Aus dem Adolf-Butenandt-Institut,
Lehrstuhl: Molekularbiologie

Vorstand:
Prof. Dr. P. B. Becker

Thema:

Einfluß der Chromatinumgebung auf die Genregulation durch den Transkriptionsfaktor Sin4 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

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

vorgelegt von
Daniel Franke
aus
Kiel

2003

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Hörz
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. V. Heinemann Priv. Doz. Dr. M. Storm
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	09.10.2003

Herrn Prof. Dr. W. Hörz gebührt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau und P. B. Becker bedanke ich mich für die Arbeitsmöglichkeit am Institut und die Unterstützung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Dorothea Blaschke, Hans Reinke, Andrea Schmid, Maasoumeh Zavari und Gabi Combriati danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung 1

II. Ergebnisse 9

II.1. Isolierung und Klonierung zufällig ausgewählter 1kb-DNA-Fragmente aus *S. cerevisiae* und *E. coli* 9

II.2. Beurteilung der Ligierungen durch DNA-Analysen 10

II.3. Transformation der Plasmide in einen *sin4*- Hefestamm (YS88) und Messung der Phosphataseaktivitäten 12

II.4. Herstellung und Untersuchung weiterer Klone, in deren Plasmide ein Hefe-DNA-Fragment integriert wurde 13

II.5. Vergleich der aus den *sin4*-Zellen zurück gewonnenen Plasmide mMit Hilfe von Restriktionsspaltungen 15

II.6. Bestimmung der Phosphataseaktivitäten der einzelnen Plasmide in *sin4*- und *SIN4*-Zellen in Flüssigmedien 16

II.7. Untersuchung von DNA-Fragmenten einer weiteren Bakterienart 17

II.8. Sequenzierung der positiv getesteten Hefe-DNA-Fragmente 19

II.9. Kontrollmessungen der Pho5-Aktivitäten 25

II.10. Vergleich der DNA-Sequenzen 27

III. Diskussion 29

III.1. Unterschiede zwischen den DNA-Fragmenten 30

III.2. Untersuchung der 9 positiv getesteten Hefe-DNA-Fragmenten auf Gemeinsamkeiten 33

III.3. Liefern die Resultate dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Eigenschaften von Sin4? 35

III.4. Vorsicht bei der Verwendung von Reporter-Genen 36

IV. Material und Methoden 38

IV.1. Material 38

IV.1.1. Chemikalien und Enzyme 38

IV.1.2. Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide und DNA 38

IV.2. Methoden 39

IV.2.1. Kulturtechniken 39

IV.2.1.1. Steriles Arbeiten mit Bakterienkulturen und *Saccharomyces cerevisiae* 39

IV.2.1.2. Anzucht von Bakterienkulturen 40
IV.2.1.3. Anzucht von Hefekulturen 40
IV.2.2. DNA-Arbeitstechniken 40
IV.2.2.1 DNA-Mini-Präparation von Plasmid-DNA nach dem Qiagen-Protokoll 40
IV.2.2.2. Isolierung von genomischer Hefe-DNA 41
IV.2.2.3 Klonierungstechniken 42
IV.2.3. Transformation von Bakterienzellen 42
IV.2.3.1. Osmotische Transformation 42
IV.2.3.2. Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation 42
IV.2.3.3. Elektroporation 43
IV.2.4. Transformation von *S. cerevisiae* 43
IV.2.5. Bestimmung der Sauren Phosphatase-Aktivität von Hefezellen in Flüssigmedium 44
IV.2.6. Bestimmung der Sauren Phosphatase-Aktivität von Hefezellen auf Agarplatten 44
IV.2.7. DNA-Sequenzierung 45
IV.2.8. Anfertigung eines Sequenzgels und Durchführung der Gelelektrophorese 45
IV.2.9. Computeranalysen 46

V. Zusammenfassung 47

VI. Literaturverzeichnis 50

VII. Abkürzungen 62

VIII. Lebenslauf 63

I. Einleitung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) nimmt als Träger der genetischen Erbinformation eine zentrale Rolle in der heutigen Biologie ein. DNA besteht aus zwei komplementären Polynukleotidsträngen, die die Struktur einer Doppelhelix besitzen (Watson und Crick, 1953). Bei der Verdoppelung (Replikation) der DNA werden vor der Zellteilung an beiden Polynukleotidsträngen neue komplementäre DNA-Ketten synthetisiert. Dadurch wird die genetische Information identisch an die nächste Zellgeneration weitergegeben.
Die Information über die Aminosäuresequenz eines zellulären Proteins ist im entsprechenden Gen durch die Reihenfolge der Nukleotide gespeichert, wobei drei aufeinander folgende Nukleotide eine Aminosäure determinieren. Beim Ablesen des Gens (Transkription) bindet eine RNA-Polymerase an eine spezifische Stelle des DNA-Strangs stromaufwärts vom kodierenden Genabschnitt. Dieser Bereich bestimmt den Startpunkt der Transkription und wird als Promotor bezeichnet. Anschließend läuft die RNA-Polymerase entlang des DNA-Strangs bis zu einem Terminationssignal. Die hierbei synthetisierte DNA-Kopie aus Ribonukleinsäure (RNA) dient Ribosomen als Matrize zur Herstellung der Aminosäurenkette des Proteins (Translation) (Alberts et al., 1997).

Eine Zelle passt ihre Proteinsynthese ständig den herrschenden Bedingungen an. Auf der Ebene der DNA findet diese Anpassung meist durch Regulation der Transkription statt. Neben der Entschlüsselung der Genome verschiedenster Organismen ist die Untersuchung der Genregulation in der heutigen Zellbiologie eine zentrale Frage. Untersuchungen an *Escherichia coli* haben zum Verständnis von Transkription und Genregulation wesentlich beigetragen. Die bakterielle RNA-Polymerase besteht aus mehreren Untereinheiten, von denen die Sigma-Untereinheit die Polymerase zum Promotor führt (Borukhov und Severinov, 2002). *E. coli* kann verschiedene Sigma-Untereinheiten exprimieren, die unterschiedliche Promotoren erkennen. Dadurch kann die Zelle durch einfachen Austausch der Sigma-Untereinheiten eine ganze Reihe von Genen an- bzw. abschalten. Durch Untersuchungen der Promotorsequenzen von *E. coli* hat man zwei Bereiche entdeckt, die in den meisten Promotoren mehr oder weniger identisch sind. Diese zwei Consensus-Sequenzen liegen im Bereich von 10 bzw. 35 Basenpaaren stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt und ähneln sich besonders bei starken Promotoren (Travers, 1987). Weitere wichtige Bestandteile eines Promotors sind kurze DNA-Sequenzen, die spezifischen Gen-Regulatorproteinen als Erkennungsstelle dienen. Ein relativ einfaches Beispiel für die Funktionsweise der

Regulatorproteine ist der Tryptophan-Repressor (Pittard, 1996). *E. coli* besitzt fünf Enzyme zur Synthese von Tryptophan, die alle vom selben Promotor transkribiert werden. Es kommt aber nur zur Transkription, wenn kein Tryptophan im Medium vorhanden ist. Reguliert wird die Transkription durch ein Gen-Regulatorprotein, das spezifisch an eine DNA-Sequenz innerhalb des Promotors binden kann. Bindet das Regulatorprotein an diesen so genannten Operator, blockiert es der RNA-Polymerase den Zugang zum Promotor und verhindert dadurch die Expression der Enzyme. Das Gen-Regulatorprotein kann aber nur an den Operator binden, wenn es selber Tryptophan gebunden hat. Dadurch wird die Transkription der Tryptophan synthetisierenden Enzyme in Gegenwart der Aminosäure abgeschaltet.

Ein etwas komplizierterer Mechanismus der Transkriptionskontrolle stellt das *lac*-Operon zur Regulation des Galaktosestoffwechels in *E. coli* dar (Beckwith, 1987; Weikert und Adhya, 1993). Das *lac*-Operon kodiert für Enzyme, die es der Zelle ermöglichen, Lactose in die Zelle zu transportieren und bei Glucosemangel als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Expression dieser Enzyme ist für die Zelle aber nur sinnvoll, wenn Glucosemangel herrscht, und gleichzeitig Lactose im Medium vorhanden ist. Die Regulation des *lac*-Operons hängt von zwei voneinander unabhängigen Gen-Regulatorproteinen ab. Das eine Regulatorprotein bindet nur bei Glucosemangel eine spezielle DNA-Sequenz des Promotors. Erst die Anlagerung des Regulatorproteins ermöglicht es der RNA-Polymerase, an den Promotor zu binden. Dadurch ist der Promotor bei Vorhandensein von Glucose abgeschaltet. Das andere Gen-Regulatorprotein bindet bei Abwesenheit von Lactose an eine bestimmte DNA-Sequenz im Promotor und blockiert dadurch der RNA-Polymerase den Zugang zum Promotor. Erst bei steigender Konzentration von Lactose, löst sich das Regulatorprotein durch Konformationsänderung vom Promotor und ermöglicht der Polymerase die Bindung an den Promotor. Dadurch ist der Promotor bei Lactosemangel abgeschaltet. Die Kombination der beiden Regulationsmechanismen hat zur Folge, dass die Enzyme des *lac*-Operons nur transkribiert werden, wenn Lactose vorhanden ist und Glucose fehlt.

In prokaryonten Zellen sind Transkription und Translation räumlich und zeitlich eng miteinander verbunden. Noch während der Synthese der mRNA beginnen die Ribosomen mit der Translation. Im Gegensatz dazu finden bei eukaryonten Zellen Transkription und Translation in verschiedenen Zellkompartimenten statt. Nachdem im Zellkern die Transkription eines Gens abgeschlossen wurde, wird das Transkript ins Zytoplasma exportiert und dort translatiert. Das ermöglicht Eukaryonten, die bei der Transkription entstandenen RNA noch im Zellkern zu spleißen. Dabei werden als Intron bezeichnete RNA-Fragmente aus dem primären Transkript herausgeschnitten (Alberts et al., 1997).

Eukaryonte Zellen besitzen im Gegensatz zu prokaryonten drei verschiedene RNA-Polymerase-Typen. Die mRNAs, die für Proteine kodieren, werden von der RNA-Polymerase II synthetisiert. Die beiden anderen Polymerasen synthetisieren spezielle RNA-Moleküle, die bei der Translation eine große Rolle spielen. Auch die Promotoren für die RNA-Polymerase II unterscheiden sich von den Promotoren prokaryonter Zellen. Die RNA-Polymerase II benötigt zur Initiation Transkriptionsfaktoren, die zuvor durch Komplexbildung mit dem Promotor diesen für die Polymerase zugänglich machen. Eine in den meisten Promotoren vorkommende Bindungsstelle für einen für die Transkription wichtigen Faktor ist die sogenannte TATA-Box, ein kurzer DNA-Abschnitt aus überwiegend T- und A-Nukleotiden der etwa 30 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegt (Roeder, 1991). Der Promotor eines Gens steht in engem räumlichen Zusammenhang zur kodierenden Sequenz und bietet zahlreiche Bindungsstellen für allgemeine und spezifische Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich gibt es regulatorische DNA-Sequenzen, die einige tausend Basenpaare vom Promotor entfernt sein können. An diese Sequenzen können spezifische Regulatorproteine binden, die die Transkription entweder steigern (Enhancer) oder drosseln (Silencer). Die Interaktion zwischen diesen Komplexen und dem Promotor kommt durch Schleifenbildung der DNA zustande (Serfling et al., 1985).

Auch die Chromosomen eukaryonter Zellen unterscheiden sich von denen prokaryonter. Sie besitzen einen komplexen Aufbau, der durch spezielle Proteine in eine kompakte Struktur gebracht wird, die man als Chromatin bezeichnet. Diese Proteine, die Histone, binden aufgrund ihres hohen Anteils an positivgeladenen Aminosäuren hochaffin an den negativ geladenen DNA-Strang. Man unterscheidet fünf Histontypen. Jeweils zwei Histone der Typen H2A, H2B, H3 und H4 bilden zusammen ein Histon-Oktamer, um das sich die DNA in einer Länge von genau 146 Basenpaaren herumwindet. Diesen Komplex aus Histon-Oktamer und DNA bezeichnet man als Nukleosom (Kornberg, 1975; Luger et al., 1997).

Die Nukleosomen sind durch eine sogenannte Linker-DNA, die in ihrer Länge zwischen 0 und 80 Basenpaaren variiert, miteinander verbunden. Dadurch wiederholen sich die Nukleosomen durchschnittlich etwa alle 200 Basenpaare, was dem DNA-Strang im elektronenmikroskopischen Bild ein perlenschnurartiges Aussehen verleiht. Die Nukleosomen stellen die erste Stufe der Verpackung eines DNA-Strangs dar und werden mit Hilfe des Histons H1 zu Strukturen höherer Ordnung kondensiert (Bednar et al, 1998; Wolffe, 1997). Diese wiederum, die man wegen ihrer Größe auch 30nm Fibrillen nennt, sind in noch wenig verstandene Domänen höherer Ordnung gefaltet.

Untersuchungen an Chromatin verschiedener Spezies haben ergeben, dass ein Zusammenhang zwischen der Transkriptionsaktivität eines DNA-Abschnitts und dem Grad seiner Verpackung besteht. So haben Experimente mit dem Enzym DNase I, das bevorzugt zugängliche DNA schneidet, gezeigt, dass die Abschnitte des Genoms einer eukaryoten Zelle leichter abgebaut werden, die transkriptionell aktiv sind (Gross und Garrard, 1988). Die dichter gepackten Abschnitte sind genetisch inaktiv und Proteinen allgemein schlecht zugänglich (Fletcher und Hansen, 1996).

Die Chromatinstruktur des Genoms ist in Abhängigkeit der jeweiligen Stoffwechsellage einem ständigen Wandel unterlegen (Svaren und Hörz, 1993; Kornberg und Lorch 1999; Jenuwein und Allis, 2001). Die eukaryonte Genregulation ist ein Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedenster Faktoren und Mechanismen. Die Struktur des Chromatins übt einen großen Einfluss auf die Genregulation aus (Svaren und Hörz, 1993). So können Nukleosomen im Bereich eines Promotors die Bindung von Transkriptionsfaktoren und damit die Expression des Gens verhindern (Lorch et al., 1987; Gregory und Hörz, 1998; Horn und Peterson, 2002). Durch Öffnen der Chromatinstruktur wiederum kann der DNA-Strang Transkriptionsfaktoren erst zugänglich gemacht oder ein Enhancer in die Nähe des Promotors gebracht werden (Lorch et al., 1999). Dort gebundene Gen-Regulatorproteine können die Positionen von Nukleosomen am Promotor verschieben oder sie ganz vom DNA-Strang entfernen und dadurch die Transkription aktivieren (Han und Grunstein, 1988; Turner, 2002; Cosma, 2002).

Viele dieser Erkenntnisse hat man durch Experimente an der Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, erhalten. Diese eukaryonte einzellige Hefe besitzt ein relativ kleines und mittlerweile komplett entschlüsseltes Genom (Johnston, 1996). Sie lässt sich relativ leicht genetisch verändern, ist leicht zu kultivieren und vermehrt sich mit einer Generationszeit von 90-120 Minuten. Außerdem ist sie in der Lage, in die Zellen eingebrachte ringförmige DNA-Moleküle, sogenannte Plasmide, wie die genomische DNA stabil zu replizieren, zu transkribieren und ihr eine Chromatinstruktur zu verleihen. Diese Vorteile haben *S. cerevisiae* zu einem gut untersuchten Modellorganismus der Molekularbiologie gemacht.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit Jahren mit der Rolle der Chromatinstruktur bei der Genregulation in *S. cerevisiae*. Unter anderem wurde die Regulation des *PHO5*-Gens

sehr eingehend untersucht. Es hat sich gezeigt, dass eine Veränderung der Chromatinstruktur seines Promotors nicht Folge der Genexpression ist, sondern vor der Transkription zu beobachten ist (Fascher et al., 1993). *PHO5* kodiert für eine saure Phosphatase, mit der die Zelle versucht, die Bereitstellung von Phosphat unter Phosphat-Hunger zu gewährleisten (Oshima et al., 1996). Ist im Medium eine ausreichende Menge anorganisches Phosphat vorhanden, wird *PHO5* kaum exprimiert. Sobald Phosphat im Medium knapp wird, antwortet *S. cerevisiae* mit einer gesteigerten Produktion sowohl von hochaffinen Phosphattransportern als auch von Phosphatasen, wie Pho5, die sezerniert werden. Dadurch versucht die Zelle, in ihrer Umgebung aus organischen Phosphatverbindungen Phosphat zu gewinnen (Lenburg und O'Shea, 1996). Im inaktiven Zustand zeigt die Chromatinstruktur des *PHO5*-Promotors dicht aufeinanderfolgende Nukleosomen, die durch nur einen 70 bp langen hypersensitiven Bereich unterbrochen werden (Almer und Hörz, 1986). Dieser Bereich befindet sich um die Position -360 vor dem Transkriptionsstartpunkt und wird stromaufwärts von den Nukleosomen -3 und -4, stromabwärts von den Nukleosomen -2 und -1 eingeschlossen (Straka und Hörz, 1991). Er beinhaltet eine Bindungsstelle für den bei der Aktivierung der Expression wichtigen Transkriptionsfaktor Pho4, die mit UAS_p1 (upstream activating sequence) bezeichnet wird und zwischen -347 und -373 stromaufwärts der kodierenden Sequenz liegt (Vogel et al., 1989) (siehe Abbildung 1).

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors Pho4 wiederum hängt von der Phosphorylierung durch Pho80 und Pho85 ab (Kaffman, et al., 1994). Ist genug Phosphat vorhanden, liegt Pho4 in phosphoryliertem Zustand vor und ist deshalb im Zytoplasma lokalisiert und nicht in der Lage, den Promotor zu aktivieren (O'Neill et al., 1996; Komeili und O'Shea, 1999). Kommt es zu einem Phosphatmangel, werden die Faktoren Pho80 und Pho85 durch den Faktor Pho81 gehemmt (Kaffman et al., 1994). Dadurch wird Pho4 nicht mehr phosphoryliert, gelangt in den Zellkern und bindet an UAS_p1 im hypersensitiven Bereich des Promotors. Durch diese Bindung lösen sich die zwei Nukleosomenpaare -1 bis -4 auf beiden Seiten der hypersensitiven Region vom Promotor ab (Han et al., 1988; Svaren et al., 1994). Dadurch wird eine weitere Bindungsstelle für Pho4 zugänglich, die im inaktiven Zustand durch das Nukleosom -2 verdeckt ist (Almer et al., 1986). Sie wird UAS_p2 genannt, liegt zwischen -239 und-262 und hat eine größere Affinität zu Pho4 als UAS_p1. Auch die für die Initiation der Transkription wichtige TATA-Box wird durch das Ablösen des Nukleosoms -1 für Transkriptionsfaktoren zugänglich (Abbildung 1). Diese Konversion ist Voraussetzung

für die Expression des Gens, aber unabhängig von der anschließenden Transkription (Fascher et al. 1993) und von der DNA-Replikation (Schmid et al., 1992).

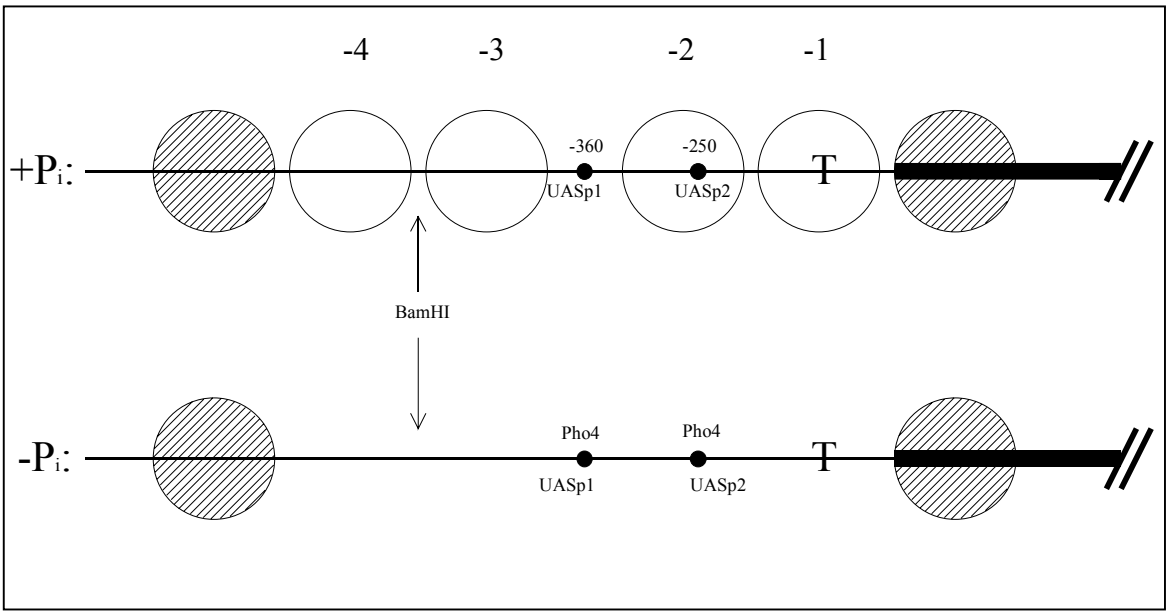

Abbildung 1: Aufbau des *PHO5*-Promotors
Durch Bindung des Transkriptionsfaktors Pho4 an die Bindungsstelle UASp1 lösen sich die Nukleosomen -1 bis -4 ab. Dadurch ist Pho4 in der Lage auch an UASp2 zu binden und den Promotor voll zu aktivieren. Auch die TATA-Box (T) wird durch die Veränderung der Chromatinstruktur für die RNA-Polymerase II zugänglich.

Mit Pho2 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor bekannt, der eine Rolle bei der Aktivierung des *PHO5*-Promoters spielt (Fascher et al., 1990). Es sind mehrere Bindungsstellen von Pho2 am Promotor in der Umgebung von UAS_p1 und UAS_p2 gefunden worden (Barbaric et al.; 1996). Außerdem binden Pho2 und Pho4 an die UAS_p1 und UAS_p2 kooperativ und interagieren dabei miteinander (Barbaric et al., 1998). Fehlt Pho4 die Interaktionsdomäne mit Pho2 (Pho4Δ*int*), kann es den *PHO5*-Promotor nicht aktivieren (Hirst et al., 1994). Werden hierbei die UAS-Elemente einzeln in einem einfachen Promotorsystem untersucht, zeigt sich, dass unter diesen Bedingungen UAS_p1 nicht aktiviert werden kann, wohl aber UAS_p2. Wird im *PHO5*-Promotor das UAS_p1-Element gegen ein UAS_p2-Element ausgetauscht, kann der Promotor unabhängig von Pho2 durch Pho4Δ*int* aktiviert werden (Barbaric et al., 1998). Diese Aktivierung ist allerdings höher, wenn Pho4 die Interaktionsdomäne mit Pho2 besitzt. Pho2 ist für die Aktivierung aber nicht essentiell, da die Überexpression von Pho4 in einem *pho2*-Stamm zu einer Transkription führt (Fascher et al., 1990).

In *Saccharomyces cerevisiae* sind zwei Gruppen von globalen Transkriptions-regulatoren gefunden worden, die gegensätzliche Wirkungen haben. Die Gruppe der *SWI/SNF* Gene kodiert für diverse positive Transkriptionsregulatoren (Carlson und Laurent, 1994), wohingegen die Gruppe der *SPT/SIN* Gene für negative Regulatoren kodiert (Winston und Carlson, 1992). Man nimmt von einigen dieser Transkriptionsregulatoren an, dass sie durch Veränderungen der Chromatinstruktur die Transkription beeinflussen. Ursprünglich wurden diese Faktoren im Zusammenhang mit der Regulation des Wechsels (switch) von einem Paarungstyp von *S. cerevisiae* zum anderen gefunden (Strathern et al., 1982). Dabei wurden die aktivierenden Faktoren Swi (switch), und die reprimierenden Sin (switch independent) genannt (Breeden und Nasmyth, 1987). Einer dieser reprimierenden Faktoren ist Sin4 (Jiang and Stillman, 1992).

Sin4 wird für die Repression verschiedener Gene benötigt (Jiang und Stillman, 1992; Covitz et al., 1994; Chen et al., 1993). Allerdings gibt es auch Gene, die Sin4 für ihre volle Aktivierung benötigen (Jiang und Stillman, 1992 und 1995). Sin4 wird auch mit dem RNA-Polymerase-II-Holoenzym als Teil eines Mediatorkomplexes in Verbindung gebracht (Li et al., 1995), wodurch Sin4 direkten Einfluss auf die Transkription haben könnte. Eine *sin4*-Mutante zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie eine Hefezelle, deren Histone mutiert sind oder völlig fehlen (Jiang et al., 1994). In beiden Zelltypen sind UAS-freie Promotoren aktiviert (Jiang und Stillman, 1992). Dies legt die Vermutung nahe, dass Sin4 Einfluss auf die Chromatinstruktur besitzt. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Tatsache, dass die gestörte Transkription von *HO-lacZ* in *swi2*-Mutanten teilweise wieder aufgehoben wird, wenn zusätzlich kein funktionsfähiges Sin4 vorhanden ist. (Stillman et al., 1994). Swi2 ist ein wichtiger Bestandteil des Swi/Snf Chromatin Remodeling Complex, der eine große Rolle in der Organisation des Chromatins spielt (Sternberg et al., 1987). Der Verlust der Sin4-Funktion hat zwar keinen Einfluss auf die Positionierung der Nukleosomen, erhöht aber die Empfindlichkeit der DNA gegenüber Nukleasen (Macatee et al., 1997). Dies legt die Vermutung nahe, dass Sin4 die Zugänglichkeit von Chromatin in irgendeiner Weise steuert.

Sin4 hat auch Einfluss auf die Regulation von *PHO5*. Vor Jahren hat unsere Arbeitsgruppe die Aktivität des *PHO5*-Promotors mit Hilfe eines Reportergens bestimmen wollen. Dazu wurde die kodierende DNA-Sequenz von *PHO5* gegen die des bakteriellen *lacZ*-Gens ausgetauscht. Unter den *PHO5*-Promotor nicht aktivierenden Bedingungen zeigte LacZ im Vergleich zu Wildtypzellen in *sin4*-Mutanten eine erhöhte Aktivität. Bei gleichen Bedingungen zeigt sich dieser Effekt nicht im nativen *PHO5*-Gen. Diese gesteigerte Aktivität des Promotors ist unabhängig von Pho4 und Pho2. Weitere Untersuchungen haben ergeben,

dass es auch zu einer von den Transkriptionsfaktoren unabhängigen Steigerung der Promotoraktivität kommt, wenn man in einem *sin4*-Stamm die kodierende Sequenz des l*acZ* stromaufwärts von *PHO5* integriert (Hörz und Gregory, unveröffentlichte Ergebnisse). Es scheint, dass die Nähe der fremden DNA zum *PHO5* ausreicht, um die Repression des *PHO5*-Promotors in *sin4*-Zellen zu stören.

In der hier vorliegenden Arbeit soll nun folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Ist die dereprimierende Eigenschaft der *lacZ* kodierenden DNA-Sequenz ein Sonderfall oder ist es eher die Regel, dass DNA-Fragmente den *PHO5*-Promotor in *sin4*-Zellen dereprimieren?
2. Ist es von Bedeutung, falls die Eigenschaft eher die Regel sein sollte, ob die DNA-Fragmente prokaryonter oder eukaryonter Herkunft sind?
3. Lassen sich, falls es tatsächlich weitere DNA-Fragmente mit dereprimierender Eigenschaft geben sollte, besondere Charakteristika dieser DNA-Fragmente finden?
4. Lassen sich dadurch neue Erkenntnisse über die Eigenschaften von Sin4 ableiten?

II. Ergebnisse

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss promotornaher Insertionen von pro- und eukaryontischer DNA auf die Regulation des *PHO5*-Promotors aus Hefe in Abhängigkeit von Sin4 zu untersuchen.
Vorausgegangene Experimente hatten ergeben, dass in einem *sin4*-Stamm (YS88) ein direkt vor den *PHO5*-Promotor integriertes *lacZ*-Fragment die Transkription von *PHO5* unter nicht-induzierenden Bedingungen steigert. Dieser Effekt zeigte sich nicht, wenn der Stamm ein funktionsfähiges Sin4 besaß (Gregory und Hörz, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie weit verbreitet die Eigenschaft bei eukaryonten bzw. prokaryonten DNA-Fragmenten ist, bei gleichen Bedingungen zu einer Steigerung der Promotoraktivität von *PHO5* zu führen.

II.1. Isolierung und Klonierung zufällig ausgewählter 1kb-DNA-Fragmente aus *S. cerevisiae* und *E. coli*

Der Vektor *pCB/WT* wurde zur Konstruktion der Plasmide herangezogen. Dieser Vektor hat eine Größe von 7598bp und besitzt das *PHO5*-Gen, das Ampizillin Resistenzgen für bakterielle Selektionsmedien, *LEU2* zur Selektion in Hefe und eine Zentromersequenz. Die einzige BamHI-Spaltstelle dieses Vektors befindet sich im Abstand von 542 bp stromaufwärts der kodierenden Sequenz von *PHO5* (siehe Abbildung 2). An dieser Stelle wurde der Vektor mit BamHI gespalten und damit linearisiert. Um bei der späteren Ligierung mit den DNA-Fragmenten eine Religierung des linearisierten Vektors zu vermeiden, wurden die Enden des linearisierten Vektors dephosphoryliert. Danach wurde der geschnittene und dephosphorylierte Vektore von dem nicht geschnittenen (Supercoil) durch eine Agarosegel-Elektrophorese getrennt und anschließend aus dem Gel isoliert. Die DNA-Fragmente für die spätere Insertion wurden durch partielle Spaltungen der genomischen DNA von *S. cerevisiae* bzw. *E. coli* gewonnen. Dazu wurde diese DNA durch das Restriktionsenzym Sau3a gespalten, wobei durch Variation der Inkubationszeit ein Maximum der DNA-Fragmentlänge von etwa 1kb erreicht wurde. Nach anschließender Auftrennung der Fragmente durch eine Gel-Elektrophorese, wurde der Gelbereich, der DNA im Längenbereich von ca. 900bp bis 1100bp enthielt, mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten und isoliert.

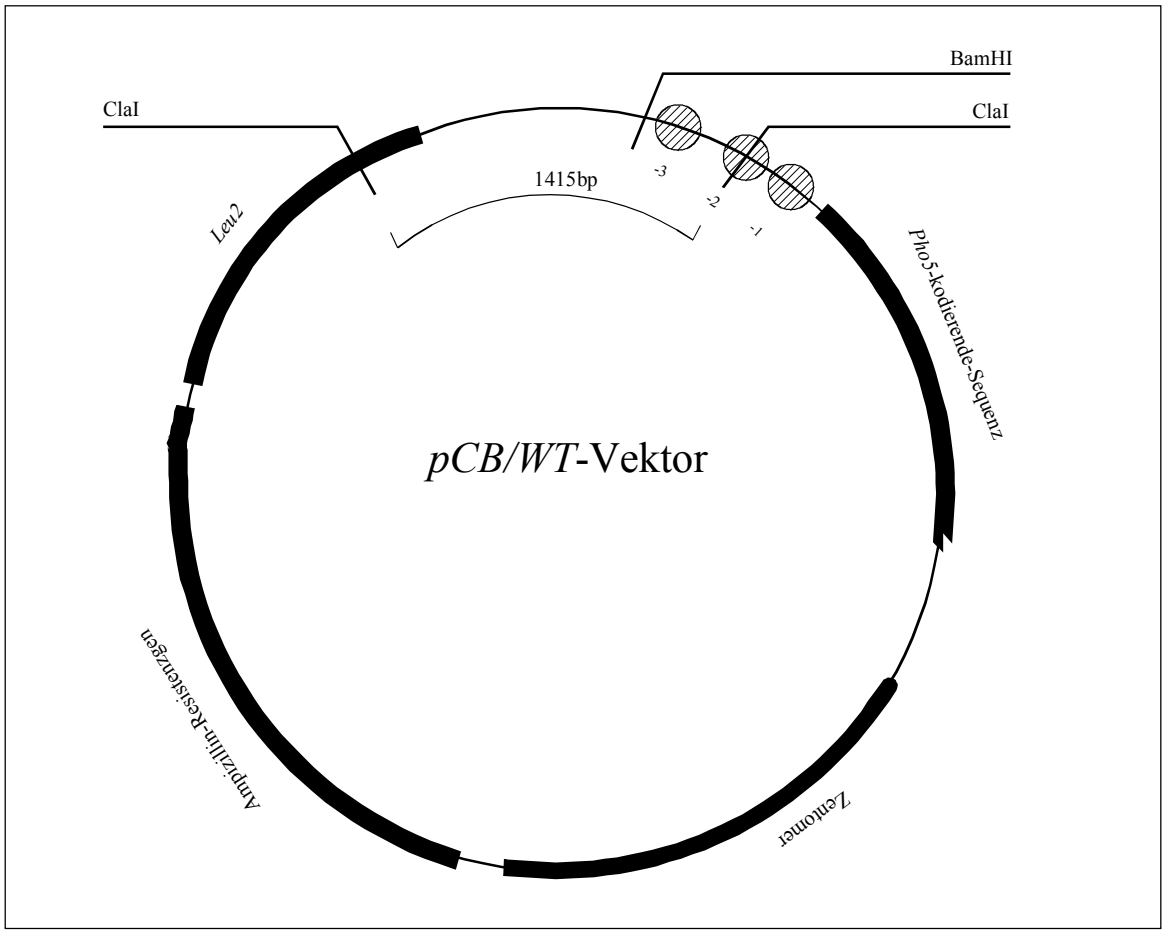

Abbildung 2: Schematischer Aufbau des *pCB/WT*-Vektors
Der Vektor enthält die kodierende Sequenz von *PHO*5. Stromaufwärts ist der Promotor mit den Nukleosomen -1 bis -3 lokalisiert. Die Restriktionsenzyme BamHI und ClaI schneiden den Vektor an den Positionen -542 bzw. -275 und -1690. Durch die Spaltung mit ClaI entstehen zwei DNA-Fragmente mit Längen von 1415bp bzw. 6183bp. Außerdem enthält der Vektor eine Zentromersequenz, das Ampizillin Resistenzgen und das *LEU2* zur Selektion in Hefe.

Die Ligierung zwischen dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor und den isolierten DNA-Fragmenten aus *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* wurde mit Hilfe der T4-Ligase durchgeführt. Die anschließenden Transformationen dieser Ligierungen in *E. coli* lieferten je etwa 800 Kolonien (siehe Abbildung 3). Da die transformierten Bakterien auf ampizillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen wurden, konnten nur die Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten.

II.2. Beurteilung der Ligierungen durch DNA-Analysen

Da es bei einer Ligierung zu einer Religierung des Vektors kommen kann, ohne dass ein DNA-Fragment integriert wurde, mussten die Plasmide daraufhin untersucht werden.

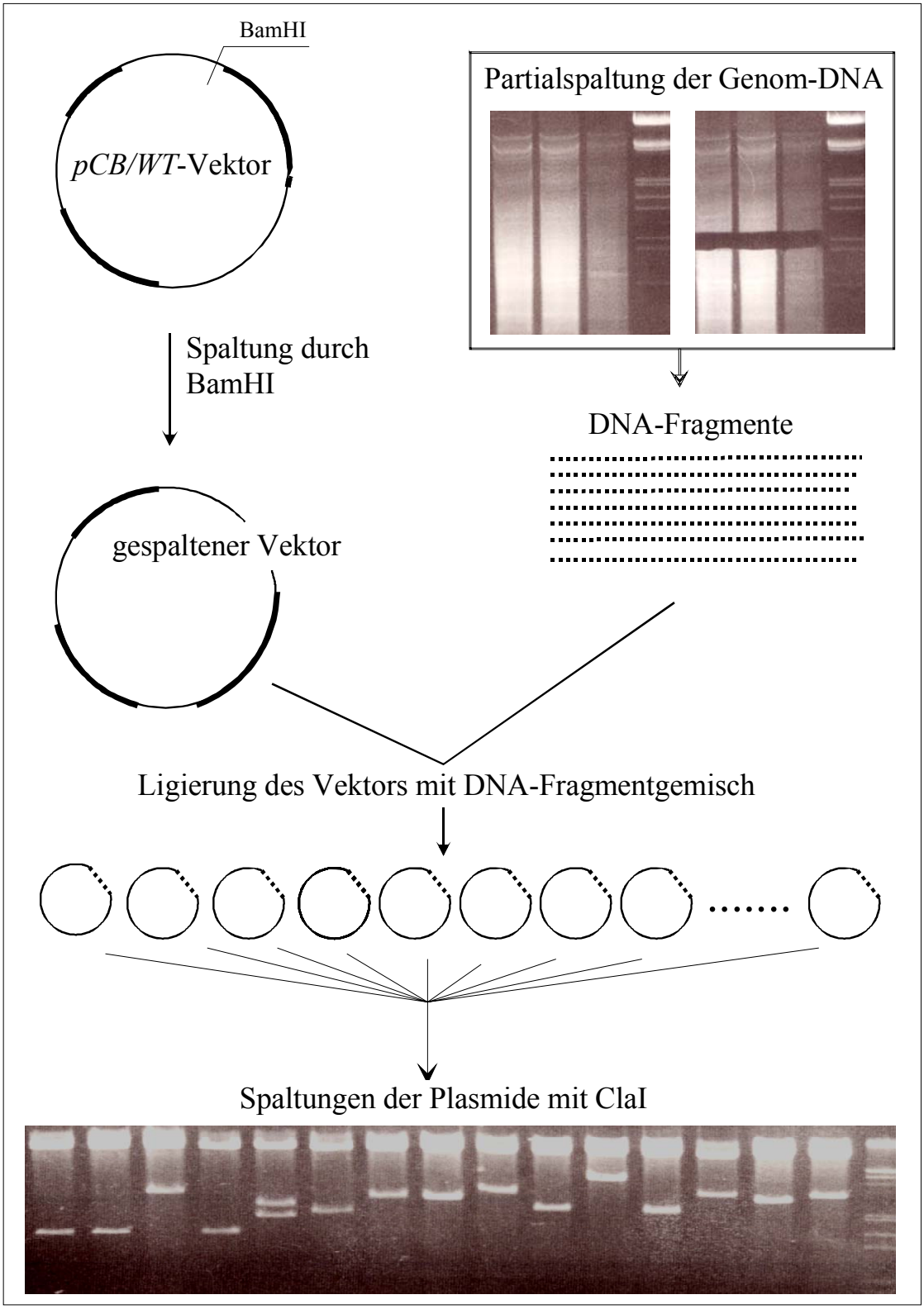

Abbildung 3

Schematische Darstellung der Plasmidkonstruktion
In den mit BamHI gespaltenen *pCB/WT*-Vektor wurde ein Gemisch aus Fragmenten des *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* Genoms einer Länge zwischen 900bp und 1100bp integriert. Die Fragmente wurden durch Partialspaltung des Genoms mit Sau3a und anschließender Auftrennung durch ein Agarosegel gewonnen. Zur Kontrolle, ob die so erhaltenen Plasmide DNA-Fragmente enthielten, wurde abschließend eine Spaltung mit ClaI durchgeführt. Hier

zeigte sich am Beispiel der Plasmide mit *E. coli*-DNA-Fragmenten, dass alle Plasmide, bis auf die ersten beiden und das vierte, ein Fragment enthielten

Dazu wurden die Plasmide durch DNA-Minipräparation aus den transformierten Bakterien zurück gewonnen. Die so zurückgewonnenen Plasmide wurden daraufhin mit dem Restiktionsenzym ClaI geschnitten und anschließend auf einem Agarosegel dargestellt. Das Restriktionsenzym ClaI spaltet den *pCB/WT*-Vektor an den Stellen -275 und -1690 (siehe Abbildung 2). Falls in den Vektor kein DNA-Fragment integriert wurde, würden sich im Agarosegel zwei Banden auf der Höhe 1415bp und 6183bp zeigen. Wurde dagegen ein DNA-Fragment in den Vektor integriert, würde sich im Gel eine Bande auf der Höhe 6183bp darstellen. Zusätzlich würden sich entweder eine Bande auf der Höhe 2500bp oder mehrere Banden darstellen, falls ClaI in der Lage wäre, auch das integrierte DNA-Fragment zu spalten. Bei dem Transformationsergebnis der Ligierung zwischen dem Vektor und den *E. coli*-DNA-Fragmenten zeigten von 15 untersuchten Kolonien 12 ein in den Vektor integriertes DNA-Fragment (Siehe Abbildung 3). Bei dem Transformationsergebnis der Ligierung zwischen dem Vektor und den *S. cerevisiae*-DNA-Fragmenten zeigten von 12 untersuchten Kolonien 10 ein in den Vektor integriertes DNA-Fragment.

II.3. Transformation der Plasmide in einen *sin4*-Hefestamm (YS88) und Messung der Phosphataseaktivitäten

Die aus den DNA-Minipräparationen erhaltenen Plasmide sollten einzeln in einen Hefestamm transformiert werden, der kein funktionsfähiges Sin4 besitzt, um anschließend die Aktivität des *PHO5*-Promotors der Plasmide in phosphatreichem Medium zu bestimmen. Dazu wurden die Plasmide einzeln in den Hefestamm YS88 transformiert, in dem *SIN4* durch Rekombination zerstört worden war. Zusätzlich war in diesem Stamm die chromosomale *PHO5* kodierende Sequenz gegen das *lacZ* ausgetauscht worden, um keine Interferenzen zwischen dem chromosomalen *PHO5*–Gen und dem *PHO5*-Gen des Plasmids zu erhalten. Die transformierten Hefezellen wurden auf leucin-freien Agarplatten ausgestrichen. Dadurch konnten nur die Hefezellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten. Denn nur sie waren durch das vom aufgenommenen Plasmid kodierten Leu2-Enzym in der Lage, die für die Zelle essentielle Aminosäure Leucin herzustellen. Die Aktivität der *PHO5*-Promotoren in diesen *sin4*-Zellen sollte nun bestimmt werden. Dazu wurden die so erhaltenen Hefeklone nebeneinander auf eine leucinfreie Agarplatte aufgetragen. Nachdem die einzelnen Hefekolonien etwa die gleiche Größe erreicht hatten, wurden die Phosphataseaktivitäten der Hefekolonien auf der Agarplatte bestimmt. Dazu wurde in Agar aufgekochtes

Naphthylphosphat auf die Hefekolonien aufgetragen. Das Naphthylphosphat wird durch die von den Hefezellen in den periplasmatischen Raum sezernierte Phosphatase gespalten, wodurch ein zugegebener Farbindikator seine Farbe verändert. Dadurch färbten sich die Hefekolonien rot, die Phosphatase produzierten. Zusätzlich wurden noch eine Positiv- und eine Negativkontrolle zum Vergleich aufgetragen. Als Positivkontrolle diente der *sin4*-Hefestamm YS88, in den der *pCB/WT*-Vektor mit in die BamHI-Spaltstelle integrierter *lacZ*-Sequenz transformiert worden war. Als Negativkontrolle diente der gleiche Stamm, in den aber der unveränderte *pCB/WT*-Vektor transformiert worden war.
Als Ergebnis zeigte sich, dass von den 12 Klonen, deren Plasmide ein *E. coli*-DNA-Fragment enthielten, bis auf zwei alle eine Phosphataseaktivität in der Größenordnung der Positivkontrolle besaßen. Bei den 10 Klonen, deren Plasmide ein Hefe-DNA-Fragment enthielten, zeigte nur einer eine Phosphataseaktivität, die höher war als die Negativkontrolle (siehe Tabelle 1).

		Anzahl der Kolonien (*sin4*-Zellen) mit	
		erhöhter Pho5-Aktivität	nicht erhöhter Pho5-Aktivität
DNA-Fragmente aus	*S. cerevisiae*	1	9
	E. coli	10	2

Tabelle1. Anzahl der jeweiligen Kolonien mit erhöhter bzw. nicht erhöhter Phosphataseaktivität

II.4. Herstellung und Untersuchung weiterer Hefetransformanten, in deren Plasmide ein Hefe-DNA-Fragment integriert wurde

Nur eins von den 10 vorher untersuchten Plasmiden mit integriertem Hefe-DNA-Fragment zeigte in *sin4*-Zellen eine erhöhte *PHO5*-Promotoraktivität bei eigentlich reprimierenden Bedingungen. Um noch weitere Hefe-DNA-Fragmente zu finden, die diesen Effekt zeigen, musste eine weit größere Anzahl von Plasmiden untersucht werden. Dazu wurden 400 transformierte *E. coli*-Kolonien aus der Ligierung zwischen Vektor und Hefe-DNA-Fragmenten in Einzelkulturen gezogen. Nachdem die Flüssigkulturen die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, wurden von 25 Einzelkulturen jeweils 100µl zu einem Endvolumen von 2,5 ml zusammengeführt. Aus diesen 16 Mischkulturen wurden mit Hilfe von DNA-Minipräparationen die Plasmide zurück gewonnen und in *sin4*-Zellen transformiert (siehe Abbildung 4). Von den einzelnen Hefetransformationen wurden jeweils 50 Kolonien auf eine Agarplatte aufgetragen.

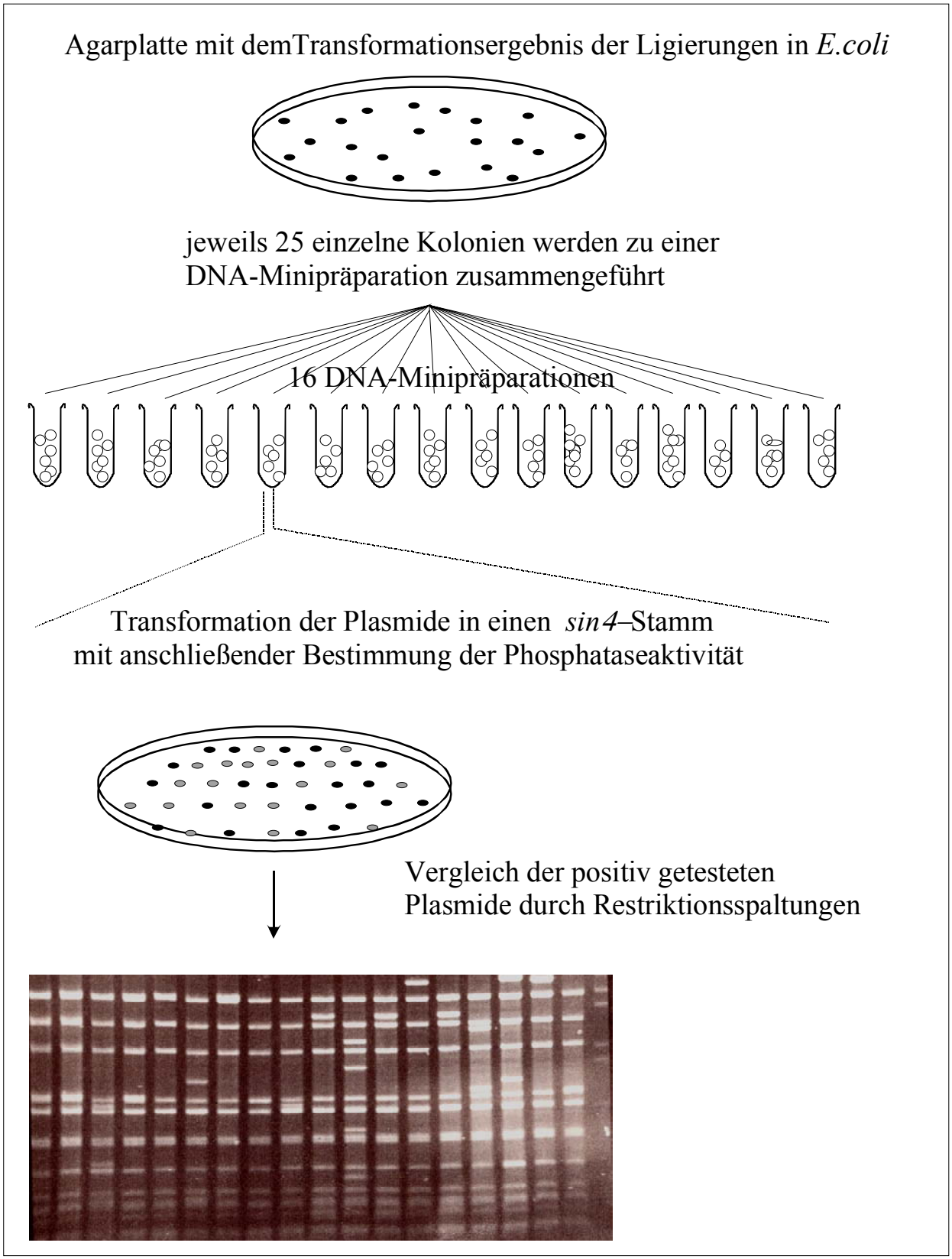

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Analyse einer größeren Anzahl von Plasmiden. Von dem Ergebnis der Transformation des Ligierungsansatzes zwischen dem gespaltenen Plasmid und den *S. cerevisiae*-DNA-Fragmenten wurden insgesamt 16 mal 25 Einzelkolonien zu einer DNA-Minipräparation zusammengefasst. Die Ergebnisse dieser Minipräparationen wurden in *sin4*-Zellen transformiert und auf einer Agarplatte aufgetragen. Anschließend wurde die *PHO5*-Promotoraktivität auf einer Agarplatte bestimmt. Die Plasmide der positiv getesteten Kolonien wurden aus den

Hefezellen zurück gewonnen und verschiedenen Restriktionsspaltungen zugeführt. Durch diese Spaltungen mit verschiedenen häufig schneidenden Restriktionsenzymen lassen sich anhand von Agarosegelen identische Plasmide herausfinden. Als Beispiel sind hier die Spaltungen einiger Plasmide mit dem Restriktionsenzym HaeIII dargestellt.

Nachdem diese Kolonien etwa die gleiche Größe erreicht hatten, wurde die *PHO5*-Promotoraktivität der einzelnen Kolonien durch den oben beschriebenen Agarplattentest bestimmt. Es wurden jeweils 50 Kolonien pro Hefetransformation getestet, obwohl nur 25 Einzelkulturen zu einer DNA-Minipräparation zusammengeführt worden waren. Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass die *PHO5*-Promotoraktivitäten von allen 25 Plasmiden pro DNA-Minipräparation getestet wurden. Es zeigten 10 der 400 Hefekolonien eine Aktivität im Bereich der Positivkontrolle. Mit dem bei der ersten Versuchsserie gefundenen Plasmid waren also insgesamt 11 Plasmide gefunden worden, die in *sin4*-Zellen eine erhöhte Aktivität des *PHO5*-Promotors trotz phosphatreichen Mediums besaßen.

II.5. Vergleich der aus den *sin4*-Zellen zurück gewonnenen Plasmide mit Hilfe von Restriktionsspaltungen

Durch das Zusammenfassen von 25 Einzelkulturen zu einer DNA-Minipräparation bestand die Möglichkeit, dass von den am Ende gefundenen 11 Hefe-Kolonien, die eine erhöhte Phosphataseaktivität zeigten, einige identisch waren. Um möglicherweise identische Kolonien zu finden, mussten die einzelnen integrierten DNA-Fragmente untereinander verglichen werden. Dazu wurden als erstes die jeweiligen Plasmide aus den einzelnen Hefekolonien durch Plasmid-DNA-Isolierung zurückgewonnen. Die so erhaltene Plasmid-DNA-Menge war zu gering, als dass eine osmotische Transformation zur Klonierung der Plasmide in *E. coli* ausgereicht hätten. Deshalb wurden die aus den Hefekolonien zurück gewonnenen Plasmide mittels der effektiveren Elektroporation in *E. coli* transformiert. Anschließend wurden die jeweiligen Plasmide durch DNA-Minipräparationen isoliert.
Durch eine Restriktionsspaltung mit ClaI konnte gezeigt werden, dass alle 11 Plasmide ein in die BamHI-Spaltstelle integriertes DNA-Fragment besaßen. Zur genauen Differenzierung wurden die einzelnen Plasmide durch das Restriktionsenzym HaeIII gespalten und im Agarosegel dargestellt. Diejenigen Plasmide, die hierbei ein DNA-Fragment-Muster mit verschieden langen Fragmenten zeigten, waren unterschiedlich. Diejenigen, die ein identisches DNA-Fragmentlängenprofil zeigten, wurden anschließend durch ein weiteres Restriktionsenzym, AluI, gespalten und im Agarosegel dargestellt. Es zeigte sich schließlich,

dass sowohl die Plasmide 5 und 10, als auch die Plasmide 8 und 11 identisch waren. Folglich waren 9 verschiedene Hefefragmente gefunden worden, die bei der Aktivitätsbestimmung des *PHO5*-Promotors mittels des Agarplattentests eine erhöhte Aktivität zur Folge hatten.
Bei den 12 Hefekolonien, deren Plasmide ein *E. coli*-DNA-Fragment enthielten, wurde die gleiche Methode angewandt um Kolonien mit eventuell identischen Plasmiden zu finden. Hier zeigte sich, dass alle 12 Kolonien Plasmide mit unterschiedlichen DNA-Fragmenten enthielten.

II.6. Bestimmung der Phosphataseaktivitäten der einzelnen Plasmide in *sin4*- und *SIN4*-Zellen in Flüssigmedien

Der oben angewandte Agarplattentest zur Bestimmung der Phosphataseaktivität besitzt nur eine qualitative Aussage über die Enzymaktivität. Zudem musste untersucht werden, ob die Steigerung der Pho5-Aktivität bei nicht induzierenden Bedingungen nur in *sin4*-Zellen zu beobachten und damit abhängig von Sin4 ist, oder aber auch in *SIN4*-Zellen vorkommt und damit nicht von Sin4 abhängt.

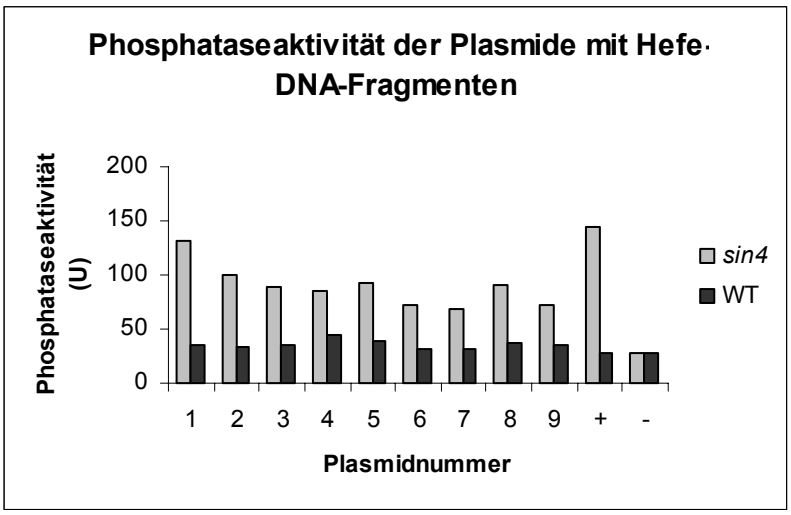

Abbildung 5: Phosphataseaktivitäten der Plasmide mit *S. cerevisiae*-DNA-Fragmenten in *sin4*- und *SIN4*-Zellen. Als Positivkontrolle (+) wurde das Plasmid mit integrierter *lacZ*-Sequenz, als Negativkontrolle (-) wurde der Leervektor *pCB/WT* benutzt.

Die Aktivitätsbestimmungen von Pho5 in *sin4*- und *SIN4*-Zellen sollten in Flüssigmedien bestimmt werden, da dieser Test quantitativ ist. Dazu wurden die einzelnen Plasmide in *SIN4*-Zellen (YS38: WT) transformiert. Anschließend wurden die Phosphataseaktivitäten der einzelnen Plasmide sowohl in *sin4*-Zellen (YS88) als auch in *SIN4*-Zellen (YS38) in Flüssigmedien bei nicht induzierenden Bedingungen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen für die 9 Kolonien, deren Plasmide ein Hefe-DNA-Fragment besitzen, sind in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigte sich, dass alle Klone in YS88 (*sin4*-Zellen) eine

Phosphataseaktivität in der Größenordnung der Positivkontrolle besaßen. Im WT zeigte kein Klon eine erhöhte Enzymaktivität.

Bei den Klonen, deren Plasmide ein *E. coli*-DNA-Fragment besaßen, wurden die Enzymaktivitäten sowohl der 10 vorher positiv getesteten, als auch der zwei negativ getesteten Kolonien (Kolonie 1 und 2) bestimmt. Die Ergebnisse für die Klone, deren Plasmide ein *E. coli*-DNA-Fragment besaßen, sind in der Abbildung 6 dargestellt.

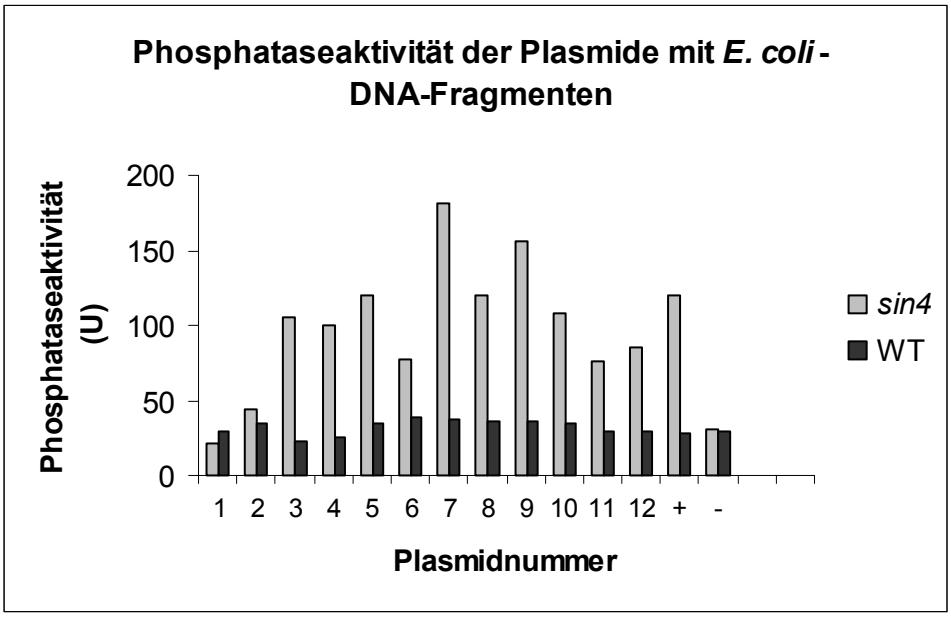

Abbildung 6: Phosphataseaktivitäten der Plasmide mit *E. coli* -DNA-Fragmenten in *sin4*- und *SIN4*-Zellen. Als Positivkontrolle (+) wurde das Plasmid mit integrierter *lacZ*-Sequenz, als Negativkontrolle (-) wurde der Leervektor *pCB/WT* benutzt.

Alle Klone, die bei der Aktivitätsbestimmung der Phosphatase auf der Agarplatte eine Steigerung zeigten, besaßen auch eine erhöhte Phosphataseaktivität bei der Bestimmung im Flüssigmedium. Im WT zeigte kein Plasmid eine erhöhte Aktivität. Die beiden vorher negativ getesteten Plasmide mit den integrierten *E. coli*-DNA-Fragmenten mit den Nummern 1 und 2 zeigten sowohl in YS88 (*sin4*), als auch im WT (*SIN4*) keine gesteigerte Aktivität.

II.7. Untersuchung von DNA-Fragmenten einer weiteren Bakterienart

Als Zwischenergebnis zeigte sich sehr deutlich, dass die meisten *E. coli*-DNA-Fragmente zu einem positiven Effekt führten. Im Gegensatz dazu taten dies nur sehr wenige Hefe-DNA-Fragmente. Als Ursache für dieses recht eindeutige Zwischenergebnis gab es mehrere Möglichkeiten. Eine Ursache könnte die Tatsache sein, dass die *E. coli*-DNA-Fragmente prokaryonte, die Hefe-DNA-Fragmente eukaryonte DNA sind. Eine weitere Ursache könnte der unterschiedliche G-C-Gehalt der beiden Genome sein. Der

durchschnittliche G-C-Gehalt von *E. coli* liegt bei 51% (Perna et al., 2001), der von *S. cerevisiae* bei 38% (Bradnam et al., 1999). Um diese Überlegungen eingehender zu untersuchen, sollten prokaryonte DNA-Fragmente einer zweiten Bakterienart untersucht werden, ob sie in die BamHI-Spaltstelle des *pCB/WT*-Vektors eingefügt in *sin4*-Zellen bei nicht induzierten Bedingungen zu einer erhöhten Aktivität des *PHO5*-Promotors führen.

Zu diesem Zweck wurde die genomische DNA des *Micrococcus lysodeikticus* mit Sau3a partialgespalten und anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Region mit den Fragmenten der Länge zwischen 900bp und 1100bp wurden herausgeschnitten und von der Agarose getrennt. Nachdem der linearisierte und dephosphorylierte *pCB/WT*-Vektor mit den etwa 1000bp langen DNA-Fragmenten ligiert worden war, wurden die hierbei entstandenen Plasmide mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert. Um festzustellen, wieviele Plasmide ein DNA-Fragment besaßen, wurden 12 DNA-Minipräparationen angefertigt und anschließend mit ClaI geschnitten. Es zeigte sich im Agarosegel, dass 3 der 12 Plasmide kein DNA-Fragment besaßen. Um auch hier eine möglichst große Zahl von Plasmiden zu untersuchen, wurden 25 Einzelkulturen zu einer DNA-Minipräparation zusammengefasst. Dies wurde insgesamt sechsmal durchgeführt, wodurch man schließlich auf eine Zahl von 150 zu testende Kolonien kam. Anschließend wurden die so erhaltenen Plasmide in YS88 (*sin4*) transformiert. Wie schon bei den Klonen, deren Plasmide ein Hefe-DNA-Fragment besaßen, wurden auch hier 50 Einzelkulturen pro zusammengefasste DNA-Minipräparation für die Aktivitätsbestimmung der Phosphatase auf eine Agarplatte aufgetragen. Die anschließende Bestimmung der Pho5-Aktivitäten der Kolonien auf der Agarplatte ergab, dass etwa 250 der 300 ausplatierten Kolonien eine Aktivität in der Größenordnung des Ausgangsstammes besaßen.

Um die Pho5-Aktivität zusätzlich noch im Flüssigmedium sowohl in *sin4*- als auch in *SIN4*-Zellen zu bestimmen, wurden pro zusammengefasste DNA-Minipräparation 3 im Plattentest positiv getestete Kolonien ausgewählt. Die einzelnen Plasmide wurden isoliert und in *E. coli* transformiert. Die durch DNA-Minipräparation zurück erhaltenen Plasmide wurden durch Restriktionsspaltungen mit den Enzymen ApoI und HaeIII miteinander verglichen. Schließlich waren 15 Kolonien gefunden, deren Plasmide unterschiedliche Fragmente besaßen, und deren Phosphataseaktivität bei nicht induzierten Bedingungen in *sin4*-Zellen erhöht war. Anschließend wurden die Plasmide noch in den WT (*SIN4*) transformiert. Schließlich wurden die Aktivitäten von Pho5 der einzelnen Plasmide im WT (*SIN4*) und in YS88 (*sin4*) im Flüssigmedium bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

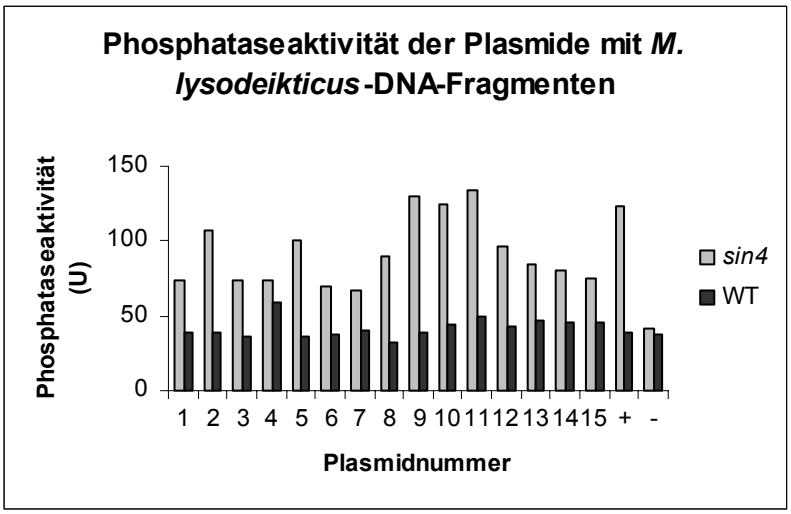

Abbildung 7: Phosphataseaktivitäten der Plasmide mit *Micrococcus lysodeikticus*-DNA-Fragmenten in *sin4*- und *SIN4*-Zellen. Als Positivkontrolle (+) wurde das Plasmid mit integrierter *lacZ*-Sequenz, als Negativkontrolle (-) wurde der Leervektor *pCB/WT* benutzt.

II.8. Sequenzierung der positiv getesteten Hefe-DNA-Fragmente

Ganz im Gegensatz zu den Plasmiden mit *Micrococcus lysodeikticus*- und *E. coli*-DNA-Fragmenten zeigte sich in den bisherigen Ergebnissen, dass nur sehr wenige Hefe-DNA-Fragmente die Regulation des *PHO5*-Promotors in *sin4*-Zellen beeinflussen (siehe Abbildung 8). Um die Fragmente auf eventuelle Besonderheiten zu untersuchen, sollten die DNA-Sequenzen der 9 positiv getesteten Hefe-DNA-Fragmente bestimmt werden.

Dazu wurden die Plasmide nochmals in *E. coli* transformiert, um eine größere Menge DNA zu erhalten. Nach Rückgewinnung der Plasmide durch DNA-Minipräparationen wurden die DNA-Sequenzen mit Hilfe der Sanger-Methode bestimmt (Sanger et al., 1977). Dazu wurde der Sequenzierprimer so gewählt, dass der Polymerisationsbeginn auf dem *pCB/WT*-Vektor eine Entfernung von 30bp stromabwärts zur BamHI-Spaltstelle besaß (siehe Abbildung 2). Von diesem Primer aus wurden jeweils die DNA-Sequenzen der ersten 100 bis 200 Basenpaare der einzelnen DNA-Fragmente bestimmt. Da die DNA-Sequenz des Genoms von *S. cerevisiae* seit einigen Jahren komplett entschlüsselt und allgemein zugänglich ist, wurden die exakten Lokalisationen dieser ersten 100 bis 200 Basenpaare der einzelnen DNA-Fragmente bestimmt. Da bei der Partialspaltung der Hefegenom-DNA anfangs das Restriktionsenzym Sau3a verwendet wurde, konnte man die DNA-Sequenzen der noch fehlenden Basenpaare durch Weiterverfolgen der Genabschnitte in der Genomdatei bis zur nächsten Sau3a-Schnittstelle erhalten. Die dadurch erhaltenen DNA-Sequenzen zeigten eine

Länge um die 1000bp, was mit dem bereits oben erwähnten Resultaten der ClaI-Spaltungen übereinstimmte.

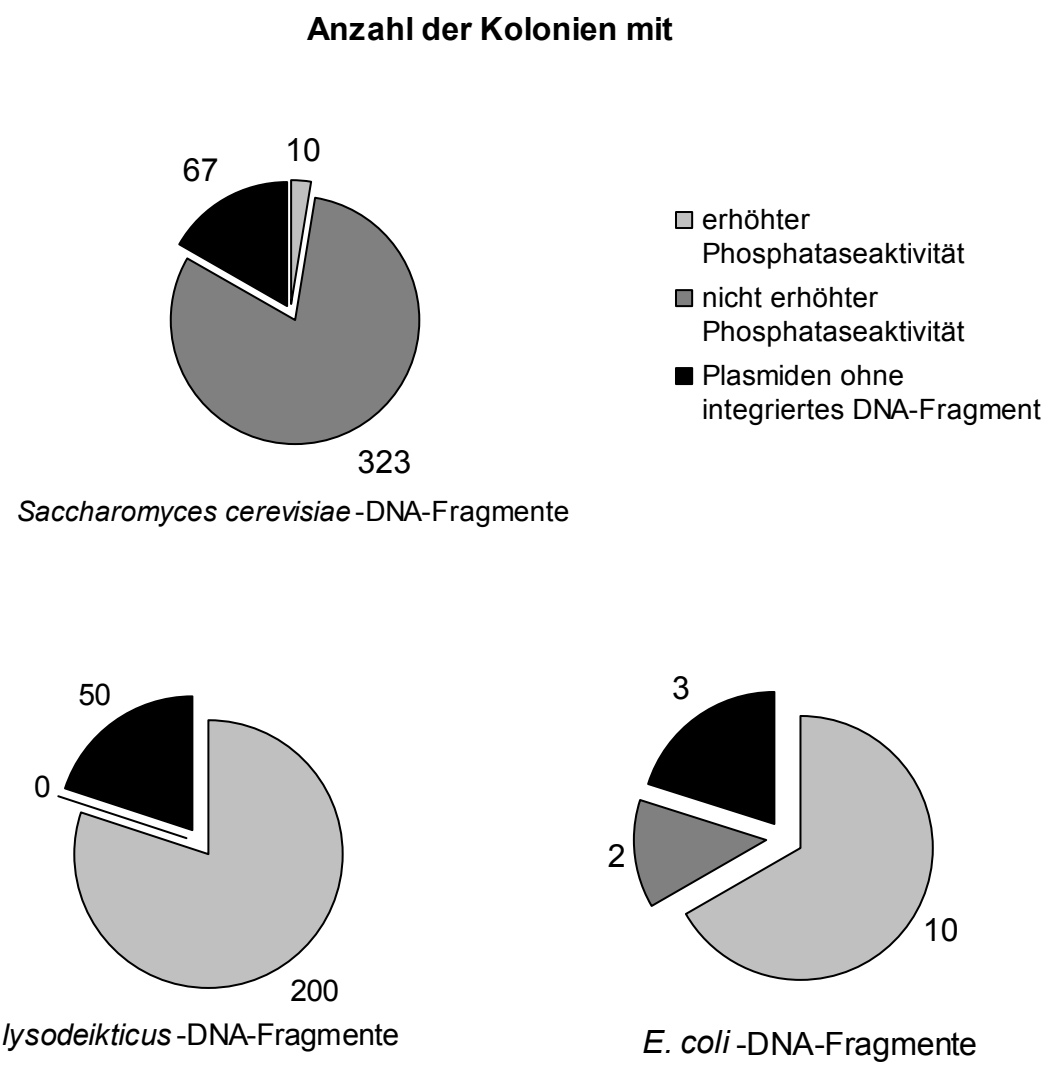

Abbildung 8: Anzahl der Kolonien mit erhöhter Phosphataseaktivität in *sin4*-Zellen, mit nicht erhöhter Phosphataseaktivität in *sin4*-Zellen und mit Plasmiden ohne integriertes DNA-Fragment für die jeweiligen DNA-Fragmente aus *S. cerevisiae*, *E. coli* und *M. lysodeikticus*. Die Phosphataseaktivitäten der Kolonien wurden auf Agarplatten bestimmt.

Die Lokalisationen der DNA-Fragmente im Hefegenom sind in den Abbildungen 9 bis 17 dargestellt. In der Darstellung wurde die Orientierung der DNA-Fragmente immer so gewählt, dass im entsprechenden Plasmid der *PHO5*-Promotor rechts vom Fragment lokalisiert ist. Mit aufgeführt sind die entsprechenden Phosphataseaktivitäten jeweils in YS88 (*sin4*) und in YS38 (WT), der G-C-Anteil und die Länge des Fragments. Außerdem sind die jeweiligen genetischen Kodierungen der DNA-Fagmente graphisch dargestellt.

Ort der Sequenz:	Chromosom IV, 368770-370023, (Jacq, C. et al., 1997)
Länge:	1254bp
G-C-Anteil:	43.3%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 36U
	sin4-Stamm: 132U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom IV:

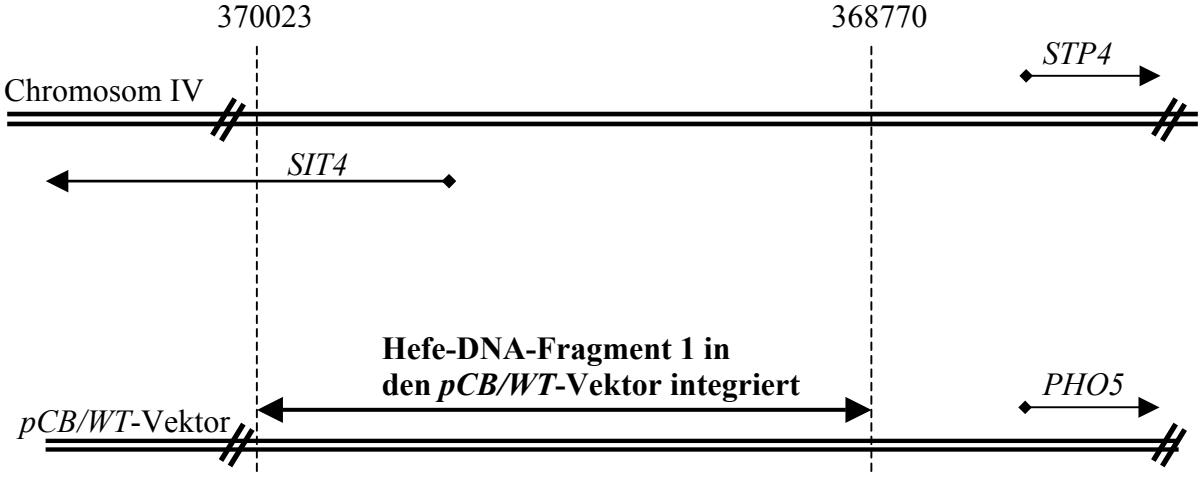

Abbildung 9: Hefe-DNA-Fragment 1
Darstellung der Lokalisation und Kodierung des Hefe-DNA-Fragments im Chromosom. Darunter ist die Orientierung des Fragments im *pCB/WT*-Vektors dargestellt. Rechts vom DNA-Fragment folgt *PHO5*. Außerdem sind die Länge und der G-C-Gehalt des Fragments angegeben. Zusätzlich sind die gemessenen Phosphataseaktivitäten im *sin4*- und *SIN4*-Stamm angegeben.

Ort der Sequenz:	Chromosom II, 593255-594332, (Feldmann, H. et al., 1994)
Länge:	1078bp
G-C-Anteil:	41.0%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 33U
	sin4-Stamm: 100U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom II:

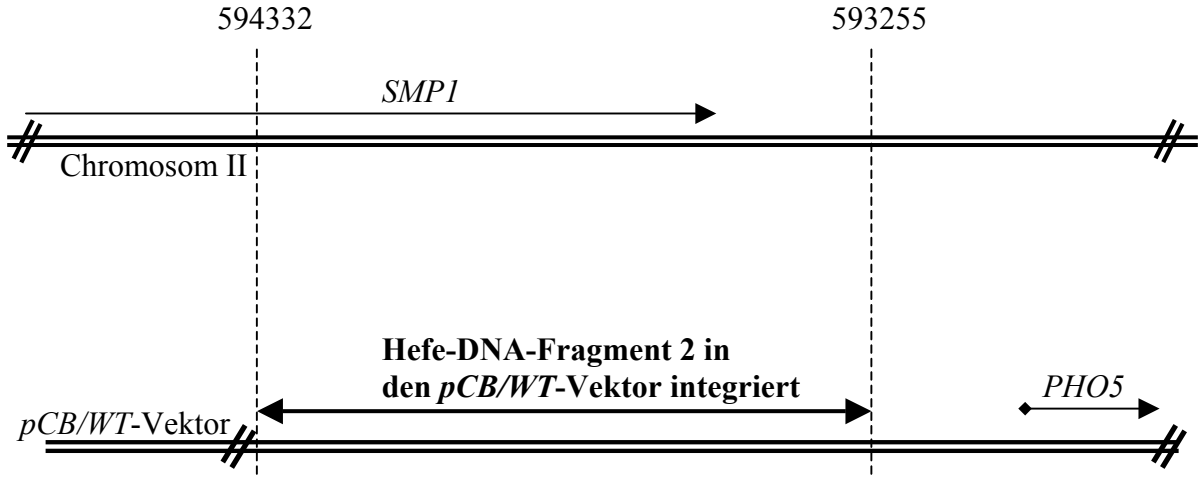

Abbildung 10: Hefe-DNA-Fragment 2

Ort der Sequenz:	Chromosom XII, 888178 - 889471, (Johnston, M. et al., 1997)
Länge:	1294bp
G-C-Anteil:	37.5%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 36U
	sin4-Stamm: 88U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom XII:

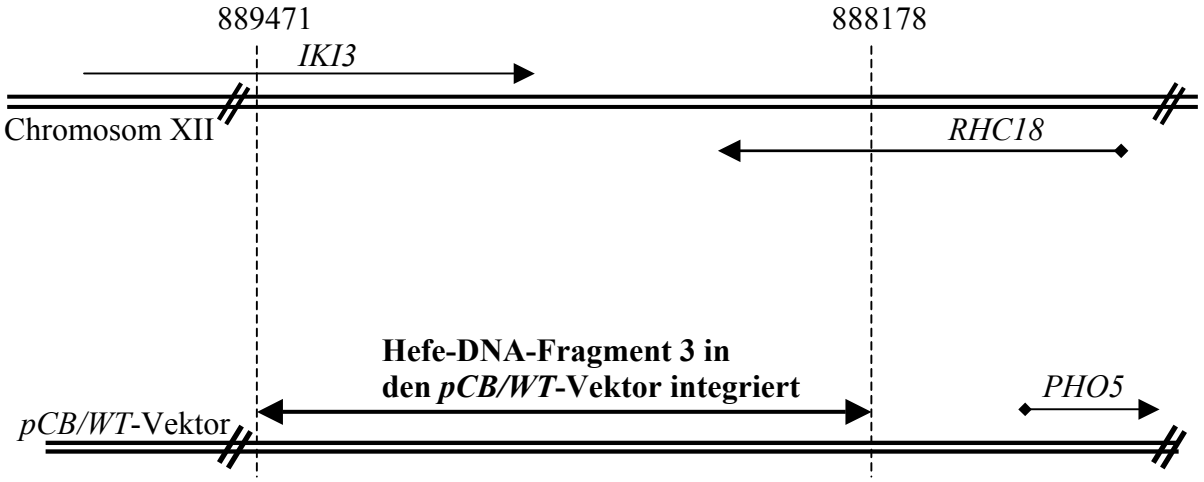

Abbildung 11: Hefe-DNA-Fragment 3

Ort der Sequenz:	Chromosom V, 402242 – 403174, (Dietrich, F.S. et al.,1997)
Länge:	933bp
G-C-Anteil:	37.3%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 45U
	sin4-Stamm: 85U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom V:

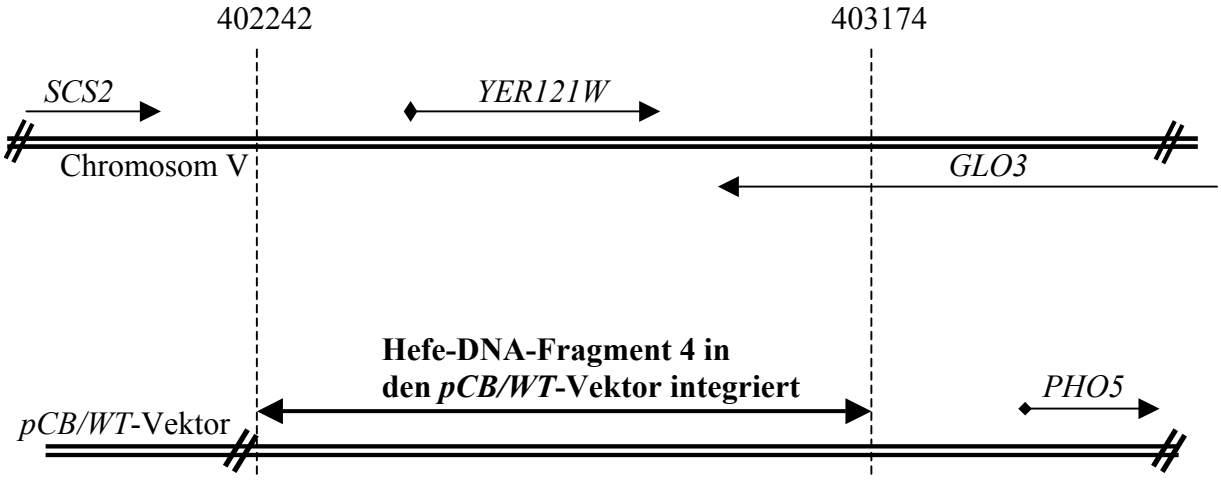

Abbildung 12: Hefe-DNA-Fragment 4

Ort der Sequenz:	Chromosom XVI, 81737 - 82798 (Bussey, H. et al., 1997)
Länge:	1061bp
G-C-Anteil:	41.2%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 39U
	sin4-Stamm: 93U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom XVI:

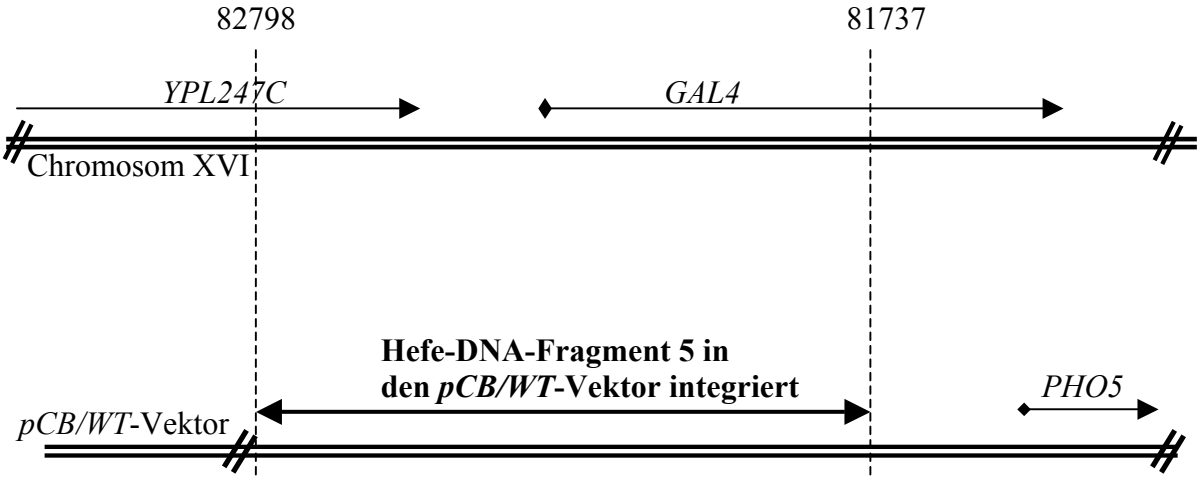

Abbildung 13: Hefe-DNA-Fragment 5

Ort der Sequenz:	Chromosom XI, 259665 - 260666 (Dujon, B. et al., 1994)
Länge:	1001bp
G-C-Anteil:	38.6%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 32U
	sin4-Stamm: 72U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom XI:

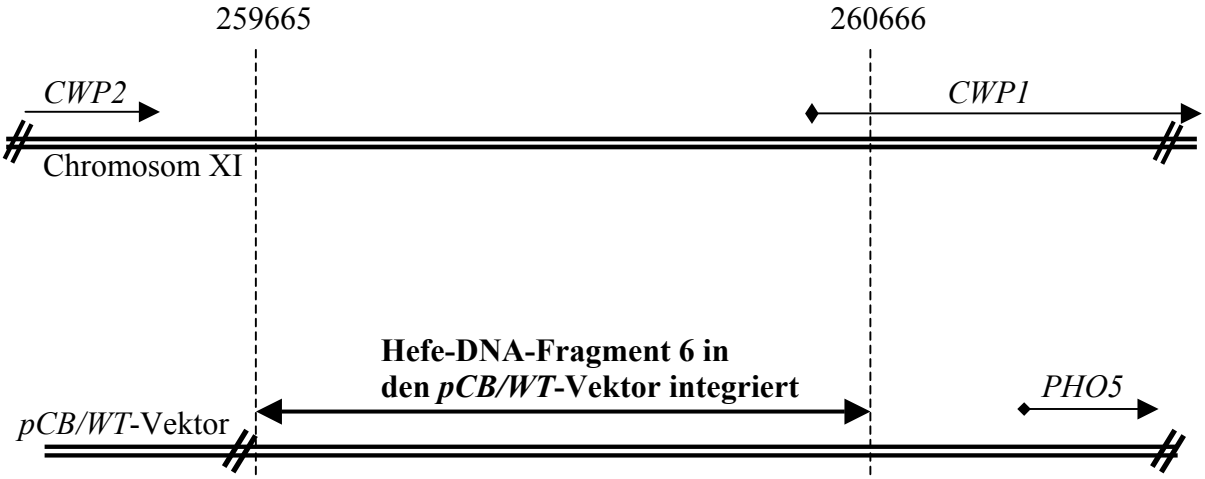

Abbildung 14: Hefe-DNA-Fragment 6

Ort der Sequenz:	Chromosom XV, 290329 - 291583 (Dujon, B. et al., 1997)
Länge:	1254bp
G-C-Anteil:	36.8%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 32U
	sin4-Stamm: 68U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom XV:

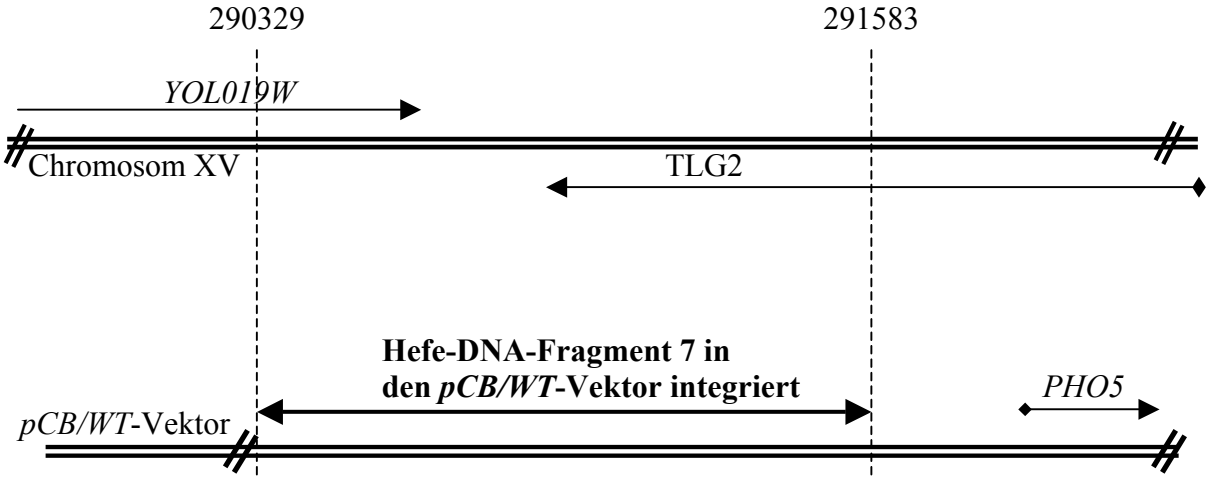

Abbildung 15: Hefe-DNA-Fragment 7

Ort der Sequenz:	Chromosom V, 243967 - 245265 (Dietrich, F.S. et al., 1997)
Länge:	1298bp
G-C-Anteil:	41.1%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 37U
	sin4-Stamm: 91U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom V:

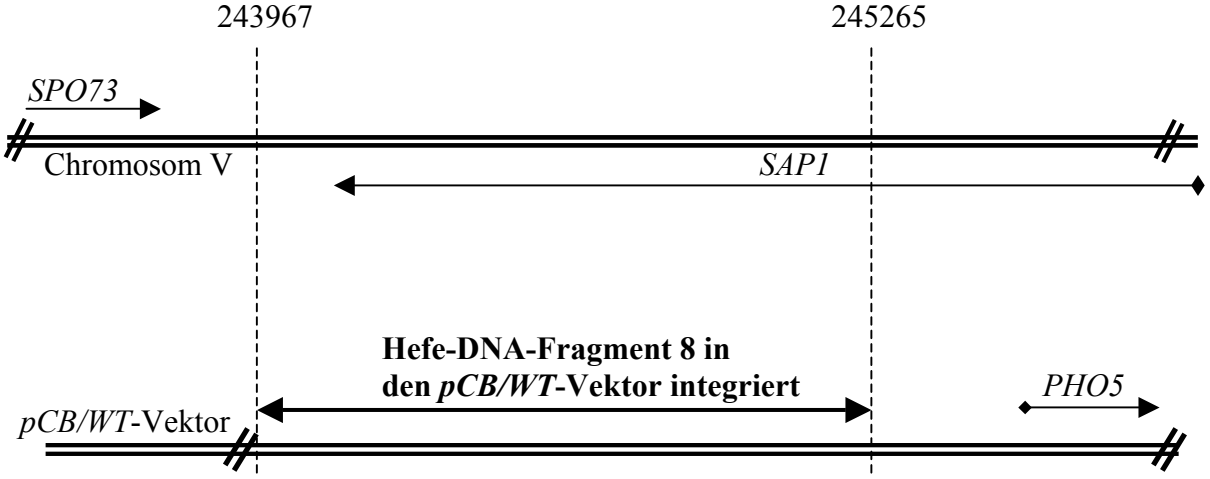

Abbildung 16: Hefe-DNA-Fragment 8

Ort der Sequenz:	Chromosom XVI, 739091 - 740021 (Bussey, H. et al., 1997)
Länge:	1030bp
G-C-Anteil:	38.6%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 35U
	sin4-Stamm: 72U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im Chromosom XVI:

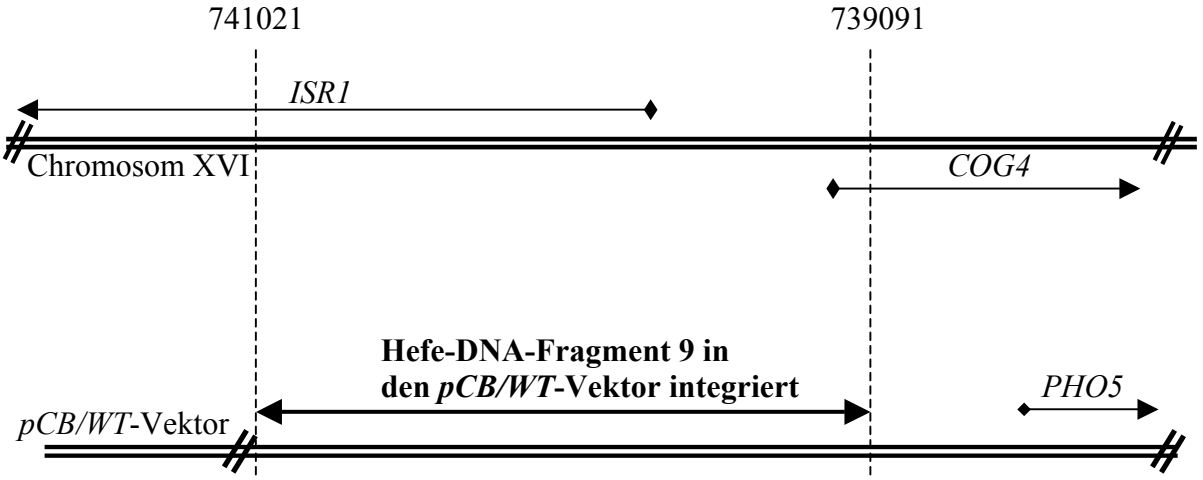

Abbildung 17: Hefe-DNA-Fragment 9

Während die Sequenzen der wenigen Hefe-DNA-Fragmente, die eine erhöhte Aktivität der Phosphatase in *sin4*-Zellen hervorrufen, von besonderem Interesse waren, lag der Fall bei den *E. coli*-DNA-Fragmenten genau entgegengesetzt. Hier lag das Augenmerk eher auf den Fragmenten, die zu keiner Aktivitätserhöhung führten, da diese offensichtlich wesentlich seltener vorkommen. Deshalb wurden die *E. coli*-DNA-Sequenzen der Klone mit den Nummern 1 und 2 nach dem oben erläuterten Verfahren unter Verwendung einer *E. coli*-Genomdatei bestimmt. Das Chromosom des *E. coli* hat eine ringförmige Struktur, weshalb man diesen Ring in verschiedene Abschnitte unterteilt und mit AE bezeichnet. Ansonsten sind die Ergebnisse auf die gleiche Weise dargestellt, wie die obigen Hefesequenzen (siehe Abbildung (18 und 19).

II.9. Kontrollmessungen der Pho5-Aktivitäten

Um auszuschließen, dass es zu irgendeiner Art von Verwechselung der Plasmide gekommen ist, wurden nochmals die Phosphataseaktivitäten der einzelnen Plasmide aus den für die Sequenzierungen angefertigten DNA-Minipräparationen bestimmt. Die Aktivitätsbestimmungen der Phosphatase bestätigten die Werte der vorherigen Messungen sowohl in YS88 (*sin4*) als auch in YS38 (*SIN4*).

Ort der Sequenz:	AE 000187, 5102 - 6009 (Perna, N.T. et al., 2001)
Länge:	907bp
G-C-Anteil:	44.7%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 29U
	sin4-Stamm: 21U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im *E. coli*-Genom:

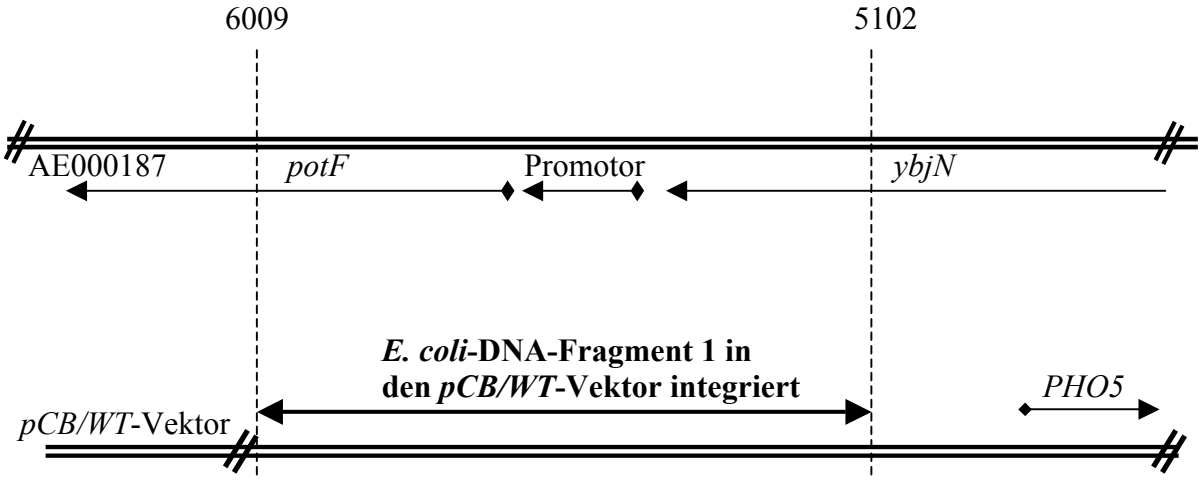

Abbildung 9: *E. coli*-DNA-Fragment 1
Darstellung der Lokalisation und Kodierung des *E. coli*-DNA-Fragments im Chromosom. Darunter ist die Orientierung des Fragments im *pCB/WT*-Vektors dargestellt. Rechts vom DNA-Fragment folgt *PHO5*. Außerdem sind die Länge und der G-C-Gehalt des Fragments angegeben. Zusätzlich sind die gemessenen Phosphataseaktivitäten im *sin4*- und *SIN4*-Stamm angegeben.

Ort der Sequenz:	AE 000283, 8736 - 9628 (Perna, N.T. et al., 2001)
Länge:	892bp
G-C-Anteil:	38.0%
Phosphataseaktivität:	*SIN4*-Stamm: 29U
	sin4-Stamm: 44U

Ort und Kodierung des DNA-Fragments im *E. coli*-Genom:

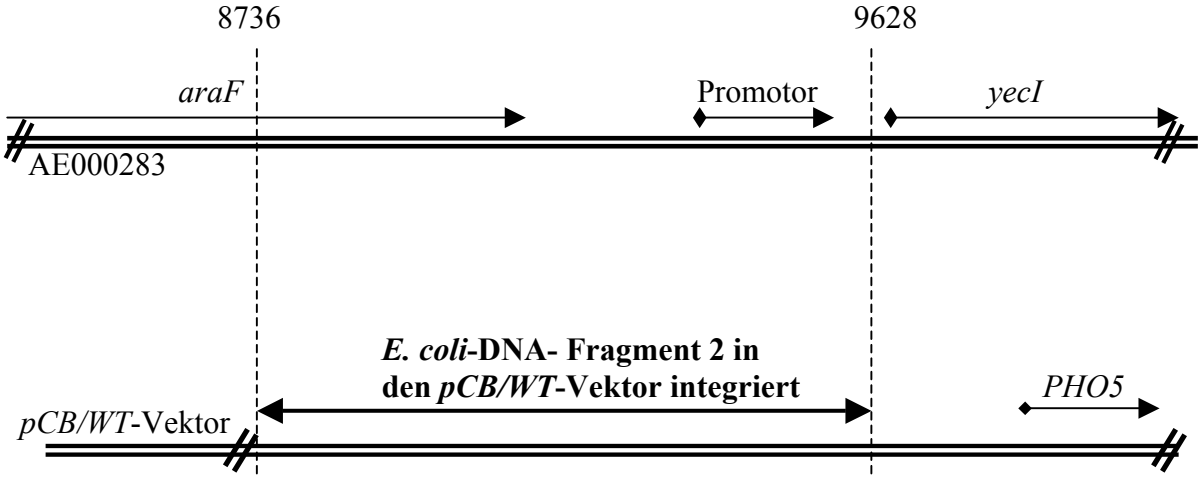

Abbildung 9: *E. coli*-DNA-Fragment 2

II.10. Vergleich der DNA-Sequenzen

Abschließend sollten die einzelnen Sequenzen daraufhin untersucht werden, ob sich irgendwelche Gemeinsamkeiten zwischen ihnen finden ließen.
Dazu sollte zunächst geklärt werden, ob sich Transkriptionsfaktoren finden ließen, die an mehrere der gefundenen Sequenzen binden konnten. Hierbei wurde eine unüberschaubare Zahl von Faktoren gefunden, die Bindungsstellen auf den einzelnen Sequenzen besaßen. Eine besondere Gesetzmäßigkeit ließ sich aber nicht erkennen. Außerdem sollte nach Gemeinsamkeiten der Sequenzen der einzelnen DNA-Fragmente untereinander gesucht werden. Dazu wurde untersucht, ob es Konsensussequenzen zwischen den DNA- Fragmenten mit einer Länge zwischen 5 und 20 Basenpaaren gab. Für eine genaue Beurteilung müsste man allerdings noch DNA-Fragmente von negativ getesteten Hefeklonen bestimmen. Die dabei gefundenen Konsensussequenzen sind mit ihrer Lokalisation im Fragment in der Tabelle 2 und 3 zusammengefasst.

	CCCTG	**TGCCG**	**CTTGCC**	**AAnGCnA**	**TGCnnnCnC**
Fragment 1	-991	1166	1164	-835	-982
Fragment 2	-493	-316	541	525	-709
Fragment 3	-872	777	1144	56	-426
Fragment 4	767	-221	-222	162	399
Fragment 5	-937	482/-141	991/-142	619	-808/-173
Fragment 6	748	704	181	-334	407
Fragment 7	939	-607	177/ 971/-608	-1148	1102
Fragment 8	619	-238	778/-239	-574	203
Fragment 9	470	29	CTgGCC/-283	281	-747

	CAnnnnnGCC	**CnnnTnTCT**	**GnnGCnnCnTC**	**GAnGnnnnnGCA**
Fragment 1	40	-362	-979	979
Fragment 2	493	638	-706	706
Fragment 3	-1072	-523	166	-1146
Fragment 4	CAnnnnnGCg/-887	---	900	-399/-899
Fragment 5	101	314	-442	-826
Fragment 6	837	15	-699	-407
Fragment 7	-1150	1085	1103	-1102
Fragment 8	1196	-535	204	-203
Fragment 9	668	-656	-747	---

Tabelle 2 und 3: Die für die 9 positiv getesteten Hefe-DNA-Fragmente gefundenen Konsensus-Sequenzen sind hier mit Lokalisation und eventuellen Abweichungen dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass es bestimmte Transkriptionsfaktoren gibt, die speziell an die in der Tabelle 2 und 3 aufgeführten Konsensussequenzen binden. Es ließen sich aber keinerlei Transkriptionsfaktoren finden, die an eine der hier gefundenen Konsensussequenzen binden.

III. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, weitere DNA-Fragmente zu finden, die den *PHO5*-Promotor in *sin4*-Zellen bei nicht induzierenden Bedingungen dereprimieren, wenn sie stromaufwärts des *PHO5*-Promotors integriert werden. Ursprünglich wurde dieses Phänomen der Fehlregulation in *sin4*-Zellen dadurch entdeckt, dass die kodierende Sequenz von *PHO5* gegen die kodierende *lacZ*-Sequenz aus *Escherichia coli* ausgetauscht wurde. Das *lacZ* wurde als sogenanntes Reporter-Gen benutzt, um die Transkriptionsrate des *PHO5*-Promotors zu bestimmen (Hörz und Gregory, unveröffentlichte Ergebnisse).

Bei der Untersuchung weiterer Genabschnitte aus dem prokaryonten Genom von *Escherichia coli* zeigten in dieser Arbeit von 14 zufällig ausgewählten, unterschiedlichen DNA-Fragmenten 12 ein positives Testergebnis. Da die DNA-Fragmente zufällig ausgewählt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass nahezu alle Sequenzabschnitte des *Escherichia-coli*-Genoms einen positiven Effekt zeigen würden. Bei der Untersuchung von Plasmiden, denen DNA-Fragmente aus dem Genom von *Micrococcus lysodeikticus* an entsprechender Stelle integriert wurden, zeigten bei der Bestimmung der Phosphataseaktivität etwa 250 von 300 Kolonien eine gesteigerte Expression der sauren Phosphatase trotz dereprimierter Bedingungen. Da sich bei einer stichprobenartigen Untersuchung der 300 Kolonien gezeigt hatte, dass von 15 Plasmiden 3 kein DNA-Fragment besaßen, war anzunehmen, dass etwa ein fünftel der Kolonien Plasmide ohne integriertes DNA-Fragment enthielten. Bei den hier untersuchten 300 Kolonien lag dieser Anteil sogar über der Anzahl der 50 negativ getesteten Kolonien. Da auch hier die Fragmente zufällig ausgewählt wurden, kann man auch für nahezu alle DNA-Fragmente aus dem *Micrococcus lysodeikticus*-Genom annehmen, dass sie, an entsprechender Stelle in den Vektor integriert, in *sin4*-Zellen zu einer Steigerung der *PHO5*-Expression trotz phosphatreichen Mediums führen würden.

Ein Hauptaugenmerk der hier vorliegenden Arbeit lag aber darin, wie wahrscheinlich es ist, dass ein zufällig ausgewähltes DNA-Fragment aus dem *Saccharomyces cerevisiae* Genom vor den *PHO5*-Promotor integriert in einem *sin4*-Stamm zu einer Aktivierung des *PHO5*-Promotors bei nicht induzierenden Bedingungen führen würde. Hier zeigte sich, dass von 400 getesteten Kolonien nur 9 Kolonien einen dereprimierenden Effekt aufwiesen. Eine Stichprobe von 12 Kolonien der 400 getesteten ergab, dass 2 der 12 Kolonien Plasmide enthielten, in die kein DNA-Fragment integriert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass der größte Teil der 400 getesteten Kolonien tatsächlich Plasmide mit integrierten DNA-Fragmenten enthielten, diese allerdings nicht den gesuchten Effekt zeigten.

Obwohl natürlich nicht jeweils die komplette genomische DNA getestet wurde, zeigt sich deutlich, dass die meisten DNA-Fragmente aus den prokaryonten Genomen von *Escherichia coli* und von *Micrococcus lysodeikticus* einen positiven Effekt im Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit zeigten, während dies kaum ein DNA-Fragment aus dem eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae*-Genom tat.

III.1. Unterschiede zwischen den DNA-Fragmenten

Die Ergebnisse haben deutlich gezeigt, dass nur ein Bruchteil der eukaryonten DNA-Fragmente aus dem Hefe-Genom zu einer Erhöhung der Promotoraktivität führen, während dies nahezu alle prokaryonten DNA-Fragmente aus *Escherichia coli*- bzw. *Micrococcus lysodeikticus* tun.
Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass die Nukleotide im *Escherichia coli*- und *Micrococcus lysodeikticus*-Genom im Gegensatz zu denen des Hefe-Genoms häufig Methylierungen aufweisen (Nakao, 2001). Allerdings werden in die Hefezelle transformierte Plasmide mit entsprechenden DNA-Fragmenten bei der Zellteilung vom Enzymapparat der Hefezelle repliziert. Da bis heute keine DNA-Methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass bei der Replikation in der Hefezelle eventuelle DNA-Methylierungen verloren gehen. Davon abgesehen, hat die DNA-Methylierung eher eine Repression der Genexpression zur Folge (Boyes und Bird, 1992). Es ist also unwahrscheinlich, dass der Unterschied, den die DNA-Fragmente in den Experimenten zeigten, aufgrund von DNA-Methylierung zustande kommt. Der Unterschied zwischen den DNA-Fragmenten scheint vielmehr aufgrund unterschiedlicher Primärsequenzen zustande zu kommen.

Eine weitere Erklärung für die gefundenen Resultate könnte der unterschiedliche G-C-Gehalt der einzelnen Genome und damit der DNA-Fragmente sein. Es ist zum Beispiel bekannt, dass sich A-T-reiche Sequenzen in den kleinen Furchen der DNA-Doppelhelix leichter komprimieren lassen als G-C-reiche und so Einfluss auf die Positionierung der Nukleosomen und damit auf die Chromatinstruktur besitzen (Hunter, 1996; Svaren und Chalkley, 1990). Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* hat einen durchschnittlichen G-C-Gehalt von etwa 38%, der von Chromosomenregion zu Chromosomenregion um maximal 5% variiert (Bradnam et al., 1999). Im Gegensatz dazu weist das Genom von *Escherichia coli* einen G-C-Gehalt von durchschnittlich 51% auf (Perna et al., 2001) und das Genom von *Micrococcus lysodeikticus* sogar einen G-C-Gehalt von etwa 72% (Kocur et al, 1972). Durch

den recht großen Unterschied zwischen dem G-C-Gehalt der Hefe auf der einen Seite und denen der beiden Bakterienarten auf der anderen Seite, wäre es nun denkbar, dass es durch einen hohen G-C-Gehalt der DNA-Fragmente zu einer Aktivierung des *PHO5*-Promotors kommt. Allerdings würde dies auch bedeuten, dass der Bereich des G-C-Wertes, bei dem der Wechsel von Nichtaktivierung zu Aktivierung des *PHO5*-Promotors durch das entsprechende DNA-Fragment von statten geht, zwischen dem G-C-Wert der Hefe und dem des *E. coli* liegen muss, da die meisten getesteten Kolonien mit integrierten *E. coli*-DNA-Fragmenten positiv getestet wurden. Die Analyse der positiv getesteten DNA-Fragmente aus dem Hefegenom ergab einen durchschnittlichen G-C-Anteil im Bereich von 36,8% bis 43,3%, also keine Abweichung vom durchschnittlichen Wert des *S. cerevisiae*-Genoms. Dagegen zeigte die Analyse der beiden negativ getesteten DNA-Fragmente aus dem *Escherichia coli*-Genom einen G-C-Anteil von 44,7% bzw. 38,0%. Diese beiden Werte liegen deutlich unter dem durchschnittlichen G-C-Gehalt von 51% des *Escherichia coli*-Genoms. Es könnte also durchaus sein, dass zwischen der Aktivierung des *PHO5*-Promotors in *sin4*-Zellen durch prokaryonte DNA-Fragmente und dem G-C-Gehalts ein Zusammenhang besteht.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der gefundenen Resultate wäre das Vorhandensein promotorähnlicher Elemente in den positiv getesteten DNA-Fragmenten. Man hat solche kryptischen Promotorelemente besonders häufig in prokaryonten DNA-Abschnitten gefunden (Schnetz, 1995; Wobbe und Struhl, 1990). Kryptische Promotoren besitzen oft mehrere DNA-Sequenzen in beiden Orientierungen, die Promotor-Sequenzen ähneln, welche eine Bindung der Polymerase an den DNA-Strang fördern. Dies würde erklären, warum im Gegensatz zu den Hefe-Genom-Fragmenten die DNA-Fragmente der beiden Bakterienarten so häufig ein positives Testergebnis liefern. Es würde auch erklären, warum es keinen Unterschied macht, in welcher Orientierung die *lacZ*-Sequenz in den Vektor integriert wird. Eine Terminatorsequenz, die zwischen das integrierte DNA-Fragment und dem *PHO5*-Promotor gebracht wird, würde eine weiter stromaufwärts des *PHO5*-Promotors initiierte Transkription abbrechen. Diese Manipulationen führten aber zu keiner Veränderung der Transkriptionsrate von *PHO5*, was kryptische Promotoren zur Erklärung des Phänomens ausschließt (unveröffentlichte Ergebnisse, Hörz und Gregory).

Eine Erklärung für die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse könnte sein, dass genomische DNA in eukaryonten Zellen im Gegensatz zu prokaryonten in Nukleosomen vorliegt (Swedlow, 1993). Die Positionen der Nukleosomen am DNA-Strang üben einen

wesentlichen Einfluss auf die Chromatinstruktur und damit auf die Regulation der Transkription aus (Wolffe, 1994; Hansen, 1992). Ein DNA-Strang bildet in Hefe durchschnittlich alle 100-170 bp ein Nukleosom (Kornberg 1981). Es besteht nun die Möglichkeit, dass die eukaryonten DNA-Fragmente aus der Hefe im Gegensatz zu den prokaryonten eine gewisse Periodizität in ihren Sequenzen besitzen, die die Affinität zwischen Histonen und DNA-Strang erhöht und die Positionierung von Nukleosomen beeinflusst. Analysen eukaryonter DNA haben ergeben, dass Motive mit einer Länge von zwei oder drei Basenpaaren vorkommen, die eine gewisse Periodizität von etwa 10,5bp besitzen (Trifonov und Sussman, 1980). Da diese Motive meist A-T-reich sind, und die DNA-Doppelhelix mit 10,4bp eine sehr ähnliche Periodizität besitzt, ist die Windung des DNA-Strangs in solchen Bereichen stärker (Sivolob und Khrapunov, 1995). Man nimmt an, dass diese verstärkte Windung die Positionierung der Nukleosomen mitbestimmt und die Affinität der Histone zum DNA-Strang erhöht (Kiyama und Trifonov, 2002). In prokaryonter DNA wurde die oben erwähnte Periodizität nicht gefunden. In Vektoren integrierte prokaryonte DNA-Fragmente, die in einem Hefekern repliziert werden, bilden Nukleosomen mit zufälliger Positionierung (Caffarelli et al., 1988; Estruch et al., 1989). Das könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit gefundenen Phänomene liefern. In *sin4*-Zellen ist der DNA-Strang Faktoren und Enzymen leichter zugänglich. Dadurch kommt es aber noch nicht zu einer Aktivierung des *PHO5*-Promotors. Erst bestimmte stromaufwärts integrierte DNA-Fragmente führen zur Dereprimierung des Promotors. Prokaryonte DNA-Fragmente bilden zwar Nukleosomen, diese aber mit zufälliger Positionierung und einer geringeren Affinität der Histone zum DNA-Strang. Das könnte bei den meisten prokaryonten DNA-Fragmenten zu einer weiteren Auflockerung der umgebenen Chromatinstruktur führen und dadurch den *PHO5*-Promotor endgültig dereprimieren. Andererseits reicht aber die Auflockerung der Chromatinstruktur alleine nicht aus, da es zu keiner Dereprimierung in Zellen mit funktionsfähigem Sin4 kommt. Die meisten Hefe-DNA-Fragmente bilden wahrscheinlich relativ stabile Nukleosomen mit einer relativ geordneten Positionierung und beeinflussen dadurch die Chromatinstruktur der Umgebung kaum. Das könnte erklären, warum die wenigsten Hefe-DNA-Fragmente trotz des Fehlens von funktionsfähigem Sin4 zu keiner Dereprimierung führen. Während sich wahrscheinlich die meisten prokaryonten DNA-Fragmente schlecht in eine Chromatinstruktur einbetten lassen, könnten die hier positiv getesteten Hefe-DNA-Fragmente aufgrund eines anderen Mechanismus zu einer Dereprimierung von *PHO5* führen.

III.2. Untersuchung der 9 positiv getesteten Hefe-DNA-Fragmente auf Gemeinsamkeiten

Die in dieser Arbeit gefundenen 9 DNA-Fragmente aus dem Hefe-Genom, die stromaufwärts des *PHO5*-Promotors integriert bei Abwesenheit von Sin4 zu einer Störung der Regulation führen, könnten eventuelle Gemeinsamkeiten aufweisen, die zur Klärung dieses Phänomens führen würden.
Die entsprechenden Fragmente könnten Enhancer enthalten. Bei Enhancern handelt es sich um DNA-Abschnitte, die einige Hundert Basenpaare meist stromaufwärts vom Promotor lokalisiert zu einer Verstärkung der Genexpression führen (Gerasimova und Corces, 2001, Bell et al., 2001). Würden die DNA-Fragmente solche Elemente enthalten, wäre diese Aktivierung wahrscheinlich unabhängig von Sin4. Da aber alle untersuchten Fragmente im Wildtyp im Gegensatz zum *sin4*-Stamm keine Erhöhung der Expression von *PHO5* zeigten, scheinen die Fragmente keine Enhancer zu enthalten, die Einfluss auf die Genregulation von *PHO5* besitzen.

Eine weitere Möglichkeit zur Klärung des Zustandekommens des positiven Effekts der 9 Hefe-Fragmente wären funktionelle Gemeinsamkeiten der einzelnen DNA-Fragmente. Die verschiedenen Abschnitte, die von den DNA-Fragmenten kodiert werden, könnten Ähnlichkeiten in ihrer Funktion oder Regulation aufweisen. Alle DNA-Fragmente enthalten nur Teile kodierender Sequenzen, abgesehen vom hypothetischen Protein Yer121W im DNA-Fragment Nummer 4. Da es sich hierbei nur um ein hypothetisches Protein handelt, ist es unwahrscheinlich, dass es zu Interaktionen zwischen den von den integrierten DNA-Fragmenten kodierten Proteinen und dem *PHO5*-Promotor kommt.
Bei der Analyse der 9 DNA-Fragmente aus dem Hefegenom ist auffällig, dass alle DNA-Fragmente intergenische Regionen enthalten. Da ein Gen des *S. cerevisiae* im Schnitt eine Länge von 2kb und ein intergenischer Bereich etwa eine von 0,4 kb besitzt, ist es sehr auffällig, dass alle 9 Hefe-DNA-Fragmente bei einer Länge von etwa 1kb intergenische Regionen besitzen, und kein DNA-Fragment eine kodierende Sequenz über seine volle Länge besitzt. Rein statistisch betrachtet, würden zufällige etwa 1kb große DNA-Fragmente der Hefegenom-DNA in der Mehrzahl nur kodierende Sequenzen besitzen. Intergenische Regionen enthalten häufig Elemente, die Einfluss auf die Genregulation besitzen. Sie könnten Elemente wie kryptische Promotoren, Enhancer oder hypersensitive Regionen besitzen, die zu einer allgemeinen Steigerung der Genexpression in der unmittelbaren Umgebung führen würden. Es könnten auch auf dem integrierten DNA-Fragment enthaltene Promotoren eine

Transkription initiieren, die durch den *PHO5*-Promotor läuft, sich auch über die *PHO5* kodierende Sequenz erstreckt und schließlich zu einer Expression von *PHO5* führt. Dies wäre aber nur für die DNA-Fragmente mit den Nummern 1, 5 und 6 vorstellbar, da die anderen keine Promotorregionen mit entsprechender Orientierung besitzen. Allerdings besitzen die von diesen Promotoren regulierten Proteine, STP4, GAL4 und CWP1, keinerlei erkennbaren Zusammenhang in ihrer Funktion oder Regulation (*Saccharomyces* Genome Database; Goffeau et al., 1996). Die Computeranalyse der 9 DNA-Fragmente auf das Vorhandensein theoretischer Promotoren ergab nur für das Fragment mit der Nummer 3 einen zusätzlichen Promotor mit der Lokalisation 1003 bis 1253 des Fragmentes (Kel-Margoulis et al., 2002). Dabei handelt es sich um DNA-Sequenzen, die den in Promotoren häufig vorkommenden Konsensus-Sequenzen ähneln, wie die TATA-Box. Vielleicht liefert diese Tatsache eine Erklärung speziell für das Fragment Nummer 3, aber als allgemeine Erklärung scheidet sie aus. Es wäre auch denkbar, dass die stromaufwärts des *PHO5*-Promotors integrierten DNA-Fragmente Bindungsstellen für funktionell ähnliche Transkriptionsfaktoren besitzen, die zu einer Genexpression führen (Roeder, 1991). Die Analyse der Transkriptionsfaktoren, die an die 9 DNA-Fragmente aus dem Hefe-Genom binden, ergab eine unüberschaubare Anzahl von Faktoren (*Saccharomyces* Genome Database), die es unmöglich machte, für alle 9 Fragmente funktionell ähnliche Transkriptionsfaktoren zu finden. Wahrscheinlich lässt sich keine einheitliche Erklärung für alle 9 DNA-Fragmente finden. Es ist vielmehr anzunehmen, dass bei einem DNA-Fragment die gesteigerte *PHO5*-Expression zum Beispiel durch eine hypersensitive Region, bei einem anderen durch eine Promotorregion zustande kommt. Hypersensitive Regionen, wie die UASp1 des PHO5-Promotors, zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht in Nukleosomen gepackt sind und damit Faktoren besonders gut zugänglich sind. Dieser gesteigerte Grad an Zugänglichkeit könnte schließlich neben dem Fehlen von funktionsfähigem Sin4 zur Dereprimierung des *PHO5*-Promotors führen. Die Tatsache, dass das ursprüngliche Fragment, die *lacZ*-Sequenz, keine Intergenregionen enthält, und dass das Einfügen einer Terminatorsequenz zwischen *lacZ*-Sequenz und *PHO5*-Promotor zu keiner Änderung der Expression führt (Hörz und Gregory, unveröffentlichte Ergebnisse), deutet darauf hin, dass der Mechanismus der Expressionssteigerung bei prokaryonten und eukaryonten DNA-Fragmenten grundsätzlich verschiedener Natur sein könnte. Bei eukaryonten DNA-Fragmenten kommt sicherlich den intergenischen Regionen eine große Bedeutung zu. Bei prokaryonten DNA-Fragmenten ist die Ursache eher in grundlegenden Unterschieden der DNA-Struktur im Vergleich zu eukaryonter DNA zu suchen.

Schließlich besteht noch die Möglichkeit über die Konsensussequenzen eventuelle Gemeinsamkeiten der DNA-Fragmente herauszufinden. Es wäre denkbar, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Motive der Konsensussequenzen binden können. Leider ließ sich kein Transkriptionsfaktor finden, der an ein Motiv der Konsensussequenzen binden würde (Wingender et al., 2001). Auch die Analyse, ob die relative Lokalisation einer bestimmten Konsensussequenz zum *PHO5*-Promotor bei der Mehrzahl der integrierten DNA-Fragmente sich ähnelt, lieferte keine Übereinstimmungen. Lediglich die Sequenz -CCCTG-, die in allen 9 DNA-Fragmenten vorkommt, wurde bis jetzt in der Literatur erwähnt. Sie dient, wenn sie mehrmals hintereinander vorkommt, als Bindungsmotiv für ein helix-loop-helix-Protein bei der geschlechtlichen Determinierung der *Drosophila melanogaster* Fliege (Yang, et al., 2001). Außerdem scheint sie eine Rolle bei der Initiation einer Transkription der RNA-Polymerase III des Menschen zu spielen (Kobayashi, et al., 1992). Aber auch diese Tatsachen liefern wohl keine Erklärung des Phänomens, da diese Konsensussequenz in keiner der 9 Fragmente sich mehrmals hintereinander wiederholend vorkommt.

III.3. Liefern die Resultate dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Eigenschaften von Sin4?

Sin4 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Gene (Chen et al., 1993; Jiang und Stillman, 1995; Stillman et al., 1994). So kommt es bei fehlendem Sin4 zu Veränderungen der Chromatinstruktur, die mit veränderter Genexpression einhergehen können. Dabei hat Sin4 keinen Einfluss auf die Positionierung der Nukleosomen. Vielmehr scheint es die Interaktion zwischen dem DNA-Strang und den Histonen zu beeinflussen (Macatee et al., 1997).

Wird nun ein bestimmtes DNA-Fragment stromaufwärts des *PHO5*-Promotors integriert und in eine *sin4*-Hefezelle gebracht, kommt es trotz phosphatreichen Mediums zu einer gesteigerten *PHO5*-Transkription, die unabhängig von den entsprechenden Transkriptionsfaktoren ist. Das integrierte DNA-Fragment scheint bei fehlendem Sin4 den *PHO5*-Promotor so zu irritieren, dass dieser aktiviert wird. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Sin4 ein hemmender Bestandteil des RNA-Polymerase-II-Holoenzyms ist, und dass dadurch eine Transkription bei Abwesenheit von Sin4 leichter vonstatten geht (Li et al., 1995).

Außerdem ist Sin4 Bestandteil des SAGA-Komplexes, und man vermutet, dass es einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des SAGA-Komplexes besitzt (Roth et al., 2001). Der SAGA-Komplex ist aus verschiedenen funktionellen Einheiten zusammengesetzt und besitzt mit Gcn5 eine katalytische Untereinheit, der Histon-acetyltransferase (HAT), zur Acetylierung von Histonen (Grant et al., 1997). Die Acetylierung von Histonen findet sich gehäuft in transkriptionell aktiven Regionen (Loidl, 1994) und verbindet funktionell die Aktivierung eines Promotors mit den Veränderungen seiner Chromatinstruktur. Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus nicht vollständig geklärt ist, scheint die Acetylierung die entsprechenden Nukleosomen für die anschließende Umstrukturierung des Chromatins zu markieren (Reinke et al., 2001). Da die Histon-Acetylierung auch bei der Regulation des *PHO5*-Promotors eine Rolle spielt (Gregory et al., 1998), könnte man sich vorstellen, dass es bei Abwesenheit des den SAGA-Komplex hemmenden Sin4 zu einer überschießenden Acetylierung der Histone des *PHO5*-Promotors kommt. Durch die zusätzlich fehlende Hemmung des RNA-Polymerase-II-Holoenzyms durch Sin4 könnte es leichter zur Initiation einer Transkription kommen. Allerdings wird bis jetzt nur diskutiert, ob Sin4 auf den SAGA-Komplex hemmend wirkt, der Beweis hierfür steht noch aus.
Dies allein reicht allerdings noch nicht zur unkontrollierten Expression von *PHO5* aus, da der *pCB/WT*-Vektor ohne integriertes DNA-Fragment bei den entsprechenden Bedingungen zu keiner Erhöhung der Expression führt. In diesem Zustand könnte die Überstruktur des *PHO5*-Promotors noch so dicht gepackt sein, dass es zu keiner Initiation der Transkription kommt. Erst die Integration eines der hier besprochenen DNA-Fragmente stromaufwärts des *PHO5*-Promotors führt zu einer gesteigerten *PHO5*-Expression. Die prokaryonten DNA-Fragmente könnten durch ihre wahrscheinlich unterschiedliche Primärstruktur die Domäne der *PHO5*-Region soweit auflockern, dass es zu einer Transkription kommt. Bei den eukaryonten DNA-Fragmenten kommt es eher durch aktivierende Elemente der intergenischen Regionen zu einer Steigerung der *PHO5*-Expression.

III.4. Vorsicht bei der Verwendung von Reporter-Genen

Abschließend sollte noch darauf hingewiesen werden, dass der Gebrauch von Reporter-Genen zur Untersuchung des Aktivierungszustandes eines Promotors kritisch betrachtet werden sollte.
Man hat nicht nur beim Gebrauch des *lacZ*-Gens als Reporter-Gen für den *PHO5*-Promotor eine unkontrollierte Expression bei fehlendem Sin4 beobachtet. Auch bei der Untersuchung

der Regulation der für den Glucosestoffwechel der Hefe wichtigen Gene *GAL1* und *GAL10* und der Endonuklease *HO* mit dem *lacZ*-Gen als Reporter-Gen zeigte sich bei fehlendem Sin4 eine unkontrollierte Genexpression (Chen et al., 1993; Jiang und Stillman, 1995; Yu et al., 2000). Auch ein Konstrukt aus dem *PHO5*-Gen mit einem davor integrierten *HIS5*-Promotor, zeigt in *sin4*-Zellen eine erhöhte Transkriptionsrate (Harashima et al., 1995).
Es ist also generell Vorsicht geboten, die Aktivität eines Promotors in *sin4*-Zellen mit Hilfe eines Reporter-Gens bestimmen zu wollen.

IV. Material und Methoden

IV.1. Material

IV.1.1. Chemikalien und Enzyme

Alle Grundchemikalien (Salze, Puffersubstanzen, Lösungsmittel) sowie Ethidiumbromid, Bromthymolblau und Hefeextrakt wurden von E. Merck, Darmstadt bezogen. Acrylamid, Fast-red-TR-salt und die Lachs-Sperma-DNA stammten von Serva, Heidelberg. Ampizillin und Tetracyclin stammten von der Bayer AG, Leverkusen. Seakem Agarose wurde von Marine Colloids, Rockland, USA, Bacto Agar, Bacto Pepton, Bacto Trypton und Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids von Difco, Detroit, USA bezogen. Aminosäuren, α-Naphthylphosphat und PEG stammten von Sigma (Deisenhofen). o-Nitro-Phenylphosphat wurde von Boehringer Mannheim bezogen.

QIAEX-Lösung zur Präparation von DNA aus Agarosegel und QIAGEN-Säulen zur Reinigung von Plasmid-DNA waren von DIAGEN, Düsseldorf.

Der Thermo Sequenase [^{33}P] Terminator Cycle Sequencing Kit wurde von Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England bezogen.

Die Restriktionsnukleasen AluI, ApoI, BamHI, ClaI, DdeI, EcoRI, HaeIII, HindIII, Sau3a und die RNAse A wurden von Boehringer Mannheim bezogen, die T4-Ligase und CIP (alkalische Phosphatase) stammten von der Firma New England Biolabs, Beverly, USA.

IV.1.2. Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide und DNA

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:
für osmotische Transformation *Escherichia coli* 490A (r_k, m_k, *met-, thr-, leu-, recA-*), Bezugsquelle war G. Hobom, Gießen.
für Elektroporation *Escherichia coli* XL1Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI^{q}ZDM15Tn10(tet)*] (Bullock et al., 1987) (Stratagene)

Folgende Hefestämme wurden verwendet:

YS18: (*MATα, his3-11,15, leu2-3,112, can*^{R}*, ura3Δ5*)

YS34: (YS18 *pho5*::*URA3*)

YS38: (YS18, die kodierende Sequenz von *PHO5* wurde durch die kodierende von *lacZ* substituiert) aus YS34, *URA3::lacZ, ura*$^{-}$*, his*$^{-}$*, leu*$^{-}$

YS88: YS38 *sin4*::*URA3*

Folgende DNA wurde verwendet:

Saccharomyces cerevisiae-DNA wurde vom Labor zur Verfügung gestellt.
Escherichia coli-DNA wurde vom Labor zur Verfügung gestellt.
Micrococcus lysodeikticus-DNA wurde von Sigma, Taufkirchen bezogen.

Die Oligonukleotide zur Sequenzierung wurden von MWG-Biotech, Ebersberg bezogen und hatten folgende Sequenzen:
5'-CTT CGC TAC TTG GAG CC-3' und 5'-AAG ACT TCC AAATAC G-3'

DNA Lamba stammte von Boehringer Mannheim und diente nach Spaltung mit EcoRI und HindIII als Größenstandard für die Agarose-Gelelekrophorese.

pCT/WT-Vektor:
Als Grundlage diente der Vektor *pCB/WT* von Fascher et al. (1990), wobei die kodierende Sequenz *TRP1* gegen die kodierende Sequenz des *LEU2*-Gens ausgetauscht wurde.

IV.2. Methoden

IV.2.1. Kulturtechniken

IV.2.1.1. Steriles Arbeiten mit Bakterienkulturen und *Saccharomyces cerevisiae*

Alle Arbeiten mit Bakterien oder Hefen wurden unter einer sterilen Werkbank oder direkt neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Kunststoffgeräte wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden autoklaviert. Glaswaren wurden bei 180°C für drei Stunden trocken autoklaviert. Hitzebeständige Geräte oder Gefäße wurden durch kurzes Abflammen keimfrei gemacht.
Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte in sterilen Reagenzgläsern. Hefen wurden in

sterilen Erlenmeyerkolben angezogen. Die verwendeten Nährmedien wurden vor Zugabe von Antibiotika autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklaviert werden dürfen, wurden sterilfiltriert.

IV.2.1.2. Anzucht von Bakterienkulturen

Das Animpfen von Flüssigkulturen erfolgte mit einer sterilen Plastiköse in LB-Medium, das zur Selektion Ampillicin 100µg/ml enthielt. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Flüssigkultur unter guter Belüftung bei 37°C im Schüttler. Auf Festmedien wurde *E. coli* mit einer sterilen Plastiköse im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

IV.2.1.3. Anzucht von Hefekulturen

Saccharomyces cerevisiae wurde in Flüssigkultur unter guter Belüftung bei 30°C im Schüttler inkubiert. Als Vollmedium wurde Yeast Extract-Pepton-Dextrose-Medium (YPD) verwendet. Als Selektionsmedium wurde Yeast Nitrogen Base [YNB] w/o Amino Acids Medium verwendet, dem eine für den jeweiligen Stamm essentielle Aminosäure nicht zugegeben wurden. Auf Festmedien wurde *S. cerevisiae* mit einer sterilen Plastiköse im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 30°C im Brutschrank angezogen.

IV.2.2. DNA-Arbeitstechniken

IV.2.2.1 DNA-Mini-Präparation von Plasmid-DNA nach dem Qiagen-Protokoll

Die Präparation kleiner Mengen von Plasmid-DNA erfolgte weitgehend nach Anleitung der Firma Qiagen. 2 ml einer Übernachtkultur von *E. coli* wurden 5 min bei 5.000 zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde in 0,3 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl (pH8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 100 µg/ml RNaseA) suspendiert, anschließend wurden 0,3 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben und vorsichtig gemischt (mehrmaliges Umschwenken der Reaktionsgefäße), wodurch ein Zellaufschluss durch alkalische Lyse erfolgte (Birnboim und Doly, 1979). Es schloß sich eine vierminütige Inkubation bei Raumtemperatur an, bei der die DNA denaturierte. Eine Kaliumacetat-Fällung erfolgte nach Zugabe von 0,3 ml eiskaltem Puffer P3

(3 M Kaliumacetat (pH 5,5)). Es wurde erneut vorsichtig gemischt und es folgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis. Durch diese Neutralisation der Lösung renaturierte die Plasmid-DNA, die eine wesentlich schnellere Reassoziationskinetik als chromosomale DNA besitzt. Die chromosomale ssDNA assoziierte mit dem Kalium-DS-Salz und fiel mit diesem aus. Eine QIAGEN-Säule (modifizierte Silicagelmatrix, Qiagen tip-20) wurde mit 1ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0,15% Triton X-100, (pH 7,0)) äquilibriert und anschließend mit dem Überstand der Zentrifugation mit 12.000 rpm über 15 min bei 4°C beladen. Die Säule wurde 4 x mit je 1 ml des Puffers QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0) gewaschen. Die an das Säulenmaterial adsorbierte DNA wurde dann mit 0,8 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5) eluiert.
Die eluierte Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,6 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation mit 15.000 rpm über 30 min bei 4°C präzipitiert, in 70%igem Ethanol gewaschen und nach fünfminütigem Trocknen in 30 µl H_20 gelöst. Zum vollständigen Lösen der DNA wurden die Reaktionsgefäße für ca. 30 min auf einen Reaktionsgefäß-Schüttler bei 1.800 rpm gestellt. Für eine analytische Restriktionshydrolyse wurden 0,5µl (ca. 300 bis 500 ng) eingesetzt.

IV.2.2.2. Isolierung von genomischer Hefe-DNA

15 ml einer Hefe-Übernachtkultur wurden in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und für 10 min mit 4.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Hefezellen in 400µl sterilem Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 200µl Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm) wurde die Zellsuspension für 3 min intensiv auf einem Vortex gemischt und dann mit einer Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 100µl Proteinase K-Mix (25µl 10% SDS, 25µl 0,1 M EDTA (pH8,0), 50µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 3 h bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung der proteolytisch gespaltenen Proteine wurde ein Volumenteil (500 µl) Phenol zugegeben, langsam geschwenkt bis die Mischung weiß und homogen war und anschließend 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die Phenolextraktion wurde zweimal mit Chloropane (50% Phenol, 50% Chloroform, 0,05% 8-Hydroxychinolin, äquilibriert mit 0,5 Volumenanteilen ANE-Puffer (10 mM Natriumacetat, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 6,0)) wiederholt. Danach wurde zur Entfernung von Phenolresten 1vol Chloroform/Isoamylalkohol [24:1(v/v)] zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in

ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 50µl RNase-Lösung (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100µg/ml RNase) versetzt und bei 37°C für 30min inkubiert. Anschließend wurde die genomische DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) und 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach einer Zentrifugation mit 12.000 rpm für 30 min bei 4°C schloss sich ein Waschschritt mit 1 ml 70%igen Ethanol an (Kühlzentrifuge, 12.000 rpm, 30 min, 4°C). Die genomische DNA wurde schließlich in 50µl TE vorsichtig gelöst und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

IV.2.2.3 Klonierungstechniken

Die Klonierungstechniken wie Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen, Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase, Auftrennung und Präparation von DNA mit Hilfe von Elektrophorese durch Agarosegele, Ligierung von DNA-Fragmenten zu Plasmiden wurden nach Standardprozeduren (Maniatis et al., 1982) ausgeführt.
Zu analytischen Zwecken wurde DNA in einem Endvolumen von 20 µl gespalten und zur Elektrophorese mit Auftragpuffer in die Taschen des Agarosegels gebracht. Für die Präparation von DNA aus Agarosegel wurde die Qiaex-Methode der Firma Diagen verwendet.
Für die Ligierung von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase wurden 20-50 ng Vektor-DNA mit 50-200 ng einzusetzendem Fragment in einem Endvolumen von 20µl über Nacht bei 16°C inkubiert.

IV.2.3. Transformation von Bakterienzellen

IV.2.3.1. Osmotische Transformation

Die Plasmid-DNA wurde nach der $CaCl_2$-Methode (Maniatis et al., 1982) in *E. coli* transformiert.

IV.2.3.2. Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

1 l LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin wurde mit 10 ml einer Übernacht-Kultur von *E. coli* XL1-Blue angeimpft. Die Kultur wurde 3 bis 4 h bis zu einer OD_{660} = 0,5 bei 37°C im

Schüttler herangezogen. Die Bakterienzellen wurden bei 6.000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert und das Sediment in einem Liter eiskaltem sterilen Wasser suspendiert. Die Zellen wurden wiederholt zentrifugiert (6.000 rpm, 4°C, 10 min) und sukzessive in 500 ml und schließlich in 20 ml eiskaltem sterilen Wasser suspendiert. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in 2,5 ml sterilem 10%igem Glycerin aufgenommen, zu Portionen von je 40 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zu 6 Monate gelagert.

IV.2.3.3. Elektroporation

Die gefrorenen kompetenten Zellen wurden auf Eis inkubiert und die zu transformierende DNA (ca. 5 ng Plasmid-DNA nach Plasmid-Minipräparation oder 25 ng Plasmid-DNA nach Ligierung) wurde sofort auf die noch gefrorene Zellsuspension pipettiert. Nach etwa fünfminütigem Auftauen der Zellen auf Eis wurde die Suspension in sterile, auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Transformation erfolgte bei 1,25 kV/cm (200 Ω, 25 µF, Pulszeit: 4,6 µs). Sofort nach dem Puls wurde 1 ml steriles SOC-Medium (2% Bacto Trypton, 0,5% Bacto Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose (frisch zugesetzt)) auf die Zellen gegeben und die Bakteriensuspension in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 1h im Brutschrank bei 37°C wurden die transformierten Bakterienzellen auf LB-Platten mit Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

IV.2.4. Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der von Ito et al. (1983) beschriebenen Lithiumacetat-Methode.

Für die Transformation von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Schiestl und Gietz, 1989) wurden 15ml einer Hefe Übernachtkultur bis zu einer OD_{600} von 2-4 angezogen. Die Zellen wurden für 5 min zentrifugiert (5.000 rpm, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Hefesediment in 50ml zweifach destilliertem Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert (5.000rpm, 5min, Raumtemperatur). Der Hefeniederschlag wurde in 1,5ml frisch angesetztem 1xTE/Lithiumacetat (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA (pH 7,5), 100mM Lithiumacetat (pH 7,5)) aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 30°C geschüttelt. 20µg Träger DNA (Heringssperma-DNA) wurden in einem Volumen von 20µl in einem

Reaktionsgefäß im Wasserbad bei 100°C für 10 min denaturiert. Die einzelsträngige DNA wurde dann sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde das zu transformierende Plasmid (3-6µg) und 100µl der kompetenten Hefezellen (s.o.) zugegeben. Nach Zugabe von 130µl einer 70%igen PEG 4000 Lösung wurde die Suspension vorsichtig gemischt und 60min bei 30°C inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Hefezellen erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 5 min. Es folgte eine kurze Zentrifugation (5 sec, 5.000rpm, Raumtemperatur) und die sedimentierten Hefezellen wurden dann zweimal in 0,5ml 1xTE gewaschen (5min, 5.000rpm, Raumtemperatur). Die Zellen wurden schließlich in 80µl 1xTE aufgenommen. Die transformierten Hefezellen wurden mit sterilen Plastikösen auf YPD-Platten ausplattiert.

IV.2.5. Bestimmung der Sauren Phosphatase-Aktivität von Hefezellen in Flüssigmedium

Hefekulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase bis zu einer Konzentration einer optischen Dichte ($O.D._{600}$) von 1 bis 2 kultiviert. Die Zellen wurden nach Abzentrifugieren und Verwerfen des Überstandes in 2ml 0,1 M Natriumacetat (pH=3,6) aufgenommen. 1ml der Suspension wurde zur Messung der Zellkonzentration durch Bestimmung der $O.D._{600}$ herangezogen. 1ml der Zellsuspension wurde mit 1ml 20 mM o-Nitro-Phenylphosphat in 0,1 M Natriumacetat (pH=3,6) bei 30°C 10 min inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde 0,5ml 1M NaOH zugegeben. Nach Zentrifugieren wurde die Absorption (A_{410}) des Überstands bei einer Wellenlänge von 410nm gemessen.
Die Aktivität der Sauren Phosphatase wurde wie folgt berechnet:

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

IV.2.6. Bestimmung der Sauren Phosphatase-Aktivität von Hefezellen auf Agarplatten

0,5g Bacto-Agar wurde in 45ml H_20 gekocht, bis es sich gelöst hat. Unter ständigem Rühren wurde die Lösung auf 80°C abgekühlt, und anschließend 5ml 1 M Natriumacetat (pH=4,0) dazugegeben. Bei einer Temperatur von 60°C wurden 0,2g Fast red und 0,01g α-Naphtylphosphat hinzugegeben. Schließlich wurden 10ml der Lösung bei 40-50°C direkt auf die Kolonien einer Agarplatte gegeben. Nach 15 bis 30 min färben sich die Kolonien rot, die eine erhöhte Aktivität der Sauren Phosphatase besitzen.

IV.2.7. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem Thermo Sequenase [^{33}P] Terminator Cycle Sequencing Kit von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt, der auf dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren basiert. Dieser wurde für die Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA modifiziert (Chen und Seeburg, 1985). Es wurden die von der Firma MWG-Biotech AG synthetisch hergestellten Oligonukleotide verwendet. Die Reaktionen wurden nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

IV.2.8. Anfertigung eines Sequenzgels und Durchführung der Gelelektrophorese

Für die Anfertigung eines Sequenzgels wurden zwei Glasplatten gründlich mit Spülmittel gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit Ethanol trocken gerieben. Die Ohrenplatte (20 x 50 cm) wurde mit 15 ml 5%igem Dichlordimethylsilan (5% Dichlordimethylsilan in Chloroform) eingerieben und nach kurzem Trocknen mit Ethanol poliert. Die Haftplatte (20 x 50 cm) wurde mit Bindesilan (6,5ml Ethanol, 190µl 10 %ige (v/v) Essigsäure, 19µl γ-(Methacryloxypropyl)-trimethoxysilan) eingerieben, kurz getrocknet und ebenfalls mit Ethanol poliert. Beide Platten wurden dann - durch Abstandshalter (0,5mm) getrennt - waagerecht plaziert. Nach Einsetzen des Taschenformers wurden 60 ml einer 6% Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 29:1) mit 300 µl 10%igem APS und 60 µl TEMED gemischt und die Lösung sofort zwischen die Platten gegossen. Dabei war es von Vorteil, wenn die Glasplatten am oberen Ende leicht erhöht liegen. Das Gel polymerisierte über einen Zeitraum von mindestens 1,5 Stunden aus.
Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Apparatur bei 1500 V (20 mA). Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Vor dem Probenauftrag erfolgte ein Vorlauf über mindestens 30 min bei 1500 V. Anschließend wurden die Taschen mehrere Male mit 1 x TBE gespült, um den aus dem Gel diffundierten Harnstoff zu entfernen. Die Proben wurden mit abgeflachten Pipetttenspitzen aufgetragen. Für eine gleichmäßige Erwärmung des Gels während des Laufs sorgte eine vor eine Glasplatte geklammerte Aluminiumplatte. Nach der Gelelektrophorese wurde die Ohrenplatte vorsichtig abgenommen und die Haftplatte mit dem Gel für 30 min in deionisiertem Wasser leicht geschwenkt. Nach 1 h Trocknen unter einem Föhn wurde das Gel schließlich autoradiographiert.

IV.2.9. Computeranalysen

Die Computeranalysen wurden mit dem Programmpaket der „University of Wisconsin Genetics Computer Group“ (UWGCG) durchgeführt (Devereux et al., 1984). Für Homologie Analysen wurde der BLAST Algorithmus des NCBI verwendet (Altschul et al., 1990). Für die Analyse der DNA-Fragmente des Genoms der Hefe *S. cerevisiae* wurde die EMBL-Database zu Hilfe genommen.

V. Zusammenfassung

Nach der Aufklärung der Basenabfolge des Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* ist die Funktion der 30.000-40.000 Gene und insbesondere das Zusammenspiel der Regulation der einzelnen Gene ein zentrales Thema der Molekularbiologie. Die DNA eukaryonter Zellen liegt durch Bindungen an Histon-Proteine im Zellkern als Chromatin vor. Die Chromatinstruktur dient nicht nur der Komprimierung der DNA auf engstem Raume, sondern hat auch starke Auswirkungen auf die Funktion der DNA. So müssen Gene bei ihrer Aktivierung durch Veränderung ihrer Chromatinstruktur, die bis zur Ablösung der Histone führen kann, den für die Transkription benötigten Enzymen und Faktoren erst zugänglich gemacht werden.

Das *PHO5*-Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt ein sehr gut untersuchtes Modell dar, bei dem Veränderungen der Chromatinstruktur genau untersucht und mit dem funktionellen Zustand des Gens korreliert worden sind. *PHO5* kodiert für eine saure Phosphatase, die bei Verbrauch der Phosphatreserven der Zelle in den periplasmatischen Raum sezerniert wird, um aus dort eventuell vorhandenen organischen Phosphatverbindungen Phosphat zu gewinnen. Ist im Medium genügend Phosphat vorhanden, ist *PHO5* reprimiert. In diesem Zustand ist die Chromatinstruktur des *PHO5*-Promotors durch vier dicht aufeinander folgende Nukleosomen gekennzeichnet, wodurch der Promotor Enzymen und regulatorischen Proteinen allgemein schlecht zugänglich ist. Nur zwischen dem zweiten und dem dritten Nukleosom ist die dichte Anordnung der Nukleosomen durch einen etwa 70 bp langen gut zugänglichen Bereich unterbrochen. In dieser sogenannten hypersensitiven Region bindet bei Phosphatmangel der aktivierende Transkriptionsfaktor Pho4 gemeinsam mit dem Faktor Pho2 an ein UAS-Element und induziert die *PHO5*-Expression. Dabei lösen sich die vier Nukleosomen vom DNA-Strang ab.

Sin4 ist ein Transkriptionsfaktor der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der auf mehrere Promotoren zumeist reprimierenden Einfluss ausübt. Ausgangspunkt der hier vorliegenden Arbeit war der Befund, dass in Abwesenheit von Sin4 die Gegenwart der prokaryontischen *lac*Z Sequenz stromaufwärts des *PHO5*-Promotors zu einer Derepression des *PHO5*-Gens führt, und zwar in Gegenwart von Phosphat, also unter eigentlich reprimierenden Bedingungen. Dieser Effekt wurde ursprünglich bei der Verwendung der kodierenden

Sequenz von *lacZ* als dem *PHO5*-Promotor nachgeschalteten Reporter-Gen in *sin4*-Hefezellen entdeckt.

Eine Frage der hier vorliegenden Arbeit galt der Ursache der Derepression von *PHO5* durch die *lacZ* kodierenden DNA-Sequenz. Dazu interessierte uns, ob die Derepression ein spezielles Phänomen der *lacZ*-Sequenz ist oder ob es sich hierbei eher um eine allgemeine Eigenschaft von DNA-Fragmenten handelt. Außerdem interessierte uns, ob die Herkunft der DNA aus prokaryonten oder eukaryonten Zellen eine Rolle spielen könnte. Dazu wurde jeweils eine große Anzahl zufällig ausgewählter DNA-Fragmente einer Länge zwischen 900bp und 1200bp aus den Genomen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Bakterien *Escherichia coli* und *Micrococcus lysodeikticus* an entsprechender Stelle vor den *PHO5*-Promotor integriert. Die so konstruierten Plasmide wurden in einen Hefestamm transformiert, in dem das *SIN4*-Gen zerstört worden war. Insgesamt wurden 400 Klone mit integrierten Hefe-DNA-Fragmenten, 300 Klone mit integrierten *M. lysodeikticus*-DNA-Fragmenten und 14 Klone mit integrierten *E. coli*-DNA-Fragmenten untersucht. Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivitäten der einzelnen Klone ergab für fast alle Plasmide mit integrierten *E. coli*- und *M. lysodeikticus*-DNA-Fragmenten eine erhöhte Aktivität trotz phosphatreichen Mediums. Im Gegensatz dazu zeigten die wenigsten Plasmide mit integrierten Hefe-DNA-Fragmenten eine Erhöhung der *PHO5*-Expression unter denselben Bedingungen. Von den insgesamt 400 getesteten Plasmiden wiesen nur neun eine gesteigerte *PHO5*-Expression auf. In allen Fällen, also für alle *E. coli*-, *M. lysodeikticus*- und Hefe-DNA-Fragmente, wurde nur in Abwesenheit von Sin4 eine erhöhte Phosphatase-Aktivität gemessen. Bei seiner Anwesenheit wurden in phosphatreichem Medium nie gesteigerte Aktivitäten beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die hier beobachtete Derepression typischerweise eine Eigenschaft prokaryonter DNA ist. Nur ein Bruchteil der eukaryonten DNA-Fragmente aus dem Hefe-Genom führt zu einer Derepression der Promotoraktivität, während dies nahezu alle prokaryonten DNA-Fragmente aus *Escherichia coli*- bzw. *Micrococcus lysodeikticus* tun. Um die neun Hefe-DNA-Fragmente, die zu einer Aktivierung des *PHO5*-Promotors führten, auf eventuelle Besonderheiten zu untersuchen, wurden ihre DNA-Sequenzen bestimmt und analysiert. Außerdem wurden noch zwei *E. coli*-DNA-Fragmente sequenziert, die zu keiner gesteigerten *PHO5*-Expression geführt haben.

Diese sehr eindeutigen Ergebnisse werfen Fragen nach dem zugrunde liegenden Mechanismus auf. Eventuelle DNA-Methylierungen oder kryptische Promotoren schieden als

Erklärung des Phänomens aus. Unterschiede des G-C-Gehalts der einzelnen DNA-Fragmente könnten besonders für die prokaryonte DNA teilweise eine Erklärung liefern. Die beiden prokaryonten Genome haben mit 51% bzw.72% einen wesentlich höheren G-C-Gehalt als das Hefegenom mit 38%. Besonders die beiden *E. coli*-DNA-Fragmente, die zu keiner gesteigerten *PHO5*-Expression führten, besitzen einen wesentlich geringeren G-C-Gehalt als der Durchschnitt des gesamten *E. coli*-Genoms (44,7% bzw. 38,0% im Vergleich zu 51%). Eukaryonte DNA besitzt in ihrer Sequenz im Gegensatz zu der aus Prokaryonten eine gewisse Periodizität, die sich etwa alle 10,5bp wiederholt und die Ausbildung von Nukleosomen erleichtert. Das Fehlen dieser Periodizität in prokaryonter DNA könnte sich ebenfalls auswirken, z.B. über eine labile Chromatinstruktur, die sich auch auf den benachbarten *PHO5*-Promotor auswirkt und dadurch eine Dereprimierung von *PHO5* in *sin4*-Zellen auslöst.

Die Dereprimierung des *PHO5*-Promotors durch die wenigen Hefe-DNA-Fragmente trotz reprimierender Bedingungen könnten aufgrund anderer Mechanismen zustande zu kommen. Die neun Hefe-DNA-Fragmente, die zu einer Aktivierung des *PHO5*-Promotors führten, zeigten auch keinen vom Hefegenom abweichenden G-C-Gehalt. Es ist auffällig, dass alle 9 DNA-Fragmente intergenische Bereiche enthalten. In diesen Bereichen gibt es oft regulatorische Elemente, die häufig in hypersensitiven Regionen gefunden werden. Hypersensitive Regionen sind nicht in Nukleosomen gepackt und könnten dadurch auch die umgebene Chromatinstruktur beeinflussen.

Unabhängig von den mechanistischen Überlegungen zeigen diese Untersuchungen, dass die Aktivität eines Promotors von der Umgebung beeinflusst werden kann und dass daher der Einsatz von heterologen Reportergenen mit Vorsicht betrachtet werden muss.

VI. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, VCH, Weinheim 1997

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

Almer, A., Hörz W. (1986) Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark in gene boundaries of the *PHO5/PHO3* locus in yeast. *EMBO J.* 5, 307-331

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman. D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410

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

Barbaric, S., Münsterkötter M., Colin G., Hörz W. (1998) Cooperative Pho2-Pho4 interaction at the *PHO5* promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho 4 at UASp2. *Mol. And Cell. Biol.* May 1998, 2629-2639

Beckwith, J. (1987) The lactose operon. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K.B. Low, et al.), Vol. 2, pp.1444-1452. Washington, DC: American Society for Microbiology

Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., Woodcock, C.L. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14173-8

Bell, A.C., West, A.G., Felsenfeld, G. (2001) Insulators and boundaries: verstile regulatory elements in the eucaryotic genome. *Science* 291(5503):447-50

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523

Borukhov, S. und Severinov, K. (2002) Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res. Microbiol*. 153:557-562

Boyes, J., Bird, A. (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*., 11, 327-333.

Bradnam, K.R., Seoighe, C., Sharp, P.M., Wolfe, K.H. (1999) G+C content variation along and among *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *Mol. Biol. Evol*. 16(5):666-675

Breeden, L. und Nasmyth, K. (1987) Cell Cycle Control of the Yeast *HO* Gene: *Cis*- and *Trans*-Acting Regulators, *Cell* Vol. 48, 389-397

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-378

Bussey, H., Storms, R.K., Ahmed, A., Albermann, K., Allen, E., Ansorge, W., Araujo, R., Aparicio, A., Barrell, B., Badcock, K., Benes, V., Botstein, D., Bowman, S., Bruckner, M., Carpenter, J., Cherry, J.M., Chung, E., Churcher, C., Coster, F., Davis, K., Davis, R.W., Dietrich, F.S., Delius ,H., DiPaolo, T., Hani, J. et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI. *Nature* 387,103-105

Caffarelli, E., De Santis, P., Leoni, L., Palleschi, A., Savino, M. (1988) Preferential positioning of nucleosomes on pBR322 as evaluated via Fourier transform of data from elecron microscopy. *Eur. J. Biochem.* 171(3):497-501

Carlson, M. und Laurent, B.C. (1994) The *SNF/SWI* family of global transcriptional activators. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:396-402

Chen, E.Y. und Seeburg, P. (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4:165-170

Chen, S., West, R.W., Johnson, S.L., Gans, H., Kruger, B., Ma, J. (1993) TSF3, a global regulatory protein that silences transcription of yeast *GAL* genes, also mediates repression by α2 repressor and is identical to *SIN4*. *Mol. Cell Biol.* 13:831-840

Chen, S., West, R.W., Ma, J., Johnson, S.L., Gans, H., Woldehawariat, G. (1993) *TSF1* and *TSF6*, required for silencing the *Saccharomyces cerevisiae GAL* genes, are global regulatory genes. *Genetics* 134:701-716

Cosma, M.P. (2002) Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol. Cell* 10:227-236

Covitz, P.A., Song, W., Mitchell, A.P. (1994) Requirement for *RGR1* and *SIN4* in *RME1*-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 138:577-586

Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O.A. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395

Dietrich, F.S. (1994), *YER121w*, *EMBL Data Libary*

Dietrich, F.S., Mulligan, J., Hennessy, K., Yelton, M.A., Allen, E., Araujo, R., Aviles, E., Berno, A., Brennan, T., Carpenter, J., Chen, E., Cherry, J.M., Chung, E., Duncan, M., Guzman, E., Hartzell, G., Hunicke-Smith, S., Hyman, R.W., Kayser, A., Komp, C., Lashkari, D., Lew,H., Lin, D., Mosedale, D., Davis, R.W. et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome V. *Nature* 387,78-81

Dower, W.D., Miller, J.F., Ragsdale, C.W.(1988) High efficiency transformation of *E. coli* by electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16:6127-6145

Dujon, B., Albermann, K., Aldea, M., Alexandraki, D., Ansorge, W., Arino, J., Benes, V., Bohn, C., Bolotin-Fukuhara, M., Bordonne, R., Boyer, J., Camasses, A., Casamayor, A., Casas, C., Cheret, G., Cziepluch, C., Daignan-Fornier, B., Dang, D.V., de Haan, M., Delius, H., Durand, P., Fairhead, C., Feldmann, H., Gaillon, L., Kleine, K. et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Nature* 387,98-102

Dujon, B., Alexandraki, D., Andre, B., Ansorge, W., Baladron, V., Ballesta, J.P., Banrevi, A., Bolle, P.A., Bolotin-Fukuhara, M., Bossier, P. et al. (1994) Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* 369,371-378

Estruch F., Perez-Ortin J.E., Matallana E., Franco, L. (1989) In vivo assembly of chromatin on *pBR322* sequences cloned into yeast plasmids. *Plasmid* 21(2):113-9

Fascher, K.D., Schmitz, J., Hörz, W. (1990) Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the *PHO5* promoter in *S. cerevisiae. EMBO J.* 9:2523-2528

Fascher K.-D., Schmitz J., Hörz W. (1993) Structural and Functional Requirements for the Chromatin Transition at the *PHO5* Promoter in *Saccharomyces cerevisiae* upon *PHO5* Activation. *J. Mol. Biol.* 231,658-667

Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., Andre, B., Baclet, M.C., Barthe, C., Baur, A., Becam, A.M., Biteau, N., Boles, E. et al. (1994) Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBO J.* 13(24),5795-5809

Fletcher, T.M., Hansen, J.C. (1996) The nucleosomal array: structure/function relationship. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 6:149-88

Gerasimova, T.I., Corces, V.G. (2001) Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organisation. *Annu Rev. Genet.* 35:193-208

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver,S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274(5287):546,563-7

Grant, P.A., Duggan, L., Cote, 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. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt-Ada) complex. *Genes Dev*. 11,1640-160

Gregory, P.D., Hörz W. (1998) Chromatin and transcription. How transcription factors battle with a repressive chromatin environment. *Eur. J. Biochem.* 251,9-18

Gregory, P.D., Schmid, A., Zavari, M., Lui, L., Berger, S.L., Hörz, W. (1998) Absence of Gcn5 HAT activity defines a novel state in the opening of chromatin at the *PHO5* promoter in yeast. *Molecular Cell*, 1,495-505

Gross D.S., Garrard, W.T. (1988) Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 57:159-198

Han M.; Grunstein, M. (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55:1137-1145

Han, M., Kim, U.J., Kayne, P., Grunstein, M. (1988) Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the *PHO5* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 7,2221-2228

Hansen J.C.; Ausio, J. (1992) Chromatin dynamics and the modulation of genetic activity. *Trends Biochem. Sci.* 17:187-191

Harashima, S., Mizuno, T., Mabuchi, H., Yoshimitsu, S., Ramesh, R., Hasebe, M., Tanaka, A., Oshima, Y. (1995) Mutations causing high basal level transcription that is independent of transcriptional activators but dependent on chromosomal position in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet.* 247:716-725

Herskowitz, I. (1989) Aregulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* Vol 342, 749-757

Hirst, K., Fisher, F., McAndrew, P.C., Goding, C.R. (1994) The transcription factor, the cdk, its cyclin and their regulator: directing the transcriptional response to a nutritional signal. *EMBO J.* 13:5410-5420

Horn, P.J., Peterson, C.L. (2002) Molecular biology. Chromatin higher order folding—wrapping up transcription. *Science* 297:1824-7

Hunter, C.A. (1996). Sequence-dependent DNA structure. *Bioessays*, 18, 157-162

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol*. 153:163-168

Jacq, C., Alt-Morbe, J., Andre, B., Arnold, W., Bahr, A., Ballesta, J.P., Bargues, M., Baron, L., Becker, A., Biteau, N., Blocker, H., Blugeon, C., Boskovic, J., Brandt, P., Bruckner, M., Buitrago, M.J., Coster, F., Delaveau, T., del Rey, F., Dujon, B., Eide, L.G., Garcia-Cantalejo, J.M., Goffeau, A., Gomez-Peris, A., Zaccaria, P. et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IV. *Nature* 387, 75-78

Jenuwein, T. und Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080

Jiang, Y.W., Dohrmann, P.R.,Stillman, D.J. (1995) Genetic and physical interactions between yeast *RGR1* and *SIN4* in chromatin organization and transcriptional regulation. *Genetics* 140:47-54

Jiang, Y. W. und Stillman, D., J. (1992) Involvement of the Sin4 global transcriptional regulator in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 12:4503-4514

Jiang, Y. W. und Stillman, D., J. (1995) *SIN4* regulation of *HIS4* expression. *Genetics* 140,103-114

Johnston M. (1996) The complete code for a eucaryotic cell. Genom sequencing. *Curr. Biol.* 6(5):500-3

Johnston, M., Hillier, L., Riles, L., Albermann, K., Andre, B., Ansorge, W., Benes, V., Bruckner, M., Delius, H., Dubois, E., Dusterhoft, A., Entian, K.D., Floeth, M., Goffeau, A., Hebling, U., Heumann, K., Heuss-Neitzel, D., Hilbert, H., Hilger, F., Kleine, K., Kotter, P., Louis, E.J., Messenguy, F., Mewes, H.W., Hoheisel, J.D. et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature* 387,87-90

Kaffman, A, Herskowitz, I., Tjian, R., O'Shea, E.K. (1994) Phosphorylation of the transcription factor Pho4 by a cyclin-CDK complex, Pho80-Pho85. *Science* 263:1153-1156

Kel-Margoulis, O.V, Kel, A.E., Reuter, I., Deineko, I.V., Wingender, E. (2002) TRANSCompel: a database on composite regulatory elements in eucaryotic genes. *Nucleic Acids Res.* 30(1):332-4

Kiyama, R. und Trifonov, E.D. (2002) What positions nucleosomes? – A model. *FEBS Letters* 523:7-11

Kobayashi, S., Higashi, N., Suzuki, K., Goto, S., Yumoto, K., Anzai, K. (1992) The 10 S BC-1 ribonucleoprotein particle contains identifier sequence-binding proteins that interact with an array of GCAAG/CTTGC motifs between split promoter sequences for RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* 267(26):18291

Kocur, M., Pacova, Z., Martinec, T. (1972) Taxonomic status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and designation of the neotype strain. *Int. J. Syst. Bacteriol*. Vol. 22, N. 4,218-223

Komeili, A., O'Shea, E.K. (1999) Roles of phosphorylation sits in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* 284(5416):977-88

Kornberg R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868

Kornberg R.D., Lorch Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eucaryote chromosome. *Cell* 98:285-94

Kornberg, R. (1981) The location of nucleosomes in chromatin: specific or statistical. *Nature* 292:579-80

Lenburg, M.E., O'Shea, E.K. (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* 21,383-387

Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y. W., Kim, Y. J., Lane, W. S., Stillman, D. J., Kornberg, R. D. (1995) Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/ RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92,10864-10868

Loidl, P. (1994) Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma* 103,441-449

Lorch Y., LaPointe J.W., Kornberg R.D. (1987) Nucleosomes inhibit the initiation of transkription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49:203-210

Lorch, Y., Zhang, M., Kornberg, R.D. (1999) Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96:389-392

Luger, K. Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389:251-260

Macatee, T., Jiang, Y.W., Stillman, D.J., Roth,S.Y. (1997) Global alterations in chromatin accessibility associated with loss of Sin4 function. *Nucl. Acids Res.* 25(6):1240-7

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York

Nakao, M. (2001) Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278(1-2):25-31

O'Neill, E.M., Kaffman, A., Jolly, E.R., O'Shea, E.K. (1996) Regulation of Pho4 nuclear localisation by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *Science* 271:209-212

Oshima, Y, Ogawa, N., Harashima, S. (1996) Regulation of phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Gene* 179(1):171-7

Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., et al. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-533

Pittard, J. (1996) The various strategies within the *TyrR* regulation of *Escherichia coli* to modulate gene expression. Genes Cells 1:717-25

Reinke, H., Gregory, P.D., Hörz, W. (2001) A transient hyperacetylation signal marks nucleosomes for remodeling at the *PHO8* promoter in vivo. *Molecular Cell*, 7,529-538

Roeder, R.G. (1991) The comlexities of eucaryotic transcription initation: regulation of preinitation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* 16:402-408

Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem*. 70:81-120

Sakai, A., Shimizu, Y., Kondou, S., Chibazakura, T., Hishinuma, F. (1990) Structure and molecular analysis of Rgr1, a gen required for glucose repression of *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 4130-4138

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467

Schiestl, R.H. und Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as carrier. *Curr.Genet.* 16:339-346

Schmid, A., Fascher, K.D., Hörz, W. (1992) Nucleosome disruption at the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction occurs in the absence of DNA replication. *Cell* 71:853-864

Schnetz, K. (1995). Silencing of *Escherichia coli* bgl promoter by flanking sequence elements. *EMBO J.* 14(11):2545-50

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

Sivolob, A.V., Khrapunov, S.N. (1995) Translational positioning of nucleosomes on DNA: the role of sequence-dependent isotropic DNA bending stiffness. *J. Mol. Biol.* 247(5):918-31

Sternberg, P.W., Stern, M.J.,Clark, I., Herskowitz, I. (1987) Activation of the yeast *HO* gene by release from multiple negative controls. *Cell*, 48:567-577

Stillman, D.J., Dorland, S., Yu, Y. (1994) Epistasis analysis of suppressor mutations that allow *HO* expression in the absence of the yeast *SWI5* transcriptional activator. *Genetics* 136:781-788

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

Strathern, J.N., Klar, A.J.S., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M.; Nasmyth, K.A. und McGill, C. (1982) Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the *MAT* locus. *Cell* 31, 183-192

Svaren, J., Chalkley, R. (1990) The structure and assembly of active chromatin. *Trends Genet*. 6:52-54

Svaren, J., Hörz, W. (1993) Histones, nucleosomes and transcrition. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:219-255

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

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

Swedlow, J.R.; Agrad, D.A.; Sedat, J.W. (1993) Chromosome structure inside the nucleus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:412-416

Travers, A.A. (1987) Structure and function of *E. coli* promoter DNA. *Crc Crit. Rev. Biochem.* 22:181-219

Trifonov, E.N.und Sussman, J.L. (1980) The pitch of chromatin DNA is reflected in its nucleotide sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.* Vol.77, No. 7, pp. 3816-3820

Turner, B.M. (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* 111:285-291

Vogel, K., Hörz W., Hinnen, A. (1989) The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with *PHO5* upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2050-2057

Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738

Weikert, M.J. und Adhya, S. (1993) The galactose regulation of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 10:245-51

Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R., Hehl, R., Lebich, I., Krull, M., Matys, V., Michael, H., Ohnhauser, R., Pruss, M., Schacherer, F., Thiele S., Urbach, S. (2001) The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 29(1):281-3

Winston, F. und Carlson, M. (1992) Yeast *SNF/SWI* transcriptional activators and the *SPT/SIN* chromatin connection. *Trends Genet.*, 11:387-391

Wobbe, C. R., Struhl, K. (1990). A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes* 4, 636-645.

Wolffe, A.P. (1994) Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *Trends Biochem. Sci.* 19(6):240-4

Wolffe, A.P., Khochbin, S., Dimitrov, S. (1997) What do linker histones do in Chromatin, *Bioessays* 19,249-255

Yang, D., Lu, H., Hong, Y., Jinks, T.M., Estes, P.A., Erickson, J.W. (2001) Interpretation of X chromosome dose at Sex-lethal requires non-E-box sites for the basic helix-loop-helix proteins SISB and daughterless. *Mol. Cell Biol.* 21(5):1581-92

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

VII. Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
HAT	Histonacetyltransferase
kb	Kilobasenpaare
M	Mol/ Liter
M. lysodeikticus	*Micrococcus lysodeikticus*
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propanosulfonsäure
O.D.	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
UAS	Upstream Activating Sequence

VIII. Lebenslauf

Name:	Daniel Franke
Geburtstag:	26.01.1972
Geburtsort:	Kiel
Wohnort:	Kidlerstraße 7 81371 München
Nationalität:	deutsch
Zivilstand:	ledig

Schulausbildung:

1978-1982	Reventlou-Grundschule/ Kiel
1982	Grundschule Lüttenheid/ Heide in Holstein
1982-1985	Werner-Heisenberg-Gymnasium/ Heide in Holstein
1985-1991	Pestalozzi-Gymnasium/ Biberach an der Riß
21.06.1991	Abitur

Zivildienst:

09.1991-11.1992	Krankenpflegehelfer, Neurochirurgie/ Uniklinikum Freiburg im Breisgau

Studium:

1992-1994	Physikstudium an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
16.06.1994	Vordiplom
09.1994-04.1995	Physikstudium an der Universität Edinburgh/ Schottland
1995-1997	vorklinisches Studium an der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen
20.04.1997	Ärztliche Vorprüfung
1997-1998	erster klinischer Studienabschnitt an der Ludwig-Maximilians-Universität München
24.03.1998	I. Staatsexamen zweiter klinischer Studienabschnitt
06.09.2000	II. Staatsexamen
10.2000-09.2001	Praktisches Jahr (Innere Medizin, Innenstadt Klinikum München; Neurologie, Städtisches Krankenhaus Harlaching; Chirurgie, Ichilov-Krankenhaus, Tel Aviv/ Israel)
16.10.2001	III. Staatsexamen

Dissertation:

06.1998-02.2000	Anfertigung des experimentellen Teils am Adolf-Butenandt-Institut der LMU-München Betreuung: Prof. Dr. W. Hörz
Seit 05.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Medizinische Virologie der Universität Zürich, Direktorin: Prof. Dr. K. Mölling