

**Die Rolle des SAGA-Komplexes bei Aktivatorbindung und  
Chromatinöffnung am *PHO5*- und *PHO8*-Promotor  
in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde des Dr. rer. nat.  
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hans Reinke

München 2003

Eingereicht am 11.08.2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

**Aus dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:**

Reinke, H. and Hörz, W. (eingereicht). Anatomy of a hypersensitive site, *Biochim Biophys Acta*.

Reinke, H. and Hörz, W. (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated *PHO5* promoter, *Mol. Cell* 11, 1599-607.

Barbaric, S., Reinke, H. and Hörz, W. (2003). Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the *PHO5* promoter, *Mol. Cell. Biol.* 23, 3468-76.

Reinke, H., Gregory, P.D. and Hörz, W. (2001). A transient histone hyperacetylation signal marks nucleosomes for remodeling at the *PHO8* promoter in vivo, *Mol. Cell* 7, 529-38.

I. Einleitung.....	1
1. Chromatin.....	1
2. Chromatin-modifizierende Enzymkomplexe.....	4
3. Die <i>PHO</i> -Gene aus <i>S. cerevisiae</i> .....	10
4. Zielsetzung der Arbeit.....	13
II. Material und Methoden.....	15
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	15
2. Medien zur Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
2.1. YPDA-Vollmedium.....	15
2.2. Phosphatfreies Minimalmedium.....	15
3. Oligonukleotidsequenzen.....	16
3.1. Oligonukleotide für ChIP-Experimente in Kombination mit quantitativer PCR.....	16
3.2. Oligonukleotide für ChIP-Experimente in Kombination mit Taqman <sup>®</sup> -PCR.....	16
3.3. Oligonukleotid für DMS <i>in vivo</i> -footprint-Analysen.....	17
4. Antikörper für ChIP-Analysen.....	17
5. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	18
5.1. Herstellung von mit Formaldehyd kreuzvernetzten Chromatinextrakten.....	18
5.2. Immunopräzipitation.....	18
5.3. DNA-Aufreinigung.....	19
5.4. DNA-Quantifizierung durch quantitative PCR gefolgt von Ethidiumbromid- Gelelektrophorese.....	19
5.5. DNA-Quantifizierung durch TaqMan <sup>®</sup> -PCR.....	19
6. <i>In vivo</i> -Analyse von Protein-DNA-Bindung mit Dimethylsulfat (DMS <i>in vivo</i> footprint).....	20
6.1. DMS-Behandlung von Hefezellen <i>in vivo</i> .....	20
6.2. Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden.....	21
6.3. Primerextensions-Reaktion und Auftrennung der Reaktionsprodukte auf einem Sequenziergel.....	21
III. Ergebnisse.....	22
1. Histonacetylierung am <i>PHO8</i> -Promotor.....	22
1.1. Histone H3 und H4 am remodulierten <i>PHO8</i> -Promotor sind nicht hyperacetyliert.....	22
1.2. Phosphathunger-Induktion in Abwesenheit von Snf2 blockiert den <i>PHO8</i> -Promotor in einem hyperacetylierten, nicht-remodulierten Zustand.....	26

1.3. In Zellen mit einem strukturell intakten Swi/Snf-Komplex ohne ATPase-Aktivität ist der induzierte <i>PHO8</i> -Promotor ebenfalls hyperacetyliert.....	28
1.4. Rekrutierung von Pho4 ist eine unbedingte Voraussetzung für die Erzeugung hyperacetylierten <i>PHO8</i> -Promotorchromatins in Abwesenheit von Swi/Snf.....	30
1.5. Gcn5 acetyliert die Histone des <i>PHO8</i> -Promotors .....	31
1.6. Rpd3 scheint nicht an der Wiederherstellung des basalen Acetylierungsgrades des remodulierten <i>PHO8</i> -Promotors beteiligt zu sein.....	33
1.7. Spezifische Hyperacetylierung der Histone des <i>PHO8</i> -Promotors.....	34
2. Histonacetylierung am <i>PHO5</i> -Promotor.....	35
2.1. Histonmodifikationen im Chromatin des remodulierten <i>PHO5</i> -Promotors .....	35
2.2. Der remodulierte <i>PHO5</i> -Promotor verhält sich in ChIP-Experimenten wie histonfreie DNA .....	39
2.3. Vor der Chromatinöffnung werden die Histone H3 des <i>PHO5</i> -Promotors hyperacetyliert .....	43
2.4. Pho4-abhängige Rekrutierung von SAGA an die <i>PHO5</i> - und <i>PHO8</i> -Promotoren .....	48
3. Die Rolle der Chromatinstruktur und des SAGA-Komplexes bei der Bindung von Pho4 an den reprimierten <i>PHO5</i> -Promotor .....	50
3.1. Bei der Induktion eines <i>gcn5</i> -Stammes wird Pho4 an den <i>PHO5</i> -Promotor rekrutiert, während noch Promotornukleosomen vorhanden sind .....	51
3.2. Pho4 wird auch in einem induzierten <i>snf2</i> -Stamm an den geschlossenen <i>PHO5</i> -Promotor rekrutiert.....	52
3.3. Pho4-Rekrutierung an den geschlossenen <i>PHO5</i> -Promotor ist vollständig von UASp2 abhängig .....	53
3.4. Bindung von Pho4 an das nukleosomale UASp2-Element.....	55
3.5. Rekrutierung von SAGA an den geschlossenen <i>PHO5</i> -Promotor in einem induzierten <i>gcn5</i> -Stamm .....	57
3.6. Chromatinremodulierung ist eine Voraussetzung für die Rekrutierung von TBP an den <i>PHO5</i> -Promotor .....	58
3.7. Die SAGA-Untereinheiten Gcn5 und Spt3 spielen gemeinsam eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Pho4 an den <i>PHO5</i> -Promotor .....	60
IV. Diskussion.....	63
1. SAGA-abhängige Histonacetylierung des <i>PHO5</i> - und des <i>PHO8</i> -Promotors .....	63

1.1. SAGA acetyliert das Chromatin des <i>PHO5</i> - und des <i>PHO8</i> -Promotors in einem frühen Stadium des Aktivierungsprozesses .....	63
1.2. Unterschiedliche Histonspezifität bei der Acetylierung des <i>PHO5</i> - und <i>PHO8</i> -Promotors .....	65
1.3. Histonacetylierung beeinflusst den Remodulierungsprozess, bestimmt aber nicht die Grenzen des zu remodulierenden Bereichs .....	66
1.4. Histonacetylierung <i>per se</i> hat keinen messbaren Einfluss auf nukleosomale Protein-DNA-Wechselwirkungen .....	67
1.5. Welche Rolle spielt die Histonacetylierung bei der Chromatinremodulierung?.....	68
2. Die Chromatinstruktur des aktiven <i>PHO5</i> -Promotors .....	72
2.1. Am vollständig remodulierten <i>PHO5</i> -Promotor lassen sich keine Histon-DNA-Kontakte nachweisen .....	72
2.2. Die Bestimmung der Histondichte ist eine essentielle Kontrolle bei der quantitativen Analyse von Histonmodifikationen in dynamischem Chromatin .....	74
3. Ein neuartiger Aktivierungszustand des <i>PHO5</i> -Promotors .....	75
3.1. Bindung von Pho4 an das geschlossene Chromatin des <i>PHO5</i> -Promotors .....	75
3.2. Ein Modell für Pho4-Bindung, Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung am <i>PHO5</i> -Promotor .....	77
3.3. Die Rolle des SAGA-Komplexes bei der Pho4-Bindung an den geschlossenen <i>PHO5</i> -Promotor.....	78
3.4. Welcher Aktivierungsschritt am <i>PHO5</i> -Promotor ist in einem <i>gcn5</i> -Stamm verzögert? ...	79
4. Dynamische Rolle der Promotorhistone bei der Transkriptionsaktivierung des <i>PHO5</i> -Promotors .....	79
5. Ausblick .....	81
V. Zusammenfassung .....	82
VI. Literatur.....	85
VII. Anhang.....	97
1. Abkürzungsverzeichnis .....	97
2. Lebenslauf.....	99
3. Danksagung.....	100

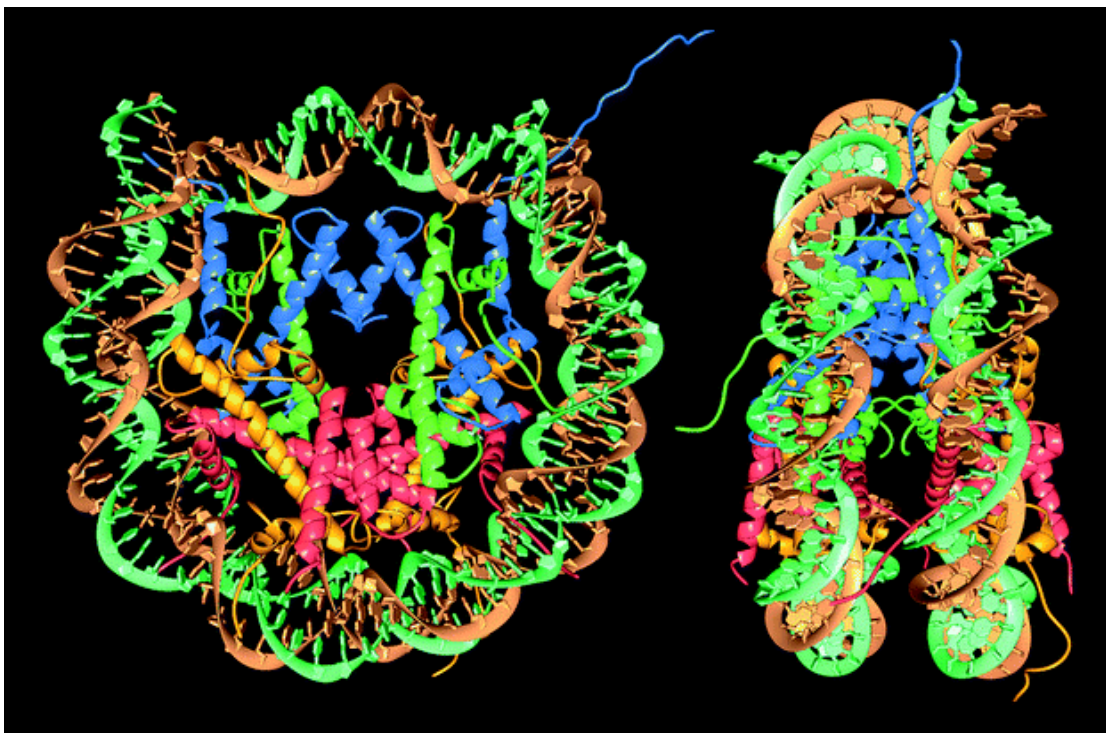
## I. Einleitung

### 1. Chromatin

DNA ist der Träger der genetischen Information aller Lebewesen. Bis auf wenige Ausnahmen ist im Zellkern jeder einzelnen Zelle eines Organismus eine vollständige Kopie des gesamten Genoms enthalten. Da ein eukaryontisches Genom zwischen  $10^7$  (Hefen) und  $10^{11}$  bp (Amphibien, Farne) umfasst, und die Länge eines Basenpaares in einem DNA-Molekül  $3,4 \text{ \AA}$  beträgt, muss ein Zellkern mit einem Durchmesser von ungefähr  $5 \text{ \mu m}$  ein bis zu  $30 \text{ m}$  langes DNA-Molekül aufnehmen. Voraussetzung dafür ist, dass die DNA im Zellkern extrem dicht gepackt werden kann, was durch Einbindung der DNA in einen Komplex mit Histonen und anderen (Nicht-Histon-)Proteinen erreicht wird. Dieser Komplex wird als Chromatin bezeichnet, und er ist in der Lage, eine hochgradig geordnete Struktur auszubilden, in der die DNA bis zu  $400.000$ -fach komprimiert vorliegt. Die hohe Verdichtung hat zur Folge, dass viele der an der DNA stattfindenden Prozesse damit beginnen, das Hindernis dieser Verpackung zu überwinden, beispielsweise damit ein Protein Zugang zu dessen DNA-Bindungssequenz erlangen kann. Zentrale Prozesse wie Transkription, Replikation, Rekombination oder Reparatur sind daher immer vom Kontext der jeweiligen Chromatinumgebung einer DNA-Region, in der sie sich abspielen, beeinflusst. Für die Transkription hat Chromatin aber nicht, wie man vermuten könnte, rein inhibitorischen Charakter. Vielmehr eröffnet die Chromatinstruktur der Zelle eine zusätzliche Dimension der Expressionsregulation, indem sie sowohl die Voraussetzungen für transkriptionelle Aktivierung als auch für Repression eines Gens schaffen kann. Dies wurde eindrucksvoll durch *in vivo*-Experimente in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* veranschaulicht, bei denen die Chromatinstruktur genomweit gestört wurde, woraufhin bei  $15\%$  aller Gene ein Anstieg und bei weiteren  $10\%$  eine Reduktion der Expression beobachtet wurde (Wyrick et al., 1999). Die Frage, wie Chromatinstruktur die Expression von Genen beeinflusst, und welche Mechanismen Eukaryonten besitzen, um Genregulation im Chromatinkontext zu ermöglichen, ist seit mehr als 25 Jahren Gegenstand intensiver Forschung.

Vor etwa 30 Jahren wurde erstmals vorgeschlagen, dass die Chromatinstruktur aus einer repetitiven Grundeinheit bestehend aus einem Histonoktamer mit jeweils zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4, und ungefähr  $200 \text{ bp}$  DNA zusammengesetzt ist (Kornberg, 1974). Schließlich wurde das Nukleosom als dieser Grundbaustein erkannt, und es wurden mehr und mehr Details von

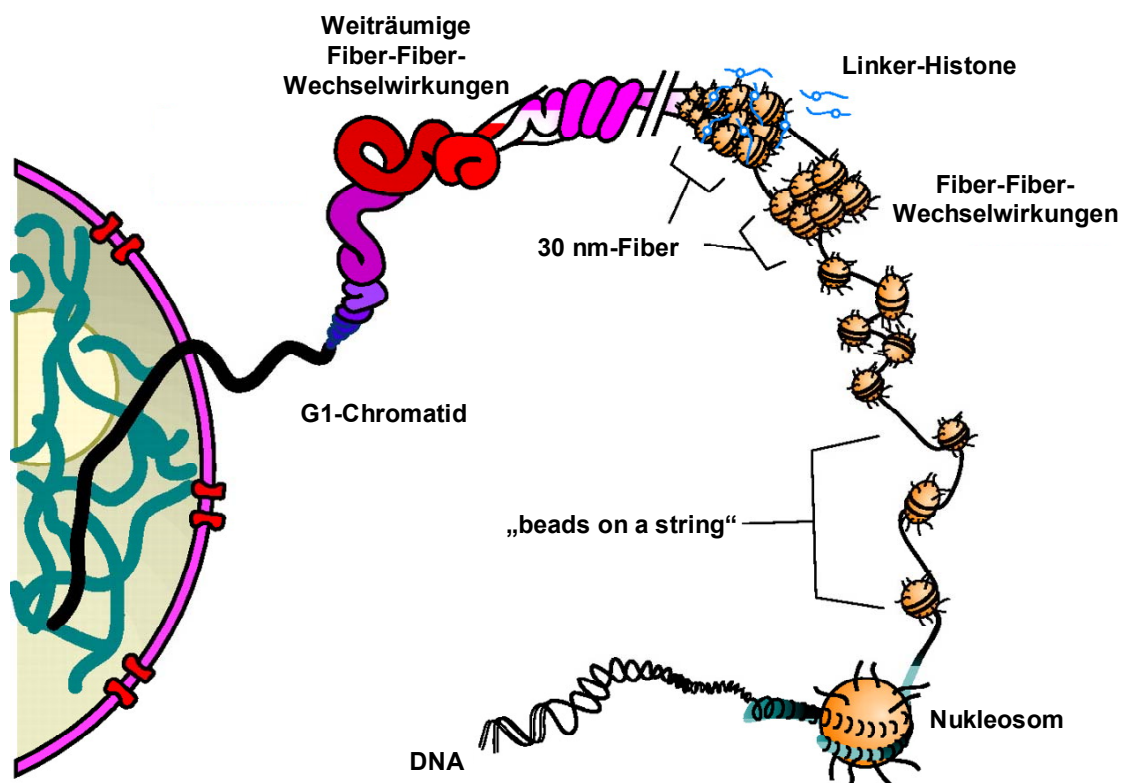
dessen Struktur bekannt. Man wusste bereits, dass Histon H3 und H4 im Nukleosom ein  $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramer, und Histon H2A und H2B zwei  $(H2A)(H2B)$ -Dimere bilden (Kelley, 1973; Kornberg and Thomas, 1974). Spaltung von Chromatin mit *Micrococcus*-Nuklease eröffnete dann die Möglichkeit zu einer genaueren Charakterisierung der Nukleosomenstruktur. *Micrococcus*-Nuklease spaltet bevorzugt DNA, die sich nicht innerhalb eines Nukleosoms befindet, übrig bleiben die sogenannten Kernpartikel. Die Größe des in einem Nukleosom enthaltenen DNA-Fragments konnte mit dieser Methode auf 147 bp bestimmt werden (Lohr and van Holde, 1975). Insbesondere sind so gewonnene Kernpartikel bereits ausreichend homogen für die Kristallisierung. Die ersten Röntgenstrukturanalysen mit einer Auflösung von 7 Å haben gezeigt, dass sich die DNA in  $1\frac{3}{4}$  linksgängigen, superhelikalen Windungen um das Histonoktamer wickelt (Finch et al., 1977). Damit waren die Grundeigenschaften des Nukleosoms weitgehend charakterisiert, bevor man 20 Jahre später zu einer Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,8 Å gelangte, die den Nukleosomaufbau bis ins atomare Detail enthüllte (Abb. 1) (Luger et al., 1997).



**Abbildung 1: Kristallstruktur des Nukleosoms.** Gezeigt ist ein Nukleosom-Kernpartikel von zwei verschiedenen Perspektiven aus betrachtet. Im linken Nukleosompartikel verläuft die Blickrichtung entlang der superhelikalen Achse der DNA, im rechten Partikel senkrecht darauf. In beiden Partikeln befindet sich der Ein- bzw. Austrittsort der DNA oben in der Mitte des Kernpartikels. Folgendes Farbschema wurde verwendet: DNA-Strang (braun) und -Gegenstrang (grün), Histon H2A (gelb), H2B (rot), H3 (blau) und H4 (grün). Entnommen aus Luger et al., 1997.



Die Histone formen im Nukleosom eine linksgängige Protein-Superhelix, die derjenigen der DNA gleicht, wobei die  $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramere im Zentrum des DNA-Pfads liegen, während sich die  $(H2A)(H2B)$ -Dimere an dessen Ende befinden. Die Polypeptidketten aller Histone bilden ein ähnliches Strukturmotiv, das Histone-Faltungs („histone fold“)-Motiv, das aus einer zentralen  $\alpha$ -Helix besteht, die an beiden Enden von kürzeren Helices und Schleifen flankiert ist, von denen einige mit der DNA interagieren. Die N-terminalen 15-30 Aminosäuren der Histone, die sogenannten Histonschwänze, sind in Röntgenstrukturanalysen nicht sichtbar, d.h. sie nehmen im Kontext eines einzelnen Nukleosoms keine exakten Positionen ein (Luger et al., 1997).



**Abbildung 2: Chromatinstruktur.** Linker-Histone und Fiber-Fiber-Wechselwirkungen bewirken die Rückfaltung der „beads on a string“-Struktur zu großen Chromatinfasern (nach Horn and Peterson, 2002).

Auf einem DNA-Molekül sind die Nukleosomen wie in einer Perlenkette hintereinander aufgereiht, wobei jeweils zwei Nukleosomen durch einen Abschnitt von 10 bis 60 bp nicht-nukleosomaler DNA („Linker-DNA“) verbunden sind (Abb. 2). Diese Anordnung wird als „beads on a string“-Struktur bezeichnet, und sie bewirkt bereits eine zehnfache räumliche Verdichtung der DNA. Aufgrund von internukleosomalen Wechselwirkungen faltet sich diese Struktur zu sogenannten

30 nm-Fibern zurück. Höhere Eukaryonten besitzen Linker-Histone, die nicht homolog zu den Histonen der Kernpartikel sind und die Bildung von 30 nm-Fibern durch Anlagerung an die Linker-DNA und die Kernpartikel unterstützen (Hayes and Hansen, 2001). Im Zellkern bilden die 30 nm-Fibern auch untereinander Kontakte aus, und es kommt zur Ausbildung von sehr großen Fibern von bis zu 300 nm Durchmesser. Für die Bildung sowohl von 30 nm-Fibern als auch noch größeren Fibern spielen die Histonschwänze vermutlich eine wichtige Rolle (Horn and Peterson, 2002).

## 2. Chromatin-modifizierende Enzymkomplexe

Welche Möglichkeiten besitzt die Zelle, um das Chromatin in einen dynamischen Zustand zu versetzen, der trotz des hohen Verdichtungsgrades Prozesse gestattet, die eine lokale Zugänglichkeit der DNA voraussetzen? Man kennt zwei Klassen von Enzymkomplexen, die Chromatin auf unterschiedliche Weise modifizieren und so dessen Struktur beeinflussen können. Dabei handelt es sich zum einen um die ATP-abhängigen Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen (Peterson and Workman, 2000; Vignali et al., 2000) und zum anderen um Enzymkomplexe, die Histone posttranslational modifizieren (Sternier and Berger, 2000; Ng and Bird, 2000). Mit der Entdeckung dieser Aktivitäten hat die Forschung an Genregulation im Chromatinkontext eine neue Dimension hinzugewonnen.

Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen sind Proteinkomplexe, die aus 2 bis 15 verschiedenen Protein-Untereinheiten bestehen. Alle haben den Besitz einer ATPase-Untereinheit der Swi/Snf-Superfamilie gemeinsam (Eisen et al., 1995). Die Swi/Snf-Familie der Nukleosomen-Remodulierungs-Komplexe wurde zuerst in Hefe entdeckt. Aus genetischen Screens wurden Mutanten isoliert, die entweder nicht mehr in der Lage waren, ihren Paarungs-Genotyp zu wechseln (*swi*<sup>1</sup>, switch) oder Saccharose zu fermentieren (*snf*, sucrose non fermenting) (Sudarsanam and Winston, 2000). Die phänotypische Ähnlichkeit vieler Mutanten hat sehr früh vermuten lassen, dass in vielen Fällen Proteine ein und desselben Komplexes betroffen waren. Die biochemische Charakterisierung dieser Faktoren hat zur Identifizierung des 11 Untereinheiten umfassenden Swi/Snf-Komplexes geführt (Tab. 1) (Cairns et al., 1994), der so zum Paradigma für Nukleosomen-

---

<sup>1</sup> Hier und im Folgenden wird die für *S. cerevisiae* übliche Schreibweise für Gene, mutierte Gene und Proteine verwendet. Im vorliegenden Fall wäre „*SWT*“ das Wildtyp-Gen, „*swi*“ das mutierte Gen und „Swi“ das zugehörige Genprodukt (Protein).

Remodulierungs-Komplexe wurde. Der Swi/Snf-Komplex ist in der Lage, durch Hydrolyse von ATP gewonnene Energie dazu zu verwenden, die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA für interagierende Proteine zu erhöhen. Die katalytische Untereinheit und damit der Motor, der diese Proteinmaschine antreibt, ist das Swi2/Snf2-Protein, eine ATPase der DEAD/H box-Familie (Boyer et al., 2000). Über die Funktionen der anderen Swi/Snf-Untereinheiten ist abgesehen von wenigen Ausnahmen nicht viel bekannt. Swi1 enthält eine AT-reiche Interaktionsdomäne, die eine unspezifische Bindung des Swi/Snf-Komplexes an DNA vermitteln könnte (Kortschak et al., 2000). Vor kurzem wurde gezeigt, dass zwei weitere Untereinheiten, Arp7 und Arp9, für die Remodulierungs-Aktivität nicht benötigt werden. Stattdessen bilden sie ein Heterodimer, das sowohl in Swi/Snf als auch in RSC, einem anderen Remodulierungskomplex, eine Rolle bei der Ausbildung der korrekten Chromatinarchitektur von DNA-Regionen spielen könnte (Szerlong et al., 2003).

<b>Swi/Snf</b>	<b>RSC</b>	<b>Isw1</b>	<b>Isw2</b>	<b>Ino80</b>
Swi2/Snf2	Sth1/Nsp1	Isw1	Isw2	Ino80
Snf5	Sfh1	p74	p140	Arp4
Swi3	Rsc8/Swh3	p105		Arp5
Swp82	Swi1	p110		Arp8
Snf11	Rsc1 oder Rsc2			Rvb1
Swp73/Snf12	Rsc6			Rvb2
Swp61/Arp7	Rsc11/Arp7			Act1
Swp59/Arp9	Rsc12/Arp9			
Snf6	Rsc3			
Swp29/Taf <sub>II</sub> 30	Rsc5			
	Rsc7			
	Rsc9			
	Rsc10			
	Rsc13			
	Rsc14			
	Rsc15			

**Tabelle 1: Nukleosomen-Remodulierungs-Komplexe aus *S. cerevisiae*.** Das in der ersten Zeile aufgeführte Protein jedes Komplexes ist jeweils die katalytische ATPase-Untereinheit. Die übrigen Untereinheiten folgen ohne bestimmte Reihenfolge.

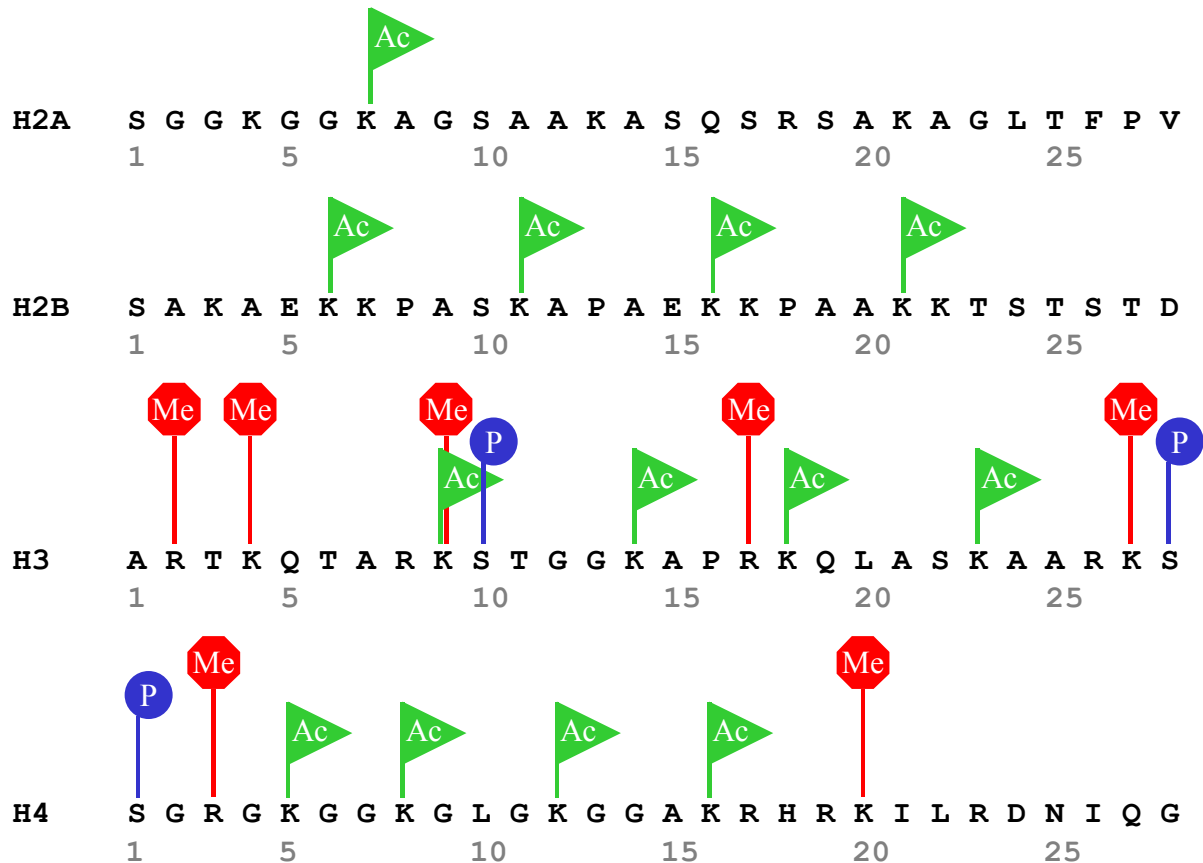
Nach und nach wurden in Hefe neben Swi/Snf noch weitere Chromatin-Remodulierungs-Maschinen charakterisiert (Tab. 1). Zunächst wurde der RSC-Komplex aufgrund seiner hohen Homologie zu Swi/Snf identifiziert. Swi/Snf und RSC besitzen mehrere homologe bzw. identische Untereinheiten, interessanterweise scheint dennoch kaum funktionelle Redundanz zwischen beiden

Komplexen vorhanden zu sein. Stämme, in denen das *SNF2*-Gen zerstört wurde, weisen lediglich einen Wachstumsdefekt auf, dagegen wird fast jede Untereinheit des RSC-Komplexes von einem essentiellen Gen kodiert (Cairns et al., 1996). Im Gegensatz zu Swi/Snf wird der RSC-Komplex hauptsächlich an PolIII-Gene rekrutiert (Ng et al., 2002). Da viele von der PolIII transkribierte Gene in der Zelle essentiell sind, könnte so die Bedeutung von RSC für das Zellwachstum erklärt werden. Während Sth1, die katalytische Untereinheit von RSC, stark homolog zu Snf2 ist, sind die ATPasen weiterer Remodulierungs-Maschinen aus Hefe Mitglieder anderer ATPase-Unterfamilien. Die Isw1- und Isw2-Komplexe besitzen mit Isw1 bzw. Isw2 jeweils eine katalytische Untereinheit der ISWI („imitation switch“-)Familie, die zuerst in *D. melanogaster* charakterisiert wurde. Wenn Zellen sich in der vegetativen Wachstumsphase befinden, wird der Isw2-Komplex von dem DNA-bindenden Repressorprotein Ume6 an die Promotoren von Genen rekrutiert, die früh in der Meiose benötigt werden. Als Folge reprimiert er diese Gene, und zwar synergistisch mit dem Sin3-Rpd3-Komplex (Goldmark et al., 2000). Über die Funktion von Isw1 *in vivo* ist wenig bekannt, man weiß aber, dass Isw1 zwei verschiedene Komplexe, Isw1a und Isw1b, bildet (Vary, Jr. et al., 2003). Nahezu alle hier beschriebenen Remodulierungs-Komplexe haben Homologe in höheren Eukaryonten, beispielsweise in *D. melanogaster* (Elfring et al., 1994), *X. laevis* (Gelius et al., 1999), *H. sapiens*, *B. taurus* (Okabe et al., 1992) und *C. elegans* (Sawa et al., 2000), wobei häufig mehrere Homologe eines Komplexes in demselben Organismus vorhanden sind.

Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen verwenden Energie aus der Hydrolyse von ATP, um Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Histonen in einem Nukleosom übergangsweise aufzuheben. Die dem zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen konnten bisher nicht widerspruchsfrei aufgeklärt werden. Unterschiedliche Reaktionsbedingungen *in vitro* haben Raum für verschiedene Modelle eröffnet, wobei im wesentlichen drei Mechanismen diskutiert werden: Translokation von Histonoktameren in *cis* (Längst et al., 1999; Hamiche et al., 1999) oder *trans* (Whitehouse et al., 1999) und Bildung eines dauerhaft remodulierten Nukleosoms (Schnitzler et al., 1998; Lorch et al., 1998). Allen Modellen ist gemeinsam, dass nukleosomale DNA vorübergehend zugänglich für interagierende Proteine und damit permissiv für regulatorische Prozesse wird.

Eine andere Möglichkeit, den Aktivierungszustand eines Gens über die Chromatinstruktur zu beeinflussen, ist die posttranslationale Modifikation von Histonschwänzen. Als wesentlich für die Regulation der Transkription haben sich vor allem die Acetylierung von Lysin-Resten, Methylierung von Lysin- und Arginin-Resten und Phosphorylierung von Serin-Resten

herausgestellt. Eine Übersicht über die Positionen möglicher posttranslationaler Modifikationen an den Histonschwänzen nach heutigem Kenntnisstand ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Positionen von Histonmodifikationen an Histonschwänzen.** Dargestellt sind Acetylierung (Ac), Methylierung (Me) und Phosphorylierung (P) an den verschiedenen Histonschwänzen eines Nukleosoms. Zu beachten ist, dass die gezeigten Modifikationen eine Zusammenfassung von Daten aus verschiedenen Organismen repräsentieren. Beispielsweise findet man Methylierung an Lysin 9 und Lysin 27 in Histon H3 nur in höheren Eukaryonten, aber nicht in Hefe.

Methylierung findet man nur an den Schwänzen der Histone H3 und H4. Die dafür verantwortlichen Enzyme, die Histon-Methyltransferasen, modifizieren spezifisch Arginin- oder Lysin-Reste (Zhang and Reinberg, 2001). Besonders der Methylierungszustand von Histon H3 spielt in höheren Eukaryonten eine bedeutende Rolle. Er entscheidet mit darüber, ob eine DNA-Region eine euchromatische oder heterochromatische Chromatinstruktur ausbildet, da methyliertes Lysin 9 von HP1 gebunden wird, was wiederum die Bildung von Heterochromatin initiiert (Nielsen et al., 2001; Jacobs and Khorasanizadeh, 2002). Hefe besitzt andere Mechanismen für die Ausbildung von Heterochromatin, dementsprechend wird Lysin 9 in Hefe nicht methyliert.

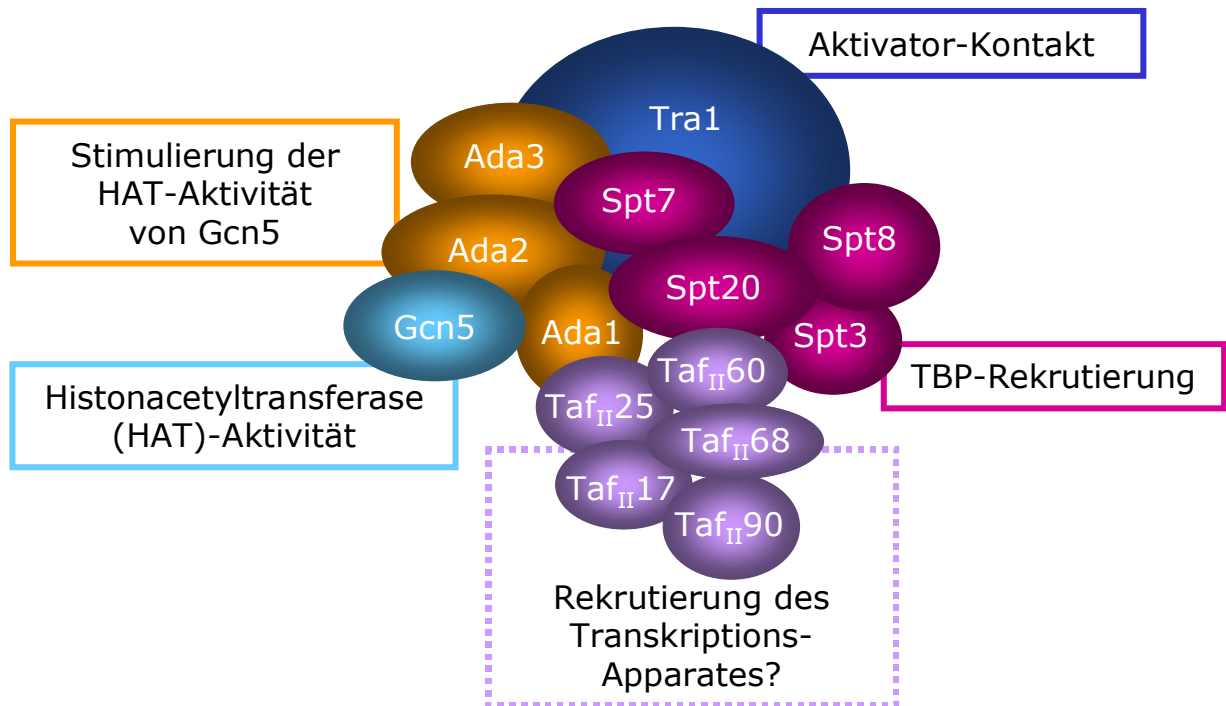
Methylierung von Lysin 4 dagegen wurde kürzlich mit einem Reaktionsschritt bei der Initiation der Transkription korreliert. An Lysin 4 modifiziert die Methyltransferase Set1 die 5'-Regionen transkriptionell aktiver Gene, und schafft damit ein Erkennungszeichen für kürzlich erfolgte Genexpression (Ng et al., 2003). Die funktionelle Bedeutung dieser Markierung ist allerdings unklar, da Zellen in Abwesenheit von Set1 keine signifikanten Defekte bei der Expression der meisten PolIII-Gene zu haben scheinen (Santos-Rosa et al., 2002).

Als Beispiel für die Funktion einer N-terminalen Histon-Phosphorylierung ist besonders die Phosphorylierung von Serin 10 in Histon H3 hervorzuheben. Interessanterweise unterstützt diese Modifikation zwei scheinbar gegensätzliche Prozesse, nämlich Transkriptionsaktivierung (Lo et al., 2001) und Kondensierung mitotischen Chromatins (Wei et al., 1999).

Eine besonders wichtige Funktion bei der Genexpression nimmt die Acetylierung von Lysin-Resten ein. Die Bedeutung der Histonacetylierung für die Genregulation wurde schlagartig deutlich, als Gcn5, ein zur damaligen Zeit bereits lange bekannter Transkriptions-Coaktivator (Georgakopoulos and Thireos, 1992), als Histonacetyltransferase (HAT) identifiziert wurde (Brownell et al., 1996). Substrate für die HAT-Aktivität von Gcn5 *in vivo* sind die Lysine K11 und K16 von Histon H2B und K9, K18 und K23 von Histon H3 (Suka et al., 2001). Tatsächlich konnte in den Promotorregionen der Gcn5-abhängigen *HIS3*- und *HO*-Gene bei Transkriptionsaktivierung ein erhöhter Acetylierungsgrad an Histon H3 nachgewiesen werden (Kuo et al., 1996; Krebs et al., 1999). Neben Gcn5 wurden in Hefe eine Reihe weiterer Acetyltransferasen charakterisiert (Gregory et al., 2001), von denen die meisten allerdings eine eher untergeordnete Bedeutung für die Regulation von PolIII-Genen zu haben scheinen. Sas2, eine Histon H4-Acetyltransferase vom MYST-Typ, ist an der Ausbildung von Heterochromatin/Euchromatin-Grenzen (Suka et al., 2002; Kimura et al., 2002), sowie bei der Replikation und beim „silencing“ (Meijsing and Ehrenhofer-Murray, 2001; Osada et al., 2001) beteiligt. Die Histon H3-Acetyltransferasen Sas3 und Elp3 spielen in der Elongationsphase PolIII-abhängiger Transkription eine Rolle (Wittschieben et al., 1999; John et al., 2000). Esa1 ist die katalytische Untereinheit des für Histon H4 spezifischen NuA4-Komplexes (Allard et al., 1999), der fast ausschließlich an die Promotoren von Genen für ribosomale Proteine rekrutiert wird (Reid et al., 2000).

In der Zelle bestimmt das Gleichgewicht zwischen Histon-Acetylierung und -Deacetylierung einen globalen Acetylierungs-Hintergrund, der sich von DNA-Region zu DNA-Region stark

unterscheiden kann (Vogelauer et al., 2000). Dem überlagert findet bei Gen-Aktivierung oder -Repression eine zielgerichtete Modulation des Acetylierungsgrades einzelner Gene durch Rekrutierung von Histonacetyltransferasen oder -Deacetylasen statt (Kurdistani and Grunstein, 2003).



**Abbildung 4: Aufbau und funktionelle Untergliederung des SAGA-Komplexes aus Hefe.**

Die Histonacetyltransferase Gcn5 ist die katalytische Untereinheit dreier HAT-Komplexe, SAGA, ADA (Grant et al., 1997) und A2 (Sendra et al., 2000), von denen SAGA der bedeutendste ist, da dessen Aktivität essentiell für die Transkription einer Vielzahl von PolIII-Genen ist. SAGA enthält neben Gcn5 drei Ada-Untereinheiten (Ada1, Ada2 und Ada3), vier Spt-Proteine (Spt3, Spt7, Spt8 und Spt20), fünf TBP-assoziierte Faktoren (Taf<sub>II</sub>17, Taf<sub>II</sub>25, Taf<sub>II</sub>60, Taf<sub>II</sub>68 und Taf<sub>II</sub>90) und das Adaptor-Protein Tra1 (Abb. 4) (Roth et al., 2001). Innerhalb von SAGA bildet Gcn5 einen trimeren Subkomplex mit den Ada-Proteinen Ada2 und Ada3, wobei Ada2 durch dessen SANT-Domäne die HAT-Aktivität von Gcn5 direkt und durch Wechselwirkung mit Histonschwänzen auch indirekt stimuliert (Boyer et al., 2002). Interessanterweise haben sich immer wieder Hinweise gefunden, dass SAGA neben der Bereitstellung von Histonacetyltransferase-Aktivität noch andere Funktionen bei der Genregulation besitzt (Sterner et al., 1999; Lee et al., 2000). Untersuchungen der *GAL*-Promotoren aus Hefe haben gezeigt, dass Spt3 eine zweite wesentliche Rolle bei der Trans-

kriptionsaktivierung besitzt. Spt3 unterstützt die Bildung des Präinitiationskomplexes an aktivierten Promotoren durch Rekrutierung von TBP an dessen Bindungsstellen (Larschan and Winston, 2001; Bhaumik and Green, 2001). Gcn5 und Spt3 zusammen scheinen alle wesentlichen SAGA-Funktionen bereitzustellen, da Mutationen in den Untereinheiten Ada1, Spt7 oder Spt20, die unbedingt für die strukturelle Integrität des Komplexes benötigt werden (Sternier et al., 1999), in allen bisher bekannten Fällen den selben Effekt haben, wie die gleichzeitige Ausschaltung der *GCN5*- und *SPT3*-Gene (Roth et al., 2001).

Genetische Untersuchungen in Hefe haben gezeigt, dass Chromatin-Remodulierungs-Komplexe und Histonacetyltransferasen in vielen Fällen funktionell miteinander verknüpft sind. Während beispielsweise weder Gcn5 noch Snf2 alleine essentiell für das Zellwachstum sind, ist ein Stamm, in dem sowohl SAGA als auch Swi/Snf fehlen, nicht lebensfähig (Roberts and Winston, 1997; Pollard and Peterson, 1997). Das deutet darauf hin, dass Histonacetylierung und Chromatin-Remodulierung bei der Transkription allgemein oder bei der Expression einiger essentieller Gene parallel zu einander zusammenwirken. Eine der momentan interessantesten Fragen ist daher, wie die Koordination verschiedener Chromatin-modifizierender Aktivitäten auf molekularer Ebene aussehen könnte. Aber es sind noch viele weitere Fragen offen, z.B.: hat die Histonacetylierung direkten Einfluss auf nukleosomale Protein-DNA-Wechselwirkungen oder nur im Zusammenwirken mit Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen? Welche Schritte bei der Genaktivierung benötigen überhaupt die Hilfe Chromatin-modifizierender Faktoren? Wie sieht remoduliertes Chromatin aus?

### 3. Die *PHO*-Gene aus *S. cerevisiae*

Für die experimentelle Untersuchung von Fragen dieser Art stellen die *PHO5*- und *PHO8*-Gene aus *S. cerevisiae* ein exzellentes Modellsystem dar, da die Chromatinstruktur an den Promotoren beider Gene im Zuge des Aktivierungsprozesses stark remoduliert wird (Almer et al., 1986; Barbaric et al., 1992). In beiden Fällen wird sowohl Nukleosomen-Remodulierungs-Aktivität in Gestalt des Swi/Snf-Komplexes, als auch die Histonacetyltransferase-Aktivität von SAGA für die Aktivierung benötigt, wobei die Chromatin-Remodulierung des *PHO5*- und des *PHO8*-Promotors in unterschiedlichem Maße von Swi/Snf und SAGA abhängen. Am *PHO8*-Promotor findet in Abwesenheit von Swi/Snf keine nachweisbare Chromatin-Remodulierung statt, und in Abwesenheit von Gcn5 HAT-Aktivität findet lediglich eine lokal äußerst begrenzte Chromatin-Remodulierung in



der unmittelbaren Umgebung der Aktivator-Bindungsstellen statt (Gregory et al., 1999). Dagegen ist die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors sowohl in einem *snf2*-Stamm als auch in einem *gcn5*-Stamm lediglich verlangsamt, nach ausreichend langer Induktion wird das Chromatin jeweils vollständig remoduliert (Barbaric et al., 2001). Ein experimentell sehr günstiger Umstand ist, dass in Abwesenheit von Phosphat im Nährmedium beide Promotoren gleichzeitig induziert werden, so dass der differentielle Einfluss von Swi/Snf, SAGA und anderen Chromatin-assoziierten Cofaktoren auf die Chromatinstruktur der reprimierten und aktivierten Promotoren in den selben Zellen untersucht werden kann.

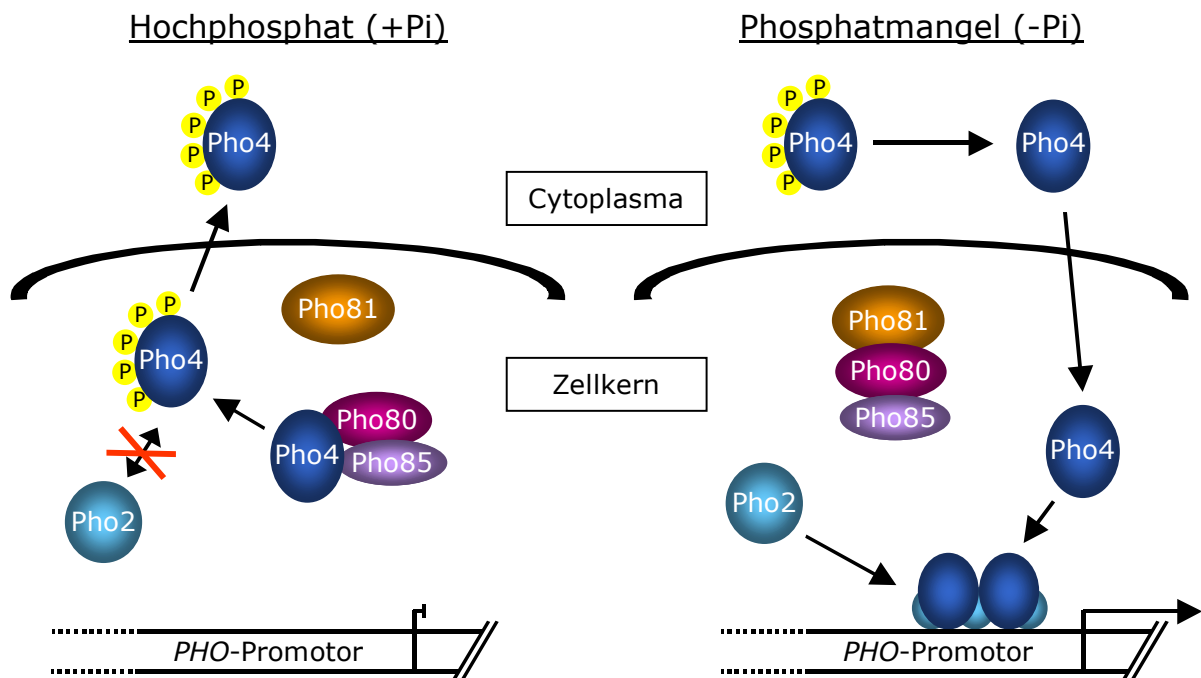
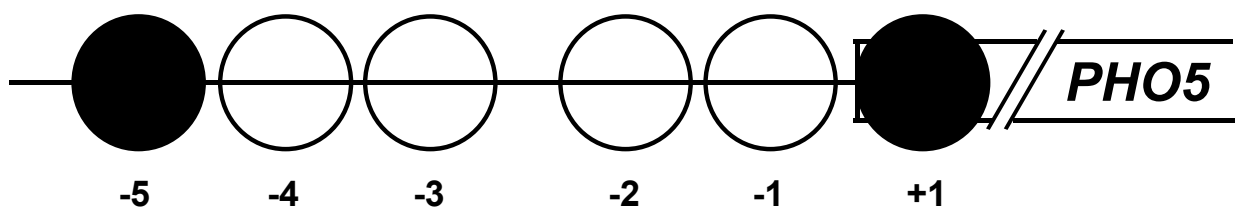


Abbildung 5: Phosphatabhängige Signaltransduktion: das *PHO*-System in *S. cerevisiae*.

Das *PHO*-System in Hefe dient bereits seit mehr als 15 Jahren als Modellsystem für die Chromatinforschung und gehört zu den am besten untersuchten Systemen überhaupt, sowohl was den Mechanismus der Aktivierung als auch die Signaltransduktionswege bei der Induktion angeht (Lenburg and O'Shea, 1996; Svaren and Hörz, 1997). Der Schlüssel zur Aktivierung der *PHO5*- und *PHO8*-Gene ist Pho4, ein Transkriptions-Aktivator der bHLH-Familie (Ogawa and Oshima, 1990). Pho4 bindet an beiden Promotoren jeweils zwei DNA-Elemente, UASp1 und UASp2. An den *PHO5*-Promotor bindet Pho4 kooperativ zusammen mit dem Homöodomänen-Protein Pho2 (Barbaric et al., 1998), das auch an der Aktivierung einer Reihe anderer Gene beteiligt ist, die sich

nicht unter Phosphat-Kontrolle befinden (Daignan-Fornier and Fink, 1992). Dagegen wird Pho2 am *PHO8*-Promotor für die Aktivierung nicht benötigt (Barbaric et al., 1992). Das Aktivierungspotential von Pho4 wird durch posttranslationale Modifikation auf mehreren Ebenen reguliert (Abb. 5). Unter Hochphosphat-Bedingungen wird Pho4 von dem Cyclin-CDK-Komplex Pho80-Pho85 an fünf Serin-Resten phosphoryliert. Diese Modifikationen bestimmen zum einen die subzelluläre Lokalisation von Pho4, da phosphoryliertes Pho4 aktiv aus dem Kern exportiert wird, und gleichzeitig der erneute Import in den Kern verhindert wird (Kaffman et al., 1998a; Kaffman et al., 1998b). Zum anderen blockiert die Phosphorylierung die zur Bindung an *PHO5* benötigte Interaktion mit Pho2 (Komeili and O'Shea, 1999).

Bei Anzucht der Zellen in phosphatfreiem Nährmedium signalisiert der membranständige Phosphat-Transporter Pho84 die Mangelbedingungen und erzeugt ein bisher noch nicht identifiziertes Phosphathunger-Signal, das zur Aktivierung des CDK-Inhibitors Pho81 führt. Pho81 wiederum hemmt die Aktivität des Pho80-Pho85-Komplexes, so dass Pho4 nicht mehr phosphoryliert wird, und sich nach und nach transkriptionell aktives Pho4 im Zellkern ansammelt (Lenburg and O'Shea, 1996). Die Transkriptionsaktivierung des *PHO5*-Promotors unter Phosphatmangel-Bedingungen bewirkt die Öffnung des Chromatins im Promotorbereich (Almer et al., 1986).



**Abbildung 6: Nukleosomenstruktur des reprimierten *PHO5*-Promotors.**

Vier Nukleosomen (Abb. 6, Nukleosomen -4 bis -1) die unter reprimierenden Bedingungen exakt im Promotor positioniert sind und eine zentrale hypersensitive Stelle zwischen den Nukleosomen -2 und -3 ausbilden, werden bei der Aktivierung remoduliert. Dadurch wird der Promotor in einem Bereich von ca. 600 bp vollständig hypersensitiv für Restriktionsnukleasen. Die Öffnung des Promotors ist sowohl von DNA-Replikation (Schmid et al., 1992) als auch von Transkription

(Fascher et al., 1993) unabhängig. Die Aktivierung des *PHO8*-Promotors geht ebenfalls mit Chromatin-Remodulierung des Promotors einher (Barbaric et al., 1992). Unter reprimierten Bedingungen liegt der Promotor in einer definierten Chromatinstruktur vor, die allerdings im Gegensatz zur Situation am *PHO5*-Promotor bei Aktivierung nicht vollständig remoduliert wird. Der proximale Teil des Promotors weist auch im aktiven Zustand nur eine intermediäre Zugänglichkeit auf.

#### 4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Histon-modifizierenden Enzymkomplexen bei der Chromatin-Remodulierung und transkriptionellen Aktivierung der *PHO5*- und *PHO8*-Gene zu verstehen. Dabei sollten sich die Untersuchungen auf den SAGA-Komplex konzentrieren, da zu Beginn der Arbeit bereits bekannt war, dass SAGA an beiden Promotoren für die Chromatin-Remodulierung benötigt wird. Die Öffnung des *PHO5*-Promotors ist zwar nicht strikt von SAGA abhängig, da der Promotor in einem Wildtyp-Stamm nach 16-stündiger Induktion in phosphatfreiem Medium vollständig remoduliert ist (Gregory et al., 1998). Bei genauerer Betrachtung des Öffnungs-Prozesses hat sich aber herausgestellt, dass SAGA bei der *PHO5*-Aktivierung doch eine Rolle spielt. In einem Stamm, dem sowohl die HAT-Aktivität von Gcn5 als auch der negative Regulator Pho80 fehlt, liegt das *PHO5*-Promotorchromatin unter Hochphosphat-Bedingungen in einem Zustand vor, der weder den positionierten Nukleosomen des reprimierten Promotors noch dem vollständig remodulierten Promotorchromatin entspricht (Gregory et al., 1998). Stattdessen findet man die Nukleosomen auf Zufallspositionen über den ganzen Promotor verteilt, was gleichzeitig die fast vollständige Aufhebung der Promotor-Aktivierung bewirkt. Später konnte gezeigt werden, dass die HAT-Aktivität von Gcn5 in einem Stamm, der Pho80 enthält, beim Übergang von Hochphosphat zu Niedrigphosphat die Geschwindigkeit der Chromatinöffnung an *PHO5* erhöht (Barbaric et al., 2001). Da der Kernimport von Pho4 mit normaler Geschwindigkeit abläuft, kann angenommen werden, dass die Abwesenheit von Gcn5 nicht die phosphatabhängige Signaltransduktion beeinflusst, sondern dass Gcn5 auf das Chromatin selbst wirkt. Für diese Annahme spricht ebenfalls, dass die Chromatinöffnung auch dann verlangsamt ist, wenn der *PHO5*-Promotor durch Gal4 statt durch Pho4 aktiviert wird, wobei gleichzeitig die Aktivierung des von Gal4 aktivierten *GALI*-Promotors mit normaler Geschwindigkeit abläuft (Barbaric et al., 2001). Der *PHO8*-Promotor dagegen ist fast vollständig von SAGA abhängig. In Abwesenheit von Gcn5

HAT-Aktivität kann nur eine sehr lokale Remodulierung der Nukleosomen-Struktur um die Pho4-Bindungsstelle UASp2 beobachtet werden (Gregory et al., 1999).

Da an beiden Promotoren alle Effekte jeweils auf die HAT-Aktivität von Gen5 zurückgeführt werden konnten, drängt sich die Vermutung auf, dass Histonacetylierung bei der Aktivierung des *PHO5*- und des *PHO8*-Promotors eine entscheidende Rolle spielt. Daher wurden beim Beginn dieser Arbeit die folgenden Fragestellungen formuliert: Wie hoch ist der Grad der Histon-Acetylierung beider Promotoren im reprimierten bzw. aktivierten Zustand? Lässt sich aus diesen Informationen unter Umständen auf die Funktion der Histonacetylierung beim Öffnungsprozess rückschließen? Wird der SAGA-Komplex bei der Aktivierung an den *PHO5*- und den *PHO8*-Promotor rekrutiert? Wenn ja, beeinflusst er vielleicht noch andere Prozesse außer der Nukleosomen-Remodulierung?

## II. Material und Methoden

### 1. *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Bezugsquelle/Referenz</u>
CY337	wt	C. Peterson
CY407	<i>snf2</i>	C. Peterson
CY397	<i>snf2K798A</i>	C. Peterson
CY53379PKM	<i>gcn5PKM</i>	S. Berger
CY338	<i>pho4</i>	Labor
CY408	<i>pho4, snf2</i>	Labor
CY637	<i>rpd3</i>	diese Arbeit
8136	<i>ash1, Myc-ADA2</i>	K. Nasmyth
8141	<i>ash1, Myc-ADA2, snf2</i>	K. Nasmyth
8136 $\Delta$ <i>pho4</i>	<i>ash1, Myc-ADA2, pho4</i>	diese Arbeit
8136 $\Delta$ <i>spt3</i>	<i>ash1, Myc-ADA2, spt3</i>	Labor
YZS276	( <i>hta1-htb1; hta2-htb2; pZS145</i> [ <i>HTA1-Flag-HTB1; CEN; HIS3</i> ]).	D. Allis

### 2. Medien zur Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

#### 2.1. YPDA-Vollmedium

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

#### 2.2. Phosphatfreies Minimalmedium

2 g/l L-Asparagin; 500 mg/l MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 100 mg/l NaCl; 100 mg/l CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 2 mg/l Inositol; 500 µg/l H<sub>3</sub> BO<sub>3</sub>; 40 µg/l CuSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 100 mg/l KJ; 200 µg/l Fe(III)Cl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 400 mg/l MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 200 µg/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>27</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 200 mg/l ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 200 µg/l Riboflavin; 200 µg/l p-Aminobezoesäure; 2 µg/l Biotin; 2 µg/l Folsäure; 400 µg/l Nicotinsäure; 400 µg/l Pyridoxin-HCl; 400 µg/l Thyaminchlorid; 13,4 mM KCl; 50 mM Natriumcitrat pH 5,0;

2% (w/v) Glucose; 1,6 g/l Aminosäure drop out-Mix (2 g Adenin, 2 g Alanin, 2 g Arginin, 2 g Asparagin, 2 g Aspartat, 2 g Cystein, 2 g Glutamin, 2 g Glutamat, 2 g Glycin, 2 g meso-Inosit 2 g Isoleucin, 2 g Lysin, 2 g Methionin 0,2 g p-Aminobenzoesäure 2 g Phenylalanin, 2 g Prolin 2 g Serin, 2 g Threonin, 2 g Tryptophan, 2 g Tyrosin, 2 g Valin; 2 g Histidin, 2 g Uracil, 2 g Leucin).

### 3. Oligonukleotidsequenzen

#### 3.1. Oligonukleotide für ChIP-Experimente in Kombination mit quantitativer PCR

*PGK1*-A: 5'-TCAAGTCCAAATCTTGGACAGAC-3';

*PGK1*-B: 5'-CTTTTCTTCTAACCAAGGGGGTG-3';

*PHO8*-5'-Region-A: 5'-TGAAGAATCCAAGGCTCTGAAAGC-3';

*PHO8*-5'-Region-B: 5'-GGAAGAAACAGCTTTGGTGACTGC-3';

distaler *PHO8*-Promotor-A: 5'-CCGTCTGAATGGTATTGTGTAGAGC-3';

distaler *PHO8*-Promotor-B: 5'-GAGTGGAAGCTTGCGAATATGG-3';

proximaler *PHO8*-Promotor-A: 5'-ATGTTTATGTAGCCACTTGCTGGC-3';

proximaler *PHO8*-Promotor-B: 5'-TGAAGTACAAGTTAGCGAGCTACG-3';

*PHO8* codierende Region-A: 5'-CAACATGTGAACTGAATGAAGCCG-3';

*PHO8* codierende Region-B: 5'-ACACTTGACGAGCATTATTCGGG-3';

*PHO5* 5'-Region-A: 5'-GTGCAGTAGTAACTTATCAGTCCG-3'

*PHO5* 5'-Region-B: 5'-ATGTTCCCTTGGTTATCCCATCGCC-3'

*PHO5* UASp2-A: 5'-ACGTGTGAGTGCCAAGGTTGTATC-3'

*PHO5* UASp2-B: 5'-TGGAAGTCATCTTATGTGCGCTGC-3'

#### 3.2. Oligonukleotide für ChIP-Experimente in Kombination mit Taqman<sup>®</sup>-PCR

*PHO5*-5'-adjacent region-C: 5'-CCTTTACCGTAATTTTCAATTGCTAA-3';

*PHO5*-5'-adjacent region-D: 5'-TCGCTTCTTCAACAGTGGTAAAAATA-3';

*PHO5*-5'-adjacent region-Sonde: 5'-VIC-CAATGTTCCCTTGGTTATCCCATCGCCA-TAMRA-3';

*PHO5* TATA-C: 5'-AAGCCATACTAACCTCGACTTAGCA-3';

*PHO5* TATA-D: 5'-GGGTAAACATCTTTGAATTGTCGAA-3';

*PHO5* TATA-Sonde: 5'-FAM-AACATCAGCGCTTATATAC-TAMRA-3';

*PGK1*-C: 5'-GAATGGCGGGAAAGGGTTTA-3';  
*PGK1*-D: 5'-TGTTTGAAGAGAGAGAGTAACAGTACGA-3';  
*PGK1*-Sonde: 5'-VIC-TACCACATGCTATGATGCCCACTGTGATC-TAMRA-3'.  
*GALI*-C: 5'-GACGCACGGAGGAGAGTCTT-3';  
*GALI*-D: 5'-CGCTTAACTGCTCATTGCTATATTG-3';  
*GALI*-Sonde: 5'-VIC-CGCTCGGCGGCTTCTAATCCG-TAMRA-3';  
*PHO5*-5'-ORF-C: 5'-GATCAAACGGTTCATTAGACAATAGGT-3';  
*PHO5*-5'-ORF-D: 5'-TGAGTGGATATTAATCGATGGAACTC-3';  
*PHO5*-5'-ORF-Sonde: 5'-VIC-CAGCCCGATATTTGCGCACGATG-TAMRA-3';  
*PHO5*-5'-Region-C: 5'-CCTTTACCGTAATTTTCAATTGCTAA-3';  
*PHO5*-5'-Region-D: 5'-TCGCTTCTTCAACAGTGGTAAAAATA-3';  
*PHO5*-5'-Region-Sonde: 5'-VIC-CAATGTTCTTGGTTATCCCATCGCCA-TAMRA-3';  
*PHO5* UASp2-C: 5'-GAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGA-3';  
*PHO5* UASp2-D: 5'-GAAAACAGGGACCAGAATCATAAATT-3';  
*PHO5* UASp2-Sonde: 5'-FAM-ACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAGC-TAMRA-3';

### 3.3. Oligonukleotid für DMS *in vivo*-footprint-Analysen

P5 UASp2: 5'-GCCAAGTAAGGTGACC-3';

## 4. Antikörper für ChIP-Analysen

<u>Antikörper</u>	<u>Bezugsquelle</u>
anti-H3 K9Ac/K14Ac	Upstate
anti-H4 K5Ac/K8Ac/K12Ac/K16Ac	Upstate
anti-Myc 9E11	K. Nasmyth
anti-TBP	K. Struhl
anti-Pho4	Labor

## 5. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

### 5.1. Herstellung von mit Formaldehyd kreuzvernetzten Chromatinextrakten

500 ml Hefezellkulturen einer Dichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml wurden in 1% Formaldehyd für 20 min bei 25°C inkubiert. Die Kreuzvernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von Glyzin in einer Endkonzentration von 125 mM beendet, die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min; 4200 U/min; 25°C) und zweimal in 50 ml eiskaltem 0.9% NaCl gewaschen. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1,25 \times 10^9$  Zellen/ml in HEG150-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.6, 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert und anschließend dreimal hintereinander mit einer French Press® bei einem Druck von 1100 psi behandelt. In diesem Schritt wurden die Zellen lysiert, und das kreuzvernetzte Chromatin wurde gleichzeitig mechanisch fragmentiert. Dabei entstanden Chromatinfragmente einer mittleren Größe von ca. 500 bp.

### 5.2. Immunopräzipitation

400 µl dieses Chromatinextrakts wurden zweimal aufeinanderfolgend zentrifugiert (1: 5 min; 13500 U/min; 4°C; 2: 30 min; 13500 U/min; 4°C), der Überstand wurde jeweils abgenommen, nach dem zweiten Mal für 2 h mit 25 µl Protein G-Beads inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert (2 s; 10000 U/min; 4°C). Zu dem Überstand wurde die entsprechende Menge eines 2 h mit 10% BSA; 0.5 µg/µl Heringssprema-DNA in HEG150-Puffer vorinkubierten Antikörpers (siehe unten) zusammen mit 20 µl Protein G-Beads zugegeben und über Nacht bei leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert. Die Protein G-Beads wurden durch Zentrifugation (2 s; 10000 U/min; 4°C) von dem ungebundenen Chromatin im Überstand abgetrennt. Anschließend wurden die Protein G-Beads für jeweils 5 min bei 4°C mit den folgenden Puffern gewaschen:

1. 1 x mit HEG150
2. 2 x mit HEG500 (500 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.6, 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)
3. 2 x mit LiCl-Lösung (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM LiCl; 1 mM EDTA; 0.1% NP40)
4. 2 x mit HEG150

Zuletzt wurden die Protein G-Beads zweimal aufeinanderfolgend für 2 h bei 4°C in TES-Puffer inkubiert und die Überstände wurden jeweils zurückbehalten und vereinigt. Zur Aufhebung der



Protein-DNA-Kreuzvernetzungen wurden die Überstände über Nacht bei 65°C unter starkem Schütteln inkubiert.

### **5.3. DNA-Aufreinigung**

Die Lösungen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, und es wurden 200 µl TEPK-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mg/ml ProteinaseK) zugegeben und für 2 h bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenolextraktion gefolgt von einer Chloroformextraktion durchgeführt. Nach Zugabe von 40 µl LTG-Puffer (5 M LiCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2,5 µg/µl Glykogen) und 1 ml Ethanol wurde das Gemisch für 30 min bei -80°C inkubiert, zentrifugiert (30 min; 13500 U/min; 4°C), und das Pellet wurde in 100 µl TE resuspendiert. Im letzten Schritt wurde die DNA in den Lösungen mit dem QiaQuick-PCR purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 100 µl 1/10 TE aufgenommen.

### **5.4. DNA-Quantifizierung durch quantitative PCR gefolgt von Ethidiumbromid-Gelelektrophorese**

Zur PCR-Amplifikation der immunpräzipitierten DNA wurden Ready-To-Go PCR-Beads (Amersham) verwendet. Jeweils 2,5 bzw. 1 µl der DNA-Lösung wurden mit jeweils 25 pmol Oligonukleotiden in einem Reaktionsvolumen von 25 µl amplifiziert. Es wurden 26 PCR-Zyklen (30 s 95°C; 30 s 50°C; 1 min 72°C) durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Reaktionen auf einem 2,5% Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetrennt und mit dem ImaGemaster-System (Amersham) und der dazugehörigen Software quantifiziert.

### **5.5. DNA-Quantifizierung durch TaqMan<sup>®</sup>-PCR**

0,6 µl der DNA-Lösung wurden zusammen mit den jeweiligen Oligonukleotiden und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden in TaqMan<sup>®</sup>-MasterMix in den vom Hersteller (ABI) angegebenen Konzentrationen in einem Reaktionsvolumen von 25 µl vermischt. Jede Reaktion wurde dreifach durchgeführt. Es wurde das ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (ABI) und die dazugehörige Software verwendet. Standardkurven der Input-DNA (aufgereinigte DNA aus Chromatinextrakten vor der Immunpräzipitation) wurden für jedes Amplikon angefertigt, und das Signal der

immunopräzipitierten DNA wurde auf die individuelle Effizienz des jeweiligen Amplikons bezogen.

## 6. *In vivo*-Analyse von Protein-DNA-Bindung mit Dimethylsulfat (DMS *in vivo* footprint)

### 6.1. DMS-Behandlung von Hefezellen *in vivo*

500 ml Hefezellkulturen wurden bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-2 angezogen und durch Zentrifugation (10 min; 4200 U/min; 25°C) geerntet. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $6,7 \times 10^6$  Zellen/ml in demselben Medium resuspendiert, und direkt anschließend wurde DMS in einer Endkonzentration von 0,001% zugegeben. Nach Inkubation für 9 min bei 25°C wurde die Methylierungsreaktion durch Zugabe von 40 ml eiskaltem TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA; 40 mM NaCl) beendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (10 min; 4200 U/min; 4°C) und in einer Dichte von  $10^7$  Zellen/ml in SCED-Puffer (1 M Sorbitol; 0,1 M Natriumcitrat pH 5,8; 10 mM EDTA; 2 mM DTT) resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl einer Zymolyase 100T-Suspension (10 mg/ml) zugegeben. Nach Inkubation bei 30°C für 30 min wurden die Zellen abzentrifugiert (2 s; 10000 U/min; 25°C) und in 1 ml TES-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 1% SDS) für 45 min bei 65°C unter Schütteln lysiert. Nach Zugabe von 400 µl 5 M Kaliumacetat pH 8,0 wurde die Lösung erst 1 h bei 4°C inkubiert und dann zentrifugiert (10 min; 13000 U/min; 4°C). Der Überstand wurde mit 650 µl Isopropanol vermischt und erneut zentrifugiert (10 min; 13000 U/min; 25°C). Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 600 µl TE-Puffer mit RNaseA (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA; 10 µg/ml RNaseA) gelöst und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 2 µl 5 M NaCl und 400 µl Isopropanol versetzt und zentrifugiert (10 min; 13000 U/min; 25°C). Nach Waschen mit 1 ml 70% Ethanol wurden 540 µl H<sub>2</sub>O, 60 µl Spaltpuffer B (Roche) und jeweils 7,5 µl *EcoRV* bzw. *BamHI* (40 U/µl) zugegeben, und die Lösung wurde bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 8 µl 5 M NaCl und 1 ml Ethanol versetzt, 20 min bei -80°C inkubiert und zentrifugiert (10 min; 13000 U/min; 4°C). Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer pro  $5 \times 10^9$  Zellen der Ausgangskultur resuspendiert.

## 6.2. Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden

In die Reaktion wurden HPLC-gereinigte Oligonukleotide (MWG-Biotech) einer Länge von 16 Nukleotiden eingesetzt. Die Markierung des 5'-Ende des Oligonukleotids erfolgte in einem Reaktionsgemisch aus 5 pmol Oligonukleotid, 10 pmol  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und 1,5  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase in T4-Polynukleotidkinase-Puffer (Roche) in einem Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l bei 37°C für 30 min. Über Sephadex G50-Säulen wurden nicht eingebaute Nukleotide von markierten Oligonukleotiden abgetrennt.

## 6.3. Primerextensions-Reaktion und Auftrennung der Reaktionsprodukte auf einem Sequenziergel

Die Amplifikation der mit DMS behandelten DNA erfolgte in einem Reaktionsgemisch aus 8-12  $\mu$ g DMS-behandelter DNA, 250.000 cpm endmarkierten Oligonukleotiden, 0,25 mM von jeweils dATP, dGTP, dCTP, dTTP und 5 U Taq-Polymerase in Taq-Polymerase-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 0,1 mg/ml Gelatine) in einem Reaktionsvolumen von 100  $\mu$ l. Es wurden 30 Reaktionszyklen (1 min 95°C; 2 min 45°C; 3 min 70°C) durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktion 13  $\mu$ l einer Lösung bestehend aus 100 mM EDTA; 1% SDS; 1 mg/ml Proteinase K zugegeben und für 30 min bei 45°C inkubiert. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l Ethanol und 5  $\mu$ l 5 M NaCl wurde ein Zentrifugationschritt (10 min; 13000 U/min; 4°C) durchgeführt und das daraus hervorgegangene Pellet in Sequenzgel-Auftragspuffer (80% Formamid; 50 mM Tris-Borat pH 8,3; 1 mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylenxyanol) aufgenommen. Diese Lösung wurde 3 min lang bei 95°C erhitzt und anschließend auf ein Sequenziergel (6% Sequagel XR, National Diagnostics) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde eine Lösung aus 100 mM Tris; 83 mM Borsäure; 1 mM EDTA pH 8,8 verwendet.

### III. Ergebnisse

#### 1. Histonacetylierung am *PHO8*-Promotor

##### 1.1. Histone H3 und H4 am remodulierten *PHO8*-Promotor sind nicht hyperacetyliert

In einem *S. cerevisiae* Wildtyp-Stamm bewirkt die Induktion des *PHO8*-Gens durch Phosphatmangel im Nährmedium eine ausgeprägte Remodulierung der Chromatinstruktur des *PHO8*-Promotors (Barbaric et al., 1992). Die Chromatinöffnung des Promotors hängt strikt vom Vorhandensein der Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität der SAGA-Untereinheit Gcn5 in den Zellen ab (Gregory et al., 1999), was darauf hindeutet, dass die Acetylierung von Promotorhistonen ein zentraler Bestandteil des Öffnungsprozesses sein könnte. Um diese Hypothese direkt zu testen, wurde der Grad der Histonacetylierung am maximal induzierten, remodulierten *PHO8*-Promotor bestimmt, und mit dem Acetylierungsgrad des reprimierten Promotors verglichen.

Zu diesem Zweck wurde die Chromatin-Immuno-Präzipitations (ChIP)-Technik in Verbindung mit quantitativer PCR eingesetzt. Diese Methode stellt gegenwärtig die einzige Möglichkeit dar, den Grad der Histonacetylierung an einer bestimmten DNA-Region *in vivo* zu bestimmen. Die ChIP-Technik wurde bereits in verschiedenen Modellorganismen einschließlich Hefe erfolgreich angewandt (Kuo and Allis, 1999). Die experimentellen Details dieser Methode sind im Material und Methoden-Teil ausführlich dargestellt. Dennoch werden im Folgenden die Grundprinzipien der ChIP-Technik kurz dargestellt, da es sich um die zentrale Methode der vorliegenden Arbeit handelt (Abb. 7).

Der erste Schritt besteht in der sogenannten Kreuzvernetzung des Chromatins. Lebende Zellen werden in 1% Formaldehydlösung inkubiert, um Histone und andere DNA-assoziierte Proteine kovalent an die DNA zu binden. Anschließend werden die Zellen aufgeschlossen, und das kreuzvernetzte Chromatin wird mechanisch fragmentiert. Gemäß den bestehenden Protokollen sollten dafür zuerst die Zellen durch ausführliches Vortexen mit Glasperlen aufgeschlossen und dann das Chromatin durch Ultraschall-Behandlung zerkleinert werden (Kuo and Allis, 1999). Im Zuge dieser Arbeit wurde das Verfahren weiterentwickelt, und es wurde eine French Press verwendet, um Zellaufschluss und Chromatinfragmentierung in einem Schritt durchzuführen. Durch die French Press-Behandlung werden die Hefezellen mit nahezu 100% Effizienz aufgeschlossen,

und es entstehen gleichzeitig in äußerst reproduzierbarer Weise Chromatinfragmente einer Größe zwischen 100 und 1000 bp, wobei der Schwerpunkt der Größenverteilung bei ungefähr 500 bp-Fragmenten liegt. Im nächsten Schritt werden Antikörper (z.B. gegen acetylierte Histone) verwendet, um bestimmte Chromatinfragmente durch eine Immunopräzipitation spezifisch anzureichern. Nach Reversion der Protein-DNA-Kreuzvernetzung und Aufreinigung der DNA wird schließlich die relative Häufigkeit bestimmter DNA-Sequenzen im Präzipitat durch quantitative PCR bestimmt. Wurde beispielsweise ein Antikörper gegen acetylierte Histone für die Immunopräzipitation verwendet, so spiegelt die relative Häufigkeit einer DNA-Sequenz im Präzipitat den Acetylierungsgrad dieser Chromatinregion im Verhältnis zu dem Acetylierungsgrad anderer Regionen wieder.

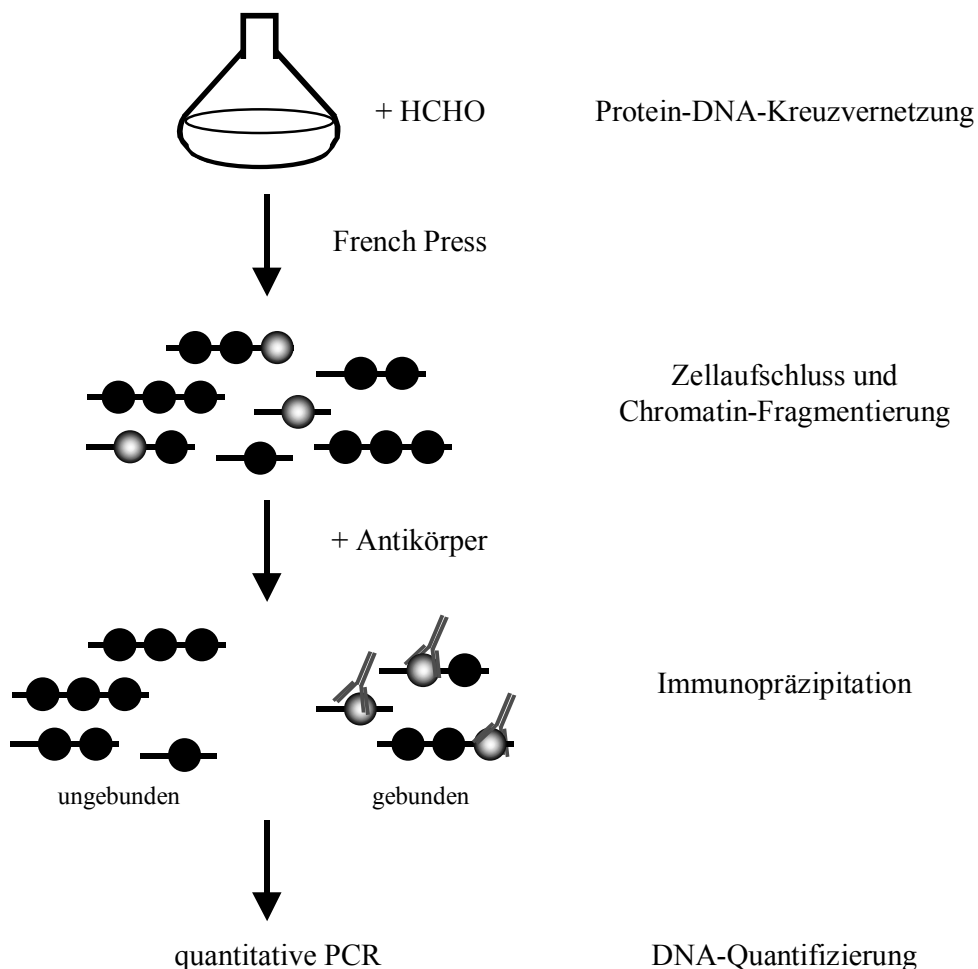
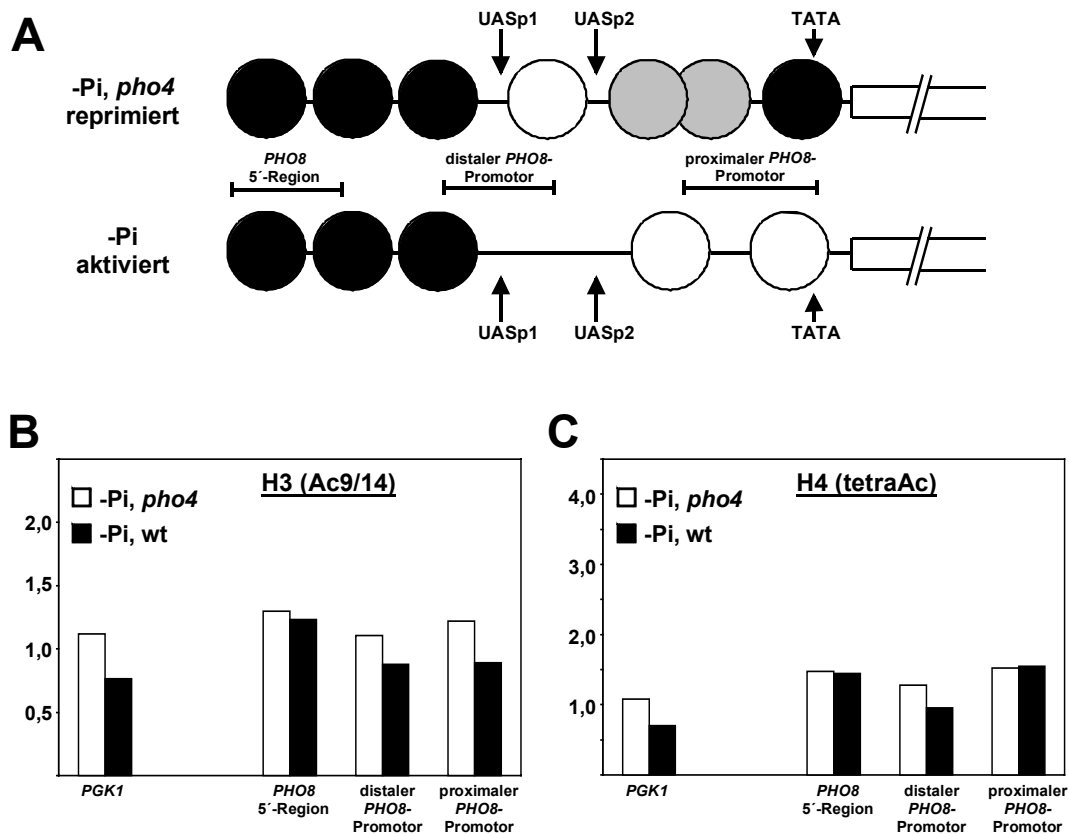


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der ChIP-Technik.

Zunächst wurde der Histonacetylierungsgrad des aktivierten *PHO8*-Promotors in einem Wildtyp-Stamm nach 16 h Induktion in phosphatfreiem Medium gemessen. Zum Vergleich wurden Zellen einer *pho4*-Deletionsmutante, in der das Phosphathunger-Signal nicht zur Induktion des *PHO8*-Promotors führt, und deren *PHO8*-Promotor daher auch bei Phosphathunger-Bedingungen im reprimierten, nicht-remodulierten Zustand vorliegt (Barbaric et al., 1992), unter identischen Bedingungen angezogen. Dadurch wurde vermieden, nicht-induzierte, sich exponentiell vermehrende Zellen eines Wildtyp-Stammes zum Vergleich heranziehen zu müssen. Da die 16-stündige Induktion in phosphatfreiem Medium zum Arrest in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus führt, müssten potentielle pleiotrope Effekte aufgrund unterschiedlichen Zellwachstums befürchtet werden. Tatsächlich wurde bereits früher ein globaler Anstieg von sowohl H3- als auch H4-Acetylierung in der S-Phase des Hefe-Zellzyklus beschrieben (Krebs et al., 1999).

Die Histonacetylierung wurde am distalen und am proximalen *PHO8*-Promotor mit verschiedenen Primerpaaren gemessen (Abb. 8A), um alle Nukleosomen abzudecken, die im aktiven Promotor remoduliert werden. Die direkt angrenzende 5'-Region von *PHO8* (schwarze Nukleosomen in der unteren Hälfte von Abb. 8A) ist nicht Teil des Promotors und wird dementsprechend im Zuge der *PHO8*-Aktivierung nicht remoduliert. Diese Region wurde daher als Kontrollregion in die Analyse mit einbezogen, um zwischen promotorspezifischen und globalen Effekten auf die Histonacetylierung unterscheiden zu können. Als weitere Kontrolle wurde der Grad der Histonacetylierung des konstitutiv aktiven *PGK1*-Promotors bestimmt, der weder durch Phosphatinduktion noch durch die Gegenwart oder Abwesenheit von Pho4 in der Zelle beeinflusst wird.

Die Acetylierung der Histone H3 und H4 wurde mit Antikörpern bestimmt, die gegen acetylierte Peptide aus den N-terminalen Bereichen der jeweiligen Histone, den sogenannten Histonschwänzen, hergestellt worden waren. Ein Antikörper bindet Histon H3, das an den Lysin 9 und 14 diacetyliert ist, der andere Antikörper bindet Histon H4, das an den Lysin 5, 8, 12 und 16 tetraacetyliert ist. Zu dem Zeitpunkt, an dem diese Experimente durchgeführt wurden, waren das die einzig erhältlichen Antikörper, die bereits erfolgreich in ChIP-Experimenten in Hefe eingesetzt worden waren (Kuo et al., 1998; Krebs et al., 1999).



**Abbildung 8: Grad der Histonacetylierung am vollständig remodulierten *PHO8*-Promotor.** (A) Die Positionen der PCR-Fragmente, die für die ChIP-Analyse des *PHO8*-Promotors verwendet wurden, sind anhand der nukleosomalen Struktur des reprimierten und des aktivierten *PHO8*-Promotors dargestellt. Im aktiven Zustand nicht-remodulierte Nucleosomen sind schwarz, teilweise remodulierte Nucleosomen sind grau und vollständig remodulierte Nucleosomen sind weiß dargestellt (Barbaric et al., 1992). Die überlappenden Kreise im oberen Teil der Abbildung sollen ein Nucleosom darstellen, das zwei alternative Positionen einnehmen kann. (B) Zellen der Stämme CY338 (*pho4*) und CY337 (Wildtyp) wurden 16 h in phosphatfreiem Medium induziert und anschließend zur Kreuzvernetzung des Chromatins mit Formaldehyd behandelt. Chromatinfragmente wurden mit einem Antikörper gegen diacetyliertes Histon H3 präzipitiert. Die Menge coimmunopräzipitierter DNA wurde durch quantitative PCR bestimmt und auf die jeweilige Input-DNA (aufgereinigtes DNA-Aliquot des in die Immunpräzipitation eingesetzten Chromatins) bezogen. (C) Der Acetylierungsgrad von Histon H4 wurde in den Stämmen CY338 und CY337 durch ChIP-Analyse bestimmt. Es wurde ein Antikörper gegen tetraacetyliertes Histon H4 verwendet.

Der Grad der Histonacetylierung des aktivierten *PHO8*-Promotors in einem Wildtyp-Stamm ist in Abbildung 8B dargestellt. Der Acetylierungsgrad von Histon H3 ist verglichen mit dem des *pho4*-Stammes leicht, aber reproduzierbar vermindert, wogegen die direkt angrenzende 5'-Region keinen Unterschied aufweist. Der Rückgang der Promotoracetylierung sowohl an Histon H3 als auch an Histon H4 wurde am *PGK1*-Promotor ebenfalls beobachtet und ist daher nicht spezifisch für den *PHO8*-Promotor. Zwischen dem reprimierten (*pho4*, geschlossenes Chromatin) und aktivierten (wt, remoduliertes Chromatin) Zustand des proximalen *PHO8*-Promotors und der *PHO8* 5'-Region wurde kein Unterschied in der Histon H4-Acetylierung festgestellt. Dagegen war die Histonacetylierung am distalen *PHO8*-Promotor zu einem ähnlichen Grad vermindert wie die Histon H3-

Acetylierung in diesem Bereich. Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, dass die offene Chromatinstruktur des aktivierten *PHO8*-Promotors nicht mit einer Hyperacetylierung von Promotorhistonen korreliert.

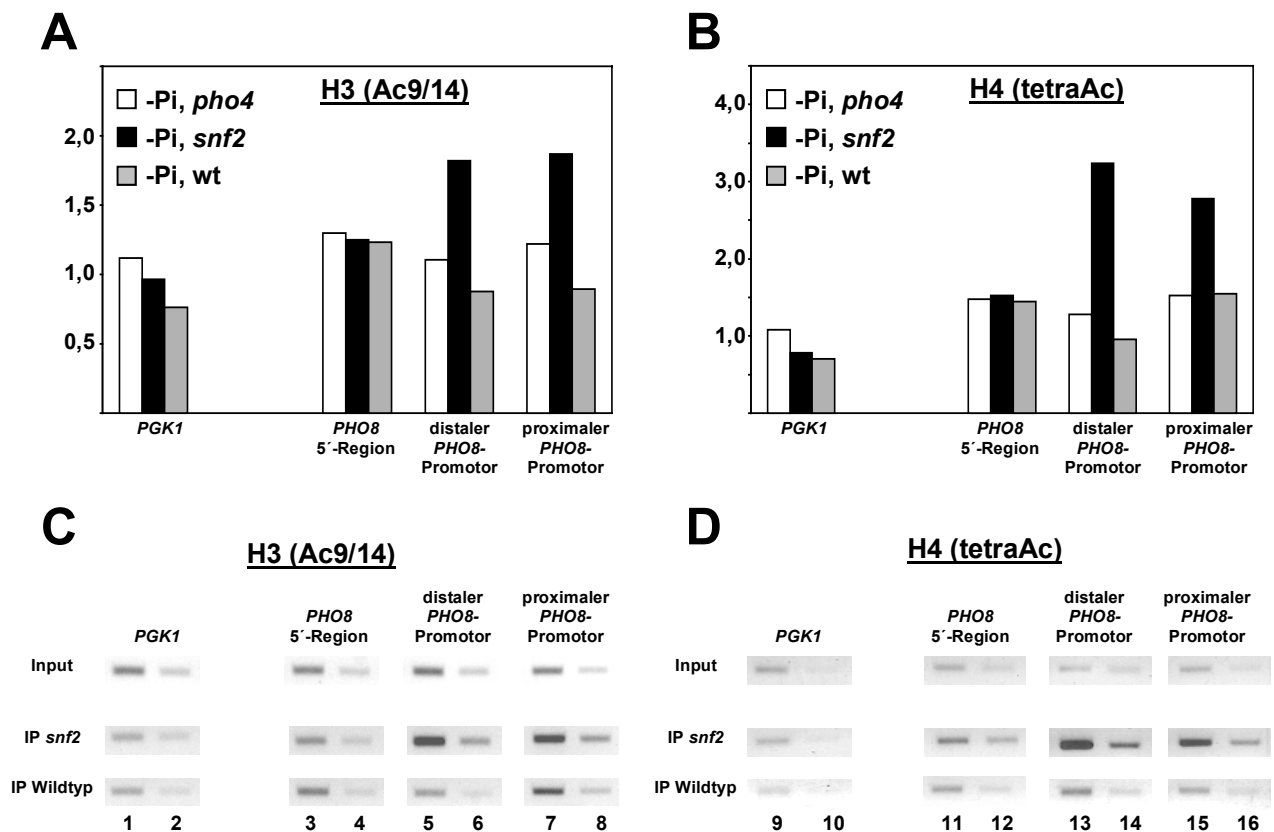
### **1.2. Phosphathunger-Induktion in Abwesenheit von Snf2 blockiert den *PHO8*-Promotor in einem hyperacetylierten, nicht-remodulierten Zustand**

Da das Chromatin des *PHO8*-Promotors im geschlossenen und im offenen Zustand denselben Acetylierungsgrad aufweist, erscheint es möglich, dass Histonacetylierung kein zentraler Bestandteil des Remodulierungs-Prozesses sein könnte. Andererseits findet am induzierten *PHO8*-Promotor in Abwesenheit von Gcn5 HAT-Aktivität so gut wie keine Chromatinremodulierung statt (Gregory et al., 1999). Das wiederum weist stark darauf hin, dass Gcn5 eine wichtige Funktion im Aktivierungsprozess einnimmt, und zwar bevor der Promotor vollständig geöffnet ist. Es ist sogar denkbar, dass der Prozess der Chromatinremodulierung selbst einen möglichen Hyperacetylierungszustand wieder umkehren könnte. Beispielsweise könnte der Swi/Snf- oder der Polymerase II-Komplex mit einer Histondeacetylaseaktivität assoziiert sein. Daher wurden Bedingungen gesucht, unter denen Pho4 bereits am Promotor gebunden ist und Cofaktoren rekrutieren kann, aber der Promotor noch geschlossen ist. Solche Bedingungen existieren in einem durch Phosphathunger induzierten *snf2*-Stamm. Wie in einem anderen Zusammenhang gezeigt wurde, ist Pho4 unter diesen Bedingungen an das für die Aktivierung essentielle UASp2-Element des *PHO8*-Promotors gebunden, aber der darauffolgende Remodulierungsprozess ist durch das Fehlen eines funktionalen Swi/Snf-Komplexes blockiert (Gregory et al., 1999). Daher sollte es auf diese Weise möglich sein, Histonacetylierung am induzierten Promotor zu untersuchen, ohne dass der nachfolgende Remodulierungsprozess möglicherweise Einfluss auf den Acetylierungsgrad nehmen kann.

In der Tat wurde in einem induzierten *snf2*-Stamm am *PHO8*-Promotor ein drastisch erhöhter Acetylierungsgrad an den Histonen H4 beobachtet (Abb. 9B). Die distale Promotorregion weist einen mehr als dreifach erhöhten und die proximale Promotorregion einen zweifach erhöhten Acetylierungsgrad auf, verglichen mit dem Promotor im nicht-induzierten oder vollständig remodulierten Zustand. Die Rohdaten der DNA-Quantifizierung immunopräzipitierter Chromatin-Fragmente des *snf2*- bzw. Wildtyp-Stammes durch quantitative PCR sind in den Abbildungen 9C und 9D dargestellt. Besonders hervorzuheben ist der drastische Anstieg des Histon H4-



Acetylierungsgrades am *PHO8*-Promotor verglichen mit dem der benachbarten 5'-Region, der nur im *snf2*-Stamm auftritt (Abbildung 9D, man vergleiche IP *snf2* in den Spuren 13 und 15 mit der Spur 11). In allen Fällen wurde jeweils immunopräzipitierte DNA mit Input-DNA verglichen (in Abb. 9C und 9D ist lediglich Input-DNA des *snf2*-Stammes gezeigt). Alle Primer-Paare ergaben nahezu identische Mengen PCR-Produkt mit Input-DNA (man vergleiche jeweils Spuren 1, 3, 5 und 7 in Abb. 9C, bzw. Spuren 9, 11, 13 und 15 in Abb. 9D).



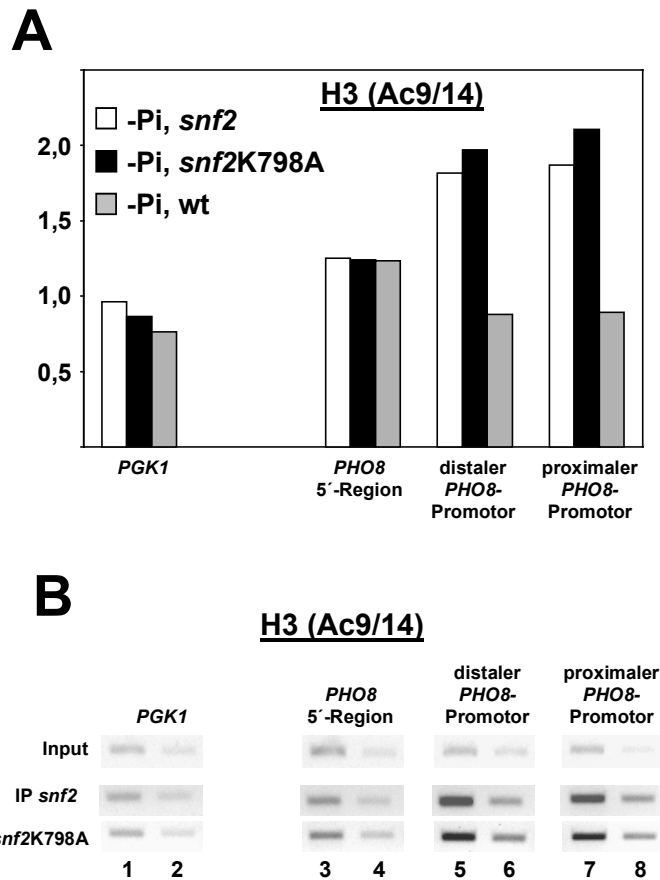
**Abbildung 9: In einem durch Phosphathunger induzierten *snf2*-Stamm ist der *PHO8*-Promotor stark hyperacetyliert.** (A) Zellen der Stämme CY338 (*pho4*), CY407 (*snf2*) und CY337 (Wildtyp) wurden für 16 h in phosphatfreiem Medium induziert und anschließend einer ChIP-Analyse unterzogen. An *PHO8* und am *PGK1*-Promotor wurde der Acetylierungsgrad der Histone H3 (A) und H4 (B) bestimmt. In (C) und (D) sind die Rohdaten der DNA-Quantifizierung durch quantitative PCR dargestellt. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ein Chromatin-Aliquot eines *snf2*-Stammes wurde vor der Immunopräzipitation entnommen, aufgereinigt und durch PCR quantifiziert (Input). Für die Analyse des *snf2*-Stammes (IP *snf2*) und des Wildtyp-Stammes (IP Wildtyp) wurden Antikörper gegen diacetyliertes H3 (C) und tetraacetyliertes H4 (D) verwendet. Alle Kombinationen von IP-DNA oder Input-DNA mit den einzelnen Primerpaaren wurden mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen an eingesetzter DNA durchgeführt (jeweils 2,5-fache Verdünnung in allen mit einer geraden Zahl nummerierten Spuren). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Menge an PCR-Produkt von der eingesetzten DNA-Menge abhängt.

Das qualitativ gleiche Ergebnis wie für Histon H4 wurde in einer Analyse der Histon H3-Acetylierung erhalten (Abb. 9A). In Abwesenheit von Snf2 sind die Histone H3 im induzierten,

nicht-remodulierten *PHO8*-Promotor doppelt so stark acetyliert, wie die im Chromatin des remodulierten Wildtyp-Stammes. Diese Ergebnisse zeigen, dass der *PHO8*-Promotor in einem durch Phosphathunger induzierten *snf2*-Stamm in einem Aktivierungszustand fixiert werden kann, in dem das Promotorchromatin stark hyperacetyliert ist.

### **1.3. In Zellen mit einem strukturell intakten Swi/Snf-Komplex ohne ATPase-Aktivität ist der induzierte *PHO8*-Promotor ebenfalls hyperacetyliert**

In dem vorangegangenen Experiment wurde ein Stamm verwendet, in dem das gesamte *SNF2*-Gen zerstört ist. Dieser Stamm exprimiert keinerlei Snf2-Protein. In diesen Zellen kann der Swi/Snf-Komplex nicht assembliert werden, da das Vorhandensein von Snf2 eine unbedingte Voraussetzung für die strukturelle Integrität dieses Komplexes ist (Richmond and Peterson, 1996). Es wäre aber denkbar, dass in Wildtyp-Zellen SAGA und Swi/Snf bei der Aktivierung um die Bindung an Pho4 konkurrieren. In diesem Szenario könnte bei vollständiger Abwesenheit von Swi/Snf der SAGA-Komplex möglicherweise wesentlich effizienter von Pho4 an den *PHO8*-Promotor rekrutiert werden, was wiederum in der beobachteten Hyperacetylierung resultieren könnte. Diese Situation würde aber nicht den Vorgängen bei der *PHO8*-Aktivierung in einem Wildtyp-Stamm entsprechen, in dem beide Komplexe intakt sind und von Pho4 rekrutiert werden könnten. Daher wurde die Histonacetylierung am induzierten *PHO8*-Promotor in einem Stamm untersucht, bei dem im Snf2-Protein der Lysin-Rest an Position 798 durch einen Alanin-Rest ersetzt ist. Dieses Snf2-Derivat kann ATP weder binden noch hydrolysieren, wodurch die Chromatinremodulierungs-Aktivität des Swi/Snf-Komplexes vollständig aufgehoben ist (Laurent et al., 1993; Côté et al., 1994). In Bezug auf die Fähigkeit, das Promotorchromatin von *PHO8* zu öffnen, verhält sich ein Stamm mit dieser Punktmutation wie einer mit einer *snf2* Null-Mutation. In beiden Fällen ist die Chromatinremodulierung nach dem Schritt der Pho4-Bindung blockiert (Gregory et al., 1999).



**Abbildung 10: Hyperacetylierung des *PHO8*-Promotors in einem Stamm mit einem strukturell intakten Swi/Snf-Komplex ohne ATPase-Aktivität.** (A) Stamm CY397 (*snf2K798A*) trägt eine Punktmutation in *Snf2*, wodurch die ATPase-Aktivität von Swi/Snf aufgehoben wird. Zellen wurden durch Phosphathunger induziert, und anschließend wurde der Acetylierungsgrad von Histon H3 durch ChIP-Analyse bestimmt. Der Grad der Histonacetylierung am *PHO8*-Promotor und am *PGK1*-Promotor wurde mit dem der Stämme CY407 (*snf2*) und CY337 (wt) verglichen. (B) Rohdaten der Quantifizierung der IP-DNA der Stämme CY397 und CY407.

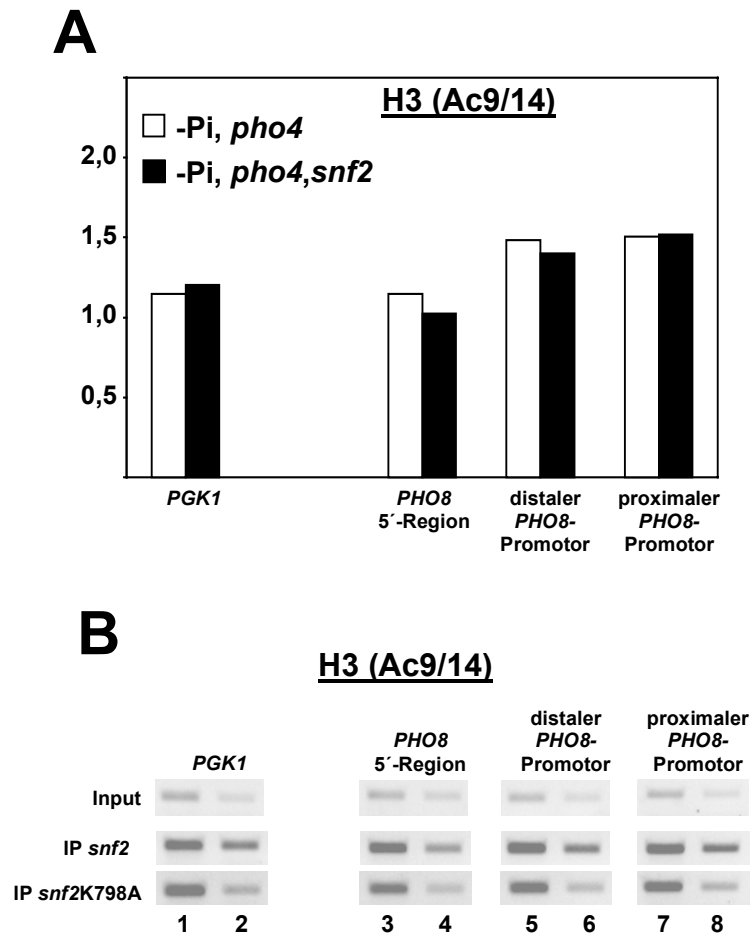
Auch in einem Stamm, der die *snf2K798A*-Mutation trägt, sind die Histone H3 im induzierten *PHO8*-Promotor deutlich stärker acetyliert, als in einem Wildtyp-Stamm unter den gleichen Bedingungen (Abb. 10A). Tatsächlich konnte an keiner der untersuchten Chromatin-Regionen ein Unterschied im Acetylierungsgrad zwischen der *snf2*-Null- und der Punkt-Mutation festgestellt werden. Das wird besonders deutlich in einem direkten Vergleich immunopräzipitierter DNA eines *snf2*-Stammes und eines *snf2K798A*-Stammes (Abb. 10B, man vergleiche IP *snf2* und IP *snf2K798A* in Spuren 1, 3, 5 und 7). Der Histon H4-Acetylierungsgrad ist auch am proximalen *PHO8*-Promotor in beiden Stämmen nicht unterscheidbar. Nur in der distalen Promotorregion ist die Acetylierung von Histon H4 in einem *snf2K798A*-Stamm etwas niedriger als in einem *snf2*-Stamm. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die vollständige Abwesenheit eines strukturell intakten Swi/Snf-Komplexes nicht die Ursache für die

beobachtete Hyperacetylierung am induzierten *PHO8*-Promotor ist. Vielmehr scheint das Blockieren des Remodulierungs-Prozesses den Promotor in einem Zwischenstadium der Aktivierung zu fixieren, in dem das Promotorchromatin stark hyperacetyliert ist.

#### **1.4. Rekrutierung von Pho4 ist eine unbedingte Voraussetzung für die Erzeugung hyperacetylierten *PHO8*-Promotorchromatins in Abwesenheit von Swi/Snf**

Durch ein weiteres Experiment sollte sichergestellt werden, dass die in einem induzierten *snf2*-Stamm beobachtete Hyperacetylierung nicht Teil einer unspezifischen Reaktion der Zelle auf die Abwesenheit des Swi/Snf-Komplexes ist, die sich zufällig genau am *PHO8*-Promotor manifestiert. Um zu zeigen, dass der erhöhte Grad der Histonacetylierung Teil einer spezifischen Antwort der Zelle auf das Phosphathungersignal ist, sollte die Abhängigkeit des Hyperacetylierungs-Signals von Pho4 demonstriert werden. Daher wurden zwei *pho4*-Stämme, von denen der eine einen intakten Swi/Snf-Komplex besitzt (*pho4*) und der andere nicht (*pho4,snf2*), durch Phosphathungern induziert und so auf Aktivator-unabhängige Effekte auf die Histonacetylierung am *PHO8*-Promotor untersucht.

Das Ergebnis dieses Experiments zeigt deutlich, dass ein *pho4*- und ein *pho4,snf2*-Stamm weder am *PHO8*-Promotor, noch am *PGK1*-Promotor signifikante Unterschiede im Histon H3-Acetylierungsgrad aufweisen (Abb. 11A und 11B). Wenn den Zellen sowohl Pho4 als auch der Swi/Snf-Komplex fehlt, ist insbesondere der Acetylierungsgrad von Histon H3 nicht höher, als derjenige der benachbarten 5'-Region (man vergleiche Abb. 10B, IP *snf2* und *snf2K798A*, Spuren 3 und 5 mit Abb. 11B, IP *pho4,snf2*, Spuren 3 und 5). Dieses Ergebnis zeigt, dass Pho4-Bindung am *PHO8*-Promotor eine unbedingte Voraussetzung für die Hyperacetylierung des Promotors ist.

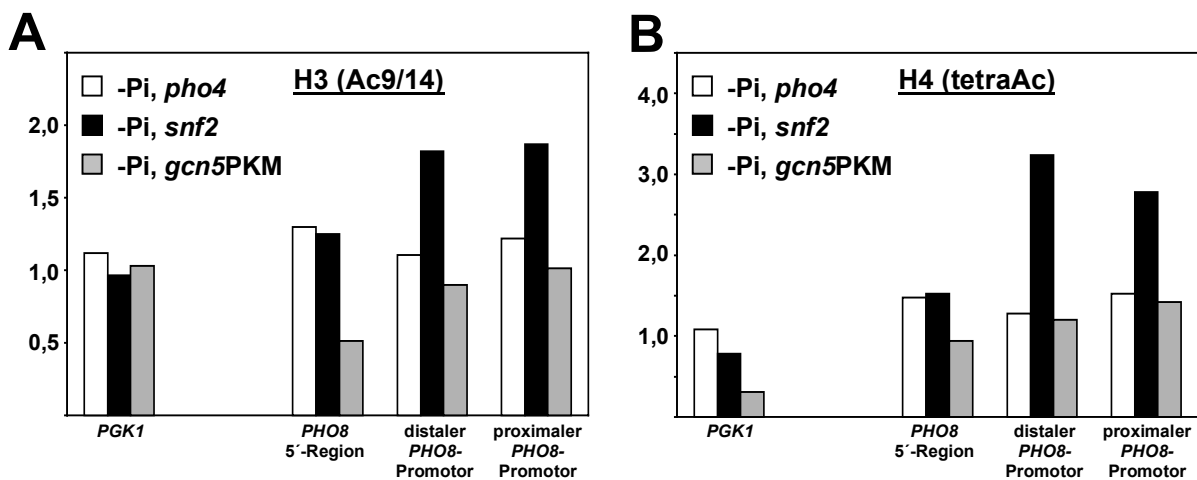


**Abbildung 11: Die Hyperacetylierung des *PHO8*-Promotors in Abwesenheit von *Snf2* ist strikt von *Pho4* abhängig.** (A) In den Stämmen CY338 (*pho4*) und CY408 (*pho4, snf2*) wurde die Histonacetylierung durch ChIP-Analyse bestimmt. (B) Quantifizierung von IP-DNA durch quantitative PCR gefolgt von Ethidiumbromid-Gelelektrophorese.

### 1.5. Gcn5 acetyliert die Histone des *PHO8*-Promotors

Als nächstes wurde untersucht, ob die HAT-Aktivität von Gcn5 zur Erzeugung des hyperacetylierten Zustands am *PHO8*-Promotor benötigt wird. Um diese Hypothese direkt zu testen, wäre das am besten geeignete Experiment, den Acetylierungsgrad des *PHO8*-Promotors in einem induzierten *snf2*-Stamm in Gegenwart und Abwesenheit von Gcn5 HAT-Aktivität zu vergleichen. Dazu müsste allerdings ein *snf2, gcn5*-Stamm verwendet werden, der in dem hier verwendeten CY-Stammhintergrund nicht lebensfähig ist (C. Peterson, persönliche Mitteilung). Anstelle dessen wurde ein Gcn5-Derivat verwendet, das aus einer „Alanin-scan“-Mutagenese hervorgegangen war, bei der jeweils drei benachbarte Aminosäuren in Gcn5 durch Alanin-Reste ersetzt worden waren (Wang et al., 1998). Durch die hier verwendete *gcn5PKM*-Mutation wird die HAT-Aktivität von

Gcn5 aufgehoben. Die Überlegung für dieses Experiment war, dass durch die PKM-Mutation die Remodulierung des *PHO8*-Promotors ebenfalls in einem Aktivierungszustand nach Bindung von Pho4 blockiert ist (Gregory et al., 1999) und in dieser Hinsicht dem blockierten Aktivierungszustand in einem *snf2*-Stamm gleich. Sollte daher eine weitere Histonacetyltransferase zusätzlich zu Gcn5 an den *PHO8*-Promotor rekrutiert werden, würde man erwarten, Hyperacetylierung des *PHO8*-Promotors auch in dem *gcn5*PKM-Stamm zu finden.

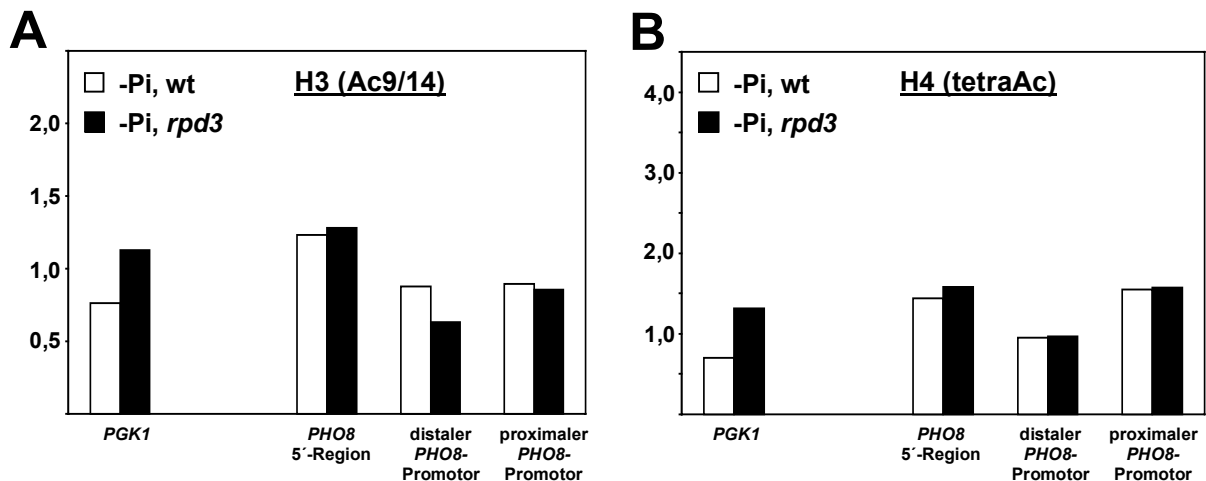


**Abbildung 12: Einfluss von Gcn5 auf die Acetylierung des *PHO8*-Promotorchromatins.** (A) Der Acetylierungsgrad von Histon H3 (A) und Histon H4 (B) wurden in einem Stamm mit der Gcn5-Mutation PKM analysiert und mit der Histonacetylierung der Stämme CY407 (*snf2*) und CY337 (wt) verglichen.

Die starke Hyperacetylierung, die charakteristisch für den in der Öffnung blockierten *PHO8*-Promotor in Abwesenheit von Snf2 ist (Abb. 9), konnte in dem induzierten *gcn5*PKM-Stamm nicht beobachtet werden (Abb. 12A und 12B, graue Säulen). Über den gesamten *PHO8*-Promotorbereich wie auch an der benachbarten 5'-Region war der Grad der Histonacetylierung jeweils gleich hoch oder sogar niedriger, als in einem *pho4*-Stamm (Abb. 12A und 12B, weiße Säulen). Die Acetylierung von Histon H3 am *PGK1*-Promotor ist in einem Wildtyp-Stamm und einem *gcn5*PKM-Stamm gleich stark (Abb. 12A), wogegen die Acetylierung von Histon H4 in Abwesenheit von Gcn5 HAT-Aktivität vergleichsweise niedriger ist (Abb. 12B). Abschließend kann aufgrund dieser Ergebnisse festgestellt werden, dass die Hyperacetylierung des *PHO8*-Promotors vollständig von Gcn5 abhängig ist.

### 1.6. Rpd3 scheint nicht an der Wiederherstellung des basalen Acetylierungsgrades des remodulierten *PHO8*-Promotors beteiligt zu sein

Die Hyperacetylierung des *PHO8*-Promotorchromatins scheint ein transienter Zustand zu sein, da am vollständig geöffneten Promotor derselbe Acetylierungsgrad gemessen wurde wie am geschlossenen Promotor (Abb. 8B und 8C). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Histondeacetylase Rpd3 eine Rolle bei der Wiederherstellung des basalen Acetylierungsgrades des remodulierten *PHO8*-Promotors spielt. Der Histonacetylierungsgrad des *PHO8*-Promotors wurde in einem *rpd3*-Stamm gemessen und mit dem eines Wildtyp-Stammes verglichen. In beiden Stämmen ist das Chromatin des *PHO8*-Promotors unter induzierenden Bedingungen vollständig remoduliert.

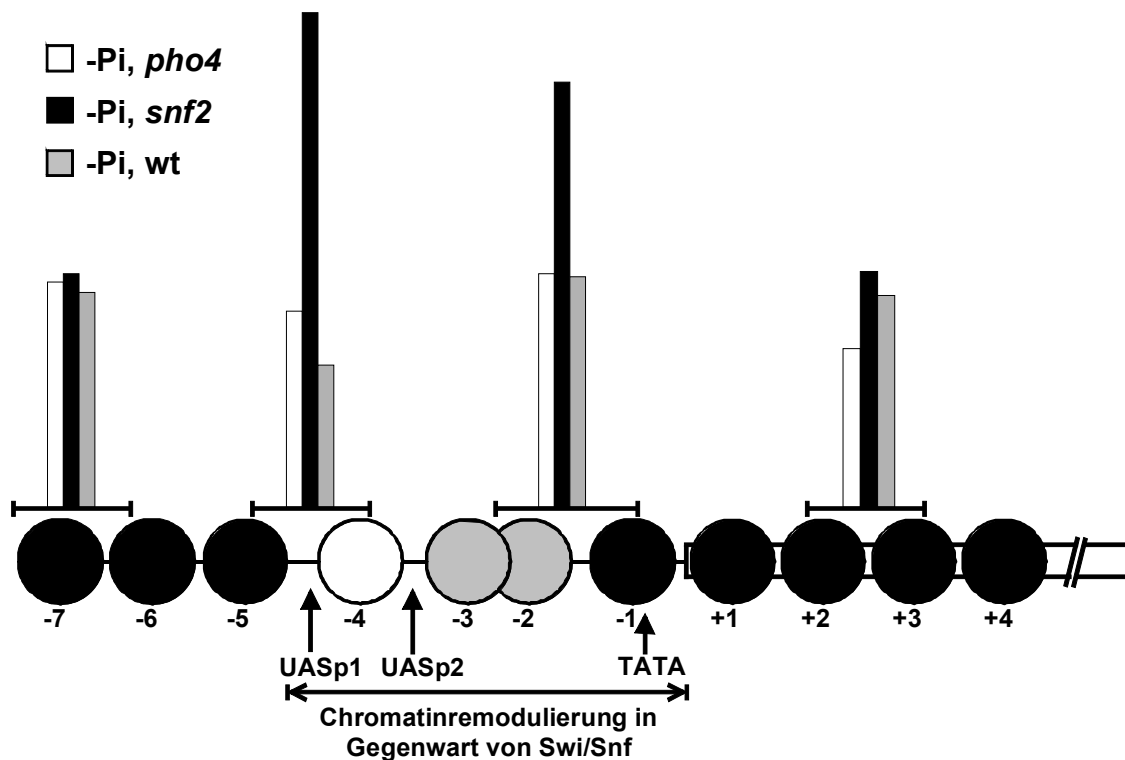


**Abbildung 13: Einfluss von Rpd3 auf die Acetylierung des *PHO8*-Promotorchromatins.** (A) Der Acetylierungsgrad von Histon H3 (A) und Histon H4 (B) am *PHO8*-Promotor wurde im Stamm CY637 (*rpd3*) analysiert und mit der Histonacetylierung des Wildtyp-Stammes CY337 verglichen.

In Abbildung 13 ist die Histonacetylierung in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Rpd3 dargestellt. Zwar ist am *PGK1*-Promotor die Acetylierung der Histone H3 und H4 im *rpd3*-Stamm leicht erhöht, am *PHO8*-Promotor ist jedoch kein Unterschied zu einem Wildtyp-Stamm feststellbar. Wichtig ist vor allem die Beobachtung, dass der *PHO8*-Promotor in Abwesenheit von Rpd3 nicht stärker acetyliert ist, als im Wildtyp-Stamm. Ein solches Ergebnis wäre aber zu erwarten gewesen, wenn Rpd3 dazu benötigt wird, das Promotorchromatin vom hyperacetylierten in den basal acetylierten Zustand zu überführen. Es kann daher gefolgert werden, dass Rpd3 zumindest nicht alleine für die Wiederherstellung der basalen Acetylierung verantwortlich ist, wenn die Öffnung des *PHO8*-Promotors vollständig ablaufen kann.

### 1.7. Spezifische Hyperacetylierung der Histone des *PHO8*-Promotors

Eine wichtige Frage in Bezug auf die Rolle der Histonacetylierung bei der Chromatinöffnung ist, welche Nukleosomen tatsächlich das Ziel der HAT-Aktivität von Gcn5 am *PHO8*-Promotor sind. Daher wurde der hyperacetylierte Zustand am induzierten *PHO8*-Promotor erneut in einem *snf2*-Stamm analysiert und mit Primerpaaren flussaufwärts und flussabwärts die Grenzen des hyperacetylierten Bereichs bestimmt.



**Abbildung 14: Spezifische Histonhyperacetylierung des *PHO8*-Promotors.** Die nukleosomale Struktur des reprimierten *PHO8*-Promotors ist schematisch dargestellt (vergleiche Abb. 1A); Der Bereich der Chromatinremodulierung in einem induzierten Wildtyp-Stamm ist unten angezeigt. Die Säulen über dem Nukleosomenschema zeigen den jeweiligen Grad der Histon H4-Acetylierung.

Wie bereits gezeigt, sind unter diesen Bedingungen die Histone H4 im distalen und proximalen Teil des *PHO8*-Promotors deutlich hyperacetyliert. Diese Hyperacetylierung dehnt sich nicht auf die unmittelbar angrenzende 5'-Region aus, obwohl für die Analyse dieser Region und des distalen *PHO8*-Promotors Primerpaare verwendet wurden, die benachbarte Nukleosomen analysieren (Abb. 8A und 14). Die Grenze des hyperacetylierten Bereichs in Richtung der codierenden Region



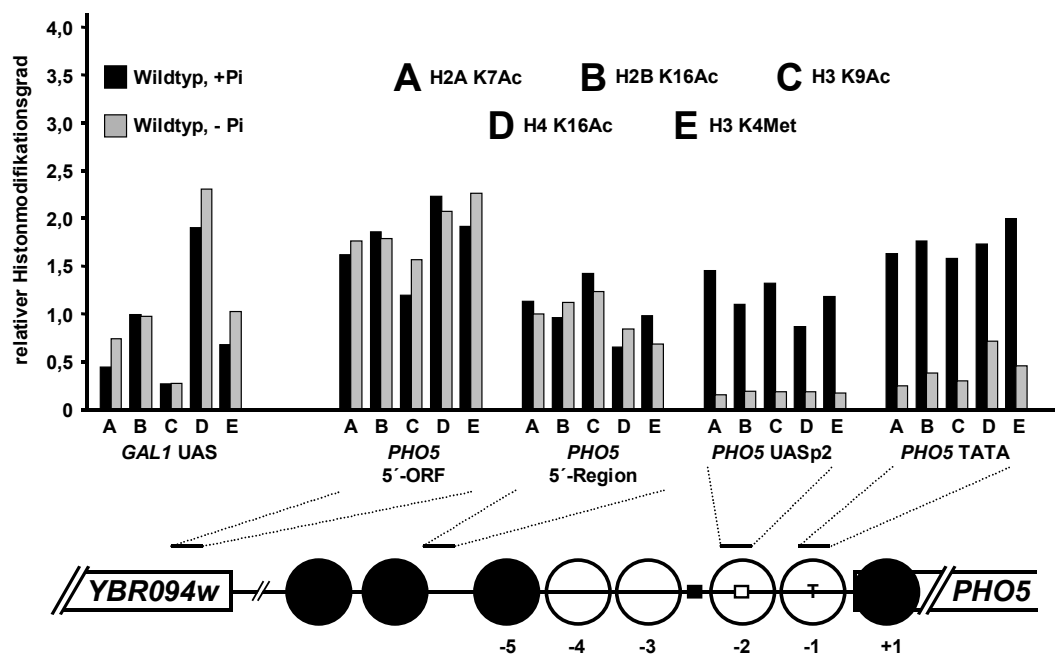
des *PHO8*-Gens wurde mit einem Primerpaar bestimmt, das vom proximalen Teil des *PHO8*-Promotors weniger als zwei Nukleosomen entfernt liegt. Wiederum wurde eine scharfe Grenze bei der Acetylierung beobachtet: Während der induzierte *PHO8*-Promotor in einem *snf2*-Stamm im proximalen Teil mehr als doppelt so stark acetyliert ist wie in einem Wildtyp- bzw. *pho4*-Stamm, ist in der codierenden Region unter denselben Bedingungen keine Hyperacetylierung nachweisbar. Die Tatsache, dass nur das Chromatin des *PHO8*-Promotors selbst unter bestimmten Bedingungen hyperacetyliert ist, lässt darauf schließen, dass nur diejenigen Nukleosomen bei der Aktivierung hyperacetyliert werden, die schließlich auch remodeliert werden.

## **2. Histonacetylierung am *PHO5*-Promotor**

### **2.1. Histonmodifikationen im Chromatin des remodelierten *PHO5*-Promotors**

Frühere Studien haben gezeigt, dass die HAT-Aktivität von Gcn5 auch die Öffnung des *PHO5*-Promotors beeinflusst. Zum einen liegt das Chromatin des *PHO5*-Promotors in einem *gcn5,pho80*-Stamm in phosphathaltigem Medium in einem Zustand vor, der weder dem Array positionierter Nukleosomen des reprimierten Promotors noch dem vollständig remodelierten Promotorchromatin entspricht (Gregory et al., 1998). Vielmehr sind die Nukleosomen auf Zufallspositionen über die ganze Promotorregion verteilt, was sich darin widerspiegelt, dass der gesamte Promotor unzugänglich für Nukleasen wird. Zum anderen erhöht Gcn5 durch seine HAT-Aktivität die Geschwindigkeit der Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors (Barbaric et al., 2001). Zwei Befunde weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass der Wirkungsort von Gcn5 das Promotorchromatin selbst ist: Erstens läuft die durch Phosphatmangel induzierte Signaltransduktion, die den Kernimport der dephosphorylierten Form von Pho4 bewirkt, in einem *gcn5*-Stamm mit normaler Geschwindigkeit ab. Zweitens ist die Chromatinöffnung auch verlangsamt, wenn der *PHO5*-Promotor durch Gal4 statt durch Pho4 aktiviert wird, wobei gleichzeitig die Aktivierung des ebenfalls von Gal4 aktivierten *GALI*-Promotors mit normaler Geschwindigkeit abläuft (Barbaric et al., 2001). Es deutet also einiges darauf hin, dass Histonacetylierung auch eine zentrale Rolle bei der Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors spielen könnte. Um diese Hypothese experimentell zu testen, wurde der Acetylierungsgrad der *PHO5*-Promotorhistone bei der Chromatinöffnung mithilfe der ChIP-Technik bestimmt.

In einem Wildtyp-Stamm wurde der Grad der Histonacetylierung des remodulierten *PHO5*-Promotorchromatins nach 4 h Induktion in phosphatfreiem Medium bestimmt (Wildtyp, -Pi in Abb. 15) und mit dem Acetylierungsgrad des geschlossenen Promotorchromatins vor der Induktion verglichen (Wildtyp, +Pi in Abb. 15). Nach 4 h Induktion durch Phosphathunger ist das *PHO5*-Promotorchromatin nahezu vollständig geöffnet, und der Promotor ist transkriptionell aktiv (Barbaric et al., 2001). Zur Bestimmung der Histonacetylierung durch SAGA wurden Antikörper gegen an Lysin 9 acetyliertes Histon H3 und an Lysin 16 acetyliertes Histon H2B verwendet. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Lysine *in vivo* von Gcn5 acetyliert werden (Suka et al., 2001). Der Acetylierungsgrad des *PHO5*-Promotors wurde an Nucleosom -2, das die für die Öffnung essentielle Pho4-Bindungsstelle UASp2 enthält, und an Nucleosom -1, welches das *PHO5* TATA-Element enthält, analysiert (Abb. 15). Als Kontrolle wurden der *GAL1*-Promotor und zwei Chromatinregionen im 5'-Bereich des *PHO5*-Promotors in die Analyse mit einbezogen.



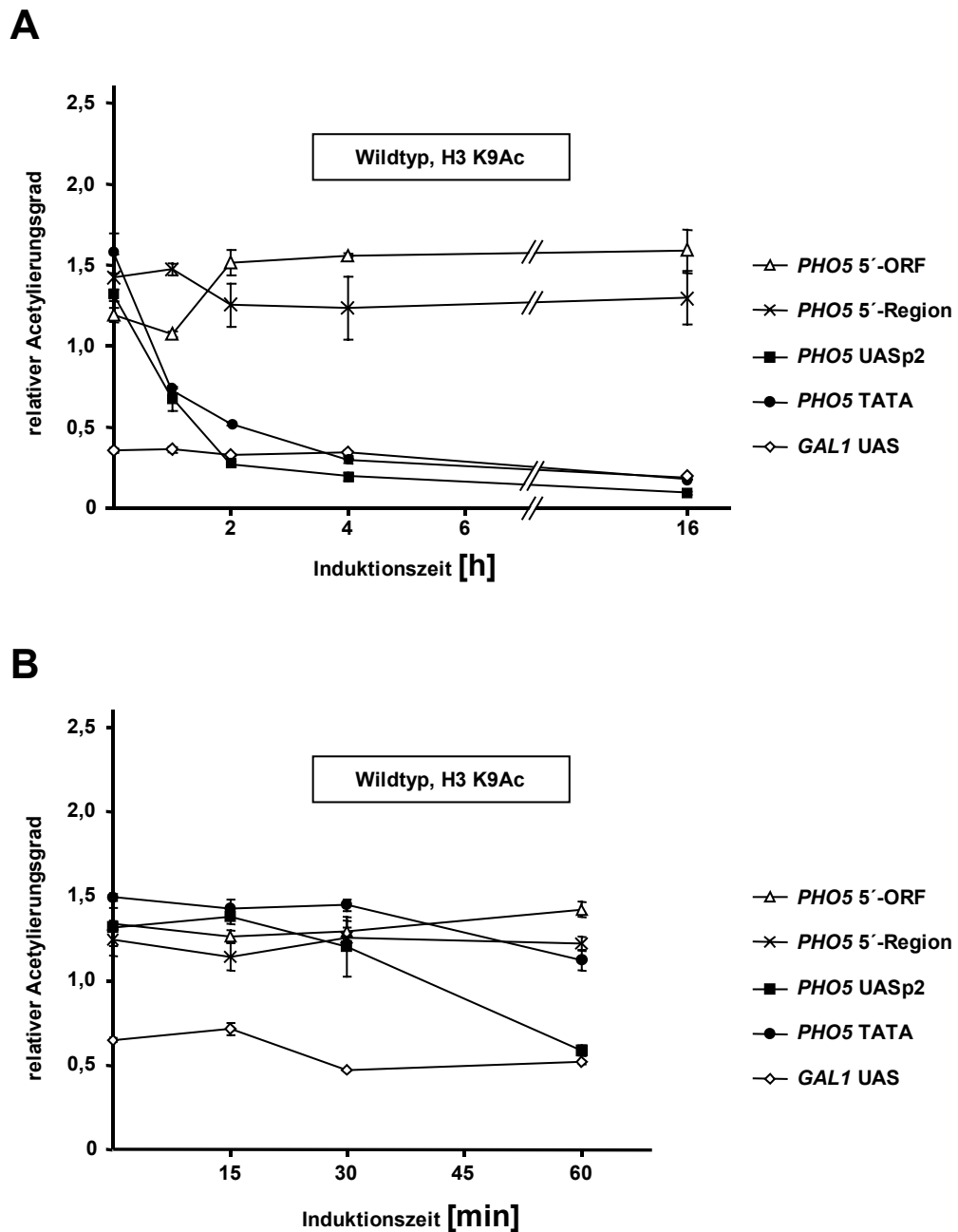
**Abbildung 15: Histonmodifikationen am *PHO5*-Promotor nach Chromatinöffnung und transkriptioneller Aktivierung.** Die Positionen der PCR-Fragmente, die für die ChIP-Analyse des *PHO5*-Promotors verwendet wurden, sind anhand der nukleosomalen Struktur des reprimierten *PHO5*-Promotors dargestellt. Im aktiven Zustand nicht remodulierte Nucleosomen sind schwarz, remodulierte Nucleosomen sind weiß dargestellt (Almer et al., 1986). Regulatorische Sequenzabschnitte (UASp1: schwarzes Rechteck; UASp2: weißes Rechteck; TATA-Element: T) sind ebenfalls eingezeichnet. Der Hefestamm 8136 (Wildtyp) wurde 4 h lang in phosphatfreiem Medium induziert, und anschließend wurde das Chromatin durch Formaldehyd-Behandlung keuzvernetzt. Chromatinfragmente wurden mit Antikörpern gegen kovalent modifizierte Histonschwänze präzipitiert (mit A-E gekennzeichnet). Die Menge immunopräzipitiertes DNA wurde mit Taqman<sup>®</sup>-PCR quantifiziert und gegen die jeweilige Input-DNA normalisiert. Die schwarzen Balken stellen die ChIP-Signale des reprimierten Promotors dar, und die grauen Balken stellen die ChIP-Signale nach 4-stündiger Induktion dar. Die Standardabweichung betrug in allen Fällen weniger als 15 Prozent.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 15 gezeigt. Das aktivierte, geöffnete Chromatin, gemessen an Nukleosom -2, weist ein sehr viel schwächeres ChIP-Signal für die Acetylierung von Histon H2B und Histon H3 auf als das nicht-remodulierte Chromatin des inaktiven Promotors. Ein beinahe gleich starker Rückgang des ChIP-Signals wurde am TATA-Nukleosom gemessen (Abb. 15, man vergleiche +Pi und -Pi in den Säulenpaaren B und C an *PHO5* UASp2 und *PHO5* TATA). Am *GALI*-Promotor und den 5' vom *PHO5*-Promotor gelegenen Regionen wurde keine Veränderung des Acetylierungsgrades vor bzw. nach Induktion durch Phosphatmangel beobachtet.

Dieser Rückgang des Acetylierungssignals für Histon H2B und H3 am remodulierten Promotor steht im Widerspruch zu der bereits demonstrierten Rolle der Gcn5 HAT-Aktivität am *PHO5*-Promotor. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein möglicherweise hyperacetylierter Zustand des Promotors nur sehr kurzlebig sein könnte und/oder nur in einem bestimmten Stadium des Öffnungsprozesses nachgewiesen werden könnte. Daher wurde im nächsten Experiment die Acetylierung von Histon H3 an Lysin 9 nach 1 und 2 h Induktion bestimmt, also zu frühen Stadien der Chromatinöffnung. Zusätzlich wurde der Acetylierungsgrad nach 16 h Induktion analysiert, also zu einem Zeitpunkt, in dem die Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert sind, und das Promotorchromatin maximal remoduliert ist.

Der Verlauf des Histon H3-Acetylierungsgrades ist in Abbildung 16A dargestellt. Das Acetylierungssignal an den Nukleosomen -2 und -1 verliert bereits nach 1 h Inkubationszeit ungefähr 50% an Intensität. Nach 4 h erreicht das Signal beinahe den niedrigsten Wert, der auch nach 16 h Inkubationszeit nicht signifikant weiter absinkt (Abb. 16A, *PHO5* UASp2 und *PHO5* TATA). Der Rückgang der Histonacetylierung verläuft mit einer Kinetik, die sehr dem Verlauf der Chromatinöffnung ähnelt. In einem Wildtyp-Stamm ist der *PHO5*-Promotor nach 1 Stunde zu ungefähr 50% und nach 4 h beinahe vollständig remoduliert. Der Acetylierungsgrad wurde zusätzlich auch nach sehr kurzen Induktionszeiten bestimmt, d.h. nach 15 bzw. 30 min (Abb. 16B), wenn noch so gut wie keine Öffnung des Promotorchromatins feststellbar ist. Aber auch unter diesen Bedingungen wurde kein messbarer Anstieg der Histonacetylierung gefunden. Wiederum ist der Verlust der Histonacetylierung spezifisch für den *PHO5*-Promotor und tritt an keiner der Kontrollregionen auf. Es ist außerdem erwähnenswert, dass der *PHO5*-Promotor im reprimierten Zustand, sowie beide benachbarte 5'-Regionen zu einem gewissen Ausmaß Acetylierung an H3K9 aufweisen. Dagegen ist am *GALI*-Promotor kaum Acetylierung nachweisbar. Das ließe sich damit

erklären, dass der *GAL1*-Promotor in glucosehaltigem Medium aktiv reprimiert ist (Johnston, 1987).



**Abbildung 16: Verlauf der H3K9-Acetylierung in einem Wildtyp-Stamm nach Phosphatinduktion.** Die Acetylierung von Histon H3 an Lysin 9 wurde durch ChIP-Analyse in Verbindung mit Taqman<sup>®</sup>-PCR bestimmt. Der relative Acetylierungsgrad an *PHO5* und den Kontrollregionen wurde gegen die Induktionszeit aufgetragen. In (A) ist der Verlauf der Acetylierung über einen 16 h-Zeitraum dargestellt und in (B) die Histonacetylierung zu sehr frühen Induktionszeiten.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse können dahingehend zusammengefasst werden, dass es nicht gelungen ist, zu irgendeinem Induktionszeitpunkt einen hyperacetylierten Zustand des *PHO5*-Promotors nachzuweisen. Stattdessen scheint ein Zusammenhang zwischen dem Voranschreiten der Chromatinöffnung und der Abnahme der ChIP-Signalstärke für den Acetylierungsgrad des *PHO5*-Promotors zu bestehen.

Weiterhin war die Frage von Interesse, ob der Rückgang des ChIP-Signals für die Histonacetylierung nur an den Histonen H2B und H3 beobachtet werden kann, oder ob vielmehr ein genereller Verlust von Histonacetylierung und vielleicht sogar von anderen Histonmodifikationen bei der Chromatinöffnung Promotors stattfindet. Daher wurde zusätzlich der Acetylierungsgrad der Histone H2A und H4, sowie der Methylierungsgrad von Histon H3 untersucht. Die Analyse wurde ebenfalls vor und nach einer 4-stündigen Phosphatinduktion durchgeführt, das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Erneut wurde eine dramatische Abnahme aller untersuchten Histonmodifikationen nach der *PHO5*-Aktivierung festgestellt (Abb. 15, Säulenpaare A, D und E). Besonders der Rückgang der Histon H3-Methylierung erscheint bemerkenswert, da bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Enzym mit Histondemethylase-Aktivität bekannt ist. Dagegen ist die Deacetylierung von Histonen ein aktiver Prozess, der in Hefe von Histondeacetylasen wie Rpd3 oder Hda1 katalysiert wird (Peterson, 2002).

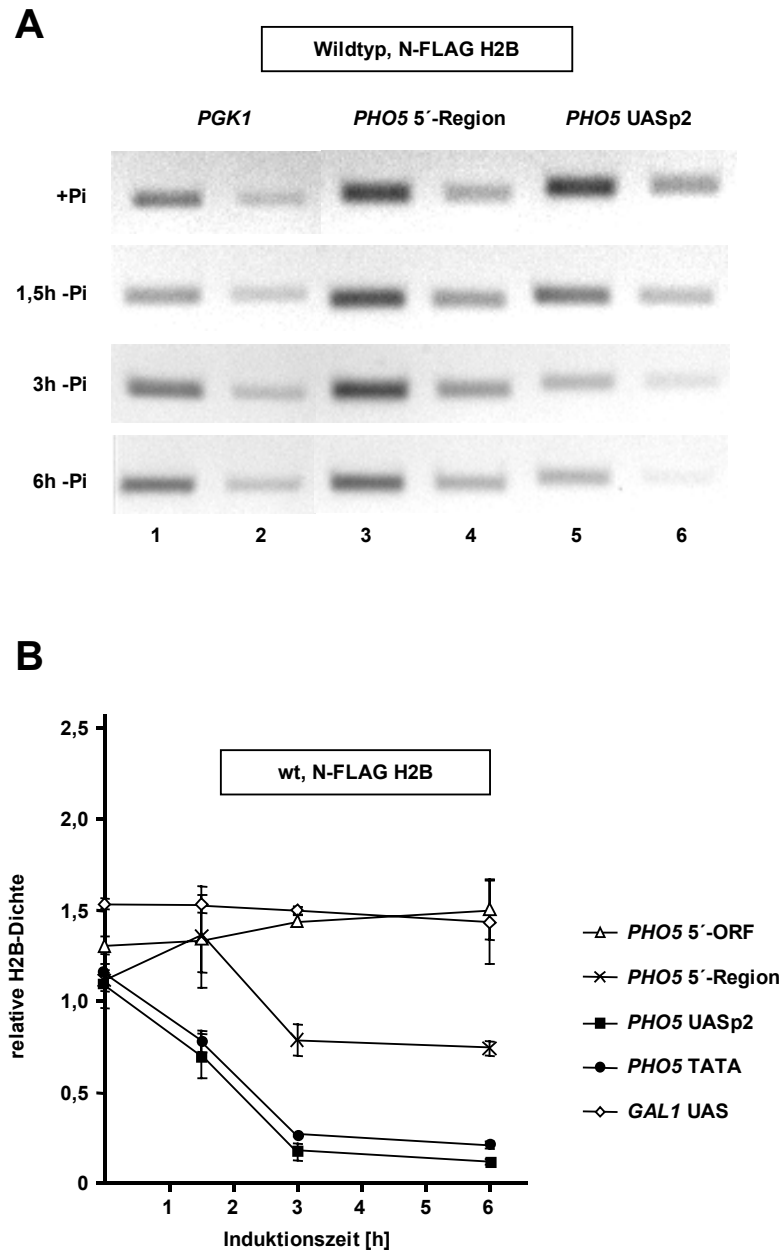
## **2.2. Der remodulierte *PHO5*-Promotor verhält sich in ChIP-Experimenten wie histonfreie DNA**

Auf den ersten Blick sprechen die zuletzt gezeigten Ergebnisse für einen generellen Verlust kovalenter Modifikationen von den N-terminalen Histonschwänzen (Abb. 15). Das könnte beispielsweise bedeuten, dass am geöffneten *PHO5*-Promotor eine Histondeacetylase und eine bisher noch nicht charakterisierte Histondemethylase-Aktivität aktiv ist. Alternativ wäre denkbar, dass bei der Promotoröffnung modifizierte Histone gegen nicht modifizierte Histone ausgetauscht werden. Ein solcher Mechanismus wurde als Möglichkeit vorgeschlagen, die Methylierung von Histonen rückgängig zu machen, ohne dass eine Histondemethylase erforderlich wäre (Bannister et al., 2002). Aber es gibt noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den gleichzeitigen Verlust aller Modifikationen. Bei der Promotoraktivierung wird der Bereich von Nukleosom -1 bis -4 vollständig für Nukleasen zugänglich. In der Tat kann in einem solchen Versuch das Promotorchromatin nicht von nackter DNA unterschieden werden (Almer et al., 1986). Es stellt sich daher

die Frage, ob die Promotorhistone im Verlauf der Remodulierung zunehmend den Kontakt zur Promotor-DNA verlieren. In diesem Fall wären sie nicht mehr mit der DNA vernetzbar, und jeder Versuch, Promotor-DNA mit Antikörpern gegen Promotorhistone zu immunopräzipitieren, würde fehlschlagen. Da dies auch für Experimente mit Antikörpern gegen modifizierte Histonschwänze gilt, würden die Ergebnisse solcher Versuche dahingehend fehlinterpretiert werden, dass bei der Aktivierung des *PHO5*-Promotors eine Abnahme der entsprechenden Histonmodifikation stattfindet.

Daher rückt die Frage in den Mittelpunkt, ob am vollständig geöffneten *PHO5*-Promotor Histone vorhanden sind oder nicht, was nach dem derzeitigen Stand der Technik nur mit der ChIP-Technik beantwortet werden kann. Um diese Frage experimentell angehen zu können, musste ein Weg gefunden werden, Histone unabhängig von deren Modifikationszustand immunopräzipitieren zu können. Zu diesem Zweck wurden zwei Strategien verfolgt. Zunächst wurde ein Stamm verwendet, in dem ein FLAG-Tag mit dem N-Terminus von Histon H2B fusioniert ist, was die Präzipitation von Histon H2B mit einem anti-FLAG-Antikörper ermöglicht. Dieses modifizierte Histon H2B ersetzt in diesem Stamm vollständig das normale Histon H2B. Da der FLAG-Tag eine vollständig artifizielle Proteinsequenz ist, sollte es keine enzymatischen Aktivitäten in der Zelle geben, die den FLAG-Tag modifizieren können, was wiederum die Bindung des FLAG-Antikörpers beeinflussen könnte. Das Vorhandensein von Histon H2B am *PHO5*-Promotor wurde während der ersten 6 h Phosphatinduktion gemessen und jeweils mit der Histon H2B-Dichte an der unmittelbar angrenzenden 5'-Region und dem *PGKI*-Promotor verglichen.

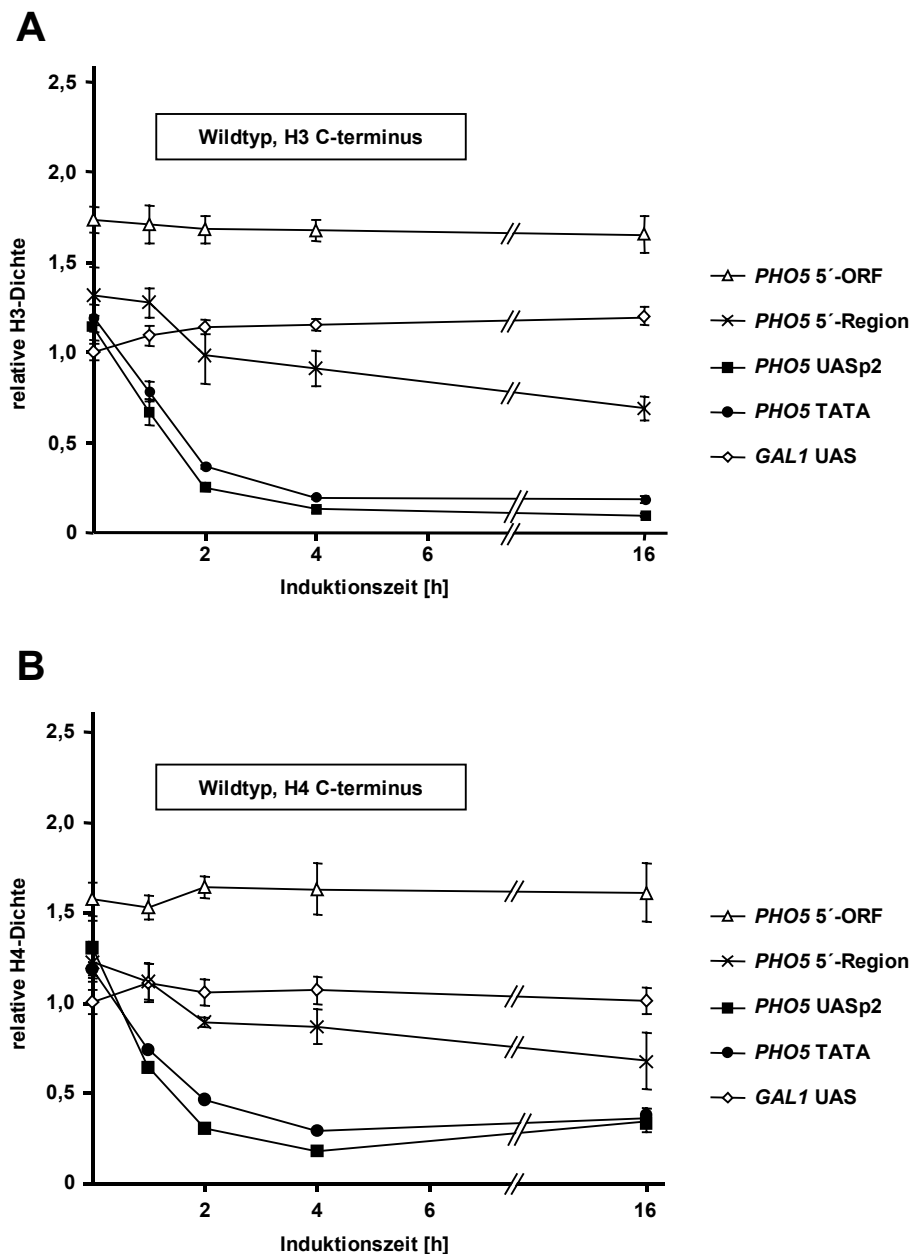
Die Histon H2B-Dichte an den Kontrollregionen weist keine Veränderungen während der Induktion in phosphatfreiem Medium auf (Abb. 17A, Spuren 1-4). Dagegen wurde ein starker Rückgang der Histon H2B-Dichte im Bereich des *PHO5*-Promotors nach 3 bzw. 6 h Induktion beobachtet (Abb. 17A, Spuren 5 und 6). Um Veränderungen der Histon H2B-Dichte genauer quantifizieren zu können, wurde das ChIP-Experiment unter den gleichen Bedingungen wiederholt, aber die DNA in den Präzipitaten wurde durch Taqman<sup>®</sup>-PCR quantifiziert. Zusätzlich wurden weitere Kontrollregionen in das Experiment mit einbezogen. In diesen Versuchen wurde spezifisch am *PHO5*-Promotor eine zehnfache Reduktion des Histon H2B-Signals nach 6 h Phosphat-Induktion festgestellt (Abb. 17B). Damit lag der erste Hinweis vor, dass am *PHO5*-Promotor bei der Aktivierung ein dramatischer Verlust von Promotorhistonen stattfinden könnte.



**Abbildung 17: Dramatische Abnahme der Histon H2B-Dichte bei der Öffnung des *PHO5*-Promotors.** (A) Der Stamm YZS276 (Flag-H2B) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion durch Phosphatmangelbedingungen mit der ChIP-Technik analysiert. Die Histon H2B-Dichte am *PHO5*- und am *PGK1*-Promotor wurde durch Immunopräzipitation mit einem anti-Flag-Antikörper gemessen. Bei der anschließenden PCR-Quantifizierung wurden alle Kombinationen von IP-DNA und den einzelnen Primerpaaren mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzter DNA durchgeführt (jeweils 2,5-fache Verdünnung in allen mit einer geraden Zahl nummerierten Spuren), was zeigt, dass sich die PCR-Reaktionen im linearen Bereich befanden. (B) Die Histon H2B-Dichte wurde durch ChIP in Verbindung mit Taqman<sup>®</sup>-PCR zur Quantifikation der DNA in den Präzipitaten bestimmt.

Dieses Ergebnis sollte durch weitere, unabhängige ChIP-Experimente bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden Antikörper gegen den C-Terminus von Histon H3 für die Immunopräzipitation

verwendet. Da in Hefe nach dem derzeitigen Wissensstand keine Modifikationen der C-Termini von Histonen existieren, sind diese Antikörper ideal, um *in vivo* Histondichte zu analysieren, ohne einen artifiziellen Sequenz-Tag wie den Flag-Tag in einen Stamm einbringen zu müssen.



**Abbildung 18: Verlust der Histone H3 und H4 am geöffneten *PHO5*-Promotor.** Der Stamm 8136 (Wildtyp) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Phosphatinduktion mit der ChIP-Technik analysiert. Antikörper gegen den jeweiligen C-Terminus der Histone H3 (A) oder H4 (B) wurden zur modifikationsunabhängigen Messung der Histondichte am *PHO5*-Promotor und verschiedenen Kontrollregionen verwendet.

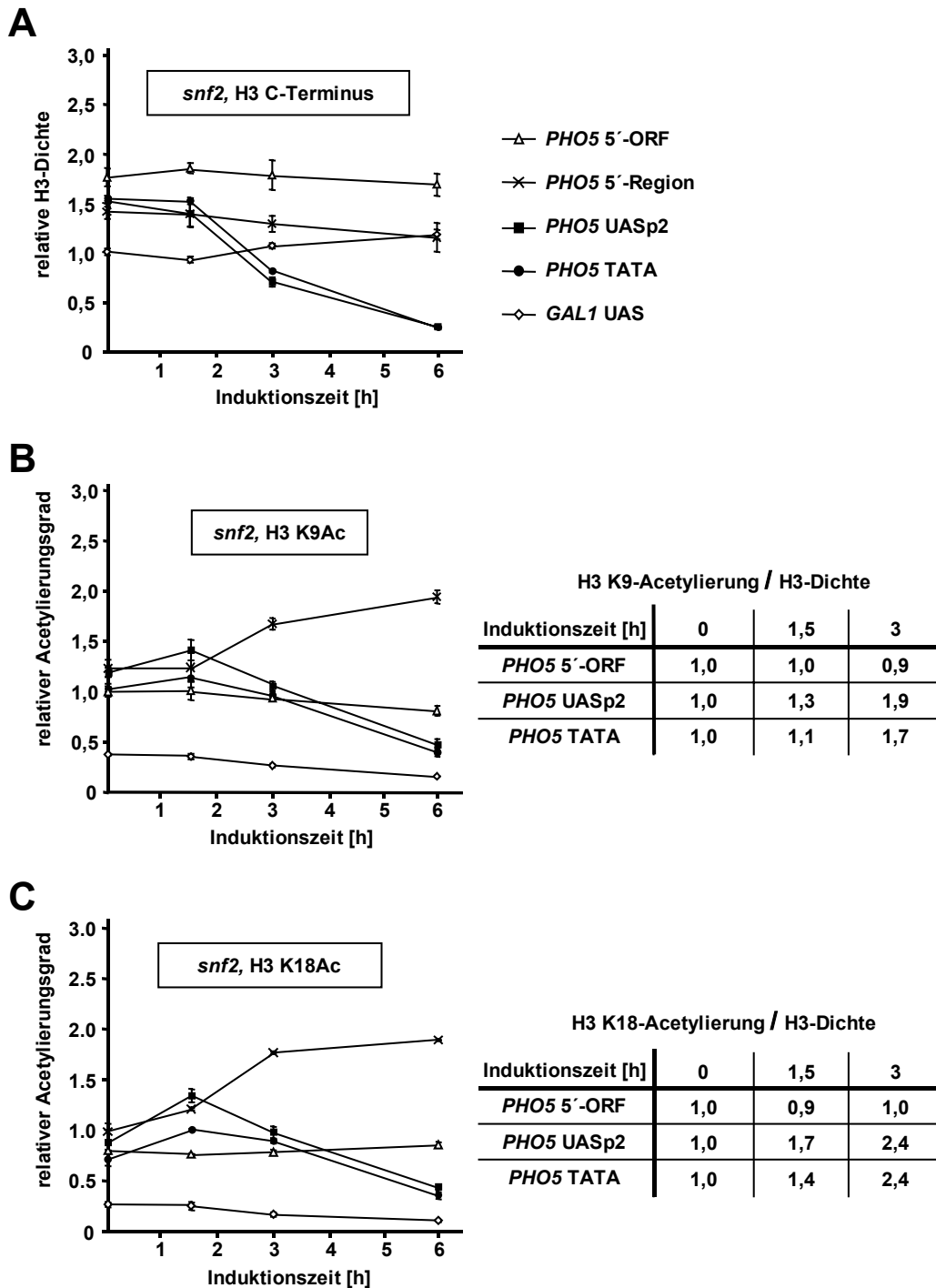


Aus Abbildung 18A geht eindeutig hervor, dass auch die Histon H3-Dichte am *PHO5*-Promotor im Verlauf der Chromatinremodulierung stark abnimmt. Es fällt außerdem auf, dass die relative Menge von mit dem Promotor-assoziierten Histon H3 mit einer Geschwindigkeit abnimmt, die stark der der Abnahme des ChIP-Signals für H3K9 gleicht (Abb. 16A). Der Verlust von Histon H3 findet wiederum spezifisch am *PHO5*-Promotor statt. Das nahezu identische Ergebnis wurde mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von Histon H4 erhalten (Abb. 18B). Aus diesem, sowie dem vorangegangenen Resultat muss auf einen dramatischen Histonverlust am remodulierten *PHO5*-Promotor geschlossen werden.

Darüber hinaus zeigen diese Experimente, dass die niedrigen ChIP-Signale, die am *GALI*-Promotor gemessen wurden, tatsächlich einen sehr schwachen Histonacetylierungsgrad widerspiegeln und nicht aus einer niedrigen Histondichte in dieser Region resultieren. Das folgt aus der Tatsache, dass die Histon H3-Dichte am *GALI*-Promotor vergleichbar zu beispielsweise derjenigen der *PHO5* 5'-Region ist (Abb. 18A), aber Histon H3 am *GALI*-Promotor verglichen mit der *PHO5* 5'-Region fünffach weniger acetyliert ist (Abb. 16A).

### **2.3. Vor der Chromatinöffnung werden die Histone H3 des *PHO5*-Promotors hyperacetyliert**

Der fortschreitende Verlust von Histonen am *PHO5*-Promotor während der Induktion stellt insbesondere für die Analyse des Acetylierungszustandes des Promotors ein Problem dar. Eine mögliche Lösung könnte sich aus den bei der Analyse der Histonacetylierung am *PHO8*-Promotor gewonnenen Erfahrungen ergeben. Dort konnte ein hyperacetylierter Zustand nur unter Bedingungen nachgewiesen werden, bei denen der Promotor induziert, aber die Chromatinremodulierung blockiert ist. Solche Bedingungen wurden in einem *snf2*-Stamm gefunden, in dem zwar die Chromatinremodulierung, nicht aber die Bindung von Pho4 an den Promotor vom Vorhandensein eines funktionellen Swi/Snf-Komplexes abhängt.



**Abbildung 19: Histon H3-Hyperacetylierung am induzierten *PHO5*-Promotor in einem *snf2*-Stamm.** Zellen des Stammes 8141 (*snf2*) wurden durch Phosphathunger induziert, und die Dichte von Histon H3 (A), bzw. der Acetylierungsgrad von Histon H3 an Lysin 9 (B) und an Lysin 18 (C) über einen Zeitraum von 6 h mit der ChIP-Technik bestimmt. Der Acetylierungsgrad wurde in Bezug zur jeweiligen Histon H3-Dichte gesetzt. Er ist in den nebenstehenden Tabellen aufgeführt. Das Verhältnis Acetylierungsgrad / Histondichte zum Zeitpunkt 0 h wurde jeweils gleich 1,0 gesetzt.

Die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors ist im Gegensatz zur Situation am *PHO8*-Promotor nicht komplett von Swi/Snf abhängig. Es wurde bereits gezeigt, dass der *PHO5*-Promotor nach ausreichend langer Induktionszeit, z.B. für 16 h, auch in einem *snf2*-Stamm geöffnet werden kann (Gaudreau et al., 1997). Jedoch ist die Geschwindigkeit des Remodulierungsprozesses in Zellen ohne Snf2 signifikant verlangsamt (Barbaric und Hörz, Manuskript in Vorbereitung), was sehr der Situation in einem *gcn5*-Stamm ähnelt (Barbaric et al., 2001). Während das *PHO5*-Promotorchromatin in einem Wildtyp-Stamm nach 2-3 h Induktion fast vollständig geöffnet ist, weist der *PHO5*-Promotor in einem *snf2*-Stamm, zu diesem Zeitpunkt in einem Nukleasezugänglichkeitstest noch keine Veränderungen der Chromatinstruktur auf (Barbaric und Hörz, Manuskript in Vorbereitung).

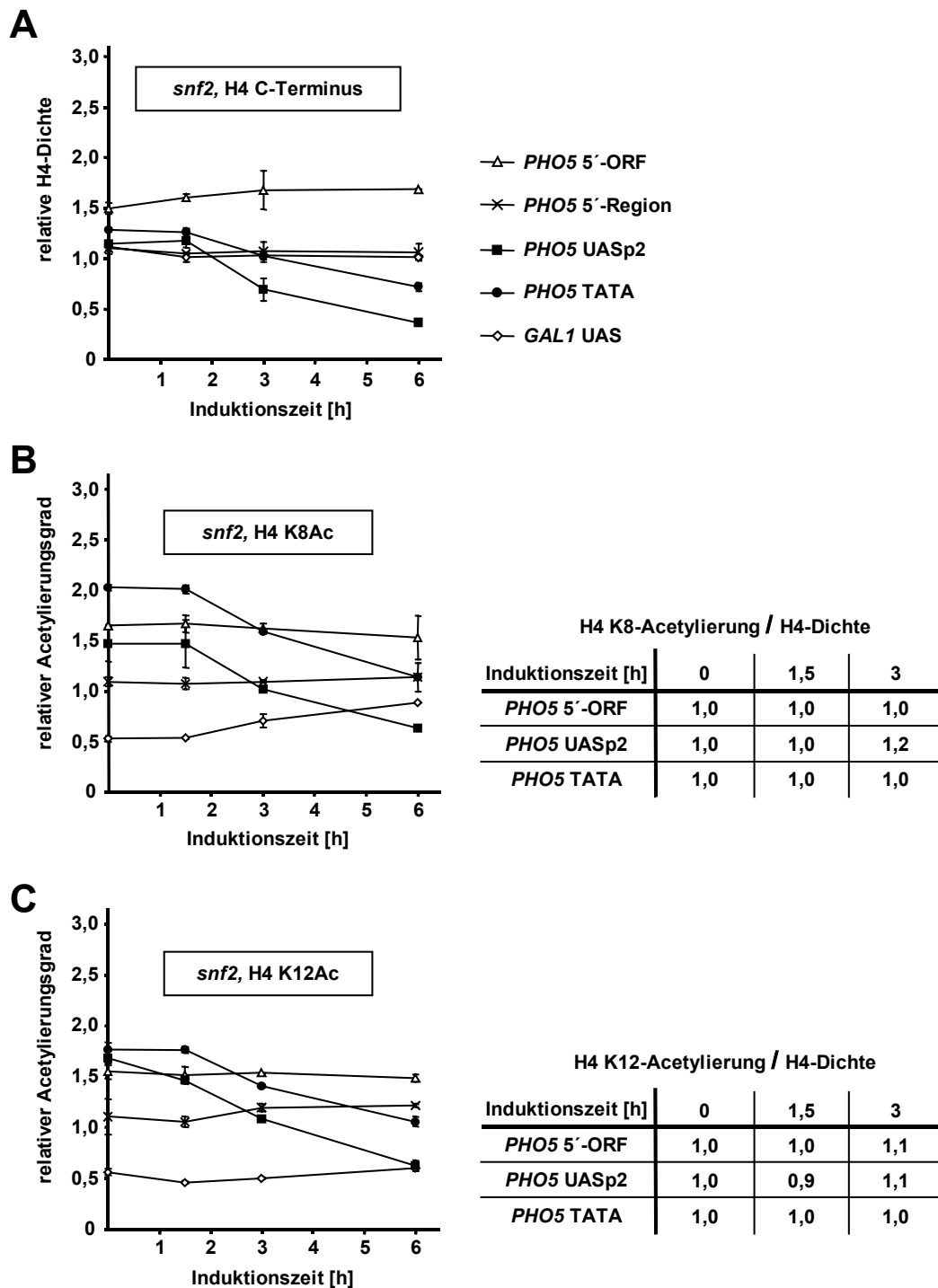
Zunächst wurde der zeitliche Verlauf des Histonverlusts am *PHO5*-Promotor in einem induzierten *snf2*-Stamm bestimmt. Der Antikörper gegen den C-Terminus von Histon H3 wurde verwendet, um die Histondichte vom Startpunkt der Phosphatinduktion bis zum 6 h-Zeitpunkt zu verfolgen. Dabei zeigte sich, dass der Histonverlust vom induzierten *PHO5*-Promotor in einem *snf2*-Stamm deutlich langsamer fortschreitet als in einem Wildtyp-Stamm (Abb. 19A). Der direkte Vergleich der jeweiligen Histon H3-Dichte nach 1,5 h Phosphatinduktion macht deutlich, dass am *PHO5*-Promotor in dem *snf2*-Stamm noch kein Histonverlust stattfindet, während die Dichte an Histon H3 im Wildtyp-Stamm zu diesem Zeitpunkt bereits um mehr als 50% reduziert ist (man vergleiche *PHO5* UASp2 in Abbildungen 18A und 19A). Eine Bestimmung des Acetylierungsgrades von Histon H3 nach 1,5 h sollte daher möglich sein, ohne dass ein möglicher Hyperacetylierungszustand von gleichzeitig stattfindendem Histonverlust überdeckt wird.

Die Analyse des Acetylierungsgrades der Lysine 9 und 18 von Histon H3 am induzierten *PHO5*-Promotor in Abwesenheit von Swi/Snf ist in den Abbildungen 19B und 19C dargestellt. Nach 1,5-stündiger Induktion wurde an den Promotornukleosomen -1 und -2 eine signifikante Erhöhung des Histon H3-Acetylierungsgrades festgestellt. Nach 3 h, wenn das ChIP-Signal für acetyliertes Histon H3 am *PHO5*-Promotor wieder absinkt, ist sogar ein weiterer Anstieg der Acetylierung zu beobachten. Das geht aus dem Absinken der Histon H3-Dichte zu diesem Zeitpunkt hervor (Abb. 19A). Zur Verdeutlichung wurde aus den ChIP-Daten ein „Netto-ChIP-Signal“ der Histonacetylierung errechnet, indem der Acetylierungsgrad durch die jeweilige Histondichte der Chromatinregion geteilt wurde. Diese Daten sind in den Tabellen in Abbildungen 19B und 19C dargestellt und zeigen, dass der Grad der Histon H3-Acetylierung am *PHO5*-Promotor während der

Aktivierung um mehr als das Doppelte ansteigt (Tabellen in Abb. 19B und 19C). Es muss besonders betont werden, dass ohne gleichzeitig vorliegende Daten über die Histondichte die gleich hohen Acetylierungswerte im *snf2*-Stamm nach 0 bzw. 3 h Induktion (Abb. 19B und 19C) dahingehend interpretiert worden wären, dass der Acetylierungsgrad am *PHO5*-Promotor an diesen Zeitpunkten gleich ist. Diese Beobachtung verdeutlicht, wie wichtig es ist, dass bei Experimenten dieser Art die richtigen Kontrollexperimente durchgeführt werden.

Überraschend ist, dass der Acetylierungsgrad an der unmittelbar angrenzenden 5'-Region des *PHO5*-Promotors in einem induzierten *snf2*-Stamm im Verlauf der Induktion ebenfalls ansteigt. Die Hyperacetylierung an Histon H3 reicht daher möglicherweise über den *PHO5*-Promotor bis zu Nukleosom -5 oder noch darüber hinaus. Allerdings führt eine mögliche Hyperacetylierung in dieser Region nicht zu nachweisbaren Veränderungen der Chromatinstruktur führen (Almer et al., 1986). Eine andere Erklärung wäre, dass dieses Primerpaar aufgrund seiner unmittelbaren Nachbarschaft zu den remodulierten Promotornukleosomen von Veränderungen am Promotor selbst mit beeinflusst würde. So ließe sich auch das scheinbare Absinken der Histondichte an der *PHO5* 5'-Region (Abb. 17 und 18) erklären, was eindeutig nicht mit Veränderungen in der Chromatinstruktur korreliert (Almer et al., 1986).

Die Histonacetyltransferase Esa1, die katalytische Untereinheit des NuA4 HAT-Komplexes (Allard et al., 1999), spielt ebenfalls eine Rolle bei der *PHO5*-Expression (Galarneau et al., 2000). Daher wurde die Acetylierung von Histon H4, dem Haupt-Angriffspunkt der HAT-Aktivität von Esa1, am *PHO5*-Promotor und den entsprechenden Kontrollregionen auf dieselbe Weise gemessen, wie eben für Histon H3 beschrieben. Die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Lysine 8 und 12 von Histon H4 am *PHO5*-Promotor während der Phosphatinduktion nicht hyperacetyliert werden. Ein Vergleich des Verhältnisses von Histonacetylierungsgrad zu Histondichte (Tabellen in Abb. 20B und 20C) zeigt eindeutig, dass sich die Promotorregion und die Kontrollregionen nicht signifikant unterscheiden. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass NuA4 HAT-Aktivität für die Öffnung des *PHO5*-Promotors nicht benötigt wird. In Übereinstimmung dazu wurde kürzlich mit einer Genom-weiten Analyse der Esa1-Rekrutierung gezeigt, dass eine Aktivator-abhängige NuA4-Rekrutierung nur an einer Untergruppe von Genen für ribosomale Proteine auftritt (Reid et al., 2000).



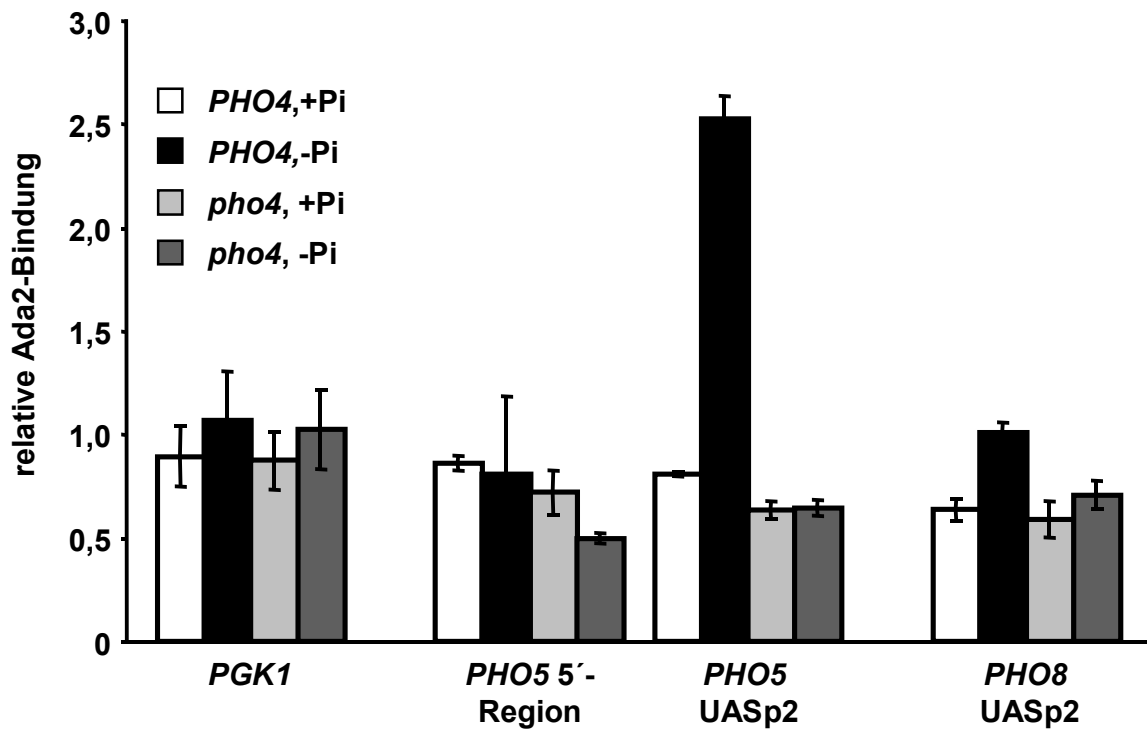
**Abbildung 20:** Der Acetylierungsgrad von Histon H4 steigt am *PHO5*-Promotor während der Induktion nicht an. Zellen vom Stamm 8141 (*snf2*) wurden durch Phosphathunger induziert, und die Dichte von Histon H4 (A), bzw. der Acetylierungsgrad von Histon H4 an Lysin 8 (B) und an Lysin 12 (C) wurden über einen Zeitraum von 6 h mit ChIP gemessen. Der Acetylierungsgrad wurde normalisiert und in Tabellen dargestellt, wie in der Legende zu Abbildung 11 beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Histone H3 am *PHO5*-Promotor im Verlauf des Aktivierungsvorgangs acetyliert werden, bevor die Chromatinremodulierung zum vollständigen Verlust der Histone von der Promotor-DNA führt.

#### 2.4. Pho4-abhängige Rekrutierung von SAGA an die *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren

Alle bisher gezeigten Ergebnisse unterstützen ein Modell, in dem die Acetylierung von Promotorhistonen durch die SAGA-Untereinheit Gcn5 eine prominente Rolle bei der Aktivierung der *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren spielt. Um dieses Modell experimentell weiter zu belegen, wurde als nächstes die Frage gestellt, ob der SAGA-Komplex bei Phosphatinduktion spezifisch an die jeweiligen Promotorregionen rekrutiert wird. Zu diesem Zweck wurde ein Stamm verwendet, in dem der Myc-Tag an die SAGA-Untereinheit Ada2 fusioniert ist. Dadurch kann die SAGA-Bindung durch Immunopräzipitation von Ada2 mit einem anti-Myc-Antikörper verfolgt werden (Cosma et al., 1999). Die Bindung von Ada2 wurde unter reprimierenden und induzierenden Bedingungen in einem Wildtyp- und einem *pho4*-Stamm gemessen. Um promotorspezifische Rekrutierung von unspezifischen Hintergrundsignalen unterscheiden zu können, wurden die unmittelbar an den *PHO5*-Promotor angrenzende 5'-Region, sowie der *PGK1*-Promotor in die Analyse mit einbezogen.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Ada2 unter voll induzierenden Bedingungen nur in Gegenwart von Pho4 spezifisch an *PHO5* und *PHO8* rekrutiert wird. Besonders deutlich ist die Ada2-Bindung am *PHO5*-Promotor nachweisbar; in einem Wildtyp-Stamm steigt das ChIP-Signal nach Phosphatinduktion um das 2,5-fache an (Abb. 21, man vergleiche *PHO4* +Pi mit *PHO4* -Pi). Dagegen ist in einem *pho4*-Stamm kein signifikanter Unterschied zwischen nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen zu erkennen. Auch am *PHO8*-Promotor nimmt das ChIP-Signal für die Ada2-Bindung nach Induktion signifikant zu. Zwar ist in einem *pho4*-Stamm in dieser Region ebenfalls eine leichte Zunahme zu beobachten, eine solche tritt aber auch am *PGK1* Promotor auf, wo im Gegensatz zum *PHO8*-Promotor kein Unterschied zwischen einem Wildtyp- und einem *pho4*-Stamm existiert. Ada2 wird daher auch am *PHO8*-Promotor bei der Aktivierung von Pho4 rekrutiert.



**Abbildung 21: Pho4-abhängige Rekrutierung von SAGA an die *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren.** Die Stämme 8136 $\Delta$ *pho4* (*pho4*, *MYC-ADA2*) und 8136 (*PHO4*, *MYC-ADA2*) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Phosphatinduktion mit der ChIP-Technik analysiert. Die Bindung der SAGA-Untereinheit Ada2 an die *PHO5*-, *PHO8*- und *PGK1*-Promotoren wurde durch Immunopräzipitation mit einem anti-Myc-Antikörper bestimmt. Relative DNA-Mengen in den Immunopräzipitaten wurden durch quantitative PCR gefolgt von Ethidiumbromid-Gelelektrophorese bestimmt.

Die bisher gezeigten Ergebnisse ergeben das folgende Bild von der Rolle des SAGA-Komplexes bei der Chromatinöffnung der *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren: Phosphatinduktion bewirkt die Pho4-abhängige Rekrutierung von SAGA an die jeweilige Promotorregion. Daraufhin werden diejenigen Nukleosomen, die im weiteren Verlauf des Öffnungsprozesses remoduliert werden, von Gcn5 acetyliert. Worauf basiert nun die Verzögerung der Chromatinöffnung an *PHO5*, bzw. das vollständige Fehlen von Remodulierung an *PHO8* in Abwesenheit von Gcn5? Zumindest für den *PHO8*-Promotor konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Chromatinöffnung an einem Schritt nach Bindung des Aktivatorproteins Pho4 blockiert ist (Gregory et al., 1999). So ist es zum Beispiel denkbar, dass beispielsweise Rekrutierung von Swi/Snf nicht ohne vorherige Acetylierung des Promotorchromatins stattfinden kann. Dagegen ist es am *PHO5*-Promotor nicht klar, ob Pho4 in einem *gcn5*-Stamm überhaupt an seine Bindungsstellen binden kann. Denn im Gegensatz zum *PHO8*-Promotor, in dem beide UAS-Elemente in nicht-nukleosomalen Bereichen liegen (Abb. 8A), ist das kritisch wichtige UASp2-Element des *PHO5*-Promotors Teil von Nukleosom -2 (Abb. 15).

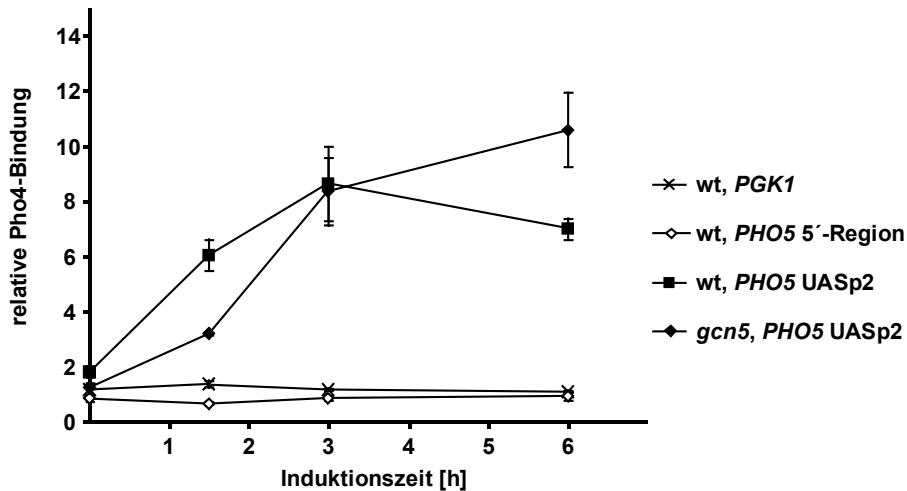
Der letzte Teil dieser Arbeit befasst sich daher mit den Voraussetzungen der Rekrutierung von Pho4 an seine Bindungsstellen im *PHO5*-Promotor.

### **3. Die Rolle der Chromatinstruktur und des SAGA-Komplexes bei der Bindung von Pho4 an den reprimierten *PHO5*-Promotor**

Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor ist der primäre Auslöser für die Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung des *PHO5*-Promotors (Fascher et al., 1990). Pho4 interagiert mit zwei Bindungsstellen in der proximalen Promotorregion, den regulatorischen Elementen UASp1 und UASp2 (Abb. 15). Induktion durch Phosphathunger bewirkt die Translokation von Pho4 aus dem Cytoplasma in den Kern (O'Neill et al., 1996), wo Pho4 den *PHO5*-Promotor im reprimierten Zustand antrifft. Unter diesen Bedingungen liegt der Promotor als Array aus vier präzise positionierten Nukleosomen vor, die eine zentrale hypersensitive Stelle zwischen den Nukleosomen -2 und -3 ausbilden (Abb. 15) (Almer et al., 1986). Der nukleosomale Anteil der Promotor-DNA ist komplett unzugänglich für Restriktionsnukleasen (Almer et al., 1986), was darauf hindeutet, dass der Zugang für DNA-bindende Proteine an die entsprechenden DNA-Regionen *in vivo* gleichfalls erschwert sein könnte. Interessanterweise liegt UASp2 im reprimierten Promotor in Nukleosom -2 (Abb. 15), und das Vorhandensein eines Nukleosoms an dieser Stelle verhindert unter diesen Bedingungen die Bindung von Pho4 an UASp2 (Venter et al., 1994). UASp2 ist aber von essentieller Bedeutung für die *PHO5*-Aktivierung. In Abwesenheit von UASp2 kann der *PHO5*-Promotor nicht geöffnet werden, nicht einmal wenn Pho4 überexprimiert wird und Zugang an UASp1 erlangen kann (Svaren et al., 1994). Bindung von Pho4 an UASp2 wurde bislang nur am remodelierten *PHO5*-Promotor nachgewiesen, nachdem UASp2 durch Pho4-induzierte Chromatinöffnung freigelegt wurde (Venter et al., 1994). Die Aktivierungsdomäne von Pho4 ist von entscheidender Bedeutung dafür, dass Pho4 Zugang zu UASp2 erlangen kann (Svaren et al., 1994), was wiederum auf die zentrale Bedeutung der Chromatinöffnung bei der Pho4-Rekrutierung hinweist. Der Mechanismus der Pho4-Bindung an den *PHO5*-Promotor stellt sich daher als sogenanntes „Henne-Ei-Problem“ dar: Wie kann Pho4 der Auslöser für die Öffnung des *PHO5*-Promotors sein, wenn zur gleichen Zeit der Promotor offenbar bereits offen sein muss, damit Pho4 Zugang zu beiden Bindungsstellen erhalten kann?



### 3.1. Bei der Induktion eines *gcn5*-Stammes wird Pho4 an den *PHO5*-Promotor rekrutiert, während noch Promotornukleosomen vorhanden sind



**Abbildung 22: Pho4-Rekrutierung an den reprimierten *PHO5*-Promotor.** Zellen der Stämme 8136 (wt) und 8139 (*gcn5*) wurden durch Phosphathunger induziert, und die Bindung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor wurde über einen Zeitraum von 6 h mit der ChIP-Technik gemessen.

Im Folgenden sollte daher die Frage beantwortet werden, wie Pho4 in die Chromatinstruktur des geschlossenen *PHO5*-Promotors eindringen kann. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Pho4-Bindung in einem induzierten *gcn5*-Stamm untersucht. Während der *PHO5*-Promotor in einem Wildtyp-Stamm nach 3 h Inkubation in phosphatfreiem Medium nahezu vollständig geöffnet ist, kann in Abwesenheit von Gcn5 zu diesem Induktionszeitpunkt keinerlei Öffnung festgestellt werden, was aus der Unzugänglichkeit der *Cla*I Restriktionsschnittstelle, die sich unmittelbar angrenzend zu UASp2 in Nukleosom -2 befindet, geschlossen werden kann (Barbaric et al., 2001). Dabei ist es wichtig festzustellen, dass das Phosphathungersignal, das letztlich zur Akkumulation von transkriptionell aktivem Pho4 im Kern führt, unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt ist (Barbaric et al., 2001).

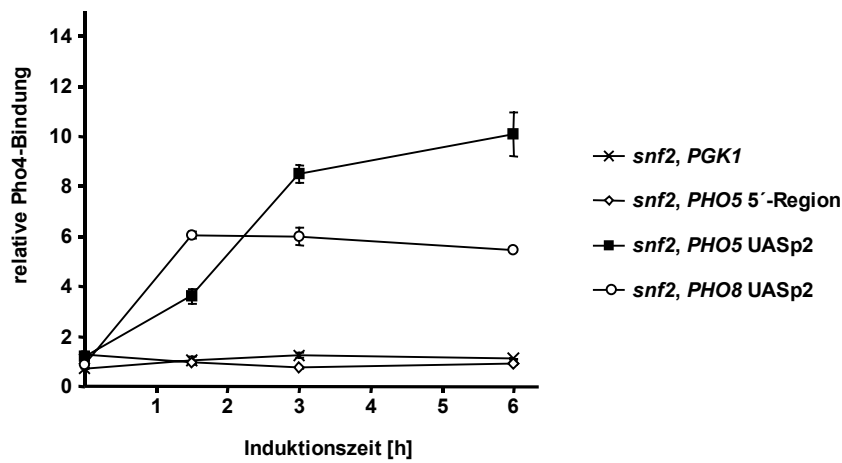
Mithilfe der ChIP-Technik wurde die Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor in Gegenwart oder Abwesenheit von Gcn5 bestimmt. Zellen wurden in Vollmedium angezogen und anschließend in phosphatfreies Medium überführt. Der Verlauf der Pho4-Bindung während der Induktion wurde angefangen am Zeitpunkt 0 h bis zum Zeitpunkt 6 h nach Induktionsbeginn gemessen. Ein PCR-Fragment, welches das *PHO5* UASp2-Element umspannt, wurde zur Bestimmung der relativen Pho4-Bindung am *PHO5*-Promotor verwendet. Um zwischen promotorspezifischen und globalen

Effekten der Phosphatinduktion auf die Pho4-Bindung unterscheiden zu können, wurden zwei zusätzliche Chromatinregionen in die Experimente mit einbezogen. Der *PGK1*-Promotor und eine unmittelbar an den *PHO5*-Promotor angrenzende Region wurden als Kontrollregionen ausgewählt. Beide Regionen enthalten keine Bindungsstellen für Pho4 und werden im Zuge der Phosphatinduktion nicht remodeliert.

Der zeitliche Verlauf der Pho4-Bindung an den *PHO5*-Promotor und die Kontrollregionen ist in Abbildung 22 dargestellt. In einem Wildtyp-Stamm kann bereits nach 1,5 h Induktion signifikante Pho4-Bindung beobachtet werden, die nach 3 h ein Maximum erreicht (Abb. 22, wt, *PHO5* UASp2). In Anlehnung an die Geschwindigkeit der Pho4-Rekrutierung ist die Öffnung des *PHO5*-Promotors nach 3 h Phosphathunger beinahe vollständig. Erwartungsgemäß bindet Pho4 nur an den *PHO5*-Promotor aber an keine der Kontrollregionen (Abb. 22, wt, *PGK1* und wt, *PHO5* 5'-Region). Wie bereits erwähnt ist das Promotorchromatin in einem *gcn5*-Stamm nach 3 h Phosphatinduktion noch vollständig geschlossen. Dagegen ist der Grad der Pho4-Rekrutierung an den *PHO5*-Promotor zu diesem Induktionszeitpunkt nicht von dem Wildtyp-Stamm unterscheidbar (Abb. 22, vergleiche wt, *PHO5* UASp2 und *gcn5*, *PHO5* UASp2). Darüber hinaus kann in Abwesenheit von Gcn5 bereits nach 1,5 h signifikante Pho4-Bindung nachgewiesen werden, wenn auch weniger als im Wildtyp-Stamm. Daraus wurde geschlossen, dass Pho4 im geschlossenen *PHO5*-Promotor an seine Bindungsstellen rekrutiert werden kann, obwohl die Nukleasezugänglichkeit zeigt, dass die Promotornukleosomen noch vorhanden sein müssen.

### **3.2. Pho4 wird auch in einem induzierten *snf2*-Stamm an den geschlossenen *PHO5*-Promotor rekrutiert**

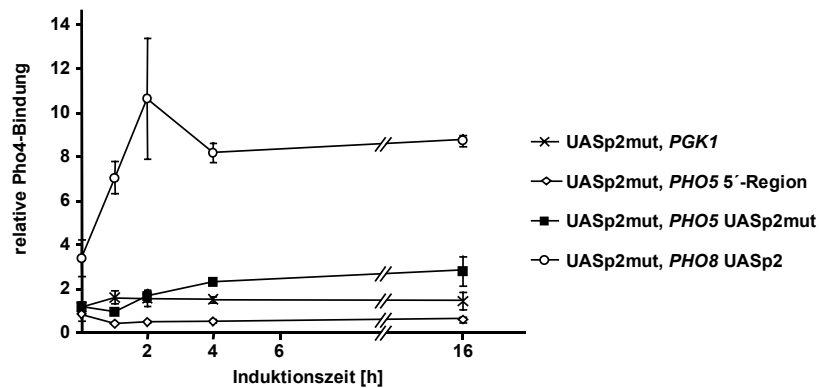
In einem induzierten *snf2*-Stamm ist die Öffnung des *PHO5*-Promotors ebenfalls stark verzögert (Abb. 19A). Eine ChIP-Analyse eines induzierten *snf2*-Stammes stellt daher eine alternative Möglichkeit dar, die Bindung von Pho4 an geschlossenes Promotorchromatin zu untersuchen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 23 gezeigt. Auch unter diesen Bedingungen bindet Pho4 an das geschlossene Chromatin des *PHO5*-Promotors (Abb. 23, *snf2*, *PHO5* UASp2). Zusätzlich wurde die Pho4-Rekrutierung an den *PHO8*-Promotor untersucht, da bereits bekannt war, dass Pho4 unter diesen Bedingungen an das *PHO8* UASp2-Element bindet (Gregory et al., 1999). Dieser Befund wurde hier erneut bestätigt. Bereits nach 1,5 h Induktion ist das Maximum der Bindung an den *PHO8*-Promotor erreicht (Abb. 23, *snf2*, *PHO8* UASp2).



**Abbildung 23: Pho4-Rekrutierung an den noch geschlossenen *PHO5*-Promotor in einem *snf2*-Stamm.** Zellen des Stammes 8141 (*snf2*) wurden in phosphatfreiem Medium induziert, und die Bindung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor wurde über einen Zeitraum von 6 h mit der CHIP-Technik gemessen.

### 3.3. Pho4-Rekrutierung an den geschlossenen *PHO5*-Promotor ist vollständig von UASp2 abhängig

Pho4 bindet mit nahezu identischer Stärke an den geschlossenen bzw. remodulierten *PHO5*-Promotor (Abb. 13). Das zeigt, dass eine geschlossene Chromatinstruktur kein absolutes Hindernis für die Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor darstellt. Um den Mechanismus der Pho4-Bindung an den geschlossenen Promotor zu bestimmen, ist es allerdings notwendig, die Bindung von Pho4 an UASp1 und UASp2 getrennt zu analysieren. Im vorangegangenen Experiment war es nicht möglich, zwischen Bindung an UASp1 oder UASp2 zu unterscheiden, da die Auflösung der CHIP-Technik durch die Größe der Chromatinfragmente nach dem mechanischen Scheren (typischerweise zwischen 150 und 1000 bp) limitiert ist. Die hierin verwendete UASp2-Sonde und vermutlich jede andere Sonde in der Nachbarschaft von UASp1 und UASp2 misst die Summe der Pho4-Bindung an beide UAS-Elemente. Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass das CHIP-Signal, das von der Pho4-Rekrutierung an den reprimierten *PHO5*-Promotor in dem induzierten *gcn5*-Stamm stammt, nur Rekrutierung an das nicht-nukleosomale UASp1-Element widerspiegelt. Denn es wurde bereits gezeigt, dass UASp1 im reprimierten *PHO5*-Promotor für Pho4 zugänglich ist (Svaren et al., 1994).



**Abbildung 24: Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor in einem Stamm ohne funktionelles UASp2-Element.** Zellen vom Stamm G1 (UASp2mut) wurden durch Phosphathunger induziert, und die Bindung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor wurde mit der ChIP-Technik bestimmt.

Das nächste Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob Rekrutierung von Pho4 an UASp1 alleine ein ChIP-Signal am reprimierten *PHO5*-Promotor erzeugt. Daher wurde die Pho4-Bindung in einem Stamm gemessen, der eine mutierte Version von UASp2 (UASp2mut) besitzt, an die Pho4 nicht binden kann. Diese Promotorvariante kann nicht remoduliert werden, nicht einmal unter maximal induzierenden Bedingungen, z.B. nach 16-stündiger Phosphatinduktion (Fascher et al., 1993). Da der Signaltransduktionsweg, der die Aktivierung und Relokalisation von Pho4 bewirkt, voll funktionsfähig ist, simuliert die Induktion dieser Promotorvariante exakt die Induktion des *PHO5*-Promotors in einem *gcn5*-Stamm nach 3 h Phosphatinduktion: der Promotor ist vollständig geschlossen, während sich transkriptionell aktives Pho4 im Kern befindet. Sollte daher Pho4 im reprimierten Promotor nur an UASp1 rekrutiert werden, wäre das daraus hervorgehende ChIP-Signal in der UASp2mut-Promotorvariante genau so stark wie das Signal in einem *gcn5*-Stamm nach 3-stündiger Phosphatinduktion.

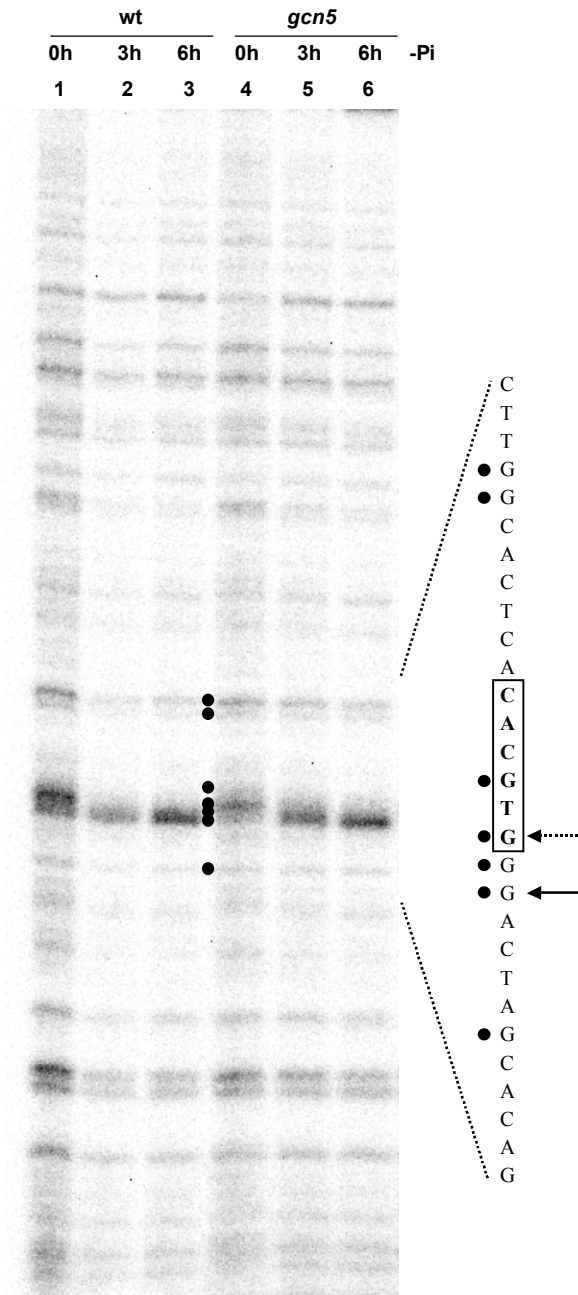
Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 24 dargestellt. Es zeigt deutlich, dass in Abwesenheit eines funktionellen UASp2-Elements keine Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor stattfindet. Verglichen mit dem Wildtyp- und dem *gcn5*-Stamm (Abb. 23) ist Pho4 zu keinem Zeitpunkt signifikant am *PHO5*-Promotor gebunden (Abb. 24, UASp2mut, *PHO5* UASp2mut). Dagegen konnte nach 3 h Phosphathungern eine deutliche Pho4-Bindung am *PHO8*-Promotor nachgewiesen werden (Abb. 24, UASp2mut, *PHO8* UASp2). Daraus wurde geschlossen, dass UASp2 für die Bindung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor unbedingt benötigt wird, auch wenn sich UASp2 in einem Nukleosom befindet.

### 3.4. Bindung von Pho4 an das nukleosomale UASp2-Element

Da die Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor ein funktionelles UASp2-Element voraussetzt, muss angenommen werden, dass Pho4 auch im geschlossenen Promotor an UASp2 binden kann. Als nächstes sollte daher diese vermutete Bindung mit einer alternativen Methode nachgewiesen werden. Die Bindung von Pho4 an UASp2 wurde mit der DMS *in vivo* footprint-Technik analysiert, da sich in der Vergangenheit gezeigt hat, dass sich diese Methode sehr gut zum Nachweis von Pho4-Bindung an die *PHO5* UAS-Elemente eignet, unabhängig davon, ob das Chromatin des *PHO5*-Promotors offen oder geschlossen ist (Svaren et al., 1994; Venter et al., 1994).

Eine DMS-Analyse der Pho4-Bindung an UASp2 wurde in einem Wildtyp- und einem *gcn5*-Stamm jeweils vor und 3 bzw. 6 h nach Beginn der Phosphatinduktion durchgeführt. Im Wildtyp-Stamm ist deutlich zu erkennen, dass die Bindung von Pho4 die Reaktivität von hauptsächlich zwei Guanin-Resten an der Pho4-Bindungsstelle beeinflusst (Abb. 25, Spuren 1-3). Ein Guanin-Rest, der Bestandteil der E-Box ist, wird durch Pho4-Bindung vor Methylierung geschützt (Abb. 25, gekennzeichnet durch einen gestrichelten Pfeil), während ein zweiter Guanin-Rest, der sich zwei Basen 3' des Guanin-Rests der E-Box befindet, sensitiver gegenüber DMS wird (Abb. 25, gekennzeichnet durch einen Pfeil mit durchgezogener Linie). Dass die Bindung eines Proteins sowohl zu verstärkter Protektion als auch zu verstärkter Exposition von Guanin-Resten führen kann, ist vielfach beobachtet worden (siehe beispielsweise Ogata and Gilbert, 1979). Auch für die Pho4-Bindung an UASp2 ist dieses Phänomen bereits früher beschrieben worden (Svaren et al., 1994; Venter et al., 1994).

Die DMS-Analyse der Pho4-Bindung in einem *gcn5*-Stamm zeigt, dass Kinetik und Stärke der Bindung qualitativ und quantitativ mit der Situation in einem Wildtyp-Stamm identisch sind (Abb. 25, Spuren 4-6). Besonders hervorzuheben ist, dass nach 3 h Induktion, wenn der *PHO5*-Promotor in einem *gcn5*-Stamm noch geschlossen ist, Pho4 eindeutig an UASp2 gebunden ist (Abb. 25, Spur 5). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Pho4 an das nukleosomale UASp2 binden kann, und dass diese Interaktion essentiell für die Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein intermediärer Aktivierungszustand des *PHO5*-Promotorchromatins existiert, in dem der Promotor noch nicht remoduliert ist, aber Pho4 bereits vollständig Zugang zu seinen Bindungsstellen erlangt hat.

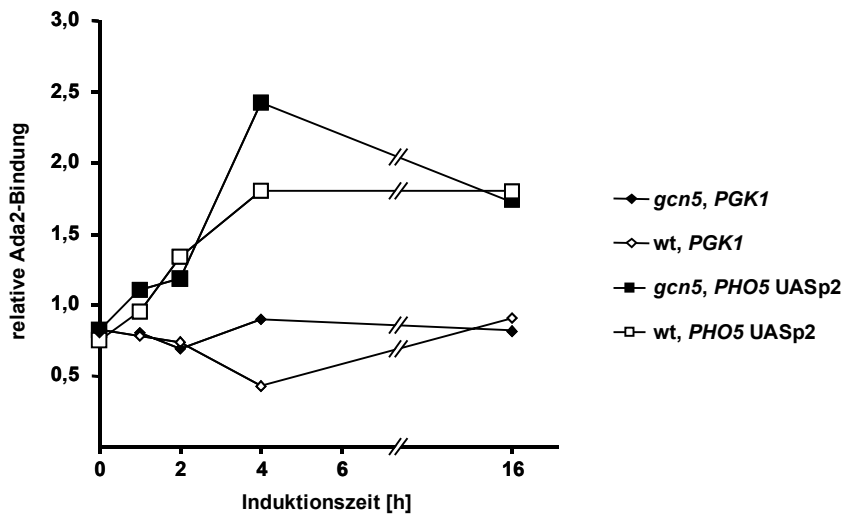


**Abbildung 25: DMS *in vivo* footprint-Analyse der Pho4-Bindung an UASp2.** Zellen der Stämme 8136 (wt) (Spuren 1-3) und 8139 (*gcn5*) (Spuren 4-6) wurden durch Inkubation in phosphatfreiem Medium induziert. Vor Beginn der Induktion (Spuren 1 und 4) und nach 3 h (Spuren 2 und 5) bzw. 6 h (Spuren 3 und 6) Induktion wurden Zellen mit DMS in einer Endkonzentration von 0,001% für 9 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, und die DNA wurde aus den Zellen isoliert. Anschließend wurde die DNA zusammen mit dem radioaktiv markierten Primer P5 UASp2 in eine Primerextensions-Reaktion eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Sequenziergel aufgetrennt. Seitlich befindet sich die DNA-Sequenz der Pho4-Bindungsstelle. Der Kasten markiert die E-Box, der gestrichelte Pfeil markiert einen Guanin-Rest, der aufgrund von Pho4-Bindung vor Methylierung durch DMS geschützt wird, während der Pfeil mit durchgezogener Linie einen Guanin-Rest markiert, der aufgrund von Pho4-Bindung stärker für DMS-Methylierung zugänglich wird. Die Punkte markieren Guanin-Reste in der Bindungsstelle.

### 3.5. Rekrutierung von SAGA an den geschlossenen *PHO5*-Promotor in einem induzierten *gcn5*-Stamm

Die Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor in einem *gcn5*-Stamm verläuft mit der selben Geschwindigkeit wie in einem Wildtyp-Stamm. Daher muss der Grund für die verzögerte Remodulierungskinetik in Abwesenheit von Gcn5 in einem Schritt liegen, der auf die Pho4-Bindung folgt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das an den geschlossenen *PHO5*-Promotor gebundene Pho4 nicht in der Lage ist, Cofaktoren an den Promotor zu rekrutieren. In einem Wildtyp-Stamm rekrutiert Pho4 den SAGA-Komplex an den *PHO5*-Promotor (Abb. 21), wobei die SAGA-Untereinheiten Gcn5 und Spt3 den Remodulierungs- und Transkriptionsaktivierungsprozess jeweils durch Histonacetylierung (Abb. 19) bzw. durch TBP-Rekrutierung (siehe unten, Abb. 27) unterstützen. Pho4 bindet zusammen mit dem Homöodomänenprotein Pho2 kooperativ an den *PHO5*-Promotor (Barbaric et al., 1996). An UASp1 wird die kooperative Interaktion zwischen Pho4 und Pho2 zur maximalen Bindung von Pho4 benötigt, und an UASp2 zur vollen Entfaltung des Pho4-Aktivierungspotentials (Barbaric et al., 1998). Unter den hier verwendeten Bedingungen könnte die Bindung von Pho4 an eine nukleosomale Bindungsstelle zu einer anderen sterischen Konformation des Pho4-Pho2-Komplexes führen, in der Pho4 seine Aktivierungsdomäne nicht richtig entfalten kann.

Daher wurde die Frage gestellt, ob an den geschlossenen *PHO5*-Promotor gebundenes Pho4 prinzipiell in der Lage ist, Cofaktoren wie den SAGA-Komplex zu rekrutieren. Bindung der SAGA-Untereinheit Ada2 an den *PHO5*-Promotor wurde in einem Wildtyp- bzw. *gcn5*-Stamm über einen Zeitraum von 6 h nach Induktion der Zellen durch Phosphathunger gemessen. In beiden Stämmen wurde Ada2-Rekrutierung bereits unmittelbar nach Beginn der Aktivierung beobachtet (Abb. 26). Weder die Geschwindigkeit der Rekrutierung noch der absolute Bindungsgrad weisen signifikante Unterschiede in Gegenwart oder Abwesenheit von Gcn5 auf. An den geschlossenen *PHO5*-Promotor gebundenes Pho4 ist also prinzipiell in der Lage, Cofaktoren an den Promotor zu rekrutieren. Dieses Ergebnis impliziert aber nicht, dass in einem *gcn5*-Stamm alle für die Promotoröffnung benötigten Cofaktoren mit ausreichender Geschwindigkeit rekrutiert werden. Ganz im Gegenteil ist es denkbar, dass das Fehlen von Histonhyperacetylierung in Abwesenheit von Gcn5 zu einer reduzierten Rekrutierung wichtiger Cofaktoren wie z.B. dem Swi/Snf-Komplex führt.

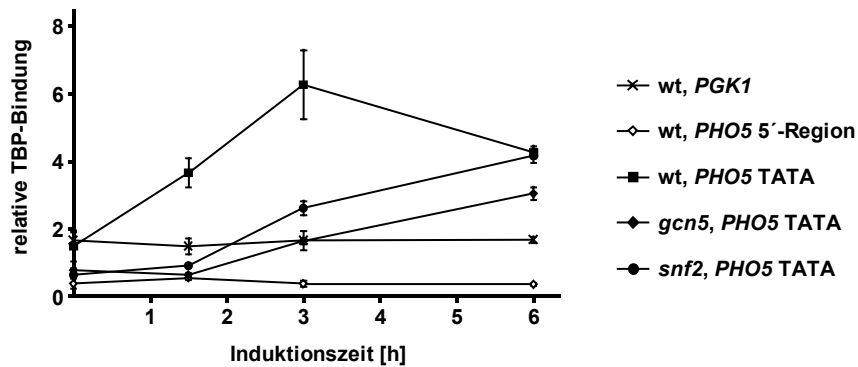


**Abbildung 26: Kinetik der SAGA-Rekrutierung in Abwesenheit von Gcn5.** Zellen der Stämme 8136 (wt) und 8139 (*gcn5*) wurden durch Phosphathunger induziert. 0, 1, 2, 4 und 16 h nach Beginn der Induktion wurden Teile der Kulturen einer ChIP-Analyse unterzogen. Beide Stämme tragen ein mit dem Myc-Tag fusioniertes Ada2, das Bestandteil des SAGA-Komplexes ist. Zur Immunopräzipitation dieses Fusionsproteins wurde der Antikörper 9E11 (K. Nasmyth, IMP Wien) verwendet.

### 3.6. Chromatinremodulierung ist eine Voraussetzung für die Rekrutierung von TBP an den *PHO5*-Promotor

Die Aktivierung eines eukaryontischen Promotors ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem die Remodulierung einer repressiven Chromatinstruktur oft eine herausragende Rolle spielt (Almer et al., 1986; Barbaric et al., 1992; Hirschhorn et al., 1992). Bis zu diesem Punkt konnte gezeigt werden, dass ein essentieller früher Aktivierungsschritt am *PHO5*-Promotor ohne Chromatinöffnung stattfinden kann. Pho4 kann im geschlossenen *PHO5*-Promotor an seine Bindungsstellen binden und ist prinzipiell dazu in der Lage, Coaktivator-Komplexe zu rekrutieren. Bindung von TBP an das TATA-Element eines Promotors wird als ein weiterer essentieller Schritt des Aktivierungsprozesses angesehen, da TBP die Rekrutierung des Polymerase II-Holoenzym an die Transkriptionsstartstelle vermittelt (Kuras and Struhl, 1999). Bindung von TBP an die TATA-Box kann von Spt3, einem Bestandteil des SAGA-Komplex unterstützt werden (Larschan and Winston, 2001; Bhaumik and Green, 2001). Da gezeigt werden konnte, dass Pho4 den SAGA-Komplex auch ohne Chromatinremodulierung an den *PHO5*-Promotor rekrutieren kann (Abb. 26), ergab sich die Frage, ob TBP ebenfalls an den geschlossenen *PHO5*-Promotor rekrutiert werden kann.





**Abbildung 27:** In Abwesenheit von Chromatinremodulierung ist die Rekrutierung von TBP an den *PHO5*-Promotor stark verzögert. Zellen der Stämme 8136 (wt), 8139 (*gcn5*) und 8141 (*snf2*) wurden von Vollmedium in phosphatfreies Medium überführt. Während der darauf folgenden 6 h wurde die TBP-Bindung am *PHO5*-Promotor mithilfe der CHIP-Technik bestimmt.

Der zeitliche Verlauf der TBP-Rekrutierung an den *PHO5*-Promotor in Gegenwart oder Abwesenheit von Gcn5 wurde mit der CHIP-Technik analysiert. Die TBP-Bindung in einem Wildtyp-Stamm verläuft mit einer ähnlichen Kinetik wie die Pho4-Bindung (vergleiche wt, *PHO5* UASp2 in Abb. 22 mit wt, *PHO5* TATA in Abb. 27). Ein signifikanter Anstieg der TBP-Bindung am Promotor wurde bereits nach 1,5 h beobachtet. Das Maximum der Bindung wurde nach 3 h Induktion erreicht (Abb. 27, wt, *PHO5* TATA). Dagegen ist die TBP-Rekrutierung in Abwesenheit von *gcn5* deutlich verlangsamt (Abb. 27, *gcn5*, *PHO5* TATA). Zum Induktionszeitpunkt 1,5 h ist kein Anstieg der Bindung zu beobachten, und auch nach 3 h Induktion ist am *PHO5*-Promotor weit weniger TBP gebunden als in einem Wildtyp-Stamm. Erst nach 6 h erreicht die TBP-Rekrutierung annähernd eine dem Wildtyp-Stamm vergleichbare Stärke. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass obwohl SAGA an den geschlossenen Promotor rekrutiert werden kann, eine offene Promotorstruktur unabdingbar für die stabile Bindung von TBP ist.

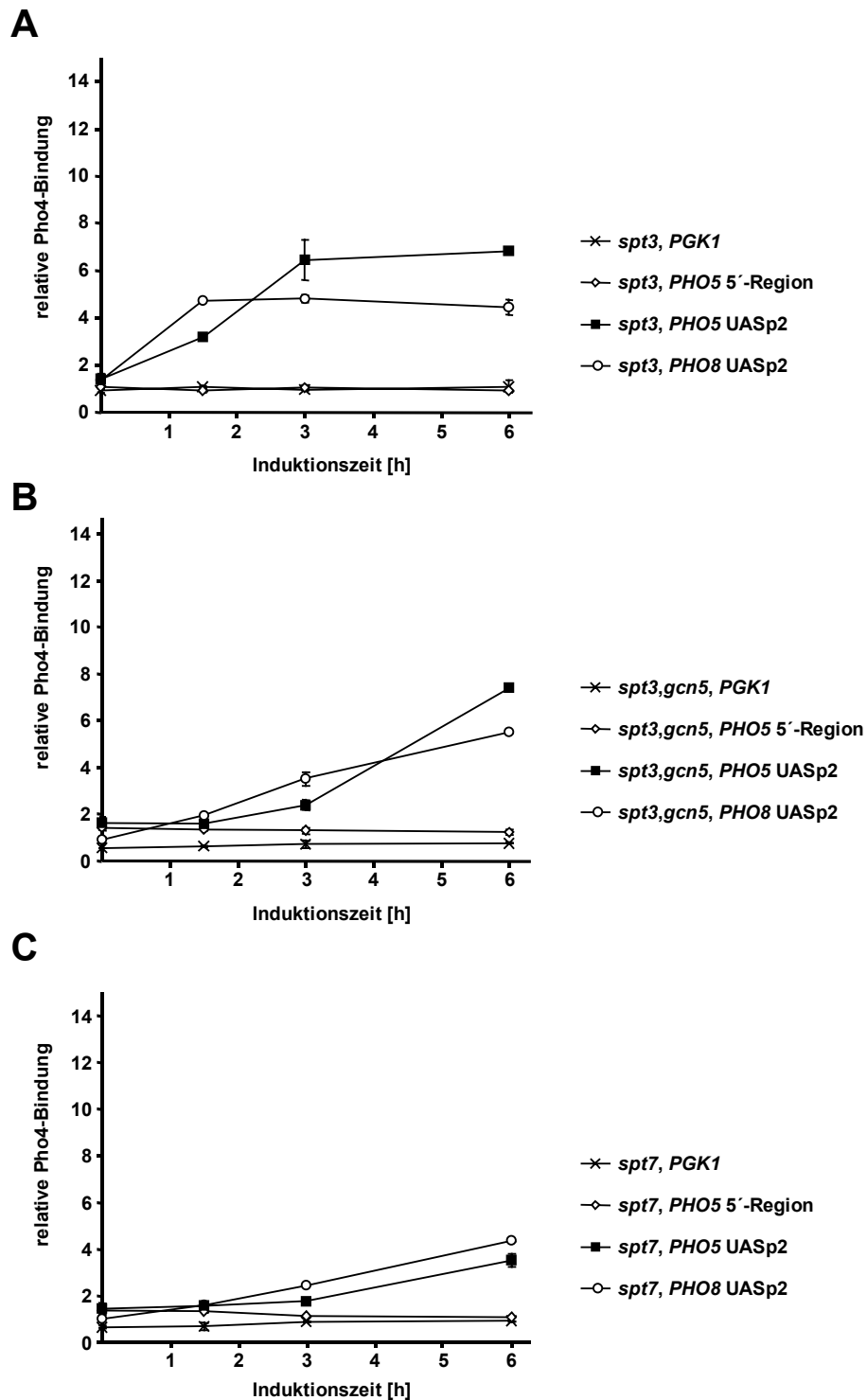
Es ist allerdings auch vorstellbar, dass nicht eine offene Chromatinstruktur, sondern das Vorhandensein von Gcn5 im SAGA-Komplex die kritische Voraussetzung für die TBP-Bindung ist. Daher wurde die Rekrutierung von TBP zusätzlich in einem *snf2*-Stamm gemessen, in dem die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors ebenfalls verlangsamt ist (Abb. 19). Die Bindung von TBP an die TATA-Box des Promotors ist auch in diesem Stamm stark verzögert (Abb. 27, *snf2*, *PHO5* TATA). Es fällt insbesondere auf, dass sich der Verlauf der TBP-Bindung in einem *snf2*- bzw. *gcn5*-Stamm stark ähnelt. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht Gcn5, sondern Chromatinöffnung die wesentliche Voraussetzung für die Rekrutierung von TBP an den *PHO5*-Promotor ist.

### **3.7. Die SAGA-Untereinheiten Gcn5 und Spt3 spielen gemeinsam eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor**

Das Vorhandensein der Pho4-Aktivierungsdomäne ist eine wesentliche Bedingung für die Bindung von Pho4 an UASp2 (Svaren et al., 1994). Pho4-Derivate, die keine Aktivierungsdomäne besitzen, können zwar an das nicht-nukleosomale UASp1-Element binden, wenn sie überexprimiert werden, nicht aber an UASp2 unter ansonsten identischen Bedingungen. Dies deutet darauf hin, dass eine wesentliche Funktion der Aktivierungsdomäne bei der Pho4-Bindung darin besteht, Cofaktoren zusammen mit Pho4 an den *PHO5*-Promotor zu rekrutieren, die Pho4 den Zugang an das nukleosomale UASp2-Element ermöglichen.

Es wurde bereits gezeigt, dass bei dem Prozess der Pho4-Bindung zumindest Gcn5 verzichtbar ist (Abb. 22). Spt3 ist neben Gcn5 eine weitere SAGA-Untereinheit, die eine wichtige Funktion im SAGA-Komplex besitzt. Spt3 ist Bestandteil des Spt-Subkomplexes von SAGA und unterstützt durch Interaktion mit TBP die Rekrutierung des TFIID-Komplexes an Transkriptionsstartstellen (Larschan and Winston, 2001; Bhaumik and Green, 2001). Es ist daher vorstellbar, dass Spt3 durch Interaktion mit TBP oder anderen noch unbekanntem Transkriptionsfaktoren die Bindung von Pho4 am Promotor rückwirkend stabilisiert.

Die Analyse der Pho4-Bindungskinetik in einem phosphatinduzierten *spt3*-Stamm zeigt, dass das Fehlen von Spt3 in den Zellen alleine keinen Einfluss auf die Pho4-Bindung besitzt (Abb. 28A). Wie zuvor schon für Gcn5 gezeigt nimmt somit auch Spt3 keine essentielle Rolle bei der Pho4-Rekrutierung ein. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch bei der Analyse eines Stammes, in dem sowohl Gcn5 als auch Spt3 deletiert sind. Unter diesen Bedingungen ist nach 3 h Phosphatinduktion am *PHO5*-Promotor kein signifikanter Anstieg der Pho4-Bindung feststellbar. Erst nach 6 h erreicht die Pho4-Bindung einen mit der Bindung in einem Wildtyp-Stamm vergleichbaren Wert (vergleiche wt, *PHO5* UASp2 in Abb. 22 mit *spt3, gcn5*, *PHO5* UASp2 in Abb. 28B). Daraus kann gefolgert werden, dass weder Gcn5 noch Spt3 alleine unverzichtbar für die Pho4-Rekrutierung sind, die gleichzeitige Abwesenheit beider jedoch zu einer starken Verzögerung der Pho4-Bindung führt.



**Abbildung 28: Rolle von Gcn5 und Spt3 bei der Pho4-Rekrutierung an den *PHO5*-Promotor.** Zellen der Stämme 8136 $\Delta$ *spt3* (*spt3*) in (A), FY1441 (*spt3,gcn5*) in (B) und FY963 (*spt7*) in (C) wurden in phosphatfreiem Medium induziert, worauf zu verschiedenen Induktionszeitpunkten die Pho4-Bindung am *PHO5*-Promotor mit der ChIP-Technik bestimmt wurde.

Interessanterweise scheint unter diesen Bedingungen die Bindung von Pho4 am *PHO8*-Promotor nicht so stark betroffen zu sein. Zwar ist die Pho4-Bindung nach 1,5 h nicht so stark erhöht wie in einem Wildtyp-Stamm (Abb. 22) oder einem *spt3*-Stamm (Abb. 28A). Aber im Gegensatz zum *PHO5*-Promotor, wo nach 3 h gar kein Anstieg der Pho4-Bindung festgestellt werden kann, ist die Bindung am *PHO8*-Promotor um fast das vierfache erhöht verglichen mit dem 0 h Wert.

Von den zwei Proteinen Spt7 und Spt20 wurde gezeigt, dass sie essentiell für die Integrität des SAGA-Komplex sind (Sternier et al., 1999). Daher weist ein Stamm, dem eines der beiden Proteine fehlt, mindestens die Merkmale eines *gcn5,spt3*-Stammes auf, da Gcn5 und Spt3 die wichtigsten funktionellen Bestandteile von SAGA zu sein scheinen (Larschan and Winston, 2001; Bhaumik and Green, 2001; Barbaric et al., 2003). Dementsprechend ähnelt die Kinetik der Pho4-Bindung an die *PHO5*- und *PHO8*-Promotoren auch sehr stark derjenigen in einem *gcn5,spt3*-Stamm (Abb. 28C), was wiederum die Bedeutung der SAGA-Rekrutierung für die Pho4-Bindung unterstreicht.

## IV. Diskussion

### 1. SAGA-abhängige Histonacetylierung des *PHO5*- und des *PHO8*-Promotors

#### 1.1. SAGA acetyliert das Chromatin des *PHO5*- und des *PHO8*-Promotors in einem frühen Stadium des Aktivierungsprozesses

Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit einen Zusammenhang zwischen Histonacetylierung und transkriptionell kompetentem Chromatin hergestellt. Daher wurde der Acetylierung von Histonen im Promotorbereich bereits sehr früh eine positive Funktion bei der Genaktivierung zugeschrieben (Allfrey et al., 1964; Kuo and Allis, 1998) und darin enthaltene Referenzen). Später konnte gezeigt werden, dass die Transkription vieler Gene in Abwesenheit der Histonacetyltransferase Gcn5 drastisch vermindert ist (Holstege et al., 1998). Am *PHO5*-Promotor wurde schließlich erstmals nachgewiesen, dass die HAT-Aktivität von Gcn5 die Chromatinstruktur eines Promotors direkt beeinflussen kann (Gregory et al., 1998). Im Zuge weiterer Untersuchungen des *PHO5*- und des *PHO8*-Gens stellte sich anschließend heraus, dass die HAT-Aktivität von Gcn5 bei der Genaktivierung für die Remodulierung repressiven Promotorchromatins benötigt wird (Gregory et al., 1999; Barbaric et al., 2001). Allerdings beinhalteten diese Studien keine Analyse des Acetylierungsgrades der Promotorhistone während der Aktivierung, so dass letztlich nicht gezeigt wurde, dass an *PHO5* und *PHO8* tatsächlich Histone das Ziel der HAT-Aktivität von Gcn5 sind. Es wäre schließlich auch vorstellbar, dass Pho4 oder Teile des basalen Transkriptionsapparates acetyliert werden müssen, um ihr volles Aktivierungspotential zu erlangen (Imhof et al., 1997). Aus Studien am *HIS3*-Promotor wusste man zwar, dass Gcn5 zumindest bei der Aktivierung des *HIS3*-Gens Histone in der Promotorregion acetyliert (Kuo et al., 1998). Andererseits waren am *HIS3*-Promotor wiederum die Veränderungen der Chromatinstruktur bei der Aktivierung nicht bekannt, so dass auch hier Histonacetylierung nicht mit Nukleosomen-Remodulierung korreliert werden konnte. Die vordringliche Frage, die im Zuge dieser Arbeit zunächst beantwortet werden sollte, lautete daher, ob sich der Grad der Histonacetylierung am *PHO5*- und *PHO8*-Promotor im Verlauf des Aktivierungsprozesses tatsächlich verändert, und welche Rolle die Histonacetylierung für die Remodulierung der Promotornukleosomen spielt.

Die hier vorgestellten ChIP-Experimente zeigen, dass der *PHO5*- und der *PHO8*-Promotor in einem frühen Stadium der Genaktivierung, das heißt, bereits bevor der Remodulierungsprozess einsetzt,

hyperacetyliert werden. Sowohl am *PHO5*- als auch am *PHO8*-Promotor war es sogar notwendig, die Chromatinremodulierung zu verzögern beziehungsweise zu blockieren, um Histonacetylierung nachweisen zu können. Es hat sich außerdem als wichtig erwiesen, den Remodulierungsprozess in einem Stadium zu blockieren, in dem der Aktivator Pho4 bereits seine Bindungsstellen besetzt hat (Abb. 22; (Gregory et al., 1999), da alle Vorgänge bei der Promotoraktivierung strikt von der Aktivatorbindung abhängen (Fascher et al., 1990; Barbaric et al., 1992).

In einem induzierten *snf2*-Stamm wurde der *PHO8*-Promotor in einem Zustand eingefroren, in dem das Chromatin stark hyperacetyliert ist, aber noch nicht remoduliert wurde (Abb. 8). Wurde der Grad der Histonacetylierung dagegen am vollständig remodulierten Promotor untersucht, konnte keine Hyperacetylierung nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der Hyperacetylierung um einen transienten Zustand bei der Promotoraktivierung handelt, und dass im Zuge der Chromatinremodulierung der ursprüngliche Acetylierungsgrad wieder hergestellt wird. Theoretisch sollte es also auch in einem Wildtyp-Stamm möglich sein, zu einem bestimmten Punkt des Remodulierungsprozesses hyperacetyliertes Chromatin am *PHO8*-Promotor nachweisen zu können. Daher wurde der Verlauf des Acetylierungsgrades nach Beginn der Phosphatinduktion gemessen, jedoch wurde der Promotor zu keinem Zeitpunkt in einem hyperacetylierten Zustand gefunden (nicht gezeigt). Die naheliegendste Erklärung dafür ist, dass der Verlust des Modifikationssignals durch die anschließende Chromatinremodulierung mit extrem hoher Geschwindigkeit abläuft. Histone würden dann, wenn sie einmal hyperacetyliert sind, sofort zum Substrat für Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen und würden damit die Acetylierungsmarkierung wieder verlieren.

Am *PHO5*-Promotor konnte Hyperacetylierung ebenfalls nur in einem induzierten und noch nicht remodulierten *snf2*-Stamm nachgewiesen werden (Abb. 19). Das *PHO5*-Promotorchromatin wird bei der Genaktivierung zunächst hyperacetyliert, bevor die Histone aufgrund des anschließenden Remodulierungsprozesses Kontakt zur Promotor-DNA verlieren (Abb. 18). Die Acetylierung von Histon H3 steigt vom Beginn der Phosphatinduktion bis zum 3 h-Zeitpunkt an. Danach dominiert der einsetzende Verlust von Promotorhistonen das ChIP-Signal und erlaubt keine weiteren Rückschlüsse auf den Acetylierungsgrad der Promotorhistone. Daher muss auch die Frage offen bleiben, ob neben dem Verlust der Histon-DNA-Kontakte auch eine einsetzende Deacetylierung für den Rückgang des ChIP-Signals am *PHO5*- und *PHO8*-Promotor verantwortlich ist.

Zusammenfassend geht aus den Experimenten aber eindeutig hervor, dass der Histonacetylierungsgrad an beiden Promotoren zu Beginn des Aktivierungsprozesses stark zunimmt.

Es wurde außerdem gezeigt, dass SAGA die Histonacetyltransferase-Aktivität bereitstellt, die das Promotorchromatin des *PHO5*- und des *PHO8*-Gens bei der Aktivierung acetyliert. Zum einen wird SAGA von Pho4 an die Promotoren beider Gene rekrutiert (Abb. 21). Zum anderen konnte der hyperacetylierte Zustand des *PHO8*-Promotors nicht in einem Stamm nachgewiesen werden, der keine Gcn5 HAT-Aktivität besitzt (Abb. 12), obwohl auch unter diesen Bedingungen der Remodulierungsprozess nach der Pho4-Bindung blockiert ist (Gregory et al., 1999). Daher kann das Hyperacetylierungssignal nicht auf die Blockierung der Remodulierung alleine zurückgeführt werden.

Diese Ergebnisse stimmen gut mit einer Reihe von Experimenten an verschiedenen anderen Hefepromotoren überein, an denen Veränderungen des jeweiligen Acetylierungsgrades im Verlauf der Geninduktion nachgewiesen werden konnten (Kuo et al., 1998; Deckert and Struhl, 2001). Interessanterweise wurden in einer Studie sowohl Hyper- als auch Hypoacetylierung aktivierter Promotoren in Abhängigkeit von dem jeweils beteiligten Aktivator beobachtet (Deckert and Struhl, 2001). Der aktivierte *HO*-Promotor wird ebenfalls bei der Aktivierung von Gcn5 acetyliert (Cosma et al., 1999), allerdings ist die SAGA-Rekrutierung in diesem Fall von der Rekrutierung des Swi/Snf-Komplexes abhängig, während sowohl am *PHO5*- als auch am *PHO8*-Promotor die beobachtete Hyperacetylierung gerade in Abwesenheit von Swi/Snf beobachtet wurde.

## **1.2. Unterschiedliche Histonpezifität bei der Acetylierung des *PHO5*- und *PHO8*-Promotors**

Überraschenderweise wird Histon H4 am *PHO8*-Promotor, aber nicht am *PHO5*-Promotor bei der Aktivierung hyperacetyliert (Abb. 20). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu anderen Studien, in denen gezeigt wurde, dass SAGA *in vitro* (Grant et al., 1997) und *in vivo* (Suka et al., 2001) Histon H2B und Histon H3, aber nicht Histon H4 acetyliert. Worauf könnte sich dieser Unterschied zurückführen lassen? Es wäre z.B. denkbar, dass am *PHO8*-Promotor im Gegensatz zur Situation an *PHO5* nicht nur SAGA, sondern zusätzlich noch eine Histon H4 modifizierende Aktivität, z.B. NuA4, rekrutiert wird. Dagegen spricht zunächst, dass beide Promotoren von Pho4 aktiviert werden, und Pho4 vermutlich in beiden Fällen dieselben Cofaktoren rekrutiert. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass Gcn5 an *PHO5* und *PHO8* unterschiedliche Lysin-Spezifität

aufweist. In beiden Fällen könnte eine differentielle Rekrutierung anderer Cofaktoren wie Pho2 eine Rolle spielen. Für eine solche Annahme gibt es allerdings keinerlei experimentelle Evidenz. In jedem Fall ist die Acetylierung von Histon H4 am *PHO8*-Promotor vollständig von SAGA abhängig (Abb. 12), was bereits in einem anderen Fall gefunden wurde, und zwar am *S. cerevisiae* *HO*-Promotor (Krebs et al., 1999).

Der Unterschied zwischen *PHO5* und *PHO8* in Bezug auf die Acetylierung von Histon H4 lässt sich vielleicht am ehesten damit erklären, dass in beiden Fällen unterschiedliche Antikörper für die ChIP-Analyse verwendet wurden. Bei der Herstellung des am *PHO8*-Promotor eingesetzten Antikörpers wurde ein tetraacetyliertes H4-Peptid verwendet. Mehrfach acetylierte Peptide kommen auch bei der Herstellung von lediglich für das Antigen Acetyl-Lysin spezifischen Antikörpern zum Einsatz. Diese Antikörper sind sehr unspezifisch gegenüber dem Sequenz-Kontext ihrer Bindungsstelle, weswegen es nicht unwahrscheinlich ist, dass der verwendete Antikörper neben acetyliertem Histon H4 auch noch andere acetylierte Proteine am *PHO8*-Promotor, z.B. acetyliertes Histon H3, erkennt. Andere Antikörper, wie z.B. die in der Untersuchung des *PHO5*-Promotors verwendeten exzessiv auf ihre Spezifität getesteten Histon H4-Antikörper (Suka et al., 2001), waren zum damaligen Zeitpunkt noch nicht verfügbar.

### **1.3. Histonacetylierung beeinflusst den Remodulierungsprozess, bestimmt aber nicht die Grenzen des zu remodulierenden Bereichs**

Am *PHO8*-Promotor wurde mit Primerpaaren für den distalen Promotorbereich eine Hyperacetylierung im Bereich der Nukleosomen  $-5$  und  $-4$  und mit Primerpaaren für den proximalen Promotorbereich im Bereich der Nukleosomen  $-2$  und  $-1$  nachgewiesen. In der angrenzenden 5'-Region und dem codierenden Bereich des *PHO8*-Gens wurde dagegen keine Erhöhung des Acetylierungsgrades festgestellt (Abb. 14). Innerhalb des Auflösungsvermögens der ChIP-Analyse ist die Hyperacetylierung damit relativ genau auf den *PHO8*-Promotorbereich begrenzt. Die Grenze des hyperacetylierten Bereichs am induzierten *PHO5*-Promotor scheint dagegen nicht so scharf gezogen zu sein wie am *PHO8*-Promotor. Mit Primerpaaren, die einen Bereich um das UASp2-Element von *PHO5* sowie die *PHO5*-TATA-Box detektieren, wurde in einem induzierten *snf2*-Stamm eine signifikante Hyperacetylierung des Promotors zu Beginn des Aktivierungsprozesses nachgewiesen. Die direkt benachbarte 5'-Region des *PHO5*-Promotors weist allerdings unter denselben Bedingungen ebenfalls eine deutliche Hyperacetylierung auf (Abb. 19), was sich nicht



hinreichend damit erklären lässt, dass das entsprechende Primerpaar durch seine Nähe zu den remodulierten Nukleosomen Veränderungen an der Promotorregion selber detektiert. Denn in diesem Fall würden nicht nur die Hyperacetylierung, sondern auch der darauf folgende Histonverlust die Stärke des CHIP-Signals beeinflussen. Das ist aber nicht der Fall, da das Acetylierungssignal noch zu einem Zeitpunkt hoch ist, an dem das Signal am Promotor selbst bereits vom einsetzenden Histonverlust dominiert wird. Hyperacetylierung wird an den Nukleosomen der *PHO5* 5'-Region nur in einem *snf2*-Stamm, nicht aber in einem Wildtyp-Stamm beobachtet (Abb. 16). Das heißt, dass die Abwesenheit des Swi/Snf-Komplexes bzw. die fehlende Chromatinöffnung für den erweiterten Bereich der Hyperacetylierung verantwortlich sein könnte. Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass der Bereich der Hyperacetylierung über den anschließend zu remodulierenden Bereich hinausgehen kann. Hyperacetylierung wäre somit eine notwendige aber nicht hinreichende Bedingung für den darauf folgenden Öffnungsprozess.

Was könnte darüber entscheiden, welche Nukleosomen bei der Genaktivierung remoduliert werden, und welche nicht, wenn es nicht der Acetylierungszustand der Histone allein ist? Zum einen könnte eine andere, bisher nicht identifizierte Modifikation ein präzises Signal zur Remodulierung bereitstellen. Es wäre auch vorstellbar, dass die Positionen der UAS-Elemente, an die der Aktivator Pho4 bindet, durch direkte Interaktion von Pho4 mit Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen die Grenzen des zu remodulierenden Bereichs bestimmen. Es wurde bereits gezeigt, dass Pho4 die Chromatin-Remodulierungs-Maschinen Swi/Snf und Ino80 rekrutiert (Steger et al., 2003). Weiterhin könnte auch die Stabilität der einzelnen Nukleosomen eine Rolle spielen. So könnten beispielsweise die Nukleosomen -1 bis -4 des *PHO5*-Promotors leichter zu remodulieren sein als die angrenzenden Nukleosomen, wodurch sich die Grenzen des remodulierten Bereichs genauso ergeben würden.

#### **1.4. Histonacetylierung *per se* hat keinen messbaren Einfluss auf nukleosomale Protein-DNA-Wechselwirkungen**

Aus Studien anderer Arbeitsgruppen haben sich vielfach Hinweise darauf ergeben, dass Histonacetylierung die Chromatinstruktur zu einem flexibleren Substrat machen könnte, was sowohl den Zugang von Transaktivatoren (Lee et al., 1993; Vettese-Dadey et al., 1996) als auch des Transkriptionsapparates (Ura et al., 1997; Nightingale et al., 1998) an Promotorbereiche erleichtern könnte. Es ist allerdings nicht klar, ob die Histonacetylierung einen direkten Einfluss auf Protein-

DNA-Wechselwirkungen im Nukleosom besitzt, oder ob sich die beobachteten Effekte auf andere Ursachen zurückführen lassen, beispielsweise auf Veränderungen von Chromatinstrukturen höherer Ordnung. Die hier sowohl am *PHO5*- als auch am *PHO8*-Promotor erhaltenen Ergebnisse sind ein starkes Indiz dafür, dass die Histonacetylierung intranukleosomale Wechselwirkungen nicht beeinflusst. Das am stärksten acetylierte Chromatin in den hier gezeigten Experimenten ist das geschlossene Chromatin des induzierten *PHO8*-Promotors in einem *snf2*-Stammhintergrund (Abb. 8). Diese Chromatinstruktur ist aber gleichzeitig die am wenigsten zugängliche, die am *PHO8*-Promotor überhaupt gefunden wurde (Gregory et al., 1999). Eine Analyse mit Restriktionsnukleasen hat gezeigt, dass die Zugänglichkeit der DNA im Promotorbereich in einem *snf2*-Stamm so niedrig ist wie in einem Stamm, in dem das Gen für den Aktivator Pho4 zerstört wurde (Barbaric et al., 1992; Gregory et al., 1999). Daraus kann geschlossen werden, dass Histonacetylierung auf die Chromatinstruktur des *PHO8*-Promotors keinen direkten Einfluss hat, zumindest soweit das mit Nukleasezugänglichkeit bestimmt werden kann.

Die Ergebnisse am *PHO5*-Promotor unterstützen dieses Modell. In einem induzierten *snf2*-Stamm kann innerhalb der ersten 1,5 h ein signifikanter Anstieg der Histonacetylierung beobachtet werden (Abb. 19B und 19C), ohne dass gleichzeitig Protein-DNA-Wechselwirkungen abgeschwächt werden (Abb. 19A). Es muss betont werden, dass die Ergebnisse durchaus mit Veränderungen höherer Chromatinstrukturen in Einklang zu bringen sind. Die Kristallstruktur des Nukleosoms hat gezeigt, dass die Histonschwänze eine wesentliche Rolle für die Ausbildung internukleosomaler Kontakte spielen könnten (Luger et al., 1997). Sollten diese Kontakte durch Acetylierung der Histonschwänze abgeschwächt werden, könnte das die Zugänglichkeit der Chromatinstruktur eines Promotors erhöhen, ohne dass die Veränderungen durch Messung der Nukleasezugänglichkeit nachweisbar wären.

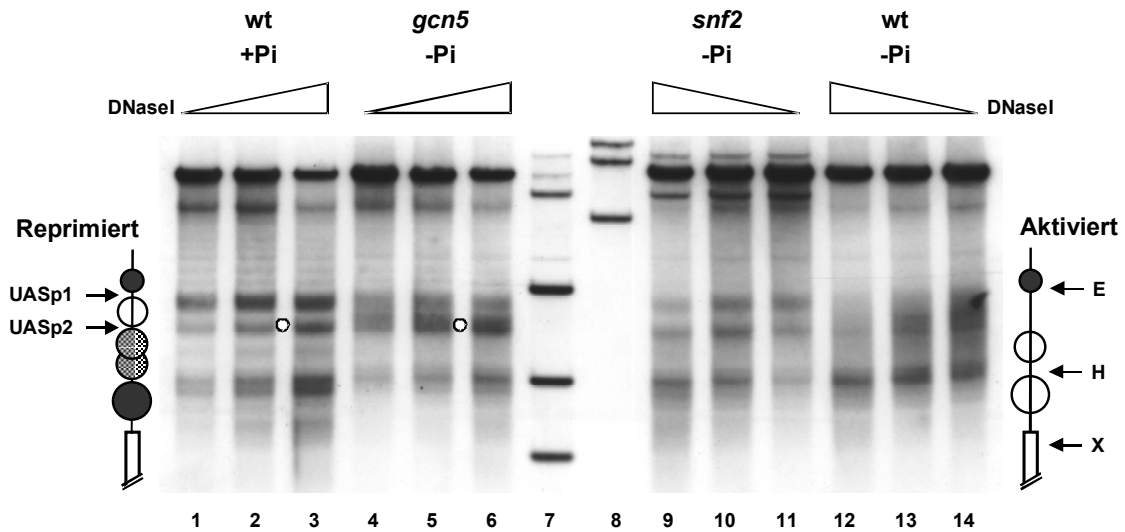
### **1.5. Welche Rolle spielt die Histonacetylierung bei der Chromatinremodulierung?**

Ungefähr zwei Jahre nach Aufnahme der Arbeit an den hier vorgestellten Experimenten wurde die Hypothese formuliert, dass der Modifikationszustand von Histonen eine Chromatinregion für die Aktivierung oder Repression der Genexpression markieren könnte (Strahl and Allis, 2000). Aus dem Zusammenspiel der verschiedenen Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung usw. könnte sich ein „Histon-Code“ zusammensetzen, der dann auf verschiedenen Wegen die Rekrutierung oder Aktivität anderer Chromatin-modifizierender Enzyme

beeinflussen würde. Aus verschiedenen Gründen ist diese Hypothese sehr attraktiv. Zum einen würde sie erklären, wie eine einzige Modifikation vollständig unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Funktionen haben kann. Beispielsweise ist die Phosphorylierung von Serin 10 an Histon H3 an der Kondensation mitotischen Chromatins, aber auch bei der Aktivierung der Transkription, was ja eine Öffnung dicht gepackter Chromatinstrukturen beinhaltet, beteiligt. Gemäß der Histon-Code Hypothese wäre es vorstellbar, dass die Phosphorylierung dieses Restes alleine weder den einen noch den anderen Prozess unterstützt, sondern nur in Zusammenhang mit einer oder mehreren zusätzlichen Modifikationen. Beispielsweise könnte der Modifikationszustand des unmittelbar benachbarten Lysin 9 den Ausschlag geben, ob ein transkriptionsaktivierendes Protein an die Chromatinregion rekrutiert werden kann, oder ein Protein, dass die Chromosomenkondensation begünstigt.

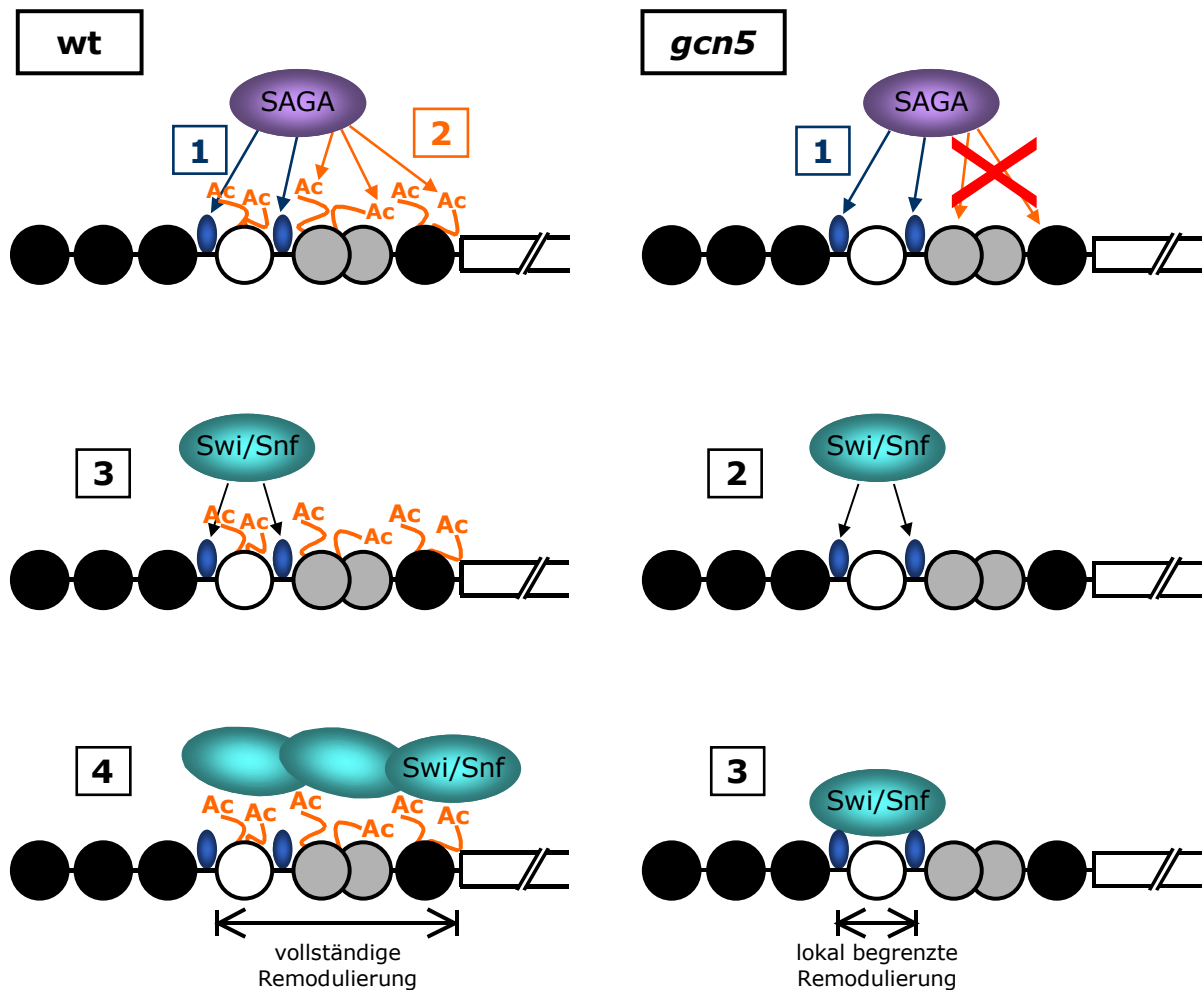
Hinweise, dass die posttranslationale Modifikation von Histonen ein Signal für nachfolgende Prozesse darstellen könnte, stammen auch aus den hier gezeigten Experimenten. Pho4 ist in Abwesenheit von Gcn5, und damit in Abwesenheit von Histonacetylierung, an den *PHO8*-Promotor gebunden und ist darüber hinaus in der Lage, mit dem Swi/Snf-Komplex zu interagieren (Syntichaki et al., 2000; Steger et al., 2003). Allerdings ist die Zugänglichkeit des distalen *PHO8*-Promotors, die in direktem Zusammenhang zur Swi/Snf-Rekrutierung stehen sollte, in Abwesenheit von Gcn5 HAT-Aktivität nur lokal in unmittelbarer Umgebung des UASp2-Elements erhöht (Gregory et al., 1999). Zur Veranschaulichung ist eine Gegenüberstellung der verschiedenen Chromatinzustände des *PHO8*-Promotors, wie sie ursprünglich in (Gregory et al., 1999) publiziert wurde, hier in anderer Form noch einmal gezeigt.

Der durch die offenen Kreise markierte Bereich (Abb. 29, Spuren 4-6) zeigt die lokale Remodulierung in einem induzierten *gcn5*-Stamm im Vergleich zum selben Bereich in einem reprimierten Wildtyp-Stamm (Abb. 29, Spuren 1-3). Die Zugänglichkeit unterscheidet sich deutlich von der Remodulierung in einem aktivierten Wildtyp-Stamm (Spuren 12-14). Die Chromatinremodulierung, die in dem induzierten *gcn5*-Stamm beobachtet wurde, findet nur in unmittelbarer Nähe der Pho4-Bindungsstelle UASp2 statt und ist nicht an weiter flussabwärts gelegenen Promotorregionen zu beobachten.



**Abbildung 29: Die verschiedenen Chromatinzustände des *PHO8*-Promotors (Gregory et al., 1999).** Isolierte Zellkerne aus einem Wildtyp- (CY337), einem *gcn5*- (CY53379) oder einem *snf2*- (CY407) Stamm, die jeweils in Gegenwart (+Pi) oder Abwesenheit (-Pi) von anorganischem Phosphat angezogen worden waren, wurden mit 0,25 (Spuren 1, 4, 9 und 12) 0,5 (Spuren 2, 5, 10 und 13) oder 1 (Spuren 3, 6, 11 und 14) U/ml DNaseI für 20 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert, mit *Bgl*II behandelt, auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Blotmembran überführt und mit einem *Pvu*II-*Xho*I-Fragment (Barbaric et al., 1992) hybridisiert. In Spur 7 sind Fragmente zur Größenbestimmung aufgetragen, die aus der Behandlung genomischer DNA mit *Bgl*II und entweder *Eco*RV (E), *Hind*III (H) oder *Xho*I (X) stammen. Spur 8 enthält Fragmente, die bei der erneuten Hybridisierung der Membran mit einer anderen Sonde zur Größenbestimmung dienen, und deshalb hier irrelevant sind. Schematische Darstellungen des reprimierten und des aktivierten *PHO8*-Promotors sind auf der rechten bzw. auf der linken Seite der Abbildung gezeigt. Sie geben die Positionen der Nucleosomen, der UAS-Elemente und der zur Herstellung der Fragmente zur Größenmarkierung verwendeten Restriktionsschnittstellen an. Es wurde zwischen stabilen Nucleosomen (schwarz), teilstabilen Nucleosomen (grau) und instabilen Nucleosomen (weiß) unterschieden (Barbaric et al., 1992).

Aus welchem Grund sollte das Fehlen von Hyperacetylierung die Swi/Snf-abhängige Remodulierung lokal eingrenzen? Eine Erklärung wäre, dass die Bromodomäne, eine Proteindomäne, die in einigen Chromatin-assoziierten Proteinen vorhanden ist (Haynes et al., 1992), den Acetylierungszustand des Chromatins wahrnehmen kann. Von der Bromodomäne der Histonacetyltransferase PCAF wurde gezeigt, dass sie bevorzugt an acetylierte Lysin-Reste in den Histschwänzen bindet (Dhalluin et al., 1999; Owen et al., 2000). Snf2 besitzt ebenfalls eine Bromodomäne, weshalb es nahe liegt anzunehmen, dass die Wechselwirkung des Swi/Snf-Komplexes mit dem *PHO8*-Promotor durch Histonacetylierung beeinflusst werden könnte. Ein Modell, dass die differentielle Swi/Snf-Rekrutierung in Abwesenheit von Histonacetylierung erklären könnte, ist in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30: Möglicher Einfluss der Promotoracetylierung auf die lokale Ausbreitung der Chromatinremodulierung.**

In einem Wildtyp-Stamm (Abb. 30, wt) wird der SAGA-Komplex vom Transkriptionsaktivator Pho4 an den *PHO8*-Promotor rekrutiert (Abb. 30, 1), worauf Gcn5 die Promotornucleosomen acetyliert (Abb. 30, 2). Pho4 rekrutiert außerdem den Swi/Snf-Komplex (Abb. 30, 3), der schließlich über Wechselwirkungen mit den acetylierten Histonschwänzen im gesamten Promotorbereich stabilisiert wird (Abb. 30, 4). Dagegen wird der Promotor in Abwesenheit von Gcn5 nicht hyperacetyliert (Abb. 30, *gcn5*, 1), weshalb der Swi/Snf-Komplex nur über den Kontakt mit Pho4 rekrutiert wird (Abb. 30, *gcn5*, 2) und daher nur die Nucleosomen in der Nachbarschaft der Pho4-Bindungsstelle remodulieren kann (Abb. 30, *gcn5*, 3). Das Grundprinzip dieser Idee, dass Histonacetylierung die Bindung einer Nucleosomen-Remodulierungs-Maschine mittels einer Bromodomäne stabilisieren kann, wurde kürzlich *in vitro* in der Arbeitsgruppe von Jerry Workman bestätigt (Hassan et al., 2002). Zukünftige Experimente werden zeigen, wie die Rekrutierung des

Swi/Snf-Komplexes mit der Histonacetylierung an den Promotoren der *PHO5*- und *PHO8*-Gene zusammenhängt.

## **2. Die Chromatinstruktur des aktiven *PHO5*-Promotors**

### **2.1. Am vollständig remodulierten *PHO5*-Promotor lassen sich keine Histon-DNA-Kontakte nachweisen**

Hypersensitivität gegenüber DNaseI wird seit langem als ein herausragendes Kennzeichen aktiver Gene angesehen. Wie der Begriff selber andeutet, ist die DNA solcher Regionen extrem empfindlich für die Spaltung durch DNaseI oder eine Reihe anderer Nukleasen. Es liegen zahlreiche Hinweise vor, dass hypersensitive Bereiche Verstärker („enhancer“)- oder Promotor-Elemente enthalten und aufgrund ihrer Zugänglichkeit als Eintrittsstellen für interagierende Transkriptionsfaktoren dienen, die wiederum für die Regulation der betreffenden Gene benötigt werden. Die Chromatinstruktur hypersensitiver Stellen ist schwierig zu bestimmen. Anfängliche Untersuchungen schienen ein klares Bild zu ergeben, aufgrund dessen die DNA in diesen Bereichen keine Nukleosomen enthält. Darüber hinaus gab es Anzeichen, dass sich hypersensitive Bereiche in einer Reihe von *in vivo*-Studien wie nackte DNA verhalten (McGhee et al., 1981; Karpov et al., 1984; Thomas and Elgin, 1988). In den folgenden Jahren wurden die Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen entdeckt, die in verschiedenen *in vitro*-Ansätzen Nukleosomen in andersartige Strukturen umformen konnten. Diese Beobachtungen ließen die Möglichkeit erahnen, dass es ein sogenanntes „dauerhaft remoduliertes Nukleosom“ geben könnte, das die den hypersensitiven Bereichen zugrunde liegende Struktur bilden könnte. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass solche alternative Nukleosomenstrukturen existieren, die eine Vielzahl von Protein-DNA-Kontakten ausbilden, aber dennoch nicht gegen die Spaltung durch Restriktionsendonukleasen schützen (Aalfs and Kingston, 2000).

Die 600 bp große zugängliche Region im aktivierten *PHO5*-Promotor stellt ein Paradebeispiel einer hypersensitiven Stelle dar. Die Nukleasezugänglichkeit dieses Bereiches in verschiedenen experimentellen Systemen würde widerspruchsfrei mit einem Modell übereinstimmen, in dem der aktivierte und vollständig geöffnete *PHO5*-Promotor frei von Histonen wäre. Andererseits kann der Promotor sehr schnell vom offenen zurück in den geschlossenen Zustand überführt werden (Schmid et al., 1992), was darauf hinweist, dass die Promotorhistone bei der Aktivierung nicht irreversibel

von der Promotor-DNA abgelöst werden, was wiederum das Vorliegen alternativer Nukleosomenstrukturen am offenen Promotor eine attraktive Hypothese erscheinen lässt. Diese Befunde zeigen jedenfalls, dass andere Techniken als Nukleasespaltung erforderlich sind, um zwischen den verschiedenen möglichen Modellen unterscheiden zu können.

Im Zuge dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass die ChIP-Technik eine solche Alternative darstellt. Ihre wichtigste Eigenschaft ist, dass sie als echte *in vivo*-Technik anzusehen ist, da ganze Zellen mit Formaldehyd behandelt werden, wodurch alle Protein-DNA-Interaktionen den Zustand der lebenden Zelle widerspiegeln. Im Vergleich zu anderen Verfahren, bei denen Nukleosomen zunächst aus dem Zellkern isoliert werden müssen, um sie anschließend *in vitro* analysieren zu können, ist ein artifizieller Verlust oder die Neuassoziation von Proteinen auf einem bestimmten DNA-Fragment bei der Isolierung ausgeschlossen. In einem Nukleosom existieren zahlreiche Protein-DNA-Kontakte, die mithilfe der ChIP-Technik erfasst werden können und auch erfasst werden: an 14 Kontaktstellen werden insgesamt 142 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein-Rückgrat und dem Phosphodiester-Rückgrat der DNA ausgebildet (Luger et al., 1997). Dagegen reichen weitaus weniger Protein-DNA-Wechselwirkungen aus, um ein DNA-Fragment zusammen mit einem daran gebundenen Protein wie z.B. Pho4, das an einer einzigen Bindungsstelle ca. 20 Kontakte zur DNA ausbildet (Shimizu et al., 1997), mit hoher Effizienz zu coimmunopräzipitieren.

Bei der Analyse der Nukleosomenstruktur des *PHO5*-Promotors wurde im Zuge der transkriptionellen Induktion ein progressiver Verlust des Histon-ChIP-Signals an der Promotorregion beobachtet (Abb. 17-18). Die einfachste Interpretation der Daten führt daher zu dem Schluss, dass am aktiven *PHO5*-Promotor keine Histone vorhanden sind, und der Promotor als nackte DNA vorliegt. Alle früheren Ergebnisse, die mit Nukleasezugänglichkeits-Assays erhalten wurden, stimmen vollständig mit diesem Modell überein. Der aktive *PHO5*-Promotor ist komplett für Nukleasen zugänglich und weist nach vollständiger Spaltung mit *Micrococcus*-Nuklease weder eine Nukleosomenleiter noch geschützte Mononukleosomen bzw. Nukleosomenkernpartikel über der Promotorregion auf (Almer et al., 1986). Würden die Promotorhistone in einer permanent veränderten Nukleosomenstruktur, wie sie beispielsweise von (Schnitzler et al., 1998) und (Lorch et al., 1998) beschrieben worden ist, auf der DNA verbleiben, müsste man annehmen, dass diese Strukturen ein Minimum an Histon-DNA-Kontakten ausbilden, was wiederum für die Immunopräzipitation ausreichen sollte. Formell kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der aktive

*PHO5*-Promotor in einer neuartigen Nukleosomenstruktur vorliegt, in der die Histone keine DNA-Kontakte ausbilden, die mit der ChIP-Technik erfasst werden könnten.

## **2.2. Die Bestimmung der Histondichte ist eine essentielle Kontrolle bei der quantitativen Analyse von Histonmodifikationen in dynamischem Chromatin**

Gewöhnlich wird die ChIP-Technik zur Messung des Histonmodifikationsgrades einer Chromatinregion eingesetzt, wofür Antikörper verwendet werden, die gegen die N-terminalen Histschwänze hergestellt worden sind. Zur Bestimmung der Histondichte einer Chromatinregion sind diese Antikörper allerdings nicht geeignet, da in diesen Regionen posttranslationale Modifikationen stattfinden. Daher kann so nicht zwischen Zu- oder Abnahme der Histondichte und Veränderungen des Histonmodifikationszustands differenziert werden. In dieser Arbeit wurde daher zunächst auf einen Stamm zurückgegriffen, der nur eine Kopie des Gens für Histon H2B trägt, und zwar einer modifizierten Form, die am N-Terminus mit dem FLAG-Tag fusioniert ist (Recht and Osley, 1999). Dieser Stamm wurde in Kombination mit einem anti-FLAG-Antikörper zur Bestimmung der Histon H2B-Dichte am *PHO5*-Promotor verwendet. Entscheidend ist, dass der FLAG-Tag eine komplett künstliche Sequenz ist, die nicht posttranslational modifiziert wird, so dass die Bindung des FLAG-Antikörpers nur von der Histondichte der jeweils untersuchten Chromatinregion abhängt. Aufgrund derselben Überlegung wurden anschließend Antikörper gegen die C-terminalen Bereiche der Histone H3 und H4 verwendet. Mit allen Antikörpern wurde beobachtet, dass die Histondichte spezifisch am *PHO5*-Promotor bei Aktivierung von *PHO5* durch Phosphatinduktion drastisch abnimmt.

Im Zuge dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass die Bestimmung der Histondichte bei der Analyse von Histonmodifikationen in transkriptionell aktivem Chromatin eine essentielle Kontrolle ist, die in allen bisher veröffentlichten Studien vernachlässigt wurde. Besonders der Vergleich der *GALI*- und *PHO5*-Promotoren in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht, dass ohne diese Kontrolle keine Aussage über den Modifizierungsgrad einer Chromatinregion möglich ist. An beiden Promotoren wurden nach 4 h Phosphatinduktion mit Antikörpern gegen acetylierte oder methylierte Histone sehr niedrige ChIP-Signale erhalten (Abb. 16). Daraus würde man ohne zusätzliche Informationen auf einen extrem niedrigen Histonmodifikationsgrad beider Promotoren schließen. Ein vollständig anderes Bild ergibt sich aber, wenn man die jeweilige Histondichte beider Chromatinregionen in die Analyse mit einbezieht. Während die Histondichte am *GALI*-Promotor



mit der anderer, nicht remodulierter Bereiche vergleichbar ist, sind unter diesen Bedingungen am *PHO5*-Promotor nahezu alle Histon-DNA-Kontakte aufgehoben (Abb. 17-18). Daher ist der Modifikationsgrad am *GALI*-Promotor tatsächlich sehr niedrig, wogegen das niedrige ChIP-Signal am *PHO5*-Promotor auf den Verlust der Histon-DNA-Kontakte durch die Chromatinremodulierung zurückzuführen ist.

### 3. Ein neuartiger Aktivierungszustand des *PHO5*-Promotors

#### 3.1. Bindung von Pho4 an das geschlossene Chromatin des *PHO5*-Promotors

Pho4 ist der Auslöser aller bislang untersuchten Prozesse bei der Aktivierung des *PHO5*- und *PHO8*-Promotors. Die Rekrutierung des SAGA-Komplexes (Abb. 21), die SAGA-abhängige Histonacetylierung (Abb. 11), sowie die Remodulierung der Promotornukleosomen (Fascher et al., 1990; Barbaric et al., 1992) setzen die Bindung von Pho4 an die Promotoren des *PHO5*- und des *PHO8*-Gens voraus. Am *PHO5*-Promotor bindet Pho4 an die zwei DNA-Bindungselemente UASp1 und UASp2. Während UASp1 in dem hypersensitiven Bereich zwischen den Nukleosomen -2 und -3 liegt und damit auch im geschlossenen Promotor zugänglich für Faktorbindung ist (Venter et al., 1994), ist UASp2 Teil der DNA von Nukleosom -2 (Almer et al., 1986). Aus den Ergebnissen vergangener Studien wurde geschlossen, dass sich die Anwesenheit von Nukleosom -2 und die Bindung von Pho4 an UASp2 gegenseitig ausschließen (Venter et al., 1994). Bindung von Pho4 an beide UAS-Elemente im *PHO5*-Promotor konnte immer nur unter Bedingungen nachgewiesen werden, bei denen das Chromatin des *PHO5*-Promotors geöffnet ist (Svaren et al., 1994; Venter et al., 1994). Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, wie Pho4 die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors induzieren kann, wenn Chromatinöffnung wiederum eine Voraussetzung für die vollständige Bindung von Pho4 an beide UAS-Elemente zu sein scheint.

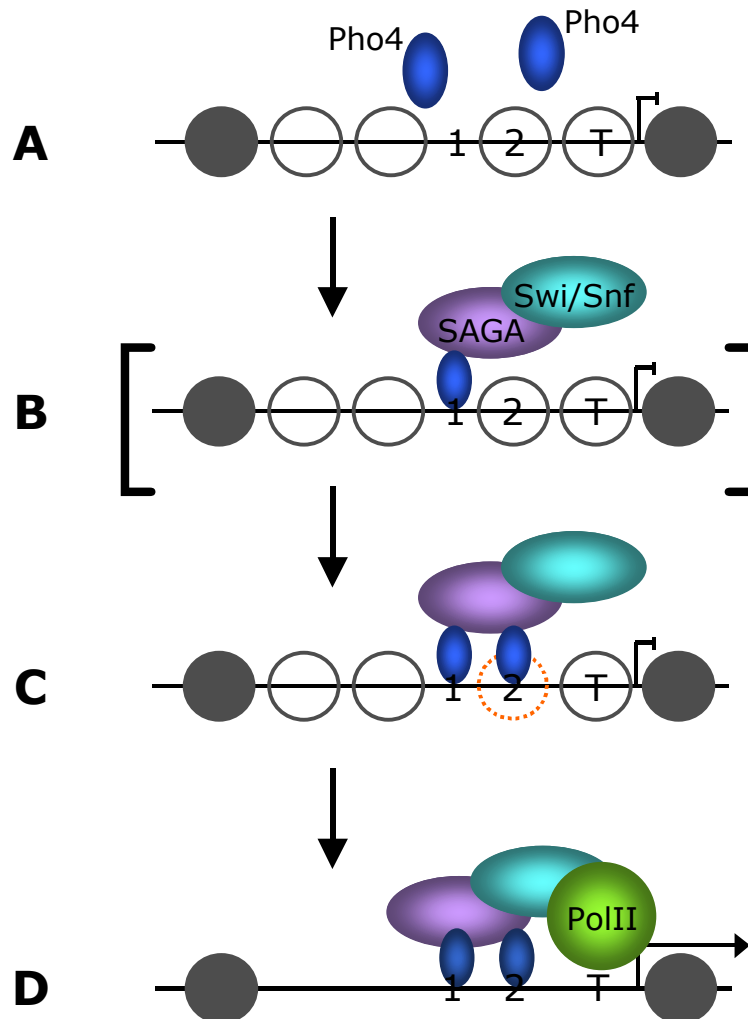
In dieser Arbeit wurde ein Zwischenzustand bei der Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors gefunden, in dem Pho4 in einer Weise an den geschlossenen *PHO5*-Promotor bindet, die der Bindung an den offenen Promotor entspricht (Abb. 22). Dieser Aktivierungszustand konnte unabhängig davon nachgewiesen werden, ob die Chromatinremodulierung durch das Ausschalten der Gcn5 HAT-Aktivität (Abb. 22) oder der Nukleosomen-Remodulierungs-Aktivität von Swi/Snf (Abb. 23) verzögert wurde. Insbesondere muss hervorgehoben werden, dass die Pho4-Bindung an

UASp2 unter Bedingungen nachgewiesen werden konnte, bei denen die direkt benachbarte Restriktionsschnittstelle *Clal* komplett unzugänglich ist (Abb. 25) (Barbaric et al., 2001).

Obwohl Pho4-Bindung an das nukleosomale UASp2-Element nachgewiesen werden konnte, bedeutet das nicht, dass das Nukleosom -2 keine Bedeutung für die Bindung von Pho4 an UASp2 besitzt. Denn es ist zu berücksichtigen, dass diese Bindung strikt von der Pho4-Aktivierungsdomäne abhängig ist (Svaren et al., 1994). Es ist daher sogar wahrscheinlich, dass bei der Bindung von Pho4 an das nukleosomale UASp2-Element eine lokale Veränderung der Chromatinstruktur stattfindet, die mit Restriktionsnukleasen nicht nachgewiesen werden kann. Die Aktivierungsdomäne von Pho4 könnte zur Rekrutierung von Cofaktoren benötigt werden, die das Chromatin für die Bindung von Pho4 an das nukleosomale UASp2 zugänglich machen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pho4 den SAGA-Komplex an den *PHO5*-Promotor rekrutiert (Abb. 21), und zwar bereits bei der Bindung an das geschlossene Promotorchromatin (Abb. 26). Darüber hinaus spielen die SAGA-Untereinheiten Gcn5 und Spt3 eine Rolle bei der Bindung von Pho4 an das nukleosomale UASp2-Element (Abb. 28).

Wie könnte eine Veränderung der Chromatinstruktur aussehen, die sich nicht mit Nukleasezugänglichkeit nachweisen lässt, aber dennoch die Bindung von Pho4 zulässt? Eine Möglichkeit wäre, dass sich das Histonoktamer des Nukleosoms -2 auf der DNA um wenige Basenpaare verschiebt, so dass in der neuen Position andere Basen Kontakte zu den Histonen ausbilden. Auf diese Weise könnte eine Bindungsstelle, die im reprimierten Zustand in direktem Kontakt zu dem Histonoktamer steht, an die Oberfläche des Nukleosoms gelangen und so für Faktorbindung verfügbar werden. Es ist auch vorstellbar, dass nicht der globuläre Teil der Histone die Bindungsstelle abschirmt, sondern die Histonschwänze. Der SAGA-Komplex könnte in beiden Fällen die Aufhebung möglicher Histon-DNA-Kontakte unterstützen, was entweder zur Repositionierung des Histonoktamers oder zur Ablösung der Histonschwänze vom UASp2-Element führen würde. Schließlich könnte vermutet werden, dass ein Verlust der (H2A)(H2B)-Dimere spezifisch an Nukleosom -2 stattfindet, da bekannt ist, dass (H3)<sub>2</sub>(H4)<sub>2</sub>-Tetramere gut gegen Nukleasen schützen. Dagegen spricht, dass immer, wenn ein Verlust von Histonen bei der Chromatinremodulierung auftrat, ein gleichzeitiger Rückgang des Signals für Histon H3, H4 und H2B beobachtet wurde. Hochauflösende ChIP-Experimente an Nukleosom -2, bei denen der Chromatinextrakt vor der Immunoprecipitation mit Restriktionsnukleasen gespalten wird, sollten diese Frage beantworten.

### 3.2. Ein Modell für Pho4-Bindung, Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung am *PHO5*-Promotor



**Abbildung 31:** Ein neuartiger Zwischenzustand bei der Aktivierung des *PHO5*-Promotors.

Der Ablauf der einzelnen Schritte bei der Pho4-Bindung und der anschließenden Chromatinöffnung am *PHO5*-Promotor ist in Abbildung 31 dargestellt. Phosphatinduktion führt zur Akkumulation von transkriptionell aktivem Pho4 im Zellkern, wo Pho4 auf das Chromatin des geschlossenen Promotors trifft (Abb. 31A). Die hier gezeigten Ergebnisse lassen keinen Rückschluss darauf zu, worin der wirklich erste Schritt der Pho4-Bindung besteht. Eine Möglichkeit ist, dass Pho4 gleich an beide UAS-Elemente bindet (Abb. 31C). Dafür spricht, dass die Bindung von Pho4 an den

*PHO5*-Promotor kooperativ ist (Barbaric et al., 1998), und zur kooperativen Bindung beide UAS-Elemente benötigt werden. Außerdem ist dieser Zwischenzustand experimentell nachweisbar. Eine attraktives Modell wäre, dass Pho4 zunächst nur an UASp1 bindet und möglicherweise mithilfe von SAGA die Bindung an das nukleosomale UASp2 ermöglicht (Abb. 31B). Ein solcher Übergangszustand könnte so labil sein, dass er experimentell nicht nachgewiesen werden kann. Letztlich führt die Bindung von Pho4 an beide UAS-Elemente des geschlossenen *PHO5*-Promotors zu Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung (Abb. 31D).

### **3.3. Die Rolle des SAGA-Komplexes bei der Pho4-Bindung an den geschlossenen *PHO5*-Promotor**

Die Bindung von Pho4 benötigt entweder Gcn5 oder Spt3. Fehlen beide Proteine in der Zelle, ist die Bindung von Pho4 sowohl an den *PHO5*- als auch an den *PHO8*-Promotor stark verzögert (Abb. 28B). Die Funktion von Gcn5 bei der Pho4-Bindung könnte darin bestehen, durch Acetylierung des *PHO5*-Promotors und speziell von Nukleosom -2 die Histon-DNA-Kontakte abzuschwächen und so die Zugänglichkeit des UASp2-Elements zu erhöhen. Von Spt3 wurde gezeigt, dass es mit TBP interagieren kann und so zur Transkriptionsaktivierung beitragen kann (Dudley et al., 1999). Wie Spt3 die Bindung von Pho4 unterstützen könnte, ist unklar, da Spt3 nach der Bindung von Transkriptionsfaktoren über SAGA an Promotoren rekrutiert zu werden scheint. Es ist denkbar, dass die Stabilisierung von TBP am Promotor rückwirkend über Spt3 und SAGA wieder die Bindung von Pho4 stabilisiert. Dagegen spricht aber, dass der *PHO5*- und der *PHO8*-Promotor auch in Stämmen remodeliert werden können, in denen die jeweilige TATA-Box an *PHO5* bzw. *PHO8* zerstört wurde.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass eine oder mehrere andere SAGA-Untereinheiten zur Bindung von Pho4 benötigt werden, dass diese kritischen Untereinheiten aber in einem *gcn5,spt3*-Stamm nicht mehr an den Promotor rekrutiert werden. Das wäre dann der Fall, wenn der SAGA-Komplex bei gleichzeitigem Fehlen von Gcn5 und Spt3 nicht mehr intakt wäre. Evidenz dafür, dass SAGA in einem *gcn5,spt3*-Stamm intakt ist, liegt bislang nur aus Gelfiltrations-Experimenten vor (Sterner et al., 1999), so dass weitere Untersuchungen beispielsweise durch Western-Blot-Analyse nötig wären um zu zeigen, dass alle SAGA-Untereinheiten vorhanden sind. Andere Untereinheiten könnten beispielsweise zur Kooperativität der Pho4-Bindung beitragen.

### 3.4. Welcher Aktivierungsschritt am *PHO5*-Promotor ist in einem *gcn5*-Stamm verzögert?

Es konnte gezeigt werden, dass die HAT-Aktivität von Gcn5 eine wichtige Funktion bei der Aktivierung des *PHO5*-Promotors besitzt. Bei der Chromatinöffnung werden die Histone des *PHO5*-Promotors von Gcn5 acetyliert, bevor sie den Kontakt zur Promotor-DNA verlieren. Kann damit die Frage beantwortet werden, warum die Chromatinöffnung in Abwesenheit von Gcn5 HAT-Aktivität verzögert ist? Zunächst ist festzustellen, dass die Pho4-Bindung in einem *gcn5*-Stamm nicht verzögert ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Rekrutierung des SAGA-Komplexes selber mit der gleichen Geschwindigkeit wie in einem Wildtyp-Stamm abläuft. Der erste Schritt, der in Abwesenheit von Gcn5 nachweislich langsamer abläuft, ist die Bindung von TBP an den Promotor. Es muss aber angenommen werden, dass diese Verzögerung keine direkte Folge des Fehlens von Gcn5 ist. Vielmehr scheint die fehlende Chromatinremodulierung der Grund zu sein, da der gleiche Effekt auch in einem induzierten *snf2*-Stamm beobachtet wurde. Zum anderen verläuft die SAGA-Rekrutierung mit normaler Geschwindigkeit, so dass auch die Rekrutierung von Spt3 gewährleistet sein dürfte.

Die naheliegendste Erklärung für die langsamere Öffnungskinetik ist, dass die Rekrutierung des Swi/Snf-Komplexes an das *PHO5*-Promotorchromatin in einem Stamm ohne Gcn5 HAT-Aktivität nicht mit normaler Geschwindigkeit ablaufen kann. Für dieses Modell sprechen mehrere experimentelle Befunde dieser und anderer Arbeiten. Jerry Workman und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Swi/Snf-Komplex *in vitro* durch Histonacetylierung am Chromatin stabilisiert wird (Hassan et al., 2002). Durch seine Bromodomäne bleibt Swi/Snf sogar am Chromatin assoziiert, nachdem das Aktivatorprotein, durch das Swi/Snf ursprünglich rekrutiert wurde, durch Konkurrenz von dem Chromatin-Template abgelöst wurde. Weiterhin ist die Chromatinöffnung des *PHO5*-Promotors in Abwesenheit von Swi/Snf selbst ebenfalls verzögert (Barbaric et al., 2001). Sollte Swi/Snf in Abwesenheit von Histonacetylierung überhaupt nicht rekrutiert bzw. am Promotor stabilisiert werden können, würde man exakt dieses Ergebnis erwarten.

### 4. Dynamische Rolle der Promotorhistone bei der Transkriptionsaktivierung des *PHO5*-Promotors

Zum Abschluss soll versucht werden, die gezeigten Ergebnisse zu einem kohärenten Modell zusammenzufassen, das alle Veränderungen der Chromatinstruktur des *PHO5*-Promotors bei der

Transkriptionsaktivierung umfasst (Abb. 32). Bevor diese Arbeit begonnen wurde, konnte man zwei Chromatinzustände des *PHO5*-Promotors unterscheiden: das geschlossene Chromatin des reprimierten Promotors (Abb. 32A) und die offene Chromatinstruktur des aktiven Promotors (Abb. 32D). Die hier gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass im Verlauf der Chromatinremodulierung mindestens noch zwei weitere Zwischenzustände auftreten, die weder dem geschlossenen noch dem offenen Zustand entsprechen.

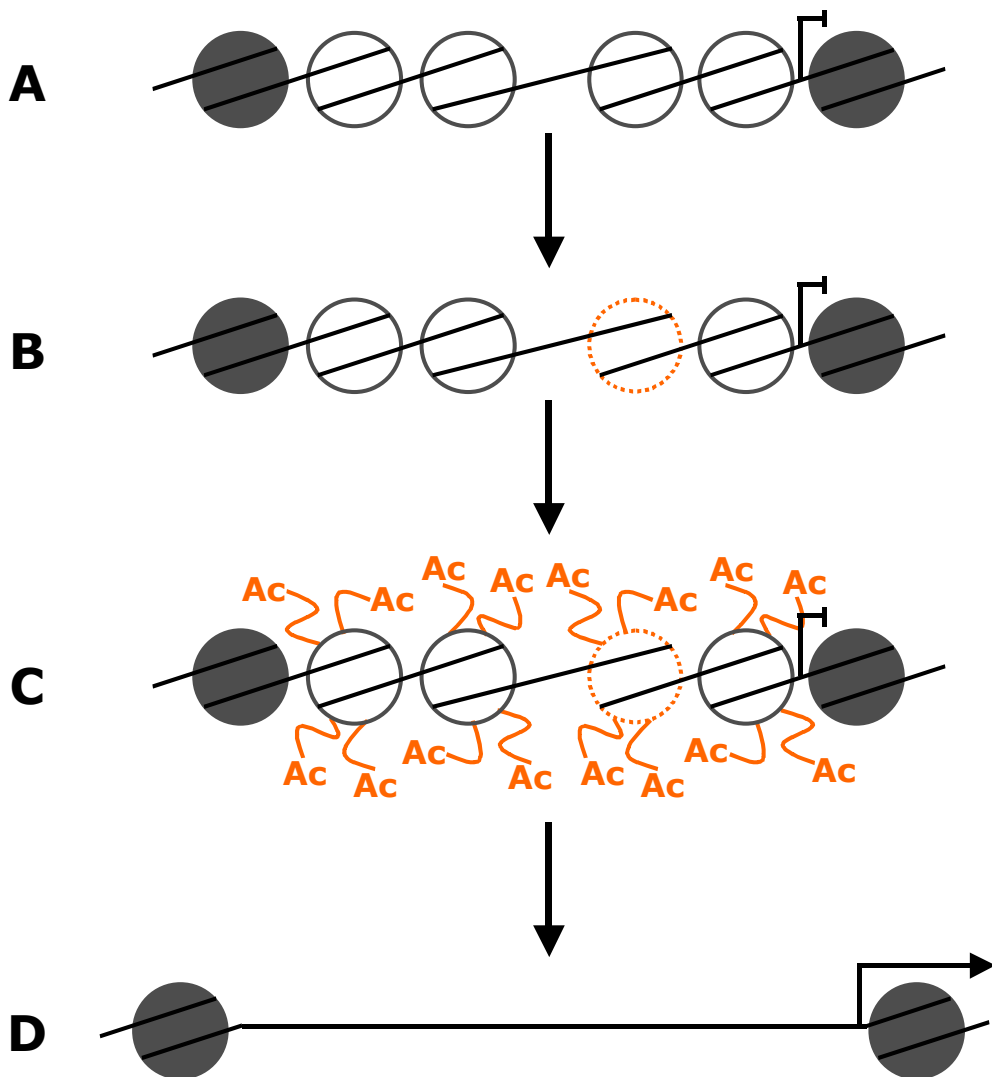


Abbildung 32: Veränderung der Chromatinstruktur des *PHO5*-Promotors im Verlauf der Genaktivierung.

Bei der Aktivierung bindet zunächst Pho4 in voller Stärke an das geschlossene Promotorchromatin. Dabei bleibt das Nucleosom -2, welches das UASp2-Element bedeckt, zwar weiterhin unzugänglich für Restriktionsnukleasen. Die Abhängigkeit der Pho4-Bindung von seiner

Aktivierungsdomäne sowie von den SAGA-Untereinheiten Gcn5 und Spt3 belegen aber, dass an diesem Nukleosom eine strukturelle Veränderung stattfindet, die nicht mit Nukleasezugänglichkeit gemessen werden kann (Abb. 32B). Anschließend wird SAGA an den Promotor rekrutiert und acetyliert die Histone des Promotorchromatins (Abb. 32C). Auch in diesem Zustand ist der *PHO5*-Promotor komplett unzugänglich für Restriktionsnukleasen. Die Hyperacetylierung ist höchstwahrscheinlich ein entscheidender Faktor für die Stabilisierung von Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen am Promotorchromatin, deren Remodulierungs-Aktivität schließlich zum vollständigen Verlust der Histon-DNA-Kontakte am *PHO5*-Promotor führt (Abb. 32D). Am offenen Promotor sind also nicht nur keine kanonischen Nukleosomen mehr nachweisbar, sondern auch keine Histone, was stark gegen die Annahme spricht, dass die Nukleosomen in einem dauerhaft remodulierten Zustand vorliegen. Damit ist es erstmals gelungen, die Veränderungen an den Histonen eines induzierbaren eukaryontischen Promotors vom Beginn der Aktivierung bis zum maximal remodulierten Zustand zu verfolgen.

## 5. Ausblick

Sicherlich eine der spannendsten Fragen, die der Histonverlust am *PHO5*-Promotor aufwirft, ist die, was mit den Promotorhistonen passiert, nachdem sie von der DNA abgelöst wurden. Zwei alternative Modelle drängen sich auf. Die Histonoktamere könnten in *cis* entweder flussaufwärts oder flussabwärts auf der DNA repositioniert werden („sliding“). Dadurch sollten in Promotornähe Anordnungen extrem dicht gepackter Nukleosomen entstehen. Würde dieses Modell zutreffen, wäre eine der nächsten Fragen, ob die Promotorhistone die Acetylierungsmarkierung noch tragen, oder ob sie unmittelbar nach der Remodulierung deacetyliert werden, um den Promotor nach dem Schließen wieder in seinen ursprünglichen Zustand zu versetzen. Alternativ könnten die Histone auch in *trans* von der Promotor-DNA abgelöst werden. Werden die Histone in diesem Fall auf Akzeptormoleküle übertragen, wofür beispielsweise Chaperone oder Nukleinsäuren, vielleicht sogar Nukleosomen-Remodulierungs-Maschinen in Frage kämen. Weiterhin drängt sich die Frage auf, ob ein Austausch der Histone bei der Öffnung stattfindet, oder ob beim Schließen des Promotors dieselben Histone wieder auf der DNA positioniert werden. Eine zukünftige Herausforderung am *PHO5*-Promotor besteht sicherlich darin, experimentelle Systeme zu entwickeln, mit denen derartig komplexe Fragestellungen *in vivo* untersucht werden können.

## V. Zusammenfassung

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Chromatinstruktur des induzierbaren *PHO5*- und *PHO8*-Gens aus *S. cerevisiae* den Aktivierungsprozess von der Bindung von Transkriptionsaktivatoren bis hin zur Transkription wesentlich beeinflusst. Insbesondere in den Promotorbereichen findet bei Transkriptionsaktivierung eine dramatische Chromatinremodulierung statt. Am *PHO5*-Promotor werden vier Nukleosomen, die unter reprimierenden Bedingungen im Promotor exakt positioniert sind, remoduliert. Dadurch wird der Promotor in einem Bereich von ca. 600 bp vollständig zugänglich. Am *PHO8*-Promotor wird ein zwischen den beiden Pho4-Bindungsstellen gelegenes Nukleosom vollständig remoduliert, und auch die Nukleasezugänglichkeit des proximalen Promotors erhöht sich deutlich. An beiden Promotoren wird sowohl die Histonacetyltransferase-Aktivität des SAGA-Komplexes als auch die Nukleosomen-Remodulierungs-Aktivität des Swi/Snf-Komplexes für die Aktivierung benötigt. Während allerdings der *PHO8*-Promotor vollständig von Swi/Snf und SAGA abhängig ist, kommt es am *PHO5*-Promotor in deren Abwesenheit lediglich zu einer starken Verlangsamung der Öffnung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Histonacetylierung durch den SAGA-Komplex bei Aktivatorbindung und Chromatinremodulierung am *PHO5*- und am *PHO8*-Promotor aufzuklären.

Zunächst wurde die Frage gestellt, ob wirklich Histone und nicht andere Proteine das Ziel der Acetylierungs-Aktivität des SAGA-Komplexes an *PHO5* und *PHO8* sind. Zu diesem Zweck wurde die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) als neue Technik im Labor etabliert. Die ChIP-Technik hat sich als äußerst wertvolle Methode bei der Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen *in vivo* erwiesen. Während andere Verfahren wie z.B. DMS-Footprint nur unterscheiden können, ob eine bestimmte DNA-Sequenz von einem Protein gebunden ist oder nicht, aber keinen Rückschluss darauf erlaubt, um welches Protein es sich handelt, geht die ChIP-Technik gleich zwei Schritte weiter. Mit ihrer Hilfe kann nicht nur die Identität eines gebundenen Proteins bestimmt werden, sondern, durch Auswahl geeigneter Antikörper, auch der posttranslationale Modifikationszustand des Proteins.

Mithilfe der ChIP-Technik konnte gezeigt werden, dass bei Phosphatinduktion SAGA vom Transkriptionsaktivator Pho4 an den *PHO5*- und den *PHO8*-Promotor rekrutiert wird. Unerwarteterweise ist der *PHO8*-Promotor im remodulierten und transkriptionell aktiven Zustand



aber nicht hyperacetyliert. Verhindert man jedoch die Chromatinremodulierung durch Ausschalten des Swi/Snf-Komplexes, kann in der Tat unter Induktionsbedingungen Hyperacetylierung an Histon H3 und H4 nachgewiesen werden. Dieser erhöhte Histonacetylierungsgrad ist vollständig von Pho4-Bindung abhängig, und es konnte gezeigt werden, dass die Hyperacetylierung auf die Nukleosomen des *PHO8*-Promotors begrenzt ist, die im weiteren Verlauf des Aktivierungsprozesses remoduliert werden. Damit scheint SAGA am *PHO8*-Promotor ein transientes Hyperacetylierungssignal zu erzeugen, das für den weiteren Fortlauf des Remodulierungsprozesses benötigt wird.

Die Analyse des Histonmodifikationszustands wurde im folgenden auf den *PHO5*-Promotor ausgedehnt. Bei der Verwendung verschiedener Antikörper in ChIP-Experimenten wurde bei der Aktivierung des *PHO5*-Promotors ein dramatischer Rückgang nicht nur des Acetylierungssignals an allen Histonen, sondern auch des Methylierungssignals beobachtet. Es stellte sich aber heraus, dass dieser Effekt nicht auf einen Verlust posttranslationaler Modifikationen, sondern auf den Verlust der Histone selbst zurückzuführen ist. Am vollständig geöffneten Promotor haben die Histone alle DNA-Kontakte, die mit der ChIP-Technik erfassbar sind, verloren. Bevor die Histone von der DNA abgelöst werden, konnte jedoch auch bei der Aktivierung des *PHO5*-Promotors für das Histon H3 eine Zunahme des Acetylierungsgrads nachgewiesen werden, was erklären könnte, warum der Remodulierungsprozess in Abwesenheit der Gcn5-HAT-Aktivität verzögert ist. Diese Ergebnisse werfen ein neues Licht auf die strukturelle Natur DNaseI-hypersensitiver Stellen. Erstmals wurde am Beispiel des *PHO5*-Promotors direkt gezeigt, dass ein hypersensitiver Bereich als nackte DNA vorliegen kann, an die nicht nur keine kanonischen Nukleosomen, sondern auch keine Histone mehr gebunden sind.

Schließlich wurde für den SAGA-Komplex eine Rolle bei der Bindung von Pho4 an den geschlossenen *PHO5*-Promotor gefunden. Vorausgegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass eine der zwei Pho4-Bindungsstellen durch das positionierte Nukleosom -2 besetzt ist. Die Bindung von Pho4 ist aber in hohem Maße kooperativ und benötigt daher beide UAS-Elemente, was wohl der Grund dafür ist, dass Pho4-Bindung bislang nur am geöffneten Promotor nachgewiesen werden konnte. Im Zuge dieser Arbeit wurde in Abwesenheit der Histonacetyltransferase Gcn5 ein neuartiger Aktivierungszustand des Promotorchromatins identifiziert, bei dem Pho4 an den geschlossenen *PHO5*-Promotor gebunden ist und darüber hinaus Cofaktoren rekrutieren kann, die für die Chromatinremodulierung wichtig sind wie z.B. den SAGA-Komplex. Gleichzeitig zeigte

sich aber, dass die Rekrutierung von SAGA (oder auch eines Gcn5 defizienten SAGA-Komplexes) notwendig für die Bindung von Pho4 ist. Die Gcn5 abhängige Histonacetylierung scheint kritisch für einen anschließenden Schritt zu sein, nämlich für die Bindung von TBP an den Promotor. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Ursache für die verzögerte Chromatinöffnung in einem Gcn5 defizienten Stamm in einem Schritt zwischen Pho4- und TBP-Bindung zu finden ist. Damit ist es zum ersten Mal gelungen, den Zustand der Histone und des Wechselspiels zwischen Histonen und Transkriptionsfaktoren eines induzierbaren eukaryontischen Promotors vom Beginn der Aktivierung bis zum maximal remodulierten Zustand zu verfolgen.

## VI. Literatur

- Aalfs, J.D. and Kingston, R.E. (2000). What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem. Sci.* *25*, 548-555.
- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Côté, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J.* *18*, 5108-5119.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *51*, 786-794.
- Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A., and Hörz, W. (1986). Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* *5*, 2689-2696.
- Bannister, A.J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* *109*, 801-806.
- Barbaric, S., Fascher, K.D., and Hörz, W. (1992). Activation of the weakly regulated *PHO8* promoter in *S. cerevisiae*: Chromatin transition and binding sites for the positive regulator protein Pho4. *Nucl. Acids Res.* *20*, 1031-1038.
- Barbaric, S., Münsterkötter, M., Goding, C., and Hörz, W. (1998). Cooperative Pho2-Pho4 interactions at the *PHO5* promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho4 at UASp2. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2629-2639.
- Barbaric, S., Münsterkötter, M., Svaren, J., and Hörz, W. (1996). The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter. *Nucl. Acids Res.* *24*, 4479-4486.
- Barbaric, S., Reinke, H., and Hörz, W. (2003). Multiple Mechanistically Distinct Functions of SAGA at the *PHO5* Promoter. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3468-3476.

- Barbaric,S., Walker,J., Schmid,A., Svejstrup,J.Q., and Hörz,W. (2001). Increasing the rate of chromatin remodeling and gene activation - a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *EMBO J.* 20, 4944-4951.
- Bhaumik,S.R. and Green,M.R. (2001). SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.* 15, 1935-1945.
- Boyer,L.A., Langer,M.R., Crowley,K.A., Tan,S., Denu,J.M., and Peterson,C.L. (2002). Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol. Cell* 10, 935-942.
- Boyer,L.A., Logie,C., Bonte,E., Becker,P.B., Wade,P.A., Wolffe,A.P., Wu,C., Imbalzano,A.N., and Peterson,C.L. (2000). Functional delineation of three groups of the ATP-dependent family of chromatin remodeling enzymes. *J. Biol. Chem.* 275, 18864-18870.
- Brownell,J.E., Zhou,J.X., Ranalli,T., Kobayashi,R., Edmondson,D.G., Roth,S.Y., and Allis,C.D. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase a: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Cairns,B.R., Kim,Y.J., Sayre,M.H., Laurent,B.C., and Kornberg,R.D. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1950-1954.
- Cairns,B.R., Lorch,Y., Li,Y., Zhang,M.C., Lacomis,L., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Du,J., Laurent,B., and Kornberg,R.D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87, 1249-1260.
- Cosma,M.P., Tanaka,T., and Nasmyth,K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311.
- Côté,J., Quinn,J., Workman,J.L., and Peterson,C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53-60.
- Daignan-Fornier,B. and Fink,G.R. (1992). Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and BAS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6746-6750.

- Deckert, J. and Struhl, K. (2001). Histone Acetylation at Promoters Is Differentially Affected by Specific Activators and Repressors. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2726-2735.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* *399*, 491-496.
- Dudley, A.M., Rougeulle, C., and Winston, F. (1999). The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator-binding step in vivo. *Genes Dev.* *13*, 2940-2945.
- Eisen, J.A., Sweder, K.S., and Hanawalt, P.C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucl. Acids Res.* *23*, 2715-2723.
- Elfring, L.K., Deuring, R., Mccallum, C.M., Peterson, C.L., and Tamkun, J.W. (1994). Identification and characterization of Drosophila relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2225-2234.
- Fascher, K.D., Schmitz, J., and Hörz, W. (1990). Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the *PHO5* promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* *9*, 2523-2528.
- Fascher, K.D., Schmitz, J., and Hörz, W. (1993). Structural and functional requirements for the chromatin transition at the *PHO5* promoter in *Saccharomyces cerevisiae* upon *PHO5* activation. *J. Mol. Biol.* *231*, 658-667.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M., and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* *269*, 29-36.
- Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A.A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Stillman, D.J., and Côté, J. (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol. Cell* *5*, 927-937.
- Gaudreau, L., Schmid, A., Blaschke, D., Ptashne, M., and Hörz, W. (1997). RNA polymerase II holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast *PHO5* promoter. *Cell* *89*, 55-62.
- Gelius, B., Wade, P., Wolffe, A., Wrangé, O., and Ostlund Farrants, A.K. (1999). Characterization of a chromatin remodelling activity in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.* *262*, 426-434.

Georgakopoulos,T. and Thireos,G. (1992). Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* *11*, 4145-4152.

Goldmark,J.P., Fazzio,T.G., Estep,P.W., Church,G.M., and Tsukiyama,T. (2000). The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* *103*, 423-433.

Grant,P.A., Duggan,L., Côté,J., Roberts,S.M., Brownell,J.E., Candau,R., Ohba,R., Owen-Hughes,T., Allis,C.D., Winston,F., Berger,S.L., and Workman,J.L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: Characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt-Ada) complex. *Genes Dev.* *11*, 1640-1650.

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

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

Gregory,P.D., Wagner,K., and Hörz,W. (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp. Cell Res.* *265*, 195-202.

Hamiche,A., Sandaltzopoulos,R., Gdula,D.A., and Wu,C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell* *97*, 833-842.

Hassan,A.H., Prochasson,P., Neely,K.E., Galasinski,S.C., Chandy,M., Carrozza,M.J., and Workman,J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* *111*, 369-379.

Hayes,J.J. and Hansen,J.C. (2001). Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 124-129.

Haynes,S.R., Dollard,C., Winston,F., Beck,S., Trowsdale,J., and Dawid,I.B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* *20*, 2603.

- Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D., and Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.* 6, 2288-2298.
- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.
- Horn, P.J. and Peterson, C.L. (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* 297, 1824-1827.
- Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* 7, 689-692.
- Jacobs, S.A. and Khorasanizadeh, S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* 295, 2080-2083.
- John, S., Howe, L., Tafrov, S.T., Grant, P.A., Sternglanz, R., and Workman, J.L. (2000). The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev.* 14, 1196-1208.
- Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51, 458-476.
- Kaffman, A., Rank, N.M., O'Neill, E.M., Huang, L.S., and O'Shea, E.K. (1998a). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* 396, 482-486.
- Kaffman, A., Rank, N.M., and O'Shea, E.K. (1998b). Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* 12, 2673-2683.
- Karpov, V.L., Preobrazhenskaya, O.V., and Mirzabekov, A.D. (1984). Chromatin structure of hsp 70 genes, activated by heat shock: selective removal of histones from the coding region and their absence from the 5' region. *Cell* 36, 423-431.
- Kelley, R.I. (1973). Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1588-1594.

- Kimura,A., Umehara,T., and Horikoshi,M. (2002). Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat. Genet.* 32, 370-377.
- Komeili,A. and O'Shea,E.K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* 284, 977-980.
- Kornberg,R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868.
- Kornberg,R.D. and Thomas,J.O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184, 865-868.
- Kortschak,R.D., Tucker,P.W., and Saint,R. (2000). ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem. Sci.* 25, 294-299.
- Krebs,J.E., Kuo,M.H., Allis,C.D., and Peterson,C.L. (1999). Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev.* 13, 1412-1421.
- Kuo,M.H. and Allis,C.D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20, 615-626.
- Kuo,M.H. and Allis,C.D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19, 425-433.
- Kuo,M.H., Brownell,J.E., Sobel,R.E., Ranalli,T.A., Cook,R.G., Edmondson,D.G., Roth,S.Y., and Allis,C.D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269-272.
- Kuo,M.H., Zhou,J., Jambeck,P., Churchill,M.E.A., and Allis,C.D. (1998). The histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes *in vivo*. *Genes Dev.* 12, 627-639.
- Kuras,L. and Struhl,K. (1999). Binding of TBP to promoters *in vivo* is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399, 609-613.
- Kurdistani,S.K. and Grunstein,M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 276-284.



- Larschan,E. and Winston,F. (2001). The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev.* *15*, 1946-1956.
- Laurent,B.C., Treich,I., and Carlson,M. (1993). The yeast SNF2/SWI2-protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* *7*, 583-591.
- Längst,G., Bonte,E.J., Corona,D.F., and Becker,P.B. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* *97*, 843-852.
- Lee,D.Y., Hayes,J.J., Pruss,D., and Wolffe,A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* *72*, 73-84.
- Lee,T.I., Causton,H.C., Holstege,F.C., Shen,W.C., Hannett,N., Jennings,E.G., Winston,F., Green,M.R., and Young,R.A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* *405*, 701-704.
- Lenburg,M.E. and O'Shea,E.K. (1996). Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 383-387.
- Lo,W.S., Duggan,L., Tolga,N.C., Emre, Belotserkovskya,R., Lane,W.S., Shiekhattar,R., and Berger,S.L. (2001). Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* *293*, 1142-1146.
- Lohr,D. and van Holde,K.E. (1975). Yeast chromatin subunit structure. *Science* *188*, 165-166.
- Lorch,Y., Cairns,B.R., Zhang,M.C., and Kornberg,R.D. (1998). Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell* *94*, 29-34.
- Luger,K., Mader,A.W., Richmond,R.K., Sargent,D.F., and Richmond,T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- McGhee,J.D., Wood,W.I., Dolan,M., Engel,J.D., and Felsenfeld,G. (1981). A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult beta-globin gene is accessible to nuclease digestion. *Cell* *27*, 45-55.
- Meijsing,S.H. and Ehrenhofer-Murray,A.E. (2001). The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *15*, 3169-3182.

- Ng,H.H. and Bird,A. (2000). Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.* 25, 121-126.
- Ng,H.H., Robert,F., Young,R.A., and Struhl,K. (2002). Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* 16, 806-819.
- Ng,H.H., Robert,F., Young,R.A., and Struhl,K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell* 11, 709-719.
- Nielsen,S.J., Schneider,R., Bauer,U.M., Bannister,A.J., Morrison,A., O'Carroll,D., Firestein,R., Cleary,M., Jenuwein,T., Herrera,R.E., and Kouzarides,T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.
- Nightingale,K.P., Wellinger,R.E., Sogo,J.M., and Becker,P.B. (1998). Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila* hsp26 gene in chromatin. *EMBO J.* 17, 2865-2876.
- O'Neill,E.M., Kaffman,A., Jolly,E.R., and O'Shea,E.K. (1996). Regulation of Pho4 nuclear localization by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *Science* 271, 209-212.
- Ogata,R.T. and Gilbert,W. (1979). DNA-binding site of lac repressor probed by dimethylsulfate methylation of lac operator. *J. Mol. Biol.* 132, 709-728.
- Ogawa,N. and Oshima,Y. (1990). Functional domains of a positive regulatory protein, PHO4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2224-2236.
- Okabe,I., Bailey,L.C., Attree,O., Srinivasan,S., Perkel,J.M., Laurent,B.C., Carlson,M., Nelson,D.L., and Nussbaum,R.L. (1992). Cloning of human and bovine homologs of SNF2/SWI2: a global activator of transcription in yeast *S. cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 20, 4649-4655.
- Osada,S., Sutton,A., Muster,N., Brown,C.E., Yates,J.R., III, Sternglanz,R., and Workman,J.L. (2001). The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1. *Genes Dev.* 15, 3155-3168.

- Owen,D.J., Ornaghi,P., Yang,J.C., Lowe,N., Evans,P.R., Ballario,P., Neuhaus,D., Filetici,P., and Travers,A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.* *19*, 6141-6149.
- Peterson,C.L. (2002). HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol. Cell* *9*, 921-922.
- Peterson,C.L. and Workman,J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 187-192.
- Pollard,K.J. and Peterson,C.L. (1997). Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6212-6222.
- Recht,J. and Osley,M.A. (1999). Mutations in both the structured domain and N-terminus of histone H2B bypass the requirement for Swi-Snf in yeast. *EMBO J.* *18*, 229-240.
- Reid,J.L., Iyer,V.R., Brown,P.O., and Struhl,K. (2000). Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol. Cell* *6*, 1297-1307.
- Richmond,E. and Peterson,C.L. (1996). Functional analysis of the DNA-stimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2. *Nucl. Acids Res.* *24*, 3685-3692.
- Roberts,S.M. and Winston,F. (1997). Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf-Swi and Srb-mediator complexes. *Genetics* *147*, 451-465.
- Roth,S.Y., Denu,J.M., and Allis,C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 81-120.
- Santos-Rosa,H., Schneider,R., Bannister,A.J., Sherriff,J., Bernstein,B.E., Emre,N.C., Schreiber,S.L., Mellor,J., and Kouzarides,T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407-411.
- Sawa,H., Kouike,H., and Okano,H. (2000). Components of the SWI/SNF complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Mol. Cell* *6*, 617-624.
- Schmid,A., Fascher,K.D., and Hörz,W. (1992). Nucleosome disruption at the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction occurs in the absence of DNA replication. *Cell* *71*, 853-864.

- Schnitzler,G., Sif,S., and Kingston,R.E. (1998). Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* 94, 17-27.
- Sendra,R., Tse,C., and Hansen,J.C. (2000). The yeast histone acetyltransferase A2 complex, but not free Gcn5p, binds stably to nucleosomal arrays. *J. Biol. Chem.* 275, 24928-24934.
- Shimizu,T., Toumoto,A., Ihara,K., Shimizu,M., Kyogoku,Y., Ogawa,N., Oshima,Y., and Hakoshima,T. (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: Flanking base recognition. *EMBO J.* 16, 4689-4697.
- Steger,D.J., Haswell,E.S., Miller,A.L., Wentz,S.R., and O'Shea,E.K. (2003). Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* 299, 114-116.
- Sterner,D.E. and Berger,S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 435-459.
- Sterner,D.E., Grant,P.A., Roberts,S.M., Duggan,L.J., Belotserkovskaya,R., Pacella,L.A., Winston,F., Workman,J.L., and Berger,S.L. (1999). Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol. Cell. Biol.* 19, 86-98.
- Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Sudarsanam,P. and Winston,F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.* 16, 345-351.
- Suka,N., Luo,K., and Grunstein,M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat. Genet.* 32, 378-383.
- Suka,N., Suka,Y., Carmen,A.A., Wu,J., and Grunstein,M. (2001). Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol. Cell* 8, 473-479.
- Svaren,J. and Hörz,W. (1997). Transcription factors vs nucleosomes: Regulation of the *PHO5* promoter in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 22, 93-97.

- Svaren,J., Schmitz,J., and Hörz,W. (1994). The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the *PHO5* promoter. *EMBO J.* *13*, 4856-4862.
- Syntichaki,P., Topalidou,I., and Thireos,G. (2000). The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling. *Nature* *404*, 414-417.
- Szerlong,H., Saha,A., and Cairns,B.R. (2003). The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin remodeling. *EMBO J.* *22*, 3175-3187.
- Thomas,G.H. and Elgin,S.C.R. (1988). Protein/DNA architecture of the DNase I hypersensitive region of the *Drosophila* hsp26 promoter. *EMBO J.* *7*, 2191-2201.
- Ura,K., Kurumizaka,H., Dimitrov,S., Almouzni,G., and Wolffe,A.P. (1997). Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J.* *16*, 2096-2107.
- Vary,J.C., Jr., Gangaraju,V.K., Qin,J., Landel,C.C., Kooperberg,C., Bartholomew,B., and Tsukiyama,T. (2003). Yeast Isw1p forms two separable complexes in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 80-91.
- Venter,U., Svaren,J., Schmitz,J., Schmid,A., and Hörz,W. (1994). A nucleosome precludes binding of the transcription factor Pho4 in vivo to a critical target site in the *PHO5* promoter. *EMBO J.* *13*, 4848-4855.
- Vettese-Dadey,M., Grant,P.A., Hebbes,T.R., Crane-Robinson,C., Allis,C.D., and Workman,J.L. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J.* *15*, 2508-2518.
- Vignali,M., Hassan,A.H., Neely,K.E., and Workman,J.L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1899-1910.
- Vogelauer,M., Wu,J., Suka,N., and Grunstein,M. (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* *408*, 495-498.

- Wang,L., Liu,L., and Berger,S.L. (1998). Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev.* *12*, 640-653.
- Wei,Y., Yu,L., Bowen,J., Gorovsky,M.A., and Allis,C.D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* *97*, 99-109.
- Whitehouse,I., Flaus,A., Cairns,B.R., White,M.F., Workman,J.L., and Owen,H.T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* *400*, 784-787.
- Wittschieben,B.O., Otero,G., de Bizemont,T., Fellows,J., Erdjument,B.H., Ohba,R., Li,Y., Allis,C.D., Tempst,P., and Svejstrup,J.Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* *4*, 123-128.
- Wyrick,J.J., Holstege,F.C., Jennings,E.G., Causton,H.C., Shore,D., Grunstein,M., Lander,E.S., and Young,R.A. (1999). Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature* *402*, 418-421.
- Zhang,Y. and Reinberg,D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* *15*, 2343-2360.

## VII. Anhang

### 1. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angstrom
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
d.h.	das heißt
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
HAT	Histonacetyltransferase
h	Stunde(n)
IP	Immunopräzipitation
kb	kilo Basepaar(e)
kd	kilo Dalton
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA
N-	Amino-
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PolII	RNA-Polymerase II
PolIII	RNA-Polymerase III
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S-Phase	DNA-Synthesephase

---

SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	$\alpha, \alpha, \alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)methylamin
U	Einheiten
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel



## 2. Lebenslauf

21. Sept. 1973                      geboren in München
- Juli 1992                              Abitur am humanistischen Wilhelmsgymnasium in München
- Okt. 1992 – Sept. 1993              Grundwehrdienst in Mittenwald
- Nov. 1993 – Juni 1998              Biologiestudium an der LMU München
- Nov. 1995              Vordiplom
- Juni 1998              Diplom  
Diplomarbeit "Untersuchungen zur Regulation des bHLH-Proteins  
PENR2 und Klonierung eines neuen bHLH-Proteins aus *Aspergillus  
nidulans*" bei Prof. Dr. A.A. Brakhage, LMU München
- seit Okt. 1998                      Doktorarbeit "Die Rolle des SAGA-Komplexes bei Aktivatorbindung  
und Chromatinöffnung am *PHO5*- und *PHO8*-Promotor in  
*Saccharomyces cerevisiae*" bei Prof. Dr. W. Hörz, LMU München

### 3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Wolfram Hörz, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Hauptsächlich seine Unterstützung hat bewirkt, dass ich die Zeit in seinem Labor in jeder Hinsicht als Gewinn empfunden habe.

Bei Prof. Dirk Eick bedanke ich mich sehr dafür, dass er die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat, und für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ich danke Prof. Regine Kahmann für die anfängliche Betreuung und die Möglichkeit, die French Press Ihrer Arbeitsgruppe zu benutzen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

Philip Gregory für die in vieler Hinsicht unvergleichliche Einarbeitung.

Horst Würfl für den Pho4-Antikörper, der mit der Zeit immer wertvoller wurde.

Andrea, Dorle, Maasoumeh, Hedwig, Carolin, Ulli, Christina, Barba, Daniel, Philipp und Tim für die nette Arbeitsatmosphäre und viele gute Diskussionen.

Allen Mitarbeitern am Lehrstuhl Prof. Becker für die ständige Hilfsbereitschaft, die ich oft in Anspruch genommen habe.