne Schritte im Prozess der Chromatinöffnung machen zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Eignung des *PHO3* Promotors als gut reguliertes und induzierbares System. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit eine Abhängigkeit des *PHO3* Promotors von den Faktoren Gcr1, Pho6 und Swi-Snf gezeigt werden konnte, liegen jetzt die Voraussetzungen vor, das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren untereinander und in ihrem chromosomalen Kontext zu untersuchen.

Durch die Erforschung solcher grundlegender molekularer Zusammenhänge resultiert ein besseres Verständnis für Prozesse, die nicht nur im regulären Ablauf eines Zellzyklus sondern auch bei der Entstehung von Krankheiten eine entscheidende Rolle spielen können. Gerade im Rahmen der Krebsforschung können Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung zahlreiche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien ergeben und damit zur Bekämpfung von Krebs einen wichtigen Beitrag leisten.

4 Materialien und Methoden

4.1 Chemikalien und Enzyme

Sämtliche Grundchemikalien (Puffersubstanzen, Lösungsmittel, Salze) sowie Bromphenolblau, β -Mercaptoethanol, Ethidiumbromid, Glucose, und Hefeextrakt stammten von Merck, Darmstadt. Von der Firma Sigma, Deisenhofen kamen die Aminosäuren, Ethylendiamintetraessigsäure, (EDTA)-Dinatriumsalz, EGTA, Polyvinylpyrrolidon, Ficoll 4000, PEG (Polyethylenglykol), 3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure (MOPS) und Rinderserumalbumin (BSA). Lachsspermien-DNA, Natriumdodecylsulfat (SDS), Harnstoff und Sorbitol wurden von der Firma Serva, Heidelberg bezogen. Das Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglycol) war von der Firma Roth, Karlsruhe. Glutamin wurde von Fluka Chemie, Schweiz geliefert und Bacto-Trypton und Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids von Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA. Bacto-Agar, -Pepton, -Yeast Extract und Yeast Extract-Pepton-Dextrose-Medium (YPD) kamen von Dickinson and Company, Sparks, USA. Seakem Agarose wird von FMC Bio Products Rockland, ME, USA vertrieben. [α - 32 P]dATP, Nylonmembran Pall Filtrationstechnik und Nylonmembranen Pall Filtrationstechnik stammten von DuPont de Nemours, NEN, Division, Dreieich. Die Röntgenfilme Fuji RX wurden von Fuji Photo Co., Tokyo, Japan geliefert und die Verstärkerschirme Curix MR 600 von Agfa-Gevaert, Leverkusen. Von Whatman Limited, Springfield Mill maidstone Kentucky USA war das Whatman, 3MM-Papier.

Die Restriktionsnukleasen Apa, BamHI, BglI, BglII, BstE, ClaI, EcoRV, HaeIII, HincII, NciI, NdeI, NheI, SacI, SalI, StuI, XbaI, XhoI sowie DnaE, Proteinase K, Rnase A, Taq-Polymerase, T4-DNA Ligase, Klenow-Enzym, Ampicillin, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), o-Nitro-Phenylphosphat (ONPP) und o-Nitro-Phenylgalactose (ONPG) wurden von Boehringer Mannheim bezogen. Von der Firma New England Biolabs, Beverly, USA kamen die alkalische Phosphatase und die T4-Ligase und von ICN Immuno Biolog. Costa Mesa, CA, USA die Zymolyase 100 T. Die QIAEX-Lösung zur Präparation von DNA aus Agarosegel und QIAGEN-Säulen zur Reinigung von Plasmid-DNA waren von QIAGEN, Düsseldorf.

4.2 Medien

LB₀-Medium für *E.coli*

10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7.0 mit NaOH

Platten: 20 g Agar/l Medium und 225 mg/l Ampicillin

YPDA – Vollmedium

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

Platten: 20 g Agar/l Medium

Thiaminfreies Minimalmedium

2 g/l L-Asparagin, 500 mg/l MgSO₄ x 7 H₂O, 100 mg/l NaCl, 100 mg/l CaCl₂ x 2 H₂O, 100 mg/l Adenin, 500 µg/l H₃BO₃, 40 µg/l CuSO₄ x H₂O, 100 µg/l KJ, 200 µg/l FeCl₃ x 6 H₂O, 400 µg/l MnSO₄ x H₂O, 200 µg/l (NH₄)₆Mo₇O₂₇ x 4 H₂O, 200 µg/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 200 µg/l, 2 mg/l Inositol, 200 µg/l Riboflavin, 2 µg/l Biotin, 2 µg/l Folsäure, 200 µg/l p-Aminobenzoessäure, 400 µg/l Nicotinsäureamid, 400 µg/l Pyridoxin – HCl, 13,4 mM KCL, 20 mM Natriumcitrat pH = 5,0, 2% (w/v) Glucose, 1,6 g/l Aminosäure drop out Mix ohne Uracil und L-Leucin, 1 g/l Phosphat (Svaren et al., 1995)
bei Bedarf Zugabe von 100 µg/l Thiaminchlorid, 2 g/l Uracil und 4 g/l L-Leucin

Aminosäure drop out

3g/l Adenin, 2g/l Alanin, 2g/l Arginin, 2g/l Asparagin, 2g/l Aspartat, 2g/l Cystein, 2g/l Glutamin, 2g/l Glutamat, 2g/l Glycin, 2g/l Histidin, 2g/l meso-Inosit, 2g/l Isoleucin, 2g/l Lysin, 2g/l Methionin, 0,2g/l p-Aminobenzoessäure, 2g/l Phenylalanin, 2g/l Prolin, 2g/l Serin, 2g/l Threonin, 2g/l Tryptophan, 2g/l Tyrosin, 2g/l Valin

4.3 Hefe-, Bakterienstämme, Vektoren und DNA

Hefestämme

YS18 : Mat- α , *his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, can^R, ura3 Δ 5* (Sengstag und Hinnen, 1987)

YS5189: enthält eine *gcn5* Disruption in einem YS18 Hintergrund

CY337: a *ura3-52 lys2-801 ade2-101 leu2- Δ 1 his3- Δ 200* (Richmond und Peterson, 1996)

CY407: enthält eine *Snf2* Disruption in einem CY337 Hintergrund

S173-6B : Mat- α *leu2-3, 112 his3-1 ura3-52 trp1-289* (Holland et al., 1987)

gcr1: Mat α *leu2-3*, 112 *his3-1* *ura3-52* *trp1-289* *gcr1* Δ ::*URA3* (Holland et al., 1987)

Bakterienstamm

Escherichia coli 490A (*r_k*, *m_k*, *met*-, *thr*-, *leu*-, *recA*-), G. Hobom, Gießen

Plasmide und DNA

pUC19: Boehringer, Mannheim

Bluescript SK⁻: Stratagene, Heidelberg

Lambda DNA: wurde nach Spaltung mit EcoRI und HindIII als Längenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet; Boehringer, Mannheim

Die Primer für die PCR stammten von MWG-Biotech, Ebersberg und hatten folgende Sequenzen:

PHO3 Promotor: 5'- ATT GGA TCC TGT TCC ACT GGT CC -3' und 5'-TGG GAT CCC
CAA ACA TAG GTA ATT TGG -3'

PHO3 Promotor A: 5'- AGA GGA TCC GGT ACT GAC TTC C -3' und 5'- ACA TCT AGA
AAC ATA GGT AAT TTG G-3'

4.4 Arbeitsmethoden

Anzucht von Kulturen

Escherichia coli wurde in 5-10 ml Flüssig-LB₀-Medium, das 100 μ g/ml Ampicillin zur Selektion enthielt, mittels steriler Plastikösen angeimpft und unter konstantem Schütteln und guter Belüftung bei 37° C angezogen. Nach entsprechender Wachstumszeit wurden die Bakterien mit einer sterilen Plastiköse auf einer Agarplatte ausgestrichen und anschließend bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

Saccharomyces cerevisiae wurden unter guter Belüftung und unter konstantem Schütteln bei 30° C in Flüssigkultur angezogen. Yeast Extract-Pepton-Dextrose-Medium (YPD) diente dabei als Vollmedium, Yeast Nitrogen Base [YNB] w/o Amino Acids Medium, dem Uracil bzw. Leucin fehlte, als Selektionsmedium. Mit Hilfe einer sterilen Plastiköse wurden die gewachsenen Hefen im Verdünnungsausstrich auf eine Festplatte aufgetragen und bei 30° C im Brutschrank inkubiert.

Klonierungstechniken

Für sämtliche Klonierungstechniken wurden Standardverfahren nach Maniatis et al. (1982) angewendet.

Dazu gehören DNA-Spaltungen mittels Restriktionsenzymen, Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels Alkalischer Phosphatase, elektrophoretische Auftrennung und Präparation von DNA in Agarosegelen und Ligation der DNA-Fragmente. Bei den Ligationen wurden 20-50 ng Vektor-DNA mit 50-200 ng Fragment DNA zusammengegeben und durch T4-DNA-Ligase miteinander verbunden. Dazu wurde der Ansatz über Nacht in einem Endvolumen von 20 µl bei 16° C inkubiert.

Restriktionsspaltungen

Spaltungen von Plasmiden und chromosomaler DNA wurden mit Restriktionsenzymen von Boehringer, Mannheim im 5-Puffer System des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 0,5 bis 1 g DNA mit einem 2- 4-fachen Enzymüberschuss 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Dies entspricht 2 bis 3 Einheiten des Enzyms. Durch Zugabe von 1/5 Volumen einer Lösung aus 50 mM EDTA, 4 mM Harnstoff, 50% Saccharose, 0,1% Bromphenolblau oder durch Alkoholfällung (Zugabe von 2,5 Volumen 96%-igem Ethanol und 0,1 Volumen 5 M NaCl) wurde die Reaktion gestoppt.

DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Präparation von DNA-Fragmenten wurden 0,8 – 1,2%-ige Agaroseflächgele aus Agarose (SeaKem) hergestellt. In diesen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA unter Spannungen zwischen 80 – 140 V pro 10 bzw. 15 cm Gellänge. Zu analytischen Zwecken wurde die DNA in einem Endvolumen von 20 µl gespalten, Ladepuffer hinzugegeben und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Der verwendete Gel- und Laufpuffer enthielt Tris-Borat (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure und 2,5 mM EDTA, pH 8,3) und 1 mg/l Ethidiumbromid. Nach Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

Isolierung von DNA zu präparativen Zwecken aus Agarosegelen nach Qiagen

Die gesuchte Bande wurde aus dem Agarosegel herausgeschnitten, gewogen und 3 Volumen Puffer QX1 zu 1 Volumen DNA hinzugegeben. Quiaex II wurde durch 30 Sekunden

kräftigen Schüttelns gelöst und 10 µl zu weniger als 2 µg DNA bzw. 30 µl zu 2-10 µg DNA hinzugegeben. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation erfolgte die vorsichtige Entfernung des Überstandes mit einer Pipette. Der Niederschlag wurde erst mit 500 µl QX1 Puffer, dann mit 500 µl Puffer PE gewaschen und anschließend 10-15 Minuten an der Luft getrocknet. Um die DNA zu eluieren wurden 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 oder Wasser hinzugegeben und das Sediment durch kräftiges Schütteln suspendiert. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei 50° C wurde die Lösung für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand mit der gereinigten DNA vorsichtig in ein sauberes Eppendorfgefäß pipettiert.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durchgeführt wurde die PCR in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Als Vorlage für die Vervielfältigung der DNA diente 1 ng Plamid-DNA. Nach Zugabe von 1 nM „Primer“, 0,25 mM Nukleotide und 0,5 µl Taq-Polymerase lief die Amplifizierung in einem Thermocycler (Biorad) unter verschiedenen Reaktionsbedingungen ab:

<u>PHO3:</u>	Denaturierung	94° C	1 Minute
	Hybridisierung	53° C/ 54° C	0.5 Minuten
	Synthese	72° C	2 Minuten
<u>PHO6:</u>	Denaturierung	94° C	1 Minute
	Hybridisierung	52° C	0.5 Minuten
	Synthese	72° C	3 Minuten

Reinigung des PCR – Produkts nach Qiagen

Zu einem Volumen des fertigen PCR Ansatzes wurden 5 Volumen Puffer PB gemischt und auf eine QIAquick Säule gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30-60 Sekunden bei der die DNA an die Säule gebunden wurde. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0.75 ml Puffer PE und erneuter Zentrifugation für 30-60 Sekunden gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule für eine weitere Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein sauberes 1.5 ml Gefäß

gegeben. Um die gereinigte DNA zu lösen wurden 50 µl Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) oder 50 µl H₂O hinzupipettiert und eine Minute zentrifugiert. Die gereinigte DNA befand sich nun in dem 1.5 ml Gefäß und die Säule konnte entfernt werden.

Hitzetransformation in *Escherichia coli*

Die Transformation der Plasmid-DNA in *E.coli* wurde nach der CaCl₂-Methode nach Cohen und Chang (1974) durchgeführt.

Verwendet wurden kompetente *E.coli*-Zellen, die nach der Methode von Dagert und Ehrlich (1979) hergestellt worden waren. 100 µl dieser Zellen wurden mit 20 µl eines Ligierungsansatzes zusammengegeben und 45 min bei 0° C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42° C wurden die Zellen 2 min bei 0° C und nach Zugabe von 1 ml LB₀-Medium 1 Stunde bei 37° C inkubiert, anschließend abzentrifugiert und auf ampicillinhaltigen Selektionsplatten ausgestrichen. Auf diesen wuchsen über Nacht bei 37° C die transformierten Bakterienklone. Nach Animpfen einiger dieser Klone in 10 ml LB₀-Flüssigmedium und Anzucht bei 37° C konnte am nächsten Morgen aus den gewachsenen Zellen die Plasmid-DNA gewonnen werden.

Isolierung von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken nach Birnboim und Doly

Die Präparation von Plasmid – DNA erfolgte nach einem Verfahren nach Birnboim und Doly (1979).

Die über Nacht in LB₀-Medium gewachsenen Kulturen wurden zentrifugiert, der Niederschlag in 300 µl Birnboim I – Lösung (0,25 M Glucose, 0,2 M EDTA, 1 M Tris-HCl, pH 8,0) suspendiert und anschließend zur Lyse der Zellwände mit 300 µl Birnboim II – Lösung (20% SDS, 5 M NaOH) vermischt. Nach 5 Minuten erfolgte durch Zugabe von 300 µl KAc (2.55 M pH = 4,8), einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis und 10 minütiger Zentrifugation die Kaliumacetat-Fällung des Zelldetritus. Im Überstand befand sich nun die Plasmid-DNA, die mit 560 µl Isopropanol versetzt wurde. Durch Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur setzte sich die DNA ab und wurde nach Dekantierung des Überstandes mit 300 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde nach 5-10 Minuten Trocknen in einer Vakuumzentrifuge mit 500 µl 0,1 M NAC/ 50 mM Tris, pH = 8,0, versetzt, und unter Schütteln 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 450 µl Isopropanol wurde die Suspension 5 Minuten zentrifugiert und der Niederschlag mit 1ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Sediments in einer Vakuumzentrifuge erfolgte die Aufnahme der DNA in 100 µl TE und RNase.

Isolierung von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken nach Qiagen

Kleine Mengen von Plasmid-DNA wurden weitgehend nach Anleitung der Firma Qiagen präpariert.

Über Nacht in 2 ml LB₀-Medium gewachsene *E.colis* wurden 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde der Niederschlag in 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 100 µg/ml RNase) suspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) wurden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen (Birnboim und Doly, 1979). Nach 5 Minuten Lyse wurden 350 µl Puffer N3 (3 M Kaliumacetat (pH 5,5)) zugegeben, die Lösung sanft aber gründlich gemischt, 10 Minuten zentrifugiert und damit eine Kaliumacetat-Fällung des Zelldetritus bewirkt. Anschließend wurde der Überstand in eine QIAprep Säule, die in einer 2 ml Tube gesteckt worden war, pipettiert und für 30-60 Sekunden zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchflusses wurde die QIAprep Säule erst durch Zugabe von 0.5 ml Puffer PB und 30-60 sekundiger Zentrifugation und anschließend durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und 30-60 sekundiger Zentrifugation gewaschen. Um restliche Puffer-Rückstände zu entfernen wurde die Säule nach Verwerfung des Durchflusses zusätzlich eine Minute zentrifugiert. Um schließlich die DNA zu eluieren wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 50 µl Puffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5) hinzupipettiert, eine Minute stehengelassen und dann eine Minute lang zentrifugiert. Die Säule wurde entfernt und in dem Eppendorfgefäß befand sich nun die gereinigte DNA.

Isolierung von genomischer Hefe-DNA

Übernacht in 2 ml Vollmedium bzw. in 5 ml thiaminarmen Medium gewachsene Hefen wurden 5 Minuten bei 5° C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment mit H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 5° C wurden 500 µl 0,9 M Sorbitol, 50 mM Na-Phosphat, pH 7,4, 140 mM β-SH hinzugegeben und die OD₆₀₀ gemessen. Zur Auflösung der Zellmembran wurden 10 µl Zymolase 100 T hinzupipettiert und die Lösung 40 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach erneuter Messung der OD₆₀₀ wurden 100 µl Proteinase K, 0,2 M EDTA (pH 8,0) und 20%-ige SDS hinzugemischt und die Lösung anschließend 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach erfolgte die Aufteilung des Gemisches auf zwei Eppendorfgefäße und die Zugabe von jeweils 1 M NaClO₄ und 1 Volumen

Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1. Nach 5 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß dekantiert, 1 Volumen Chloroform hinzupipettiert und die Suspension erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fällung des Überstandes mit 1 ml Ethanol durch 30-minütige Aufbewahrung bei -70°C und 15-minütiger Zentrifugation bei 0°C . Der Niederschlag wurde mit 300 μl TE und 4% RNase versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 mM NaCl und 0,6 Volumen Isopropanol erfolgte die Zentrifugation der Suspension für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend wurde der Niederschlag mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 200 μl TE aufgenommen.

Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken nach Qiagen

Kulturen, die über Nacht in LB_0 -Medium gewachsen waren, wurden zentrifugiert und das Sediment in 4 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 100 $\mu\text{g/ml}$ Rnase A) suspendiert. Es wurden 4 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) hinzugegeben, leicht geschüttelt und anschließend bei Zimmertemperatur 4 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P3 und sofortigem Mischen wurde die Lösung 15 – 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 30 Minuten bei 4°C . Nach Abgießen des Überstandes wurde dieser erneut bei 12000 rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und anschließend auf eine mit 4 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0,15% Triton X-100, (pH 7,0) äquilibrierte Qiagensäule 100 gegeben. Um Verunreinigungen zu entfernen wurde die Säule zweimal mit Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0) gewaschen und dann die DNA mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5) eluiert. Mit 0,7 Volumen Isopropanol wurde die DNA gefällt, dann 30 Minuten mit 9500 rpm bei 4°C zentrifugiert und vorsichtig der Überstand entfernt. Die DNA wurde mit 2 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, 5 Minuten an der Luft getrocknet und abschließend in 200 μl TE gelöst.

Hefetransformation

Die Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen wurde nach der Lithiumacetat-Methode von Ito et al. (1983) durchgeführt.

10 ml einer Hefe-Übernachtskultur wuchsen logarithmisch bis zu einer OD_{600} von 2-4. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 min (5.000 rpm bei Raumtemperatur) wurde der Überstand abgegossen und das Sediment in 50 ml sterilem TE gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (5.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur) wurde das entstandene Sediment in 1,5 ml frisch

angesetztem 1xTE/Lithiumacetat (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,5), 100 mM Lithiumacetat (pH 7,5)) gelöst, und für 1 Stunde bei 30° C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden 3 µl der zu transformierenden DNA, 27 µl TE, 5 µl Lachs-DNA, die zuvor in einem Volumen von 20 µl im Wasserbad bei 100° C für 10 Minuten denaturiert und als einzelsträngigen DNA auf Eis gestellt worden war, und 100 µl des Zellansatzes in einem sterilen Gefäß zusammengegeben und 30 min bei 30° C inkubiert. Nach Zugabe einer 60 %-igen PEG 4000 wurde die Suspension gut gemischt und eine weitere Stunde bei 30° C inkubiert. Zur Aufnahme der DNA wurden die Zellen einem Hitzeschock unterzogen (42°C für 5 min), anschließend für eine Minute zentrifugiert (5.000 rpm, Raumtemperatur) und mit 1 ml sterilem H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 5.000 rpm, Raumtemperatur) und Aufnahme der Zellen in 100 µl sterilem Wasser erfolgte das Ausstreichen der transformierten Hefezellen mittels steriler Plastikösen auf YPDA-Platten.

Bestimmung der Sauren Phosphatase-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Sauren Phosphatase erfolgte nach Haguenaer-Tsapir und Hinnen (1984).

Über Nacht in Vollmedium gewachsene Hefekulturen wurden am Morgen sowohl in thiaminarmen als auch in thiaminreichen Medium angeimpft. Nach 2 Stunden und nach jeder weiteren Stunde wurden 4 OD₆₀₀ Zellen abgenommen, abzentrifugiert und in 2 ml 0,1 M Natriumacetat (pH = 3,6) aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml zur Messung der OD₆₀₀ verwendet und 1 ml 20 mM o-Nitro-Phenylphosphat in 0,1 M Natriumacetat (pH = 3,6) 10 min bei 30° C inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 ml 1 M NaOH wurde die Reaktion beendet und nach Abzentrifugation der Zellbestandteile wurde die Absorption des Überstandes gegenüber einem Blindwert bei 410 nm photometrisch bestimmt. Die Berechnung der Aktivität der sauren Phosphatase erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität (U)} = \frac{A_{410} \cdot 1000}{\text{OD}_{600} \cdot v \cdot t}$$

A₄₁₀ = Absorption des Reaktionsgemisches bei 410 nm

t = Reaktionszeit (= 10 min)

v = Volumen der verwendeten Hefezellsuspension (= 1 ml)

OD₆₀₀ = Optische Dichte der Hefezellen bei 600 nm

Bestimmung der LacZ-Galactosidase Aktivität

Aus Übernachtskulturen in Vollmedium wurden am Morgen Zellen nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser in thiaminarmen und thiaminreichen Medien angeimpft. Nach 2 Stunden bzw. jeder weiteren Stunde wurden ca. 2 OD₆₀₀ der Zellen abgenommen, abzentrifugiert und in 1 ml Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1mM Mg₂SO₄, 40 mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Von 200 µl Zellsuspension wurde die O.D.₆₀₀ bestimmt. Die restlichen 800 µl wurden mit 50 µl 0,1% SDS und 20 µl Chloroform versetzt und 5 Minuten bei 30° C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl ONPG (ortho-Nitro-Phenyl-β-D-Galaktopyranosid) als wässrige Lösung. Nach Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 0,5 ml 1 M Natriumcarbonat beendet und nach Zentrifugation die Absorption zellfreien Lösung bei 420 nm gemessen (Guarente, 1983; Straka und Hörz, 1991). Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität (U)} = \frac{1000 \cdot A_{420}}{\text{OD}_{600} \cdot v \cdot t}$$

A₄₂₀ = Absorption des Reaktionsgemisches bei 420nm

t = Reaktionszeit

v = Volumen der verwendeten Hefezellsuspension

OD₆₀₀ = Optische Dichte der Hefezellen bei 600nm

Isolierung von Hefezellkernen

Die Präparation der Hefezellkerne erfolgte nach der modifizierten Methode nach Wintersberger et al. (1973) wie beschrieben in Almer et al. (1986).

Aus logarithmisch in Vollmedium wachsenden Vorkulturen wurden Zellen entnommen und nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser sowohl in 0,5 l thiaminarmen als auch 0,5 l thiaminreichen Medium mit OD₆₀₀ = 0.003 angeimpft. Diese Übernachtskulturen wuchsen bei 30° C bis zu einer OD₆₀₀ = 3.0 heran. Nach Zentrifugation (10 min, 3000 g, Raumtemperatur) wurden die Zellen zweimal in sterilem Wasser gewaschen und das Nassgewicht bestimmt. Anschließend wurden sie in 2 Volumen Vorinkubationslösung (0,7 M β-Mercaptoethanol; 2,8 mM EDTA) suspendiert und 30 Minuten bei 28° C geschüttelt. Nach 5 – minütiger Zentrifugation bei 5° C wurden die Zellen mit 1 M Sorbit gewaschen und anschließend in 5 Volumen 1 M Sorbit, 5 mM β-Mercaptoethanol aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von 100µl 2%-iger Zymolyase 100 T pro Gramm Naßgewicht und die Messung der Absorption einer stark verdünnten Lösung der Zellen in H₂O bei 600 nm sowohl vor als auch nach

Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei 28° C. Durch den Abfall der Werte auf 5-20% konnte das Ausmaß der Auflösung der Zellwand ermittelt werden. Die gewonnenen Sphäroblasten wurden in 1 M Sorbit gewaschen, und anschließend in 5 Volumen 18% Ficoll, 20 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0,25 mM EGTA, 0,25 mM EDTA, pH 6,8 lysiert. Bei der nachfolgenden Zentrifugation für 30 min bei 5000 g und 5° C setzten sich die Zellkerne ab, die nach Verwerfung des Überstandes eingefroren und bei -70° C aufbewahrt wurden.

DNase I und RNase Spaltung der isolierten Hefekerne

Die DNase I Spaltung der Hefekerne erfolgte wie beschrieben in Svaren et al. (1994).

Es wurde das Nassgewicht der tiefgefrorenen Hefekerne bestimmt und diese in 6-facher Menge 150 mM Tris-HCl pH 7.5, 750 mM NaCl, 30 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 , 10 mM β -Mercaptoethanol auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Kerne gewaschen, im gleichen Puffer aufgenommen und auf vier Gefäße verteilt. Es erfolgte die Spaltung der Kerne für 10 min mit 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 und 8 Einheiten DNase I/ml bei 37° C. Die Reaktion wurde mit 0.5% SDS, 4 mM EDTA und 50 mM Tris-HCl, pH 8.8 beendet. Mit 1 mg/ml Proteinase K erfolgte der Abbau der Proteine für 30 Minuten bei 37° C. Dieser Prozess wurde durch 1 M NaClO_4 (Endkonzentration) gestoppt. Durch Zugabe von 1 Volumen Phenol und 1 Volumen Isoamyl-Phenol-Chloroform in Verhältnis 1:25:24 und anschließender Zentrifugation (3 min, RT) wurde die DNA/RNA extrahiert. Es erfolgte eine Ethanol-fällung mit 2,5 Volumen 96%-igem Ethanol. Die gereinigte DNA/RNA wurde 1 Stunde bei 37° C mit RNase inkubiert. Danach wurde sie mit 200 mM NaCl und 0,6 Volumen Isopropanol gefällt, 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die fertige DNA wurde in 1 μl TE/mg Nassgewicht aufgenommen und vor Auftrennung mittels Gelelektrophorese mit geeigneten Restriktionsnukleasen nachgespalten.

Southern Blot und Hybridisierung von DNA

Nach Behandlung der Hefezellkerne (s.o.) wurden diese in Kammern mit Wasserkühlung unter einer Spannung von 100 V auf einem 1%-igen Vertikalagarosegel aufgetrennt. Der verwendete Gel- und Laufpuffer wird als Loening-Puffer bezeichnet und enthält 40 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,4 und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid. Das Gel wurde unter UV-Beleuchtung fotografiert und anschließend 20 min unter vorsichtigem Schütteln in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH denaturiert. Zur Vorbereitung des DNA Transfers wurden Nylonmembranen (Pall B) 20 min in destilliertem Wasser und 20 min in 20xStandard Saline

Citrate" (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Na₃-Citrat, pH 7,4) äquilibriert. Über Nacht erfolgte nach dem Prinzip des Kapillarblotverfahren von Southern (Southern, 1979) mit 20xSSC die Übertragung der DNA auf den Filter. Dieser wurde am nächsten Morgen zwischen Whatmanpapier luftgetrocknet und dann im Vakuumofen für 2 Stunden bei 80° C gebacken. Anschließend wurde er in einem rotierendem Zylinder bei 68° C erst 30 min in 0,5 l 3xSSC und dann 2 Stunden in 0,5 l 3xSSC/1xDenhardt Lösung (0.2 g/l BSA, 0.2 g/l Ficoll, 0.2 g/l Polyvinylpyrrolidon (Denhardt, 1966)) gewaschen. Dann erfolgte die Prähybridisierung unter Zugabe von 50 ng denaturierter Lachsspermien-DNA (10 min bei 100° C) und 26 ml 3xSSC/1xDenhardt für 2 Stunden bei 68° C. Hybridisiert wurde mit 4 ml einer radioaktiv markierten Sonde (s.u.) für 16 h bei 68° C. Anschließend wurden die Membranen mit 0,5l 2xSSC gespült und dann erst zweimal jeweils 5-10 min bei 68° C mit jeweils 0,5 l 2xSSC/1xDenhardt und dann zweimal jeweils 15-20 min bei 68° C mit jeweils 0,5 l 2xSSC und 0,5% SDS gewaschen. Zum Abschluss wurden sie nochmals mit 0,5 l 2xSSC gewaschen, bevor sie eingepackt in Haushaltsfolie unter Verwendung von Du Pont „Lightning-Plus“-Verstärkerfolien gegenüber Fuji RX Röntgenfilmen (Fuji Photo Co., Japan) für eine Stunde bis maximal 7 Tage bei -70° C exponiert wurden.

Rehybridisierung

Sollte die Membran mit einer anderen Sonde radioaktiv markiert werden, wurde die alte Sonde erst 30 min bei 42° C mit 0,4 ml 0,4 M NaOH und dann 30 min bei 42° C mit 0,4 l 0,1% SDS, 0,1xSSC und 0,2 M Tris-HCl, pH = 7,5 abgewaschen und anschließend wie oben beschrieben hybridisiert.

Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Zur Synthese von DNA – Sonden wurden Plasmidfragmente oder PCR Produkte über Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend erfolgte die radioaktive Markierung mit der „Random-Priming“-Methode mit einem Hexanukleotidgemisch nach Feinberg und Vogelstein (1983, 1984), bei der $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) verwendet wurden.

5 Zusammenfassung

Aufgaben und Veränderungen der Chromatinstruktur im Rahmen der Regulation der Transkription stellen ein interessantes Forschungsgebiet dar. Seit der Entschlüsselung der dreidimensionalen Anordnung der DNA in Form einer Doppelhelix durch James D. Watson und Francis Crick in den 50-iger Jahren wuchs das Verständnis von Aufbau und Funktion der DNA sprunghaft an. Man weiß heute, dass die kompakte Struktur des Chromatins nicht ausschließlich dazu dient, die DNA in den Zellkern zu verpacken, sondern ebenso eine dynamische Rolle in der Regulation der Transkription spielt.

Zwei Mechanismen, die Veränderungen der Chromatinstruktur bewirken können, stehen im Vordergrund des Forschungsinteresses. Der eine Vorgang führt über eine Acetylierung der Histone an ihren N-terminalen Extensionen zu einer Reduktion der Affinität zwischen DNA und Histonen und schafft spezifische Bindungsplätze für Regulationsfaktoren. Ein Faktor, der über Histonacetylierung die Transkription stimuliert, ist Gcn5. Der andere Mechanismus bewirkt die Umformung des Chromatins (chromatin remodelling) über einen ATP-abhängigen Vorgang. Swi-Snf ist ein Beispiel für einen solchen Chromatinremodellingkomplex, der unter Energiegewinnung aus der Hydrolyse von ATP die Interaktion zwischen Histonen und DNA destabilisiert, nukleosomenfreie Regionen erzeugt und damit zu einer gesteigerten Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren führt.

Ein ideales Modell für die Untersuchung der Genexpression in einem komplexen Netzwerk von Regulationsfaktoren stellt das PHO System in Hefe dar. Zu diesem gehören das *PHO5*, das *PHO10* und das *PHO11* Gen, die drei Isoenzyme der sauren Phosphatase kodieren. Da mehr als 90% der sauren Phosphataseaktivität durch das *PHO5* Genprodukt zur Verfügung gestellt wird, haben sich Experimente auf seine Regulation konzentriert. Es ist das am besten untersuchte strukturelle Gen im Phosphatase System.

Das *PHO3* Gen, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt, ist der chromosomale Nachbar von *PHO5*. Zwischen beiden bestehen große Homologien sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene. Das *PHO3* Gen kodiert für eine saure Phosphatase, deren Funktion in der Hydrolyse von Thiaminphosphat zu Thiamin besteht, bevor dieses in die Zellen aufgenommen wird. Die Expression des *PHO3* Gens kann durch einen Thiaminmangel induziert werden, wobei die regulatorischen Gene *PHO6* (*THI2*) und *PHO7* (*THI3*) eine Rolle spielen. Reprimiert wird es durch Thiamin, Hda1, Rpd3 und Methylmethansulfonat.

In dieser Arbeit sollte die Abhängigkeit des *PHO3* Promotors von den Faktoren Swi-Snf, Gcn5, Pho6 und dem Transkriptionsaktivator Gcr1 sowie Veränderungen der Chromatinstruktur des *PHO3* Promotors im aktivierten und supprimierten Zustand untersucht werden.

Dazu wurde zum einen ein Hefestamm mit einer Disruption bzw. Inaktivierung des *PHO6* Gens erzeugt. Diese Mutante diente dazu, die positive Rolle von Pho6 zu bestätigen und für folgende Versuche eine Negativ-Kontrolle zur Verfügung zu haben. Zu diesem Zweck wurde ein Fragment kloniert, das zum einen die ursprüngliche Sequenz des *PHO6* Gens und zum anderen das *URA3*-Gen enthielt. Dabei wurde das *URA3*-Gen so in die *PHO6* Sequenz eingebaut, dass die *PHO6* Enden ausreichend lange Flanken für die Rekombination darstellen, während das *URA3*-Gen sowohl für die Ausschaltung der Funktionsfähigkeit des *PHO6* Gens sorgte, als auch die Selektion der gesuchten Kolonien sicherstellte. Der *PHO6*-Disruptionsstamm wurde über den sogenannten „Ein-Schritt“ – Genaustausch im Hefegenom hergestellt, bei dem eine homologe Paarung der chromosomalen Zielsequenz und der eingebrachten linearen DNA stattfindet, auf die ein doppeltes Rekombinationsereignis mit Austausch der Sequenzen folgt.

Zum anderen wurde ein Vektor kloniert, mit dem die Aktivität des *PHO3* Promotors in Hefe bestimmt werden konnte. Dieser enthielt sowohl die *PHO3* Promotor Region, die mittels PCR synthetisiert worden war, als auch das Reporter-gen LacZ zur Aktivitätsbestimmung. Der Vektor wurde in verschiedene Hefestämme transformiert. Diese wurden in thiaminhaltigem Medium als auch in Medium ohne Thiamin angezogen und anschließend LacZ-Galactosidase und Phosphatasemessungen durchgeführt. Die Wildtypstämme YS 18 und CY 337 zeigten eine Induzierbarkeit des *PHO3* Promotors unter Thiaminmangel. Der *pho6*-Disruptionsstamm, der *gcr1*-Stamm sowie der CY407 Stamm, dem die ATPase Untereinheit des Swi-Snf Komplexes fehlt, zeigten keinen Anstieg der Aktivität, was eine Abhängigkeit der Aktivierung des *PHO3* Promotors von Pho6, Gcr1 und Swi-Snf erkennen ließ. Die Messergebnisse am YS5189 Stamm, dem die Histonacetyltransferase Gcn5 fehlt, ließen darauf schließen, dass keine Abhängigkeit des *PHO3* Promotors von Gcn5 besteht.

Für die Untersuchungen der Chromatinstruktur des *PHO3* Promotors wurde eine DNase I Spaltung und indirekte Endmarkierung von präparierten Hefekernen durchgeführt. Dazu wurde durch Rekombination ein Hefestamm mit eindeutiger Bindungsregion für eine Sonde hergestellt, die bereits in früheren Experimenten zur Darstellung des *PHO5* Promotors verwendet worden war. Das hierfür konstruierte lineare Fragment bestand an dessen

3`Ende aus dem *PHO3* Promotor und an seinem 5`Ende aus einer 250 bp langen Sequenz, die sich 1600 bp stromaufwärts des *PHO5* Promotors zwischen den Spaltstellen *StuI* und *Clal* befindet. Zusätzlich wurde in dieses Fragment ein *URA3*-Gen zur Selektion integriert. Nach dem „Ein-Schritt“-Genaustausch konnte die Chromatinstruktur des *PHO3* Promotors durch Nukleasespaltung beurteilt werden. Diese ergab im reprimierten und im induzierten Zustand ein im Wesentlichen identisches Bandenmuster, das den Aufbau des *PHO3* Promotors aus lokalisierten Nukleosomen nahe legte, ohne dass eine deutliche Veränderung im Rahmen der Aktivierung der Transkription eintrat.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Regulation der Genexpression am *PHO3* Promotor von Pho6, Swi-Snf und Gcr1 abhängt. Außerdem zeigt sich ein Nukleasespaltmuster, das den Aufbau des *PHO3* Promotors aus lokalisierten Nukleosomen nahe legte. Bei der Induktion der Transkription wurde hier keine Veränderung der Chromatinstruktur beobachtet. Diese Ergebnisse machen den *PHO3* Promotor zu einem interessanten, gut induzierbaren Modellsystem, an dem das Zusammenspiel einzelner Transkriptionsfaktoren untersucht werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Agalioti, T., Chen, G. and Thanos, D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111 :381-392, 2002.

Allfrey, V.G., Faulkner, R. and Mirsky, A.E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51:786-794, 1964.

Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A. and Hörz, W. Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* 5:2689-2696, 1986.

Almer, A. and Hörz, W. Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the *PHO5/PHO3* locus in yeast. *EMBO J.* 5(10):2681-2687, 1986.

Armstrong, J.A., Bieker, J.J. and Emerson, B.M. A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* 95:93-104, 1998.

Axelrod, J.D., Reagan, M.S. and Majors, J. GAL4 disrupts a repressing nucleosome during activation of GAL1 transcription in vivo. *Genes Dev.* 7:857:869, 1993.

Bajwa, W., Meyhack, B., Rudolph, H., Schweingruber, A.M., Hinnen, A. Structural analysis of the two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast. *Nucleic Acids Res.* 12(20):7721-39, 1984.

Baker, H.V. GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(21):9443-7, 1991.

Bannister, A.J. and Kouzarides, T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384:641-643, 1996.

Barbaric, S., Fascher, K.D., Hörz, W. Activation of the weakly regulated PHO8 promoter in *S. cerevisiae*: chromatin transition and binding sites for the positive regulatory protein PHO4. *Nucleic Acids Res. (England)* 20(5):1031-1038, 1992.

Barbaric, S., Munsterkotter, M., Svaren, J., Hörz, W. The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter. *Nucleic Acids Res.* 24(22):4479-86, 1996.

Barbaric, S., Münsterkötter, M., Goding, C., Hörz, W. 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. (United States)* 18(5):2629-2639, 1998.

Barbaric, S., Walker J., Schmid, A., Svejstrup, J.Q., Hörz, W. Increasing the rate of chromatin remodeling and gene activation--a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *EMBO J.* 2001 Sep 3;20(17):4944-51.

- Bazett-Jones, D.P., Côté J., Landel, C.C., Peterson, C.L. and Workman, J.L. The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol. Cell. Biol.* 19:1470-1478, 1999.
- Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 83(6):851-7, 1995.
- Berger, S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Agapite, J., Regier, J.L., Triezenberg, S.J. and Guarente, L. Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* 70:251-265, 1992.
- Bertram, S. und Gassen, H.G. *Gentechnische Methoden*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York, 1991.
- Biggar, S.R., Crabtree, G.R. Continuous and widespread roles for the Swi-Snf complex in transcription. *EMBO J.* 18(8):2254-64, 1999.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523, 1979.
- Breathnach, R. und Chambon, P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* 50:349-83, 1981.
- Brown, T.A. *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH 2002. 3.Auflage
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84:843-851, 1996.
- Candau, R., Zhou, J.X., Allis, C.D. and Berger, S.L. Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function in vivo. *EMBO J.* 16:555-565, 1997.
- Chavez, S., Beato, M. Nucleosome-mediated synergism between transcription factors on the mouse mammary tumor virus promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7):2885-90, 1997
- Clifton, D. and Fraenkel, D.G. The gcr (glycolysis regulation) mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256:13074-13078, 1981.
- Clifton, D., Weinstock, S.B. and Fraenkel, D.G. Glycolysis mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 88:1-11, 1978.
- Cohen, S.N. und Chang, A.C. A method for selective cloning of eukaryotic DNA fragments in *Escherichia coli* by repeated transformation. *Mol. Gen. Genet.* 134(2):133- 41, 1974.
- Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97:299-311, 1999.
- Costlow, N.A., Simon, J.A., Lis, J.T. A hypersensitive site in hsp70 chromatin requires adjacent not internal DNA sequence. *Nature (England)* 313(5998) :147-149, 1985.
- Côté J., Quinn J., Workman, J.L. and Peterson, C.L. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265:53-60, 1994.

- Côté, J., Peterson, C.L and Workman, J.L. Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4947-4952, 1998.
- Dagert, M. and Ehrlich, S.D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli*. Cells. Gene (1):23-81979, 1979.
- Denhardt, D.T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem Biophys Res. Commun. 23(5):641-6, 1966.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. Structure and ligand of a histone acetaltransferase bromodomain. Nature 399:491-496, 1999.
- Durrin, L.K., Mann, R.K., Grunstein, M. Nucleosome loss activates CUP1 and HIS3 promoters to fully induced levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. 12(4):1621-9, 1992.
- Elgin, S.C.R. DNase I-hypersensitive sites of chromatin. Cell 27:413-415, 1981.
- Elgin, S.C.R. Anatomy of hypersensitive sites. Nature 309:213-214, 1984.
- Emerson, B.M. and Felsenfeld, G. Specific factor conferring nuclease hypersensitivity at the 5' end of the chicken adult beta-globin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1):95-99, 1984.
- Emerson, B.M., Lewis, C.D., Felsenfeld, G. Interaction of specific nuclear factors with the nuclease-hypersensitive region of the chicken adult beta-globin gene: nature of the binding domain. Cell (United States) 41(1):21-30, 1985.
- Fascher, K.D., Schmitz, J, Hörz W. Structural and functional requirements for the chromatin transition at the *PHO5* promoter in *Saccharomyces cerevisiae* upon *PHO5* activation. J Mol Biol. 1993 Jun 5;231(3):658-67.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. (United States) 132(1):6-13, 1983.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. „A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity“. Addendum. Anal. Biochem. (United States) 137(1):266-267, 1984.
- Felsenfeld, G. Chromatin unfolds. Cell 86:13-19, 1996.
- Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Nowock, J., Stech-Jurk, U., Theisen, M., Sippel, A.E. Alternative sets of DNase I-hypersensitive sites characterize the various functional states of the chicken lysozyme. Nature (England) 311(5982) :163-165, 1984.
- Gaudreau, L., Schmid, A., Blaschke, D., Ptashne, M., Horz, W. RNA polymerase II holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast *PHO5* promoter. Cell. 4;89(1):55-62, 1997.
- Georgakopoulos, T. and Thireos, G. Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the yeast GCN5 protein to promote normal levels of transcription. EMBO J. 11:4145-4152, 1992.

- Grant, P.A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candou, R., Ohba, R., Owen, H.T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. Workman, J.L. 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, 1997.
- Gregory, P.D. and Hörz, W. Life with nucleosomes:chromatin remodelling in gene regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10(3):339-344, 1998.
- Gregory, P.D., Schmid, A., Zavari, M., Lin, L., Berger, S.L. and Hörz, W. 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, 1998b.
- Gregory, P.D., Schmid, A., Zavari, M., Münsterkotter, M., Hörz, W. Chromatin remodelling at the *PHO8* promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* 18(22):6407-6414, 1999.
- Gu, W. and Roeder, R.G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90:595-606, 1997.
- Guarente, L. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of clones genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101 p181-192, 1983.
- Guarente, L. Yeast promoters:positive and negative elements. *Cell*, 36:799-800, 1984.
- Haguenauer-Tsapis, R., and Hinnen A. A deletion that includes the signal peptidase cleavage site impairs processing, glycosylation, and secretion of cell surface yeast acid phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 4:2668-2675, 1984.
- Han, M und Grunstein, M. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell.*55(6):1137-45, 1988.
- Hassan, A. H., Neely, K.E., Workman, J.L. Histone acetyltransferase complexes stabilize Swi/Snf binding to promoter nucleosomes. *Cell*, 104(6):817-827, 2001.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., Workman, J.L. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter. *Cell (United States)* 111(3):369-379, 2002.
- Hershey, A.D. and Chase, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Pysiol.* 36:39-56, 1952.
- Holland, J.P., Labieniec, L., Swimmer, C. and Holland, M.J. Homologous nucleotide sequences at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* 258:5291-5299, 1983.
- Holland, M..J., Yokoi, T., Holland, J.P., Myambo, K. and Innis, M.A. The GCR1 gene encodes a positive transcriptional regulator of the enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Bio.* 7:813-820, 1987.
- Holstege, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. and Young, R.A. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95:717-728, 1998
- Horn, P.J., Peterson, C.L. Molecular biology. Chromatin higher order folding-wrapping up transcription. *Science* 297:1824-1827, 2002.

- Huang, Z.Q., Li, J., Sachs, L.M., Cole, P.A., Wong, J. A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *EMBO J.* 22(9):2146-2155, 2003.
- Huie, M.A., Scott, E.W., Drazinic, C.M. et al. Characterization of the DNA-binding activity of GCR1: in vivo evidence for two GCR1-binding sites in the upstream activating sequence of TPI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12(6):2690-2700, 1992.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168, 1983.
- Iwashima, A. and Nose, Y. Regulation of thiamine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 128:855-857, 1976.
- Iwashima, A., Nishimura, H. and Nose, Y. Soluble and membrane-bound thiamine-binding proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 577:460-468, 1979.
- Iwashima, A. and Nishimura, H. Isolation of a thiamine-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 577:217-220, 1979.
- Jackson, D.A., Symons, R.H., Berg, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (United States)*, 69(10):2904-2909, 1972.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., Tjian, R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science (United States)* 288(5470):1422-1425, 2000.
- Jelinsky, S.A. and Samson, L.D. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1486-1491, 1999.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. Translating the histone code. *Science (United States)* 293(5532):1074-1080, 2001.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13:2339-2352, 1999.
- Kornberg, R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184(139):868-871, 1974.
- Kornberg, R. The location of nucleosomes in chromatin: specific or statistical. *Nature.* 292(5824):579-80, 1981.
- Kossel, A. Ueber einen peptoartigen bestandheil des zellkerns. *Z. Physiol. Chem.* 8:511-515, 1884.
- Krebs, J.E., Kuo, M.H., Allis, C.D. and Peterson, C.L. Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev.* 13:1412-1421, 1999.
- 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. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383:269-272, 1996.

- Kuo, M.H., Zhou, J. Jambeck, P., Chruchill, M.E.A. and Allis, C.D. Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev.* 12:627-639, 1998.
- Kwon, H., Imbalzano, A.N., Khavari, P.A., Kingston, R.E. and Green, M.R. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature* 370:477-481, 1994.
- Laurent, B.C. Treich, I. and Carlson, M. The yeast SNF2/SWI2-protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* 7:583-591, 1993.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72:73-84, 1993.
- Lewin, B. *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum akademischer Verlag Heidelberg Berlin, 2002.
- Linn, S., Arber, W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59:1300-1306, 1968.
- Linxweiler, W., Horz, W. Reconstitution of mononucleosomes: characterization of distinct particles that differ in the position of the histone core. *Nucleic Acids Res.* 12(24):9395-413, 1984.
- Löffler, G., Petrides, P. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 6.Auflage, 1998.
- Logie, C. and Peterson, C.L. Catalytic activity of the yeast SWI/SNF complex on reconstituted nucleosome arrays. *EMBO J.* 16(22):6772-6782, 1997.
- Logie, C., Tse, C., Hansen, J.C. and Peterson, C.L. The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry* 38:2514-2522, 1999.
- Lohr, D. Organization of the GAL1-GAL10 intergenic control region chromatin. *Nucleic Acids Res. (England)* 12(22):8457-8474, 1984.
- Lopez, M.C., Baker, H.V. Understanding the growth phenotype of the yeast gcr1 mutant in terms of global genomic expression patterns. *J. Bacteriol.* 182(17):4970-4978, 2000.
- Lorch, Y., Zhang, M., Kornberg, R.D. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96:389-392, 1999.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389, 251-260, 1997.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- Marcus, G.A., Silverman, N., Berger S.L., Horiuchi, J. and Guarente, L. Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *EMBO J.* 13:4807-4815, 1994.
- McGhee, J.D., Wood, W.I., Dolan, M., Engel, J.D., Felsenfeld, G.A. A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult beta-globin gene is accessible to nuclease digestion. *Cell (United States)*, 27(1Pt 2):45-55, 1981.

Meselson, M., Stahl F.W. The replication of DNA in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 44:671-682, 1958.

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., et al. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. Cell 87:1261-1270, 1996.

Muchardt, C. and Yaniv, M. ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. J. Mol. Biol. 293:187-198, 1999.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350, 1987.

Neef, DW and Kladde, MP. Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of *PHO5*. Mol Cell Biol. 2003 Jun;23(11):3788-97.

Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L., Workman, J.L. Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. Mol. Cell. Biol. 22(6):1615-25, 2002.

Neigeborn, L. and Carlson, M. Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 108:845-858, 1984.

Nedospasov, S.A., Georgiev, G.P. Non-random cleavage of SV40 DNA in The compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:532-39, 1980.

Nishimura, H., Kawasaki, Y., Kaneko, Y., Nosaka, K., Iwashima, A. A positive regulatory gene, *THI3*, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 174(14):4701-4716, 1992.

Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H. and Iwashima, A. A possible role for acid phosphatase with thiamin-binding activity encoded by *PHO3* in yeast. FEMS Microbiol. Lett. 60:55- 60, 1989.

Nosaka, K., Yamanishi, K., Nishimura, H. and Iwashima, A. Upstream activation element of the *PHO3* gene encoding for thiamin-repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 305:244-248, 1992.

Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H. and Iwashima, A. Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 268(23):17440-17447, 1993.

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell 87, 953-959, 1996.

Oshima, Y. In the molecular biology of the yeast *saccharomyces*: metabolism and gene expression. Strathern, J.N. et al. (eds). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 159-180, 1982.

Owen-Hughes, T., Utley, R.T., Côté J., Peterson, C.L. and Workman, J.L. Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex. Science 273:513-516, 1996.

- Pavlovic, B. and Hörz, W. The chromatin structure at the promoter of a glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae* reflects its functional state. *Mol. Cell. Biol.* 12(8):5513-5520, 1988.
- Pazin, M.J., Kadonaga, J.T. SWI2-SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell* 88:737-740, 1997.
- Pennisi, E. Opening the way to gene activity. *Science* 275:155-157, 1997.
- Peterson, C.L. Multiple SWItches to turn on chromatin? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:171-175, 1996.
- Peterson, C.L. and Workman, J.L. Promotor targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:187-192, 2000.
- Phelan, M.L., Schnitzler, G.R. and Kingston, R.E. Octamer transfer and creation of stably remodeled nucleosomes by human SWI/SNF and its isolated ATPases. *Mol. Cell. Biol.* 20:6380-6389, 2000.
- Phillips, D.M.P. and Johns, E.W. A fractionation of the histones of groups F2a from calf thymus. *Biochem. J.* 94:127-130, 1965.
- Pollard, K.J., Peterson, C.L. Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 17:6212-6222, 1997.
- Proffitt, J.H. DNase I-hypersensitive sites in the galactose gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol. (United States)* 5(6):1522-1524, 1985.
- Quinn, J., Fyrberg, A.M., Ganster, R.W., Schmidt, M.C., Peterson, C.L. DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 379(6568):844-847, 1996.
- Reinke, H., Gregory, P.D., Horz, W. A transient histone hyperacetylation signal marks nucleosomes for remodeling at the PHO8 promoter in vivo. *Mol Cell.* 7(3):529-38, 2001.
- Richmond, E. and Peterson, C.L. Functional analysis of the DNA-stimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2. *Nucleic Acids Res.* 24:3685-3692, 1996.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 70:81-120, 2001.
- Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Suka, N., Turner, B.M. and Grunstein, M. Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* 392:831-835, 1998.
- Rupp, S. LacZ assays in yeast. *Methods Enzymol (United States)*, 350:112-131, 2001.
- Ryan, M.P., Jones, R., Morse, R.H. SWI-SNF complex participation in transcriptional activation at a step subsequent to activator binding. *Mol. Cell. Biol.* 18(4):1774-17782, 1998.
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Soffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988.

Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., McMahon, S.B., Litchfield, D.W., Yates, J.R., Lees-Miller, S.P., Cole, M.D. and Brandl, C.J. Tra1p is a component of the yeast AdaSpt transcriptional regulatory complexes. *J. Biol. Chem.* 273:26559-26565, 1998.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 1989.

Santangelo, G.M. and Tornow, J. Efficient transcription of the glycolytic gene ADH1 and three translational component genes requires the GCR1 product, which can act through TUF/GRF/RAP binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 10:859-862, 1990.

Schweingruber, E.M., Fluri, R., Maundrell, K., Schweingruber, A.M. and Dumermuth E. Identification and characterization of thiamin repressible acid phosphatase in yeast. *J. Biol. Chem.* 261:15877-15882, 1986.

Scott, E.W., Allison, H.E., Baker, H.V. Characterization of TPI gene expression in isogenic wild-type and *gcr1*-deletion mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18(23):7099-7107, 1990.

Sengstag, C. and Hinnen, A. The sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* gene PHO2 codes for a regulatory protein with unusual aminoacid composition. *Nucleic Acids Res. (England)*, 15(1):233-246, 1987.

Serfling, E., Jasin, M., Schaffner, W. Enhancers and eucaryotic gene transcription. *Trends Genet.* 1:224-230, 1985.

Smith H. O., Wilcox, K.W. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51:379-391, 1970.

Southern, E. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* 68:152-176, 1979.

Stafford, G.A., Morse, R.H. Chromatin remodeling by transcriptional activation domains in a yeast episome. *J Biol Chem.* 272(17):11526-34, 1997.

Stern, M., Jensen, R. and Herskowitz, I. Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J. Mol. Biol.* 178:853-868, 1984.

Straka, C., Hörz, W. A functional role for nucleosomes in the repression of a yeast promoter. *EMBO J.* 10:361-368, 1991.

Svaren, J., Schmitz, J., Hörz, W. The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the *PHO5* promoter. *EMBO J.* 13:4856-4862, 1994.

Svaren, J., Hörz, W. Interplay between nucleosomes and transcription factors at the yeast *PHO5* promoter. *Semin. Cell Biol.* 6:177-183, 1995.

Svaren, J., Venter, U., and Hörz, W. In vivo analysis of nucleosome structure and transcription factor binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Gene Techniques* 6:153-167, 1995.

Svaren, J. and Hörz, W. Transcription factors vs nucleosomes: regulation of the *PHO5* promoter in yeast. *Trends Biochem. Science* 22:93-97, 1997.

- Toh-e, A., Kakimoto, S. and Oshima, Y. Two new genes controlling the constitutive acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 141:81-83, 1975.
- Tornow, J., Zeng, X., Gao, W. and Santangelo, G.M. GCR1, a transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*, complexes with RAP1 and can function without its DNA binding domain. *EMBO J.* 12(6):2431-7, 1993.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Hache, R.J., Beato, M. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* 14(8):1737-51, 1995.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P. and Hansen, J.C. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 18:4629-2638, 1998.
- Uemura, H. and Jigami, Y. Role of GCR2 in transcriptional activation of yeast glycolytic genes. *Mol. Cell. Biol.* 12(9):3834-3842, 1992.
- Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G. and Wolffe A.P. Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone dependent transcriptional repression. *EMBO J.* 16:2096-2107, 1997.
- Utey, R.T., Cote, J., Owen-Hughes, T., Workman, J.L. SWI/SNF stimulates the formation of disparate activator nucleosome complexes but is partially redundant with cooperative binding. *J. Biol. Chem.* 272:12642-12649, 1997.
- Vettese-Dadey, M., Grant, P.A., Hebbes, T.R., Crane-Robinson, C., Allis, C.D. and Workman, J. L. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.* 15, 2508-2518, 1996.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E. and Workman, J.L. ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20:1899-1910, 2000.
- Wade, P.A., Pruss, D., Wolffe, A.P. Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem. Sci.* 22:128-132, 1997.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738, 1953.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. *Rekombinierte DNA*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford, 2.Auflage, 1993.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B.R., White, M.F., Workman, J.L. and Owen-Hughes, T. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400:784-787, 1999.
- Wintersberger, U., Smith, P. and Letnansky, K. Yeast chromatin. Preparation of isolated nuclei, histone composition and transcription capacity. *Eur. J. Biochem.* 33:123-130, 1973.
- Wolffe, A.P. Transcription: in tune with the histones. *Cell* 77:13-16, 1994.
- Wolffe, A.P. Transcriptional control: sinful repression. *Nature* 387:16-17, 1997.
- Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* 27:711-720, 1999.

Wong, J., Shi, Y.B., Wolffe, A.P. 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(11):3158-71, 1997.

Workman, J.L. and Kingston, R.E. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67:545-579, 1998.

Wu, C The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* 286:854-860, 1980.

Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., Nakatani, Y. A p300/CBP associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382:319-324, 1996.

Yu, Y., Eriksson, P., Stillman, D.J. Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Mol. Cell Biol.* 20(7):2350-2357, 2000.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
d.h.	das heißt
DNA	2`Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
HAT	Histonacetyltransferase
h	Stunde
kb	kilo Basenpaar(e)
kDa	kilo Dalton
min	Minuten
N-	Amino
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tris	α,α,α ,-Tris-(hydroxymethyl)methylamin
U	Einheiten
UAS	upstream activating sequence
UAS _{RPG}	upstream activating sequence in ribosomal protein genes
% w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

8 Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfram Hörz bedanke ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas sowie seine hervorragende Betreuung. Mein Dank gilt vor allem seiner unermüdlichen, freundlichen und immer geduldigen Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich ganz besonders bei Philip Gregory für seine Hilfestellungen, sowie der jederzeitigen Ansprechbarkeit bei der experimentellen Laborarbeit.

Hans Reinke danke ich für methodische Anleitungen sowie seine geduldige Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Bei Andrea, Dorle, Maasoumeh und Horst bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die praktische Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Darüberhinaus möchte ich Philipp Korber für seine schnelle und unkomplizierte Korrektur der Doktorarbeit bedanken.

9 Lebenslauf

8.2.1977 geboren in Freising

Ausbildung:

Juli 1997 Abitur am Gymnasium München-Moosach

10/1997 – 11/2003 Studium der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Examina:

03/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Doktorarbeit:

09/1999-10/2000 Thema: „Chromatinstruktur und Regulation der
Genexpression des *PHO3* Promotors in *Saccharomyces
cerevisiae*“ bei Prof. Dr. W. Hörz, LMU München

Praktisches Jahr:

10/2002-02/2003 Chirurgie
Krankenhaus Dritter Orden, München
Allgemein-, Gefäß- und Schilddrüsenchirurgie

02/2003-06/2003 Pathologie
Pathologisches Institut der LMU München

06/2003-09/2003 Innere Medizin
Städtisches Krankenhaus München-Harlaching
IV. Medizinische Abteilung (Hämatologie, Onkologie)

Anstellung:

Seit 04/2004 Ärztin im Praktikum/ Assistenzärztin
Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. R. Büttner